

Elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle von Gap Junctions
bei der Entstehung von synchronisierter, GABA_A-Rezeptor
vermittelter Aktivität in der Großhirnrinde der Maus *in vitro*



Christian Galata

München 2013

Aus dem Lehrstuhl für Physiologische Genomik
am Physiologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Magdalena Götz

Angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. rer. nat. Bernd Sutor

**Elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle von Gap Junctions
bei der Entstehung von synchronisierter, GABA_A-Rezeptor
vermittelter Aktivität in der Großhirnrinde der Maus *in vitro***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Galata

aus Starnberg

München 2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Sutor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer

Priv.-Doz. Dr. med. Frank Padberg

Dekan: Prof. Dr. med Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Meinen Eltern

»These creatures you call mice, you see, they are not quite as they appear. They are merely the protrusion into our dimension of vast hyperintelligent pandimensional beings. The whole business with the cheese and the squeaking is just a front.«

The old man paused, and with a sympathetic frown continued.

»They've been experimenting on you I'm afraid.«

DOUGLAS ADAMS, *The Hitchhiker's Guide to the Galaxy*

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Der Neocortex der Säugetiere | 1 |
| 1.1.1 Pyramidenzellen | 2 |
| 1.1.2 Interneurone | 5 |
| 1.2 Synapsen im Neocortex | 7 |
| 1.2.1 Chemische Synapsen | 8 |
| 1.2.2 Elektrische Synapsen – Gap Junctions | 8 |
| 1.2.2.1 Neuronale Connexine | 10 |
| Connexine während der Entwicklung des Gehirns | 11 |
| Connexine im adulten Gehirn | 12 |
| 1.2.2.2 Gap Junction vermittelte Kopplung im Neocortex | 14 |
| 1.2.2.3 4-Aminopyridin und synchronisierte neocorticale Aktivität | 17 |
| 1.3 Fragestellung der Arbeit | 20 |
| 2 Material und Methoden | 22 |
| 2.1 Versuchstiere | 22 |
| Wildtyp | 22 |
| Cx36-Knockout | 22 |
| Cx45-Knockout | 23 |
| 2.1.1 Genotypisierung | 24 |
| Extraktion der DNA | 24 |
| Durchführung der PCR | 25 |
| 2.2 Perfusionslösungen für die Elektrophysiologie | 27 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3 | Gehirnschnittpräparate des Neocortex | 29 |
| 2.4 | Elektrophysiologische Messungen | 30 |
| | Messplatz | 30 |
| | Elektroden | 30 |
| | Messelektronik und Datenaufnahme | 31 |
| | Pharmaka und Substanzapplikation | 33 |
| 2.4.1 | Extrazelluläre Ableitungen | 33 |
| 2.4.2 | Kombinierte intra- und extrazelluläre Ableitungen | 35 |
| | Patch-Clamp-Technik | 35 |
| | Durchführung der Messungen | 36 |
| 2.5 | Datenauswertung | 38 |
| | Software | 38 |
| | Neuronenklassifizierung | 39 |
| | Erfassung der synchronisierten neocorticalen Aktivität | 40 |
| | Statistische Analyse | 40 |
| 3 | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Elektrophysiologische Charakterisierung der GABA-Wellen | 42 |
| 3.1.1 | Beschreibung der untersuchten Neuronenpopulation | 43 |
| | 3.1.1.1 Die Neuronencharakterisierung am Beispiel einzelner Zellen | 43 |
| | 3.1.1.2 Betrachtung der untersuchten Neuronenpopulation insge- | |
| | samt | 47 |
| 3.1.2 | Der Zeitverlauf der GABA-Wellen | 49 |
| | 3.1.2.1 Die Polarität der GABA-Wellen in intrazellulären Ablei- | |
| | tungen | 49 |
| | 3.1.2.2 Die Polarität der GABA-Wellen in extrazellulären Ablei- | |
| | tungen | 51 |
| | 3.1.2.3 Das Umkehrpotential der GABA-Wellen | 53 |
| | 3.1.2.4 Mehrfach reversible Dauerentladungen neocorticaler Neu- | |
| | rone unter 4-Aminopyridin | 56 |
| 3.1.3 | Analyse der GABA-Wellen in simultanen intra- und extrazellulären | |
| | Ableitungen verschiedener Genotypen | 58 |
| | 3.1.3.1 Entwicklung der Frequenz der GABA-Wellen über 30 | |
| | Minuten | 58 |
| | 3.1.3.2 Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen in | |
| | intrazellulären Messungen | 60 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.1.3.3 | Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen in extrazellulären Messungen | 61 |
| 3.1.3.4 | Vergleich der GABA-Wellen zwischen verschiedenen Zelltypen im Wildtyp | 63 |
| 3.1.3.5 | Cx36KO und Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp: supragranuläre Pyramidenzellen | 65 |
| | Cx36KO <i>vs.</i> Wildtyp | 65 |
| | Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp | 66 |
| 3.1.3.6 | Cx36KO und Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp: infragranuläre Pyramidenzellen | 66 |
| | Cx36KO <i>vs.</i> Wildtyp | 66 |
| | Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp | 67 |
| 3.1.3.7 | Cx36KO und Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp: Interneurone | 67 |
| | Cx36KO <i>vs.</i> Wildtyp | 67 |
| | Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp | 69 |
| 3.2 | Die GABA-Wellen in langdauernden Feldpotentialableitungen | 69 |
| 3.2.1 | Die Entwicklung der GABA-Wellen im Wildtyp | 69 |
| 3.2.2 | Gap Junction Blocker im Wildtyp | 72 |
| 3.2.2.1 | Carbenoxolon | 73 |
| 3.2.2.2 | 1-Heptanol | 73 |
| 3.2.2.3 | Mefloquin | 76 |
| 3.2.2.4 | 1-Octanol | 78 |
| 3.2.3 | Carbenoxolon in Cx36KO- und Cx45KO-Mäusen | 78 |
| 3.2.3.1 | Carbenoxolon: Cx36-Knockout <i>vs.</i> Wildtyp | 80 |
| 3.2.3.2 | Carbenoxolon: Cx45-Knockout <i>vs.</i> Wildtyp | 80 |
| 4 | Diskussion | 84 |
| 4.1 | Methodische Betrachtung | 84 |
| 4.1.1 | Elektrophysiologie und Genotypisierung | 84 |
| 4.1.2 | Auswahl der connexindefizienten Mausstämme | 84 |
| 4.1.3 | Datenbasis | 85 |
| 4.2 | GABA-Wellen im adulten Neocortex der Wildtypmaus | 86 |
| 4.2.1 | Bedeutung der Untersuchung am Neocortex der Maus | 86 |
| 4.2.2 | Generierung der GABA-Wellen | 86 |
| 4.2.3 | Charakteristika der GABA-Wellen | 87 |
| 4.2.3.1 | Entwicklung der GABA-Wellen über die Zeit | 88 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2.3.2 | Auswirkungen von Gap Junction Blockern auf die GABA-Wellen im Wildtyp | 89 |
| | Carbenoxolon | 89 |
| | 1-Heptanol und 1-Octanol | 90 |
| | Mefloquin | 91 |
| 4.3 | Gap Junctions und neocorticale Synchronisation im 4-Aminopyridin-Modell | 92 |
| 4.3.1 | Connexin 36 | 94 |
| 4.3.2 | Connexin 45 | 95 |
| 4.3.3 | Mögliche Beteiligung astrozytärer Netzwerke | 96 |
| 4.4 | Die GABA-Wellen als chloridabhängige Vorgänge | 96 |
| 4.5 | Reversible ektope Dauerentladung neocorticaler Neurone in Gegenwart von 4-Aminopyridin | 97 |
| 4.6 | Die GABA-Wellen: »epileptiforme« Aktivität? | 97 |
| 5 | Zusammenfassung | 100 |
| | Literaturverzeichnis | 102 |
| | Danksagung | 137 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 138 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Schematische Darstellung einer Pyramidenzelle | 3 |
| 1.2 | Molekulare Organisation einer Gap Junction Plaque | 9 |
| 1.3 | Pyridinring und 4-Aminopyridin | 18 |
| 2.1 | Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration | 36 |
| 2.2 | Messung der GABA-Wellen | 41 |
| 3.1 | Charakterisierung einer supragranulären Pyramidenzelle | 44 |
| 3.2 | Charakterisierung einer infragranulären Pyramidenzelle | 45 |
| 3.3 | Parameter zur Charakterisierung eines Interneurons | 46 |
| 3.4 | Repräsentative Zeitverläufe intrazellulärer GABA-Wellen | 50 |
| 3.5 | Zeitverläufe von GABA-Wellen in neocorticalen Feldpotentialableitungen . | 52 |
| 3.6 | Beispiele für GABA-Wellen zur Bestimmung des Umkehrpotentials | 54 |
| 3.7 | Regressionsgerade und 99-Prozent-Konfidenzband für das Umkehrpotential | 55 |
| 3.8 | Mehrfach reversibles ektopes Entladungsverhalten unter 4-AP | 57 |
| 3.9 | GABA-Wellen: Frequenzentwicklung intra- und extrazellulär | 59 |
| 3.10 | GABA-Welle: intrazelluläre Parameter in Wildtyp, Cx36KO, Cx45KO . . | 60 |
| 3.11 | GABA-Welle: extrazelluläre Parameter in Wildtyp, Cx36KO, Cx45KO . . | 62 |
| 3.12 | Vergleich der GABA-Wellen zwischen Zelltypen des Wildtyps | 64 |
| 3.13 | Kontrolle <i>vs.</i> Cx36KO: supragranuläre Pyramidenzellen | 65 |
| 3.14 | Kontrolle <i>vs.</i> Cx36KO: Interneurone | 68 |
| 3.15 | Feldpotentialableitungen: Entwicklung der GABA-Wellen über 170 Minuten | 70 |
| 3.16 | Zeitverläufe der GABA-Wellen an verschiedenen Messzeitpunkten | 71 |
| 3.17 | GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: Carbenoxolon | 74 |
| 3.18 | GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: 1-Heptanol | 75 |
| 3.19 | GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: Mefloquin | 77 |
| 3.20 | GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: 1-Octanol | 79 |
| 3.21 | Cx36KO <i>vs.</i> Wildtyp: Carbenoxolon | 81 |

| | |
|--|----|
| 3.22 Cx45KO <i>vs.</i> Wildtyp: Carbenoxolon | 82 |
|--|----|

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Bekannte Connexine im adulten Gehirn | 12 |
| 2.1 | Lysispuffer zur DNA-Extraktion | 25 |
| 2.2 | Cx36KO, Cx45KO: PCR-Primer | 26 |
| 2.3 | Cx36KO, Cx45KO: PCR-Ansätze | 26 |
| 2.4 | Cx36KO, Cx45KO: PCR-Programme | 27 |
| 2.5 | Cx36KO, Cx45KO: Bandengrößen | 27 |
| 2.6 | Zusammensetzung der Stammlösung | 28 |
| 2.7 | Modifikation der Stammlösung | 28 |
| 2.8 | Zusammensetzung der »Intrazellulärlösung« | 32 |
| 2.9 | Pharmaka: Konzentration und Wirkmechanismus | 33 |
| 2.10 | Pharmaka: Summenformeln und IUPAC-Namen | 34 |
| 2.11 | Feldpotential-Messungen: Messprotokoll | 35 |
| 2.12 | Extra- und intrazelluläre Messungen: Messprotokoll | 38 |
| 3.1 | Charakterisierung der Neuronenpopulation | 48 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| τ | Membranzeitkonstante (somatisch) |
| \emptyset | Durchschnitt |
| Abb. | Abbildung |
| Abschn. | Abschnitt |
| aCSF | Artificial cerebrospinal fluid |
| ANOVA | Analysis of variance |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Base pair(s) |
| CCD | Charge-coupled device |
| CFP | Cyan fluorescent protein |
| CR | Calretinin |
| Cx | Connexin |
| d. h. | Das heißt |
| DIC | Differential interference contrast |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EC ₅₀ | Mittlere effektive Konzentration |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EEG | Elektroenzephalogramm |
| EGFP | Enhanced green fluorescent protein |
| EPSP | Excitatory post-synaptic potential |

| | |
|----------|------------------------------------|
| ez | Extrazellulär |
| FP | Feldpotential |
| FS | Fast spiking |
| GABA | γ -aminobutyric acid |
| GJ. | Gap Junction |
| IB | Intrinsic bursting |
| INN | International nonproprietary name |
| IPSP | Inhibitory post-synaptic potential |
| IR | Irregular spiking |
| IV-Kurve | Strom-Spannungs-Kurve |
| iz | Intrazellulär |
| KI | Konfidenzintervall |
| KO | Knockout |
| Konz. | Konzentration |
| LCD | Liquid crystal display |
| LTS | Low threshold spiking |
| MP | Membranpotential |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| n. s. | Nicht signifikant |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PV | Parvalbumin |
| R_N | Eingangswiderstand |
| RMP | Ruhemembranpotential |
| rpm | Revolutions per minute |
| RS | Regular spiking |
| s. | Siehe |

| | |
|------------|----------------------------|
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| SEC | Singel electrode clamp |
| SOM | Somatostatin |
| Tab. | Tabelle |
| u. a. | Unter anderem |
| USAN | United States adopted name |
| vs. | Lat. <i>Versus</i> |
| z. B. | Zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Der Neocortex der Säugetiere

Das Gehirn der Säugetiere ist Hauptintegrationsort komplexer Information und zentrale Steuerstelle des Organismus. Der Großhirnrinde kommt hierbei besondere Bedeutung zu: als phylogenetisch jüngster Teil enthält sie die am weitesten entwickelten Strukturen des zentralen Nervensystems und erlangt hierdurch die größte Bedeutung für dessen höhere Funktionen. Beim Menschen bildet der Neocortex mit rund 90 Prozent den Großteil der Oberfläche des Gehirns. Nach vor allem funktionellen, aber auch histologischen und neurochemischen Gesichtspunkten wird er in Areale gegliedert, die untereinander verschaltet sind und mit vor- und nachgelagerten subcorticalen Gebieten in Verbindung stehen. So existieren spezialisierte Zentren für die Steuerung der Motorik oder die Verarbeitung somatosensorischer Information. Durch ihre Interaktion entstehen komplexe neuronale Netzwerke, die in ihrer Funktionsweise erst zum Teil verstanden sind, in ihrem Zusammenwirken aber die Leistungsfähigkeit hochentwickelter Organismen ermöglichen.

Zur Verwirklichung dieses Netzwerkes benötigt der Neocortex spezialisierte Zellen. Hier können grundsätzlich zwei Typen unterschieden werden: Neurone und Gliazellen. Beide sind in unterschiedlicher Dichte und Ausprägung über die sechs Schichten, in die sich der Isocortex histologisch gliedert, verteilt. Der adulte menschliche Neocortex verfügt über 50 bis 65 Milliarden Zellen, davon etwa 20 bis 30 Milliarden Neurone (PELVIG et al., 2008). Die Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) wurden in der Vergangenheit als Hilfszellen der Neurone aufgefasst. Heute ist bekannt, dass Neurone und Gliazellen zwei komplementäre Systeme bilden, von denen jedes für die Funktion des zentralen Nervensystems von entscheidender Bedeutung ist. Gliazellen bilden ein Stützgerüst, tragen zur elektrischen Isolation bei und sind wesentlich an Stoff- und Flüssigkeitstransport sowie der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns beteiligt. In jüngerer Zeit mehren

sich die Beweise, dass sie auch an der Modulation neuronaler Kommunikation beteiligt sind (HAYDON und CARMIGNOTO, 2006; FIELDS, 2008; TASKER et al., 2012). Auch ist belegt, dass Neurone und Gliazellen aus gemeinsamen multipotenten Stammzellen hervorgehen (MAYER-PROSCHEL et al., 1997; GÖTZ et al., 1998; MALATESTA et al., 2000; HE et al., 2001). Das eigentliche Korrelat der Informationsverarbeitung im Neocortex stellen jedoch die Neurone dar. Ihr maßgebliches Merkmal ist die elektrische Erregbarkeit, die Voraussetzung für Integration und Signalübertragung im zentralen Nervensystem ist.

Bis heute ist eine Vielzahl verschiedener Typen von Neuronen im Neocortex beschrieben worden. Die Leistungsfähigkeit der Großhirnrinde beruht aber nicht ausschließlich auf der Vielfalt dieser Zellen, sondern vor allem auf der Komplexität ihrer Verschaltung: jedes Neuron kann mit einer Vielzahl anderer in Verbindung stehen und in multiple Schaltkreise variabler Größe eingebunden sein (DEFELIPE et al., 2003). Neurone sind in der Großhirnrinde in vertikalen Säulen und Mikrosäulen organisiert, die dort funktionellen Einheiten bilden (MOUNTCASTLE, 1997; JONES, 2000; BUXHOEVEDEN und CASANOVA, 2002). Schon rein anatomisch weist dieses Netzwerk eine erhebliche Komplexität auf: so findet sich in der Maus eine geschätzte Gesamtaxonlänge von ca. 3000 Metern pro mm^3 , die Dichte der Neurone beträgt ca. 9×10^4 pro mm^3 , die der Synapsen ca. 7×10^8 pro mm^3 (SCHÜZ und PALM, 1989). Vom funktionellen Standpunkt aus können im Neocortex im Wesentlichen zwei Arten von Nervenzellen unterschieden werden: exzitatorische, glutamaterge Pyramidenzellen und inhibitorische, GABAerge Interneurone.

1.1.1 Pyramidenzellen

Pyramidenzellen sind die Prinzipalzellen des Neocortex. Mit 70 bis 85 Prozent der Neurone repräsentieren sie dort den häufigsten Nervenzelltyp, der im sechsschichtigen Isocortex in den Schichten II bis VI mit Ausnahme der Schicht IV zu finden ist. Sie kommen ausschließlich im Neo- und Paläocortex vor und zeichnen sich durch ihre besondere Morphologie aus. Sie verfügen klassischerweise über ein pyramidenförmiges Zellsoma, an dessen Spitze (apikal) ein kräftiger Dendrit entspringt, der sich in Richtung *Pia mater* fortsetzt und in der Schicht I aufzweigt. An der Zellbasis verzweigt sich ein großes Dendritensystem nach lateral und nach unten. Dort entspringt auch das lange Axon, das bis in subcorticale oder andere corticale Gebiete führt (DEFELIPE und FARIÑAS, 1992). Von dieser traditionellen Vorstellung der Pyramidenzelle existieren zahlreiche Varianten, die sich hinsichtlich Art

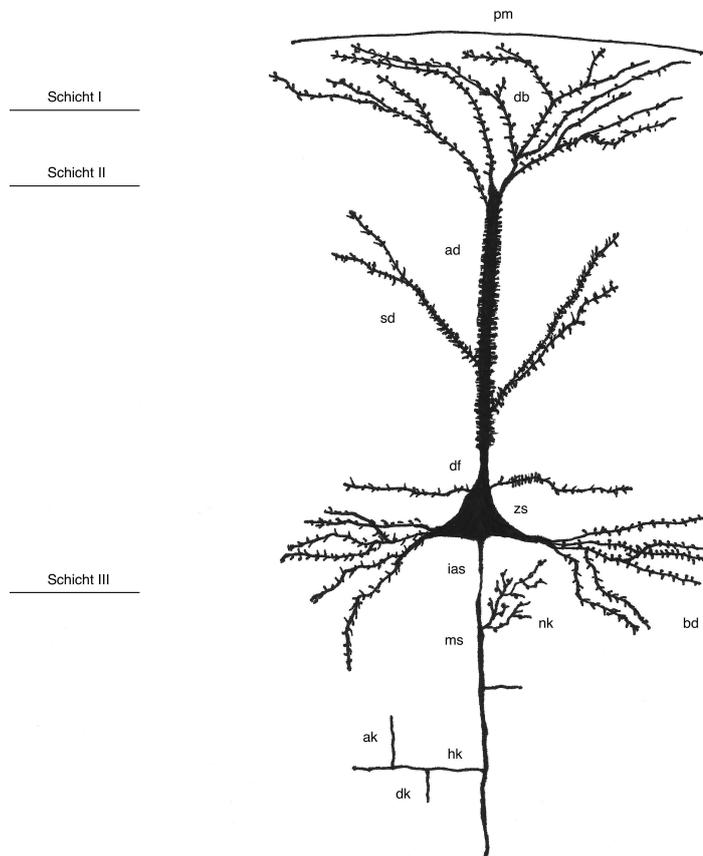


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer klassischen Pyramidenzelle der Schicht III. »pm«: Pia mater, »db«: Dendritenbaum, »ad«: apikaler Dendrit, »sd«: schräger Dendrit, »df«: dornfortsatzfrei, »zs«: Zellsoma, »ias«: initiales Axonsegment, »db«: basale Dendriten, »nk«: Nebenkollaterale, »ms«: Myelinscheide, »hk«: Hauptkollaterale, »ak«: ascendierende Kollaterale, »dk«: deszendierende Kollaterale. Gezeichnet nach DEFELIPE und FARIÑAS (1992).

und Anzahl ihrer Dendritenbäume, Aufzweigungen, Form der Zellkörper oder axonalen Charakteristika unterscheiden. Obwohl Pyramidenzellen zunächst als homogenere Gruppe erschienen als die Interneurone, ist heute erwiesen, dass es sich um eine durchaus heterogene Zellpopulation handelt. Es werden daher zunehmend Bemühungen unternommen, auch Pyramidenzellen nach morphologischen, elektrophysiologischen und molekulargenetischen Charakteristika zu klassifizieren (KAWAGUCHI, 1993a; MOLNÁR und CHEUNG, 2006; SLOMIANKA et al., 2011). Auch scheinen funktionell verschiedene Anforderungen bestimmter Hirnareale zu unterschiedlicher Ausprägung von Pyramidenzellen in den einzelnen neocorticalen Regionen zu führen. So verfügen Pyramidenzellen im präfrontalen Cortex über 23-mal mehr Dornfortsätze als Pyramidenzellen im primär visuellen Cortex (ELSTON, 2003). Auch zwischen den Spezies unterscheiden sich Pyramidenzellen zum Teil erheblich (ELSTON et al., 2001, 2011).

Pyramidenzellen sind die Projektionsneurone des Neocortex. Dies bedeutet, dass nur über ihre Axone Information den Neocortex verlassen kann. Interaktion findet sowohl zwischen den Pyramidenzellen selbst als auch mit anderen Neuronen statt (BANNISTER, 2005). Eingänge anderer Neurone setzen in verschiedenen Bereichen der Pyramidenzelle an: es sind Synapsen am initialen Axonsegment, am Dendritenschaft, an den Dornfortsätzen der Dendriten und axosomatische Synapsen bekannt (DEFELIPE und FARIÑAS, 1992). Dabei sind neben Glutamat und GABA eine Vielzahl von Neurotransmittern an unterschiedlichen Synapsentypen beteiligt, beispielsweise sind auch nikotinische Acetylcholinrezeptoren an Pyramidenzellen der Schicht V nachgewiesen worden (ZOLLES et al., 2009). Exzitatorische Eingänge erreichen die Pyramidenzelle über die Dornfortsätze ihrer Dendriten, deren Entwicklung einer komplexen Regulation unterliegt (MCFARLANE, 2001). Die genaue Bedeutung dieser Dornfortsätze selbst ist noch unklar (SPRUSTON, 2008; YUSTE, 2011). Der Informationsfluss über synaptische Eingänge an den Dendriten ist dabei nicht statisch, sondern kann, beispielsweise über spannungsabhängige Ionenkanäle, dynamisch moduliert werden (REMY et al., 2010).

Pyramidenzellen können andere Neurone über asymmetrische glutamaterge Synapsen aktivieren und lösen so Effekte lokal oder in der Peripherie aus (DEFELIPE et al., 2003). Sie sind über lokale, stereotyp organisierte Mikroschaltkreise untereinander oder mit Interneuronen verbunden (THOMSON und DEUCHARS, 1997; SILBERBERG et al., 2002). Der Aufbau und die Regulation dieser Mikroschaltkreise im Einzelnen sind komplex (MITTMANN et al., 2004; BERGER et al., 2009; SILBERBERG und MARKRAM, 2007; SILBERBERG, 2008; BUCHANAN und SJÖSTRÖM, 2009). Zwischen Pyramidenzellnetzwerken einzelner Schichten

der Großhirnrinde existieren hochspezifische, interlaminaire Verbindungen (THOMSON und MORRIS, 2003; CALLAWAY, 2003; WATTS und THOMSON, 2005). Eine Pyramidenzelle kann mit mehr als 1000 weiteren exzitatorischen Zellen und mit bis zu 75 Interneuronen in Verbindung stehen (PETERS, 2003). Die Charakterisierung einzelner Verschaltungen hat bisher jedoch nur zu einem unzureichenden Verständnis des Gesamtsystems geführt. Komplexere Signalverarbeitung und Netzwerkphänomene, aber auch höhere Konzepte wie »Bewusstsein« sind allenfalls auf psychologischer Ebene untersucht, ihre Physiologie ist bis heute weitgehend unverstanden (DOUGLAS und MARTIN, 2007). Ein elementarer Gesichtspunkt neocorticaler Steuerung allerdings ist gut erforscht: die Hauptregulation der Pyramidenzellen erfolgt durch inhibitorische Interneurone (THOMSON et al., 1996).

1.1.2 Interneurone

Hemmende Interneurone kommen in allen Schichten (I bis VI) der Großhirnrinde vor und wirken über GABAerge, symmetrische Synapsen inhibitorisch auf Pyramidenzellen oder andere Interneurone. Sie sind inhomogen zwischen den Schichten des Neocortex verteilt. Klassischerweise wird von einer Häufung in der Schicht IV ausgegangen (DEFELIPE und FARIÑAS, 1992), neuere Untersuchungen weisen aber auch auf eine hohe Dichte in den Schichten II und Va hin (MEYER et al., 2011). Im Vergleich zu Pyramidenzellen sind Interneurone kleine Zellen, die in lokale Schaltkreise eingebunden sind und nicht in entfernte corticale oder subcorticalen Regionen projizieren (MOORE et al., 2010), was auch in einer wesentlich kürzeren Axonlänge zum Ausdruck kommt (DEFELIPE und FARIÑAS, 1992). Sie entstehen klonal in der ganglionären Eminenz im sich entwickelnden zentralen Telenzephalon und migrieren tangential in den Cortex (DRUGA, 2009; BROWN et al., 2011). Der genaue Ursprungsort und Zeitpunkt ihrer Entstehung entscheidet über ihren späteren Subtyp in der Großhirnrinde (BUTT et al., 2005). Dabei wandern GABAerge Interneurone in der Entwicklungsphase schneller als andere Neuronengruppen (DE LIMA et al., 2008). GABAerge Synapsen haben entscheidenden Anteil an der Ausreifung des zentralen Nervensystems und werden vermutlich noch vor glutamatergen Synapsen gebildet (BEN-ARI et al., 2004).

Obwohl Interneurone nur etwa 15 bis 20 Prozent der Nervenzellen des Neocortex ausmachen (TAMAMAKI et al., 2003), sind sie morphologisch und physiologisch außerordentlich heterogen. Dies hat dazu geführt, dass diesbezüglich bis heute keine einheitlich akzeptierte Klassifikation existiert (DEFELIPE, 2002). Interneurone unterscheiden sich sowohl von

Pyramidenzellen als auch untereinander zum Teil erheblich, was zu Einteilungen nach elektrophysiologischen, morphologischen und neurochemischen Kriterien geführt hat (CONNORS und GUTNICK, 1990; KAWAGUCHI, 1993a; HALABISKY et al., 2006; KAWAGUCHI, 1993b; KAWAGUCHI und KUBOTA, 1997; MA et al., 2006; RUDY et al., 2011). Daneben bestehen zwischen Interneuronen aber auch Gemeinsamkeiten, die diese Zellpopulation wesentlich von derjenigen der Pyramidenzellen abheben. Interneurone verfügen – mit Ausnahme spezieller Subtypen wie beispielsweise der Martinotti-Zellen – über keine oder nur sehr wenige Dornfortsätze an ihren Dendriten. Ferner haben Interneurone über ihre Axone keine Verbindung zu subcorticalen Gebieten oder entfernten Hirnregionen, sondern bleiben in ihrer Verschaltung auf den Neocortex beschränkt (MARKRAM et al., 2004). Auch molekularbiologisch weisen Interneurone Gemeinsamkeiten auf: nahezu alle neocorticalen Zellen, die die calciumbindenden Proteine Calbindin-D28K (CB), Parvalbumin (PV) und Calretinin (CR) exprimieren, werden den Interneuronen zugeordnet (DEFELIPE, 1997). Der inhibitorische Neurotransmitter GABA ist mit bestimmten Neuropeptiden (DEFELIPE et al., 2003) und der neuronalen Stickoxyd-Synthase (nNOS) kolokalisiert (DRUGA, 2009). Außerdem wird versucht, die molekulare Diversität der Interneurone anhand von Genexpressionsmustern (BLATOW et al., 2005) und der ihrer Entwicklung zu Grunde liegenden Transkriptionsfaktoren zu erfassen (ANASTASIADES und BUTT, 2011).

Morphologisch werden GABAerge Interneurone nach ihrer axonalen und dendritischen Architektur in sieben Untergruppen eingeteilt. Sie werden als Korbzellen, Chandelierzellen, Martinottizellen, bipolare Zellen, neurogliaforme Zellen, »bitufted cells« und »double-bouquet cells« bezeichnet (MARKRAM et al., 2004). Die Namen der beiden letztgenannten beziehen sich auf die besondere Form der Dendritenbäume (tuft: Büschel). Korbzellen stellen mit etwa 50 Prozent die größte Gruppe, die sich wiederum in drei Subgruppen gliedert (WANG et al., 2002). Die synaptischen Verbindungen zu Pyramidenzellen variieren mit dem Zelltyp: Zielkompartiment der Korbzellen sind Soma und proximale Dendriten, Zielkompartiment der Chandelierzellen ist das Axon der Pyramidenzellen. Martinottizellen, neurogliaforme Zellen und »double-bouquet cells« innervieren distale Dendriten von Pyramidenzellen und regulieren so die vertikale Integration des synaptischen Eingangs entlang des Dendritenbaumes (DRUGA, 2009).

Hauptaufgabe der Interneurone ist die Inhibition von Pyramidenzellen. Nur spezielle Subpopulationen weisen exzitatorische Synapsen auf (»spiny stellate cells«, SCC). Die Inhibition erfolgt über GABAerge Synapsen, die eine hohe Diversität aufweisen (GUPTA,

2000). Diese synaptische Hemmung ist Regulativ und Modulation neocorticaler Erregung. So editieren Interneurone die Aktionspotentialmuster der Prinzipalzellen und sind auch für deren synchronisierte Aktivität von Bedeutung (MANN et al., 2005). Verbindungen zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen werden einerseits als dichtes und unspezifisches Netz kanonischer Mikroschaltkreise (PACKER und YUSTE, 2011; FINO und YUSTE, 2011), andererseits als hochspezifisch in Bezug auf Zelltyp und Eigenschaften der synaptischen Potentiale beschrieben (BEIERLEIN et al., 2003; WOZNY und WILLIAMS, 2011). Dabei sind Interneurone möglicherweise auch direkt an der Signalverarbeitung beteiligt und können Bestandteil von Netzwerken der Form »Pyramidenzelle - Interneuron - Pyramidenzelle« sein (HOLMGREN et al., 2003). Bestimmten Untergruppen werden spezifische Funktionen zugeschrieben. So sollen Martinottizellen eine Rolle bei der Regulation der Geschwindigkeit corticaler Signalverarbeitung spielen (KRISHNAMURTHY et al., 2012). Derartig modulierende Aufgaben übernehmen Interneurone überwiegend in lokal begrenzten Netzwerken. Für einige Interneurone wurden allerdings auch lange, GABAerge, cortico-corticale Verbindungen beschrieben (TOMIOKA et al., 2005). Entscheidend für ihre Funktion ist aber weniger die exakte Anatomie ihrer Verschaltung, als vielmehr die Dynamik der Erregung, die über diese Schaltkreise läuft (HAIDER und MCCORMICK, 2009). Reguliert werden Interneurone nicht nur durch extrinsische, sondern auch durch intrinsische Faktoren (BACCI et al., 2005). Beides ist notwendig, da neocorticale Exzitation und Inhibition in einem komplexen Gleichgewicht stehen: ein zu hohes Maß an Inhibition beeinträchtigt die Signalübertragung, ein zu geringes Maß an Inhibition führt zu überschießender, »epileptiformer« Aktivität (PFEIFFER et al., 1996; SIEGLE und MOORE, 2011).

1.2 Synapsen im Neocortex

Im zentralen Nervensystem von Säugetieren finden Signalübertragung und -modulation an Kontaktstellen zwischen Nervenzellen statt, die als Synapsen bezeichnet werden. Hierbei sind zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen zu unterscheiden: chemische und elektrische Synapsen.

1.2.1 Chemische Synapsen

Der Großteil der Informationsübertragung zwischen Neuronen erfolgt über chemische Synapsen. Hierbei besteht kein direkter Zellkontakt; vielmehr werden Aktionspotentiale ausgelöst, indem chemische Signale über den synaptischen Spalt zwischen Zellmembranen übertragen werden. Als Signalüberträger («Neurotransmitter») sind eine Reihe von Substanzen, wie beispielsweise der klassische Neurotransmitter Acetylcholin (ACh), identifiziert worden, der im Organismus von Säugetieren alleine diesem Zweck dient. Der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Gehirns ist Glutamat, der vorherrschende inhibitorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems γ -Aminobuttersäure (GABA). Darüber hinaus können viele weitere chemische Verbindungen als Überträgersubstanzen fungieren (SCHULDINER et al., 1995). Kommunikation über chemische Synapsen findet nach folgendem Prinzip statt: Neurotransmitter werden in präsynaptischen Nervenendigungen synthetisiert und dort in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Ihre Freisetzung erfolgt Aktionspotential- und Calcium-abhängig. An der postsynaptischen Membran binden die Neurotransmitter an spezifische Rezeptoren, über die sie ihre exzitatorische oder inhibitorische Wirkung entfalten. Für jede Substanz bestehen dabei eigene Inaktivierungsmechanismen (SCHULDINER et al., 1995; DE CAMILLI und TAKEI, 1996). Insgesamt findet über chemische Synapsen eine indirekte Informationsübertragung statt, der aufgrund ihres Mechanismus eine gewisse Latenz (ca. 0.8 bis 1.0 ms) inhärent ist (FUKUDA, 2007).

1.2.2 Elektrische Synapsen – Gap Junctions

Gap Junctions sind spezialisierte Kontakte zwischen eukaryoten Zellen. Der Begriff »Gap Junction« wird in der Regel synonym mit »elektrischer Synapse« verwendet. Als kanalbildende Strukturen zwischen angrenzenden Plasmamembranen erlauben sie sowohl eine direkte elektrische als auch metabolische Kommunikation. Der Spalt (gap) zwischen beiden Membranen beträgt ca. 2 bis 3 nm (CONNORS und LONG, 2004). Molekültransport durch passive Diffusion ist bis zu einem Molekulargewicht von 1000 Dalton möglich, was anorganische Ionen (Na^+ , K^+ , Ca_2^+ , etc.) genauso einschließt wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) (BENNETT und ZUKIN, 2004). Für hydrophile Moleküle von geringem Durchmesser ($< 1.5 \text{ nm}$) sind sie relativ unselektiv permeabel (KUMAR und GILULA, 1996). Gap Junctions sind aus Protein-Untereinheiten aufgebaut, die in Vertebraten als Connexine,

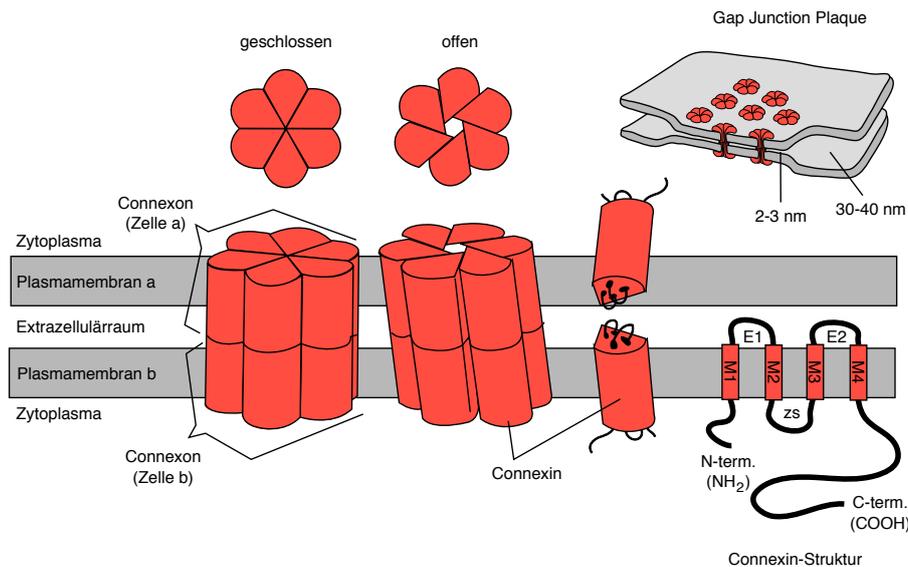


Abbildung 1.2 Molekulare Organisation und schematische Topologie einer Gap Junction Plaque. »M1-M4«: Transmembrandomänen, »E1-E2«: extrazelluläre Schleifen, »zs«: zyttoplasmatische Schleife, »N/C«: terminale Domänen. Grafik modifiziert nach M. RUIZ sowie SÖHL et al. (2005).

in Invertebraten als Innexine bezeichnet werden (EVANS und MARTIN, 2002). Jeder Kanal besteht aus zwei Halbkanälen (hemichannels), die gegenüberliegend in je eine Plasmamembran integriert und aus sechs Connexin-Untereinheiten aufgebaut sind. Die Connexine selbst bestehen aus vier membranübergreifenden Domänen, zwei extrazellulären Schleifen und drei zyttoplasmatischen Komponenten, nämlich einer Schleife sowie einer amino- und einer carboxyterminalen Region. Es sind homotypische von heterotypischen Gap Junctions zu unterscheiden: homotypische beinhalten zwei identische, heterotypische zwei verschiedene Arten von Halbkanälen. Analog hierzu bestehen homomere Halbkanäle aus einer, heteromere aus mehreren verschiedenen Connexin-Isoformen (SÖHL et al., 2005). Gap Junctions treten nicht isoliert, sondern in »Plaques« auf, die tausende Einzelkanäle enthalten können (KUMAR und GILULA, 1996).

Obwohl die Informationsübertragung über Gap Junctions einfacher ist als über chemische Synapsen (SÖHL et al., 2005), ist ihre Regulation komplex. So kann ihr Öffnungszustand spannungsabhängig reguliert werden (BENNETT, 1997); es existieren symmetrische Gap Junctions mit gleichem Kopplungskoeffizienten und asymmetrische mit ungleichem Kopplungskoeffizienten (RELA und SZCZUPAK, 2004). Die Kopplung über elektrische

Synapsen ist, je nach Zelltyp, unterschiedlich stark vom pH-Wert abhängig, der in Astrozyten einen größeren Einfluss besitzt als in Neuronen (CONNORS et al., 1984). Auch über Glutamatrezeptoren kann eine Regulation erfolgen (LANDISMAN und CONNORS, 2005). Im Zentralnervensystem von Säugetieren findet man zudem »gemischte Synapsen«, d. h. Kolokalisationen von chemischen Synapsen und Gap Junctions, die beide Formen der Signalübertragung über einen einzigen Zellkontakt ermöglichen und in denen die Interaktion der Bestandteile den Grad der elektrischen Kopplung bestimmen kann (SMITH und PEREDA, 2003). Man darf sich Gap Junctions dementsprechend nicht als statische Gebilde denken, vielmehr handelt es sich um Strukturen, die durch posttranslationale Modifikationen (z. B. Phosphorylierung) (EVANS und MARTIN, 2002) oder Umbau ihrer Connexin-Untereinheiten dynamisch reguliert werden können (FLORES et al., 2012). Wie chemische Synapsen verfügen also auch Gap Junctions über Eigenschaften synaptischer Plastizität (PEREDA et al., 2013).

1.2.2.1 Neuronale Connexine

Die Existenz von Gap Junctions im Neocortex von Säugetieren ist bereits von SLOPER (1972) elektronenmikroskopisch dokumentiert worden. Ihre molekulare Struktur und ihre regionalen Expressionsmuster wurden allerdings erst in jüngerer Zeit klarer. Im Genom der Maus sind bisher 20 Gene identifiziert worden, die für Connexine kodieren. Ihre Nomenklatur bezeichnet einzelne Isoformen durch die Buchstaben »Cx«, gefolgt von ihrem geschätzten Molekulargewicht in Kilodalton (kD) (SÖHL et al., 2005). Neben den Connexin-Genen sind in Vertebraten drei weitere Gene (PANX1, PANX2, PANX3) bekannt, deren Produkte als Pannexine bezeichnet werden. Ihre Sequenz weist eine signifikante Homologie zu den Innexinen der Invertebraten auf. Sie sind ebenfalls in der Lage, Kanäle in Zellmembranen zu bilden und werden im Gehirn exprimiert (BARANOVA et al., 2004; RAY et al., 2005); ob sie hier allerdings an Gap Junctions im Sinne interzellulärer Verbindungen beteiligt sind, ist auch in der jüngsten Literatur umstritten (ABASCAL und ZARDOYA, 2013; SOSINSKY et al., 2011; MACVICAR und THOMPSON, 2010; PANCHIN, 2005; BRUZZONE et al., 2003). Im Gehirn der Säugetiere übernehmen Gap Junctions in der Entwicklungsphase und im adulten Organismus wichtige Aufgaben, unterscheiden sich dabei aber in ihrem Connexin-Aufbau und ihrer Funktion erheblich nach Alter, Hirnregion und Zelltyp.

Connexine während der Entwicklung des Gehirns Während der Entwicklung und Differenzierung exprimieren die meisten Zellen des zentralen Nervensystems Gap Junctions (SÖHL et al., 2005). Nahezu alle Typen von Neuronen und Gliazellen sind in dieser Phase untereinander und zelltypübergreifend durch Gap Junctions gekoppelt (BITTMAN et al., 1997; KANDLER, 1997; KANDLER und KATZ, 1998; PEINADO, 2001; BITTMAN et al., 2002). Dies betrifft Neuroblasten der ventrikulären Zone, migrierende Zellen und radiäre Glia, Astrozyten, Oligodendrozyten sowie Pyramidenzellen und inhibitorische Interneurone, die in elektrisch gekoppelten Verbänden gruppiert sind. Die extensive Kopplung von Pyramidenzellen beschränkt sich hierbei in Nagetieren auf die ersten beiden postnatalen Wochen (SUTOR und HAGERTY, 2005). Sie kann durch verschiedene Mechanismen (Aktivierung der Proteinkinase A, endogenes Dopamin, Azidifizierung) beeinflusst werden (RÖRIG et al., 1995, 1996). Insgesamt ist für eine Vielzahl von Connexinen eine Expression während der Entwicklung des zentralen Nervensystems *in vivo*, *in vitro* oder in Zellkultur gezeigt worden. Die größte Bedeutung scheint hierbei den Connexinen Cx26, Cx32, Cx36, Cx43 und Cx45 zuzukommen (BITTMAN et al., 2002; MONTORO und YUSTE, 2004). Für Cx40 existieren Hinweise auf eine geringfügige Expression; seine genaue Bedeutung bleibt unklar (CINA et al., 2007). Die Expressionsmuster werden in ihrer zeitlichen Abfolge fein reguliert (VANDECASTEELE et al., 2006). So steigt beispielsweise die Expression von Cx36 bis P14¹ kontinuierlich an und fällt bis P28 rapide ab (SONG et al., 2012).

Die Funktion von Gap Junctions während dieser Periode ist nicht vollständig geklärt. Sie sind offenbar an der Kontrolle der Neurogenese und der Formierung von Mikroschaltkreisen beteiligt (MONTORO und YUSTE, 2004). Besonders für die Zellmigration ist eine entscheidende Funktion belegt (BRUZZONE und DERMIETZEL, 2006). So wird die Wanderung junger Neurone an ihren endgültigen Bestimmungsort im Cortex durch Cx26 und Cx43 reguliert (FUSHIKI et al., 2003; LIU et al., 2012). Wird deren Expression in der Entwicklungsphase heruntergefahren, führt dies zu einer Beeinträchtigung der Zellmigration (ELIAS et al., 2007). Eine Deletion der C-terminalen Domäne von Cx43 verändert die Wanderung von Neuronen in den Neocortex (CINA et al., 2009). Die Bedeutung von Cx26 wird auch dadurch deutlich, dass seine Deletion in bestimmten Mutanten bereits während der Embryonalphase letal ist. Im Widerspruch dazu steht eine Arbeit, die in einer Reporterallelanalyse eine Expression von Cx26 lediglich in den Meningen, nicht aber in Neuronen oder Gliazellen fand, und zwar weder im adulten, noch im embryonalen Organismus (FILIPPOV et al., 2003). Auch für die Formierung neuronaler Schaltkreise sind Gap Junctions essentiell (ROERIG und FELLER, 2000; YU et al., 2012).

¹Tage *P* postnatal

| Connexin | (Haupt-)Zelltyp | (Haupt-)Expressionsort |
|----------|--|---|
| Cx26 | Astrozyten | ubiquitär |
| Cx29 | Oligodendrozyten | ubiquitär |
| Cx30 | Astrozyten | ubiquitär |
| Cx30.2 | Inhibitorische Interneurone | Hippocampus, Neocortex |
| Cx30.3 | Olfaktorische Progenitorzellen | Vomeronasalorgan, Cochlea |
| Cx31.1 | Dopaminerge Neurone | Substantia nigra (Pars compacta) |
| Cx32 | Oligodendrozyten | ubiquitär |
| Cx36 | Inhibitorische Interneurone | ubiquitär |
| Cx43 | Astrozyten | ubiquitär |
| Cx45 | Bestimmte Interneurone, Pyramidenzellen | Retina, Thalamus, Hippocampus, Neocortex |
| Cx47 | Oligodendrozyten | ubiquitär |
| Cx57 | Horizontalzellen | Retina |

Tabelle 1.1 Bekannte Connexine im adulten Gehirn

Sie stehen hierbei mit chemischen Synapsen in Wechselwirkung: diese regulieren einerseits die Entstehung elektrischer Synapsen (PARK et al., 2011), andererseits sind auch Gap Junctions für die Bildung chemischer Synapsen notwendig (TODD et al., 2010). Das Expressionsmuster von Cx36 hat Einfluss auf die Differenzierung von Astrozyten und Neuronen (HARTFIELD et al., 2011). Neueste Erkenntnis zeigen außerdem, dass Gap Junctions an NMDA-abhängigen Mechanismen beteiligt sind, die den Tod oder das Überleben einzelner Neurone in dieser Phase steuern (DE RIVERO VACCARI et al., 2007; BELOUSOV, 2011). Sie scheinen auch am sekundären Tod von Neuronen nach traumatischen Läsionen beteiligt zu sein (WANG et al., 2010; BELOUSOV et al., 2012; WANG et al., 2012).

Connexine im adulten Gehirn Als Nachweisverfahren für Connexine sind eine Reihe von Methoden etabliert, darunter immunhistochemische Verfahren, *in-situ*-Hybridisierung, Einzelzell-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder die gezielte Deletion der entsprechenden Gene. Angaben über das Vorkommen einzelner Connexine können sich also je nach Publikation auf die Expression von mRNA, das Protein selbst oder ein Reportergen beziehen (HORMUZDI et al., 2004). Für folgende Connexine ist bis heute eine Expression im adulten Gehirn von Nagetieren gezeigt worden: Cx26, Cx29,

Cx30, Cx30.2, Cx30.3, Cx31.1, Cx32, Cx36, Cx43, Cx45, Cx47 und Cx57. Außerdem sind möglicherweise die Pannexine Panx1 und Panx2 an der Bildung von Gap Junctions zwischen Pyramidenzellen, Interneuronen und Astrozyten beteiligt (BRUZZONE et al., 2003; SÖHL et al., 2005; THOMPSON und MACVICAR, 2008). Als adulte neuronale Connexine sind Cx30.2, Cx36, Cx45 und Cx57 bekannt (SÖHL et al., 2005; RACKAUSKAS et al., 2010; DERE und ZLOMUZICA, 2012). Anfängliche immunohistochemische Hinweise, dass auch Cx26, Cx32 und Cx43 in Neuronen exprimiert werden, haben sich in Reporteranalysen nicht bestätigt (FILIPPOV et al., 2003; THEIS et al., 2003; SÖHL et al., 2004, 2005). Allerdings führt die Defizienz von Cx32 im Neocortex zu Myelinisierungsdefekten und Hyperexzitabilität (SUTOR et al., 2000).

Das bei weitem bedeutendste neuronale Connexin ist Cx36. Es wird im Gehirn ubiquitär exprimiert (CONDORELLI et al., 1998; TEUBNER et al., 2000; RASH et al., 2000; BELLUARDO et al., 2000; MEIER et al., 2002; WILLECKE et al., 2002; SÖHL et al., 2004). Insbesondere ist es in PV- und SOM-Interneuronen nachweisbar. Cx36-Knockout-Mäuse verfügen über nahezu keine elektrischen Synapsen zwischen Interneuronen (DEANS et al., 2001). Die Funktionseigenschaften und die Regulation von Cx36 werden seit längerem untersucht (SRINIVAS et al., 1999). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen Cx36 und bestimmten Effektor- und Strukturproteinen (AF6 und MUPP1) besteht (LI et al., 2012) und eine Phosphorylierung durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKII) zur funktionellen Plastizität der Kanäle beiträgt (ALEV et al., 2008; DEL CORSSO et al., 2012).

Welche Funktion Cx45 in adulten Gehirn genau einnimmt, ist unklar. Fest steht, dass es sowohl während der Entwicklungsphase als auch im adulten Gehirn in Neuronen exprimiert wird (CONDORELLI et al., 2003; SÖHL et al., 2004). Der Schwerpunkt liegt allerdings in der Phase der Entwicklung (MAXEINER et al., 2003). Nach deren Abschluss scheint Cx45 hauptsächlich im Thalamus, in NeuN²-positiven Zellen der CA3-Region des Hippocampus, im perirhinalen Cortex, im olivo-cerebellären System (Stern- und Korbzellen), sowie in Interneuronen im Hinterhorn des Rückenmarks und in der Retina exprimiert zu werden, aber auch vereinzelt in Pyramidenzellen des Neocortex (KRÜGER et al., 2000; MAXEINER et al., 2003; BENNETT und ZUKIN, 2004; VAN DER GIESSEN et al., 2006; THOMPSON und MACVICAR, 2008; ZLOMUZICA et al., 2010; CHAPMAN et al., 2012).

²Ein nukleäres Antigen, das als neuronaler Biomarker eingesetzt wird.

Cx30.2 ist ein neuronales Connexin, das in inhibitorischen Interneuronen des Hippocampus exprimiert wird und auch in anderen corticalen Regionen von Bedeutung sein könnte. In Knockout-Mäusen wird das deletierte Cx30.2 offenbar durch andere Connexine kompensiert, wobei insbesondere Cx36 eine tragende Rolle zugeschrieben wird (KREUZBERG et al., 2008). Von Cx31.1 ist bekannt, dass es an höheren Funktionen des Gehirns beteiligt ist und die Spiegel der Acetylcholinesterase (AChE) und des Transkriptionsfaktors CREB-1 (cAMP response element binding protein) im Striatum und piriformen Cortex moduliert (DERE et al., 2008). In der Ratte ist mRNA von Cx31.1 in GABAergen Neuronen des Striatum und dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra, pars compacta* nachgewiesen worden (VENANCE et al., 2004; VANDECASTEELE et al., 2006). Es könnte daher auch noch in weiteren Teilen des Gehirns von Bedeutung sein (DERE und ZLOMUZICA, 2012). Bei Cx57 handelt es sich um ein ebenfalls neuronales Connexin. Seine Expression scheint aber den Horizontalzellen der Retina vorbehalten zu sein (HOMBACH et al., 2004; SHELLEY et al., 2006). Spezifische Expressionsorte sind auch für Cx30.3 identifiziert worden, das in Progenitorzellen des olfaktorischen Epithels, im Vomeronasalorgan und der Cochlea vorkommt (ZHENG-FISCHHÖFER et al., 2007; WANG et al., 2010). In Gliazellen haben je nach Zelltyp andere Connexine eine Bedeutung: Astrozyten exprimieren Cx26, Cx30 und Cx43, Oligodendrozyten Cx29, Cx32 und Cx47 (YAMAMOTO et al., 1992; NAGY et al., 2001; EVANS und MARTIN, 2002; CONNORS und LONG, 2004; KAMASAWA et al., 2005; ORTHMANN-MURPHY et al., 2008; NAGY et al., 2011). Im Mausmodell führt die Deletion von Cx32 in Oligodendrozyten und Cx43 in Astrozyten zu Vakuolenbildung in der weißen Substanz, Astrozytenuntergang und ist innerhalb weniger Wochen letal (MAGNOTTI et al., 2011), was die funktionelle Bedeutung dieser Proteine unterstreicht.

1.2.2.2 Gap Junction vermittelte Kopplung im Neocortex

Die Expression von Connexinen während und nach Abschluss der Entwicklung des Gehirns legt nahe, dass dort sowohl Neurone als auch Gliazellen über Gap Junctions gekoppelt sind. Diese Kopplung hat in der Entwicklungsphase ihren Höhepunkt und nimmt in der Adoleszenz ab (MONTORO und YUSTE, 2004). Im adulten Gehirn sind elektrische Synapsen vor allem in GABAergen Interneuronen von Bedeutung (FUKUDA und KOSAKA, 2000; GALARRETA und HESTRIN, 2001a). Die Kopplung unterscheidet sich in Ausmaß und Funktion nach Interneuron-Subtyp und Hirnregion (MEYER et al., 2002). Gap Junctions wurden zuerst innerhalb der Gruppen der FS- und LTS-Interneurone nachgewiesen, eine Kopplung zwischen unterschiedlichen Subtypen kommt vor, ist aber selten (GALARRETA

und HESTRIN, 1999; GIBSON et al., 1999, 2005; HESTRIN und GALARRETA, 2005). So können auch PV-Interneurone mit PV-negativen Interneuronen gekoppelt sein (FUKUDA und KOSAKA, 2003). Später wurden Gap Junctions auch innerhalb anderer Klassen GABAerger Interneurone, beispielsweise cannabinoidrezeptor-positiver IR-Interneurone, nachgewiesen (GALARRETA et al., 2004). Das Ausmaß der Kopplung ist signifikant: GALARRETA und HESTRIN (2002) gehen davon aus, dass PV-positive FS-Interneurone im Neocortex der Maus zu 61 Prozent über elektrische Synapsen gekoppelt sind, die Kopplung über chemische Synapsen in der selben Zellgruppe beträgt 71 Prozent. Eine aktuelle Arbeit von MA et al. (2011) deutet darauf hin, dass vermutlich alle Subpopulationen neocorticaler Interneurone über Gap Junctions verfügen. Eine Expression von Cx36 konnte hier für alle Neurone gezeigt werden, die für folgende Marker positiv sind: 1. Parvalbumin (PV) (80 Prozent), 2. Somatostatin (SOM) (52 Prozent), 3. entweder Calretinin (CR), vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und Cholezystokinin (CCK) oder Cholinacetyltransferase (ChAT) (37 Prozent). In den am stärksten gekoppelten PV-Interneuronen ist diese Kopplung dendro-dendritisch (FUKUDA und KOSAKA, 2003). Es sind allerdings auch Zelltypen bekannt, für die zumindest in einigen Schichten oder Regionen keine Kopplung vorliegt, wie für die RS-Interneurone der Schicht IV (HORMUZDI et al., 2004). Wie stark ihre Kopplung in anderen Schichten ausgeprägt ist, ist unklar (SZABADICS et al., 2001).

Funktionell sind Gap Junctions an der Netzwerkaktivität des Neocortex beteiligt. Sie haben für die Induktion von Synchronisation und Rhythmisierung in großen Neuronengruppen Bedeutung und beeinflussen deren oszillatorische Aktivität auf unterschiedlichen Frequenzbändern (DEANS et al., 2001; GALARRETA und HESTRIN, 2001b; HORMUZDI et al., 2004; GIBSON et al., 2005). Diese besondere Bedeutung für die Vermittlung synchronisierter neocorticaler Aktivität erklärt sich aus der Tatsache, dass Signalübertragung über elektrische Synapsen im Vergleich zu chemischen Synapsen nahezu ohne Zeitverzögerung stattfindet (FUKUDA, 2007). Zwar kann solche Aktivität auch über chemische Synapsen vermittelt werden, jedoch wird deren Präzision und Ausmaß durch das Fehlen elektrischer Synapsen beeinträchtigt (HORMUZDI et al., 2004). Die Ausdehnung der Gap Junction Kopplung eines Interneurons wird auf bis zu 200 μm geschätzt, weshalb vermutet wird, dass jedes Interneuron mit etwa 50 benachbarten Interneuronen über elektrische Synapsen in Verbindung steht (AMITAI et al., 2002; CONNORS und LONG, 2004). Synchronisiertes Entladungsverhalten kann aber auch zwischen größeren Gruppen räumlich weit verteilter Interneurone ($> 200 \mu\text{m}$) ausgelöst werden (BEIERLEIN et al., 2000; FUKUDA, 2007). Diverse Kopplungsszenarien sind in computergestützten Modellen simuliert worden (DI GARBO et al., 2002; PFEUTY et al., 2003; MANCILLA et al., 2007;

DI GARBO, 2008; CALÌ et al., 2008; LAU et al., 2010). Auch die gezielte Deletion von Connexinen im Mausmodell hat ihre Beteiligung an Mikroschaltkreisen gezeigt (DEANS et al., 2001; GALARRETA und HESTRIN, 2001b). Der Knockout von Cx36 bringt zwischen Interneuronen desselben Typs pharmakologisch induzierte über- und unterschwellige Oszillationen zum Erliegen. Insbesondere wurde dies in FS- und LTS-Interneuronen der Schicht IV beobachtet (GIBSON et al., 2005; HORMUZDI et al., 2004). In den Schichten II und III wird für die Erzeugung rhythmischer θ -Aktivität in multipolaren Zellen sowohl GABAerge Neurotransmission als auch Cx36-vermittelte Gap Junction Kopplung benötigt (BLATOW et al., 2003). In den Schichten II und III führt der Verlust von Cx36 nicht zu einer Beeinträchtigung rhythmischer Entladungen in FS-Interneuronen. FS-Interneurone sind dort über eine andere Connexin-Isoform gekoppelt, bei der es sich möglicherweise um Cx45 oder ein Pannexin handelt (HORMUZDI et al., 2004; SÖHL et al., 2005).

Im adulten Cortex konnten elektrische Synapsen zwischen Pyramidenzellen lange Zeit nicht nachgewiesen werden (GALARRETA und HESTRIN, 2001b; FUKUDA und KOSAKA, 2003; CONNORS und LONG, 2004). Man ging davon aus, dass hier die Expression von Gap Junctions im Laufe der Adoleszenz vollständig herunterreguliert wird (MEYER et al., 2002). Neuere Arbeiten zeigen, dass Gap Junctions sehr wohl in Pyramidenzellen adulter Säugetiere – auch im Neocortex – exprimiert werden, allerdings wesentlich seltener als in Interneuronen und mit einem geringeren Grad elektrischer Kopplung (BENNETT und PEREDA, 2006; MERCER et al., 2006; WANG et al., 2010; TRAUB et al., 2010; MERCER, 2012; CUNNINGHAM et al., 2012). In jüngster Zeit ist im Hippocampus der adulten Ratte der Nachweis für gemischte chemische und elektrische Synapsen sowohl zwischen Pyramidenzellen als auch zwischen Interneuronen erbracht worden (HAMZEI-SICHANI et al., 2012). Abseits neuronaler Netzwerke haben Gap Junctions auch in Gliazellen vielfältige Aufgaben. Astrozyten sind über homotypische Kanäle (Cx43:Cx43, Cx30:Cx30) untereinander und über heterotypische Kanäle (Cx47:Cx43, Cx32:Cx30) mit Oligodendrozyten gekoppelt (WASSEFF und SCHERER, 2011). Auch Cx26 ist an der Bildung heterotypischer Gap Junctions zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten beteiligt (NAGY et al., 2011). In Astrozyten sind sie sowohl für die Pufferung von extrazellulärem K^+ (»spatial buffer«) im Rahmen der Homöostase als auch für die Kommunikation von Bedeutung (SCEMES und SPRAY, 2012). Astrozyten, die Cx43 und Cx30 exprimieren, interagieren mit der synaptischen Transmission zwischen Pyramidenzellen des Hippocampus (CA1). Hier »entsorgen« sie neben extrazellulärem K^+ auch Glutamat, modulieren die Erregbarkeit und Transmitterfreisetzung aus Nervenzellen und sind am Aufbau postsynaptischer AMPA-Rezeptoren beteiligt (PANNASCH et al., 2011). Über astrozytäre Gap Junctions

kann eine Ausbreitung der »spreading depressions« über den Cortex erfolgen (BENNETT et al., 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass in Nagetieren funktionelle Gap Junctions zwischen der Mikroglia und Neuronen bestehen (DOBRENIS et al., 2005). Die dynamische Modifikation von Gap Junctions stellt vermutlich Möglichkeiten zur Reorganisation elektrisch gekoppelter neuronaler Netzwerke bereit (HAAS et al., 2011). Nicht zuletzt spielt elektrische Kopplung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung synchronisierter neocortikaler, »epileptiformer« Aktivität eine bedeutende Rolle (VOLMAN et al., 2011).

1.2.2.3 4-Aminopyridin und synchronisierte neocorticale Aktivität

Aminopyridine sind organische Verbindungen, die zur Gruppe der Heteroaromaten zählen. Sie bestehen aus einem Pyridinring, der mit einer Aminogruppe substituiert ist. Abbildung 1.3 zeigt das Nummerierungssystem des Pyridinrings und die Strukturformel von 4-Aminopyridin (4-AP). 4-AP ist eine Substanz, von der (neben Tetraethylammonium, TEA) seit langem bekannt ist, dass sie selektiv spannungsabhängige K^+ -Kanäle in biologischen Membranen blockiert (PELHATE und PICHON, 1974; MEVES und PICHON, 1975; KANNAN und DANIEL, 1978; HERMANN und GORMAN, 1981; GLOVER, 1982). Spannungsabhängige K^+ -Kanäle sind eine heterogene Kanalgruppe mit komplexem Aufbau, zu dem mehr als 30 Genprodukte beitragen (COX, 2005). Ihre Blockade durch 4-AP betrifft in üblichen Konzentrationen (50-100 μM) vornehmlich die Kv1.4, Kv1.5, Kv3.1 und Kv3.2 Untereinheiten (ZAHN et al., 2008) und kann im aktivierten (KEHL, 1990; WAGONER und OXFORD, 1990; CHOQUET und KORN, 1992; TSENG, 1999) oder geschlossenen Zustand erfolgen (CAMPBELL et al., 1993; WANG et al., 1995; TSENG et al., 1996; TSENG, 1999). 4-AP wirkt auch im zentralen Nervensystem (GUSTAFSSON et al., 1982; SAITO et al., 2006), es wird daher zur Aufklärung von K^+ -Strömen im Cortex eingesetzt (SPAIN et al., 1991a,b). Die genauen Mechanismen der Kanalinaktivierung sind Gegenstand aktueller Forschung (LEUNG, 2012). In verschiedenen Geweben sind weitere Effekte beschrieben worden, darunter eine erleichterte Neurotransmitterfreisetzung aus Nervenendigungen (LLINÁS et al., 1976; TIBBS et al., 1989), auch von Glutamat (MORA und TAPIA, 2005), weshalb 4-AP zur Überwindung einer prä- oder postsynaptischen Blockade der neuromuskulären Übertragung (z. B. durch D-Tubocurarin) eingesetzt werden kann (KIM et al., 1980). Außerdem existiert eine Interaktion mit einzelnen Typen von Natrium- (HARVEY und MARSHALL, 1977; LU et al., 2005) und Calciumkanälen (WU et al., 2009). Im Rückenmark von Säugetieren führt 4-AP zur Erleichterung der Reflexbahnung und synaptischen Übertragung in exzitatorischen und inhibitorischen Verschaltungen

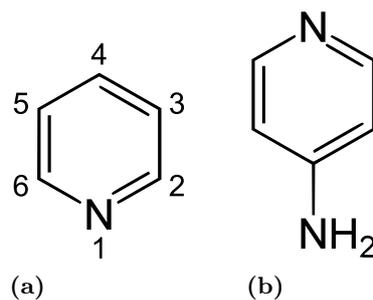


Abbildung 1.3 (a) Pyridinring mit Nummerierungssystem, (b) Strukturformel des isomeren 4-Aminopyridin. Abbildung nach GLOVER (1982).

(LEMEIGNAN, 1972, 1973; GALINDO und RUDOMÍN, 1978). In der Medizin ist es im Rahmen bestimmter neurologischer Krankheitsbilder, bei denen durch die Fazilitation synaptischer Transmission eine Besserung oder Kontrolle der Symptomatik erreicht werden kann, zu klinischer Anwendung gekommen. Beispiele für den frühen klinischen Einsatz von 4-AP und anderen Aminopyridinen sind eher seltene Erkrankungen wie die Myasthenia gravis (eine Autoimmunerkrankung, die Acetylcholinrezeptoren der motorischen Endplatte betrifft) und das Lambert-Eaton-Syndrom (eine paraneoplastische Autoimmunerkrankung, die »präsynaptische« Calciumkanäle der motorischen Endplatte betrifft) (LUNDH et al., 1979, 1977, 1983; LEMEIGNAN et al., 1984; LUNDH et al., 1985). Für den therapeutischen Effekt bei bestimmten Formen der cerebellären Ataxie ist nachgewiesen, dass er auf der Blockade von K^+ -Kanälen beruht, die in der Pathophysiologie der Erkrankung eine Rolle spielen (ALVIÑA und KHODAKHAH, 2010). Seit neuestem konzentriert sich die klinische Anwendung von 4-AP³ auf die Therapie der Multiplen Sklerose, einer häufigen, chronisch-entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankung des zentralen Nervensystems (HERSH und RAE-GRANT, 2012; SEDEHIZADEH et al., 2012); mögliche Anwendungen in der Therapie spinaler Verletzungen werden diskutiert (SUN et al., 2010).

Im Gehirn der Säugetiere hat die Blockade von K^+ -Kanälen durch 4-AP Auswirkungen, die zu einem breiten Einsatz in neurobiologischer und elektrophysiologischer Forschung geführt haben. Von GALVAN et al. (1982) wurde gezeigt, dass seine Applikation in Gehirnschnittpräparaten von Meerschweinchen *in vitro* zu elektrischen Entladungen führt, die denen während cerebraler Krampfanfälle im EEG beobachtbaren gleichen, also »epileptiform« sind. Diese Beobachtung deckt sich mit der klinischen, dass es in therapeutischer Dosierung zu

³Freinamen: Fampridin (INN), Dalfampridin (USAN).

unerwünschten zentralnervösen Wirkungen, darunter Verwirrheitszustände und Krampfanfälle⁴, kommen kann (MURRAY und NEWSOM-DAVIS, 1981). 4-AP hat nicht nur im Menschen, sondern auch in zahlreichen anderen Säugetieren prokonvulsive Eigenschaften (MORA und TAPIA, 2005). BUCKLE und HAAS (1982) fanden im Hippocampus der Ratte unter 4-AP bei extrazellulärer Ableitung eine Vergrößerung synaptischer Feldpotentiale, bei intrazellulärer Messung eine Zunahme sowohl von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP), als auch von inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSP). In der Folge ist eine synchronisierte neuronale Aktivität in zahlreichen Tiermodellen und Gehirnregionen, schwerpunktmäßig im Hippocampus, aber auch im Neocortex, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen worden. Das 4-AP-Modell hat sich als eines der Standardmodelle zur Untersuchung »epileptiformer« Aktivität in neuronalen Netzwerken etabliert (KITA et al., 1985; RUTECKI et al., 1987; ARAM et al., 1991; PERREAULT und AVOLI, 1992; AVOLI et al., 1994; SINISCALCHI et al., 1997; AVOLI et al., 1996; MAIER et al., 2002; SZENTE et al., 2002; D'ANTUONO et al., 2004; DOUGALIS et al., 2004; MORA und TAPIA, 2005; AYALA und TAPIA, 2005; GAJDA et al., 2006).

Die durch 4-AP ausgelöste synchronisierte neuronale Aktivität weist im Zeitverlauf einen Charakter auf, der von BANDYOPADHYAY et al. (2006) als wellenförmig bezeichnet wird (»waves of activity«). Sie wird durch Substanzen, die K⁺-Kanäle öffnen, aufgehoben, beruht also im Grundsatz auf dem Mechanismus der K⁺-Kanal-Blockade (KOBAYASHI et al., 2008). Für ihre Ausbreitung in neuronalen Netzwerken sind GABAerge Synapsen von Bedeutung, die im Gehirn den Großteil der Inhibition vermitteln. Im Neocortex existieren zwei Typen GABAerger IPSP, die als »schnell« und »langsam« bezeichnet und über zwei unterschiedliche Rezeptorklassen vermittelt werden: GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren. Die GABA_A-Antwort ist chloridabhängig und erzeugt das ligandengesteuerte, schnelle IPSP. GABA_B-Rezeptoren aktivieren über einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus eine postsynaptische K⁺-Leitfähigkeit und führen so über eine Hyperpolarisation der Zellmembran zum späten, langsamen IPSP (CONNORS et al., 1982; AVOLI, 1986; HOWE et al., 1987; CONNORS et al., 1988; DEISZ und PRINCE, 1989; BENARDO, 1994). Für die synchronisierte neocorticale Aktivität unter 4-AP ist gezeigt worden, dass sie auch nach Blockade der exzitatorischen synaptischen Übertragung, also der glutamatergen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren, auftritt. Nach Applikation von GABA_A-Rezeptor-Antagonisten (z. B. Bicucullin oder Picrotoxin) kommt der Großteil ihrer Komponenten

⁴Aus diesen Gründen haben auch andere Aminopyridine, beispielsweise 3,4-Diaminopyridin, therapeutische Bedeutung erlangt, da sie in geringerem Ausmaß als 4-AP die Blut-Hirn-Schranke passieren (LUNDH et al., 1983).

zum Erliegen. Diese 4-AP-induzierte synchronisierte Aktivität wird also durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt und dementsprechend als GABA-Wellen bezeichnet (ARAM et al., 1991; PERREAULT und AVOLI, 1992; AVOLI et al., 1994, 1996; LOUVEL et al., 2001; LAMSA und TAIRA, 2003; AVOLI et al., 2003). GABA_B spielt für einige Komponenten ebenfalls eine Rolle und hat modulierende Funktion (BENARDO, 1997; KANG et al., 1998; KANTROWITZ et al., 2005; GONZALEZ-SULSER et al., 2011; PANUCCIO et al., 2012).

Schon früh ist diskutiert worden, dass rhythmische, synchronisierte Aktivität in Neuronen auch über nicht-synaptische Mechanismen übertragen werden könnte (JEFFERYS und HAAS, 1982). Mit Hilfe des 4-AP-Modells haben etliche Arbeitsgruppen gezeigt, dass für die Entstehung oder Ausbreitung der Aktivität möglicherweise Gap Junctions von Bedeutung sind. Dieser Hinweis ergab sich zunächst nur indirekt: eine unspezifische, pharmakologische Blockade von Gap Junctions (z. B. durch Carbenoxolon) führt zu einer Reduktion der synchronisierten neuronalen Aktivität (ROSS et al., 2000; YANG und MICHELSON, 2001; TRAUB et al., 2001; GIGOUT et al., 2006; ZSIROS et al., 2007; MEDINA-CEJA et al., 2008). Ähnliches ist in unterschiedlichem Ausmaß für eine spezifische Blockade neuronaler Cx36-Kanäle (z. B. durch Quinidin oder Mefloquin) in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems gezeigt worden (GAJDA et al., 2005; GIGOUT et al., 2006; CHAPMAN et al., 2009). Auch mRNA-Expressionsstudien lieferten Hinweise auf eine Beteiligung verschiedener Connexin-Isoformen (SZENTE et al., 2002; GAJDA et al., 2003; ZAPPALÀ et al., 2006; GAJDA et al., 2006). Eine endgültige Klärung der Frage, inwiefern elektrische Synapsen zur Synchronisation unter 4-AP beitragen, war allerdings bisher nicht möglich. Ein neuer Ansatz hat sich durch die Verfügbarkeit connexindefizienter Mäuse ergeben. Hier haben Untersuchungen in Hippocampus und Rückenmark von Cx36-Knockout-Mäusen bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen in Bezug auf die Rolle von Gap Junctions geführt (MAIER et al., 2002; PAIS et al., 2003; BEAUMONT und MACCAFERRI, 2011). Für den Neocortex liegen derartige Untersuchungen nicht vor.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Der K⁺-Kanal-Blocker 4-Aminopyridin (4-AP) führt in Säugetieren *in vitro* und *in vivo* zu synchronisierter neuronaler, »epileptiformer« Aktivität. Diese Aktivität wird über GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Die Reduktion dieser Aktivität durch spezifische und unspezifische pharmakologische Gap Junction Blocker einerseits sowie mRNA-Expressionsstudien

andererseits haben eine Beteiligung elektrischer Synapsen (Gap Junctions) an diesem Phänomen unterstellt. Ihre genaue Bedeutung hierbei ist allerdings unklar. Untersuchungen dieser Aktivität im Hippocampus connexindefizienter Mäuse haben zu uneinheitlichen Ergebnissen in Bezug auf die Rolle elektrischer Synapsen geführt. Eine Untersuchung der 4-AP-induzierten Aktivität im Neocortex connexindefizienter Tiere liegt bisher nicht vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die durch 4-AP induzierte, synchronisierte neuronale Aktivität (GABA-Wellen) in Gehirnschnittpräparaten des Neocortex von Mäusen *in vitro* charakterisiert und zwischen Wildtyp, Cx36-Knockout- und Cx45-Knockout-Mäusen verglichen werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob eine Deletion neuronaler Connexine, und damit eine Unterbrechung der elektrischen Kopplung zwischen Interneuronen, zu einer Veränderung von Auftrittsfrequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen führt. Außerdem sollte analysiert werden, ob sich die Wirkung von Pharmaka mit Blockadewirkung auf Gap Junctions zwischen Wildtyp- und connexindefizienten Tieren unterscheidet.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die elektrophysiologischen Messungen wurden *in vitro* an 131 Gehirnschnittpräparaten von insgesamt 80 Wildtyp- sowie Cx36- und Cx45-defizienten Mäusen beider Geschlechter durchgeführt. Für die intrazellulären Ableitungen lag das Alter¹ zwischen P16 und P30, für die Feldpotentialmessungen wurden Tiere bis P178 verwendet. Aufzucht und Haltung erfolgten unter strikter Trennung der Stämme im Tierhaus des Physiologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Standardbedingungen, d. h. bei einer konstanten Raumtemperatur von 23 °C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden. Trockenfutter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

Wildtyp Als Wildtyp-Stamm wurde die C57BL/6-Mauslinie verwendet. Bereits 1921 wurde C57BL von LITTLE durch die Verpaarung von Tieren aus der Zucht von LATHROP erzeugt, die Substämme C57BL/6 und C5BL/10 dann im Jahr 1937 separiert (MEFFERT, 2002). Heute handelt es sich bei C57BL/6 um den in der Forschung weltweit am häufigsten eingesetzten Inzuchtstamm, der in 14 Prozent aller Studien mit Inzucht-Mäusen zum Einsatz kommt (WETZEL, 2003). Er ist zu 98 Prozent genetisch identisch.

Cx36-Knockout Die Cx36-defiziente Mauslinie wurde am Institut für Genetik der Universität Bonn² entwickelt, die Zuchtpaare wurden von dort zur Verfügung gestellt.

¹Tage *P* postnatal

²Arbeitsgruppe PROF. DR. KLAUS WILLECKE, Institut für Genetik, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Römerstraße 164, 53117 Bonn

Die weitere Aufzucht erfolgte am Lehrstuhl für Physiologische Genomik³ der Ludwig-Maximilians-Universität München. Der Knockout von Cx36 wurde in dieser Mauslinie mit Hilfe des Cre/loxP-Systems verwirklicht. Das Genom der Maus wurde zunächst so modifiziert, dass das Cx36-Gen von loxP-Stellen flankiert wird, denen ein CFP-Reportergen folgt. Die auf diese Weise entstandene Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}-Maus verfügt über etwa 75 Prozent C57BL/6-Hintergrund und reduziert die ubiquitäre⁴ Expression von Cx36 im Vergleich zum Wildtyp um ca. 30 bis 60 Prozent, dies jedoch ohne signifikante Beeinflussung der Zellkopplung. Verpaarung dieser Tiere mit PGK-Cre-rekombinanten Mäusen führte zu einer ubiquitären Deletion von Cx36 (WELLERSHAUS et al., 2008), was dann als Cx36^{del(CFP)/del(CFP)}-Maus, oder im Folgenden kurz als Cx36-Knockout (Cx36KO), bezeichnet wird.

Cx45-Knockout Auch die Cx45-defizienten Mäuse entstanden am Institut für Genetik² der Universität Bonn und wurden dem Lehrstuhl für Physiologische Genomik³ der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt, wo die weitere Aufzucht erfolgte. In der Vergangenheit hatten Versuche zur Erzeugung eines ubiquitären Cx45-Knockouts im Mausmodell zu Störungen der Entwicklung des Herz- und Gefäßsystems geführt, die noch in der Embryonalphase letal waren (KRÜGER et al., 2000). Es wurde daher ein zellspezifischer, neuronaler Knockout von Cx45 geschaffen. Wie die Cx36-defizienten Mäuse basieren auch sie auf dem C57BL/6-Stamm. In der Entwicklung dieses Knockouts wurde das Exon3, das die gesamte kodierende Region des Cx45-Gens enthält, durch loxP-Stellen flankiert und EGFP als Reportergen unter die Kontrolle des endogenen Cx45-Promotors gestellt. Mittels der unter dem Nestin-Promotor stehenden Cre-Rekombinase kommt es zur neuronalen Deletion von Cx45 und begleitend zur Expression von EGFP (MAXEINER, 2005). In der Literatur werden Tiere mit lediglich »gefloxtem«, nicht aber deletiertem Exon3 als Cx45^{flox/flox}-Mäuse und Knockout-Tiere als Cx45^{del(EGFP)/del(EGFP)} oder Cx45^{flox/flox}: Nestin-Cre-Mäuse bezeichnet. Im Folgenden wird als Cx45-Knockout (Cx45KO) auf sie Bezug genommen.

³Arbeitsgruppe PROF. DR. BERND SUTOR

⁴Cx36 wird sowohl von Neuronen des ZNS als auch von β -Zellen des endokrinen Pankreas exprimiert.

2.1.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für die Wildtyp-Tiere des C57BL/6-Stammes wurde, bis auf die üblichen, stichprobenartigen Überprüfungen im Rahmen der Aufzucht, keine Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Die Brutpaare der Cx36KO-Mäuse wurden vor Beginn der Aufzucht auf eine komplette Deletion des Cx36-Gens hin untersucht und erst nach deren Sicherstellung verpaart. Da die Verpaarung der hier verwendeten Cx36KO-Mäuse ebenfalls Cx36-defiziente Tiere ergibt (WELLERSHAUS, 2006), waren nach Zuchtbeginn lediglich regelmäßige, stichprobenartige Kontrollen des Genotyps notwendig. Die Aufzucht der Cx45KO-Mäuse erfolgte ausgehend von Brutpaaren, die aus Cx45^{flox/flox}-Weibchen und Cx45^{flox/flox}:Nestin-Cre-Männchen bestanden. Aus einer solchen Verpaarung können sowohl Cx45^{flox/flox}-Tiere als auch Cx45KO-Tiere hervorgehen. Außerdem ist zu beachten, dass eine Nestin-Cre-Aktivität in den Keimzellen zu einer kompletten Deletion des »geflochten« Cx45 in der nächsten Generation führen kann (MAXEINER, 2005). Aus diesen Gründen wurden alle Tiere dieser Zuchtlinie einer Genotypisierung unterzogen.

Extraktion der DNA Das DNA-Material für die PCR wurde aus den Schwanzspitzen der Versuchstiere gewonnen. Diese wurden in der Regel *post mortem*, im Anschluss an die Präparation der Gehirnschnitte, entfernt und bis zur Extraktion der DNA bei -20°C gelagert. Hierzu wurden ca. 100 mg Gewebe zerkleinert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 μL eines Lysispuffers, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2.1 aufgelistet ist, vollständig bedeckt. Der Ansatz wurde unter gelegentlichem Rühren für 60 Minuten inkubiert und danach für 20 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sterilen Kautelen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 μL Isopropanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Hierauf wurde erneut bei 12 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand vorsichtig abpipettiert. Das getrocknete Pellett wurde mit 200 μL Tris-HCL (10 mM, pH 8,5) versetzt und für 90 Minuten auf 55°C erwärmt. Die Lagerung der genomischen DNA bis zur Durchführung der PCR erfolgte bei 4°C . Da die DNA bei dieser Temperatur ausfallen kann, wurde sie unmittelbar vor Beginn der PCR nochmals für 10 Minuten bei 55°C inkubiert.

| Substanz | Konzentration | Volumen-% |
|--------------------------|-----------------------------|-----------|
| Tris-HCl (pH 8,5) | 1.0 M | 10 |
| EDTA | 0.5 M | 1 |
| SDS | 10.0 %-ige Lsg. | 2 |
| NaCl | 1.0 M | 20 |
| H ₂ O bidest. | 55.6 M | 66 |
| Proteinase K | 10.0 mg/mL H ₂ O | 1 |

Tabelle 2.1 Lysispuffer zur DNA-Extraktion

Durchführung der PCR Zur Bestimmung des Genotyps beider Knockout-Mauslinien wurden PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Die Protokolle entsprechen im Wesentlichen denen, die an der Universität Bonn zur Genotypisierung entwickelt wurden. Beide Stämme wurden sowohl auf das Wildtyp-Connexin und dessen »gefloxte« Variante, als auch auf den Knockout getestet. Die verwendeten Primer sind für beide Genotypen in Tabelle 2.2 dargestellt. Ihre Synthese erfolgte durch die Metabion International AG (Martinsried, Deutschland). Die Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung der PCR-Ansätze. Sowohl die DNA-Polymerase als auch der zugehörige Reaktionspuffer wurde kommerziell erworben⁵. In der Tabelle 2.4 sind beide PCR-Programme zusammengefasst, die Tabelle 2.5 zeigt die entstehenden Bandengrößen auf (WELLERSHAUS et al., 2008; MAXEINER, 2005). Nach erfolgter PCR wurden 10 µL des jeweiligen Reaktionsansatzes zusammen mit einem Vergleichs-Größenmarker auf ein Agarose-Gel (1.5 %) aufgetragen und die Länge der PCR-Produkte elektrophoretisch ermittelt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Moleküle mit Ethidiumbromid gefärbt, die Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis auf Photopapier dokumentiert.

⁵Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, Missouri, USA

| Genotyp | Oligo-Name | Basenfolge |
|----------|------------|---|
| Cx36wt | Cx36USP-1 | 5'-TAA GTG CAA TAA AGG GGG AGG GCC TCG-3' |
| Cx36flox | Cx36DSP-1 | 5'-GAG ACA GGA GAA GGT ATT CCC AAG GGC-3' |
| Cx36KO | DSP-CFP-1 | 5'-AAG AAG TCG TGC TGC TTC ATG TGG-3' |
| Cx45wt | I5FCfor | 5'-GGA TTA AAG GCA TAT GTC ACC ACT CTT GGC-3' |
| Cx45flox | I3Frev | 5'-CTC TAG GAA CAC TGT AAC CTG AGA TGT CCC-3' |
| Cx45KO | IipX3rev | 5'-AAG AAC GGC CAC AAC TCT GGT AAC AGG AAG-3' |

Tabelle 2.2 Cx36KO, Cx45KO: PCR-Primer

| Cx36KO | | |
|---|--|---------------------------|
| Substanz | Konzentration | Menge [μmol] |
| dNTP | 10 mM | 0.2 |
| Cx36USP-1 | 10^{-3} mM | 0.2 |
| Cx36DSP-1 | 10^{-3} mM | 0.2 |
| DSP-CFP-1 | 10^{-3} mM | 0.2 |
| 10× Reakt.-Puffer f. JumpStart™ Taq-DNA-Polymerase (15 mM MgCl_2) | | 2.5 |
| JumpStart™ Taq-DNA-Polymerase | 2,5 units ^a / μL | 0.4 |
| H ₂ O | | 19.3 |
| Ziel-DNA | | 2.0 |
| Gesamt | | 25.0 |
| Cx45KO | | |
| dNTP | 10 mM | 0.2 |
| I5FCfor | 10^{-3} mM | 0.2 |
| I3Frev | 10^{-3} mM | 0.2 |
| IipX3rev | 10^{-3} mM | 0.2 |
| 10× Reakt.-Puffer f. JumpStart™ Taq-DNA-Polymerase (15 mM MgCl) | | 2.5 |
| JumpStart™ Taq-DNA-Polymerase | 2,5 units ^a / μL | 0.4 |
| H ₂ O | | 19.3 |
| Ziel-DNA | | 2.0 |
| Gesamt | | 25.0 |

^a Eine unit ist definiert als diejenige Enzym-Menge, die innerhalb von 30 min 10 nmol dNTP bei 74 °C an in Säure ausfällbare DNA angliedert.

Tabelle 2.3 Cx36KO, Cx45KO: PCR-Ansätze

| Gen | PCR-Schritt | Temperatur [°C] | Dauer [min] | |
|------|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Cx36 | Initiale Denaturierung | 95 | 5.00 | } 40 Zyklen |
| | Denaturierung | 95 | 0.75 | |
| | Annealing | 56 | 0.75 | |
| | Elongation | 72 | 1.00 | |
| | Abschließende Extension | 72 | 10.00 | |
| | | | 4 | |
| Cx45 | Initiale Denaturierung | 94 | 4.00 | } 35 Zyklen |
| | Denaturierung | 94 | 2.00 | |
| | Annealing | 67 | 1.00 | |
| | Elongation | 72 | 1.00 | |
| | Abschließende Extension | 72 | 10.00 | |
| | | | | |

Tabelle 2.4 Cx36KO, Cx45KO: PCR-Programme

| Gen | Genotyp | Bandengröße [bp] |
|------|---------------------------------------|------------------|
| Cx36 | Cx36-Wildtyp | 311 |
| | Cx36 ^{flox(CFP)/flox(CFP)} | 384 |
| | Cx36 ^{del(CFP)/del(CFP)} | 505 |
| Cx45 | Cx45-Wildtyp | 389 |
| | Cx45 ^{flox/flox} | 473 |
| | Cx45 ^{flox/flox} :Nestin-Cre | 620 |

Tabelle 2.5 Cx36KO, Cx45KO: Bandengrößen

2.2 Perfusionslösungen für die Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an den Gehirnschnittpräparaten wurden *in vitro* durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität in diesen Schnitten wurden diese ständig in einer Lösung gehalten, die in ihrer ionalen Zusammensetzung dem natürlichen *Liquor cerebrospinalis* entsprach. Diese Lösung wird als aCSF (artificial cerebrospinal fluid) bezeichnet. Ausgehend von einer Stammlösung (s. Tab. 2.6) wurden zwei unterschiedliche Lösungen hergestellt: eine Präparations- und Schneidelösung, die während der Herstellung der Gehirnschnitte zum Einsatz kam, sowie eine Lösung, die bei der Inkubation der Präparate vor Versuchsbeginn und während der Messungen

| Substanz | Summenformel | Konz. [mM] |
|---------------------------|---|------------|
| Natriumchlorid | NaCl | 125.00 |
| Kaliumchlorid | KCl | 3.00 |
| Natriumdihydrogenphosphat | NaH ₂ PO ₄ | 1.25 |
| Natriumhydrogencarbonat | NaHCO ₃ | 25.00 |
| D-Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 25.00 |

Tabelle 2.6 Zusammensetzung der Stammlösung

verwendet wurde. Erstere verfügte über eine niedrigere Calcium- und höhere Magnesium-Konzentration. Hieraus resultierte eine verringerte Erregbarkeit und Stoffwechselaktivität der Nervenzellen während der unvermeidbaren Traumatisierung bei der Herstellung der Hirnschnitte, und daher eine deutlich verbesserte Überlebensdauer einzelner Neurone und eine höhere Anzahl vitaler Neurone insgesamt. Im Hinblick auf die ionale Zusammensetzung handelte es sich bei den Lösungen um Modifikationen nach FRICK et al. (2007). Alle Lösungen wurden kontinuierlich mit Carbogen⁶ (Volumen: 95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Dieses Gasgemisch stellte zum einen die adäquate Sauerstoffversorgung der Nervenzellen sicher, zum anderen etablierte CO₂ zusammen mit NaHCO₃ ein offenes Puffersystem, das zusammen mit NaH₂PO₄ dazu führte, dass sich bei einer Temperatur von 28 °C ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Die Osmolarität der Lösungen betrug 310-330 mosmol × L⁻¹. Im Vergleich zu natürlicher Cerebrospinalflüssigkeit verfügten beide aCSF-Lösungen mit 25 mM über eine erhöhte Konzentration an D-Glucose (*in vivo* ca. 5 mM), was zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels der Nervenzellen unter *in-vitro*-Bedingungen notwendig war (LIPTON und WHITTINGHAM, 1984; TANAKA et al., 2008).

| Lösung | CaCl ₂ [mM] | MgCl ₂ [mM] | pH ^a | Osmolarität [mosmol/L] |
|-------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| Präparation | 1.00 | 6.00 | 7.4 | 310–330 |
| Ableitung | 2.00 | 2.00 | 7.4 | 310–330 |

^a bei 37 °C

Tabelle 2.7 Modifikation der Stammlösung für Präparations- und Ableitelösung

⁶Linde AG, Gases Division Germany, Pullach, Deutschland

2.3 Gehirnschnittpräparate des Neocortex

Zur Herstellung der Gehirnschnitte wurden die Versuchstiere zunächst in einer Narkosekammer bis zum Eintreten eines Toleranzstadiums mit CO₂ betäubt und anschließend enthauptet. Das Toleranzstadium war definiert als ein nach Ende der initialen Exzitationsphase einsetzender, erstspannter Zustand des Tieres mit Verlust der Auffangreflexe und fehlender Schmerzreaktion bei erhaltenem Atemantrieb (KÖHLER et al., 1999).

Unmittelbar nach der Enthauptung wurde der Kopf für eine Minute in eisgekühlte und mit Carbogen begaste Präparationslösung getaucht. Durch kältebedingte Vasokonstriktion kam es hierbei zum Auswurf eines Großteils des im Gehirn verbliebenen Restblutes (WERTHAT, 2012). Danach wurde das Gehirn zügig und möglichst atraumatisch freipräpariert, *in toto* aus dem Schädel entnommen und wiederum für eine Minute in eisgekühlter Präparationslösung inkubiert. Anschließend wurde das Cerebellum mit einer gereinigten⁷ Rasierklinge⁸ abgetrennt und das Cerebrum entlang der *Fissura longitudinalis* in seine Hemisphären gespalten. Von diesen Hemisphären wurde eine als Reserve zurück in die Präparationslösung gegeben; die andere wurde an ihrem occipitalen Ende durch eine coronare Schnittführung mit einer glatten Fläche versehen, die auf der medialen Trennungsebene der Hemisphären senkrecht stand. Mit dieser Oberfläche wurde die Hemisphäre durch eine dünne Schicht Cyanacrylat-Klebstoff⁹ auf einem Objektisch fixiert. Zur Stabilisierung lag sie dabei mit der medialen Hemisphärenschnittfläche einem zuvor aufgebrauchten Agarblock an. Der Objektisch wurde in die Wanne eines Vibrationsmikrotoms¹⁰, die mit Carbogen-begaster Präparationslösung befüllt war, eingesetzt. Die Temperatur der Badlösung wurde durch aktive Kühlung bei 8 °C konstant gehalten. Der Objektisch wurde so ausgerichtet, dass die Schnittfläche der horizontal einfahrenden Mikrotomklinge senkrecht zum Agarblock mit der anliegenden Hemisphäre orientiert war. Auf diese Weise konnten sehr exakt coronare Schnittpräparate der Hemisphäre angefertigt werden. Die Einstellungen am Mikrotom wurden so gewählt, dass bei langsamer Vorschubgeschwindigkeit und mittlerer Vibrationsfrequenz etwa vier bis fünf Schnittpräparate mit einer Dicke von 300 µm aus dem Bereich des frontalen Cortex entstanden (WERTHAT, 2012). Die Präparate wurden für 60 Minuten in einem Wärmebad bei 28 °C inkubiert und mit Carbogen begast. Im

⁷Kommerziell erhältliche Rasierklingen sind häufig mit Stoffen versetzt, die vor der Verwendung als Präparationswerkzeug mit Hilfe organischer Lösungsmittel, z. B. Aceton, entfernt werden müssen.

⁸*Wilkinson Sword Classic Double Edge Razor Blades*, Wilkinson Sword Ltd., High Wycombe, UK

⁹*Lock-Tite 406*, Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland

¹⁰*HM 650V*, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland

Anschluss wurde die Temperatur auf 20 °C reduziert und die Schnitte vor der Verwendung im Experiment für mindesten weitere 60 Minuten im Becken belassen (BIBER, 2004).

2.4 Elektrophysiologische Messungen

Messplatz Der Versuchsaufbau bestand aus einem motorisierten, aufrechten Durchlicht-Mikroskop¹¹ mit infrarotfähiger DIC-Optik. Mit der DIC-Technik werden lokale Variationen optischer Weglängen im betrachteten Objekt in Helligkeitsunterschiede im Bild umgesetzt. Hierdurch können transparente Phasenobjekte, wie Neurone im Gewebeverband, sichtbar gemacht und in der Durchlichtmikroskopie plastisch dargestellt werden. Durch die Verwendung von infrarotem Licht können Nervenzellen bis in eine Tiefe von ca. 150 µm erreicht werden (DOTT und ZIEGLGÄNSBERGER, 1990). Das vom Mikroskop erzeugte Bild wurde mit einer infrarotsensitiven CCD-Kamera¹² auf einen LCD-Monitor übertragen, außerdem konnten Einzelbilder digital abgespeichert werden. Der untersuchte Gehirnschnitt befand sich in einer Perfusionskammer, die auf dem Objektstisch des Mikroskops angebracht war. Zur mechanischen Stabilisierung wurde ein weitmaschiges Nylonnetz auf das Schnittpräparat gelegt. Die Perfusion der Präparate erfolgte mittels eines Zirkulationssystems, wobei der Flüssigkeitstransport durch eine peristaltische Pumpe¹³ aufrecht erhalten wurde. Die Durchflussrate betrug $2\text{-}3 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$.

Elektroden Die Elektroden für die intrazellulären Messungen und die Feldpotentialableitungen wurden mit Hilfe eines Gerätes zum Ziehen von Mikropipetten (Puller)^{14,15} aus Borosilikat-Glaskapillaren¹⁶ hergestellt. Die Elektrodenrohlinge hatten einen Spitzendurchmesser von ca. 1 µm und wurden je nach Messtechnik mit unterschiedlichen Lösungen befüllt. Bei Feldpotential-Messungen kamen Elektroden zum Einsatz, die mit aCSF oder NaCl (150 mM) gefüllt waren. Für die intrazellulären Ableitungen wurden Pipetten verwendet, die eine in Tabelle 2.8 aufgeführte »Intrazellulärlösung« (Osmolarität $290 \text{ mosmol} \times \text{L}^{-1}$, pH 7.3) enthielten. Die mit Salzlösung gefüllten Glaspipetten wurden

¹¹ *Axioskop FS*, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland

¹² *C2400*, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan

¹³ *Gilson Minipuls® 3*, Gilson Inc., Wisconsin, USA

¹⁴ *DMZ-Universal-Puller*, Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland

¹⁵ *P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller*, Sutter Instrument Company, California, USA

¹⁶ *GC150F-10*, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA

über einen chlorierten Silberdraht an den Vorverstärker angeschlossen. Der elektrische Widerstand der Elektroden betrug 6-10 M Ω . Als Referenzelektrode diente eine weitere chlorierte Silberelektrode, die sich in der Badlösung befand. Zur Auslösung von synaptischen Antworten kam eine bipolare Reizelektrode zum Einsatz. Mess- und Reizelektroden wurden mit Hilfe von Mikromanipulatoren¹⁷ im Gewebe positioniert.

Messelektronik und Datenaufnahme Die für die intrazellulären Messungen eingesetzten Elektroden waren über einen Vorverstärker mit dem eigentlichen Signalverstärker¹⁸ im Rack verbunden. Es handelte sich um ein Verstärker-System (single electrode clamp, SEC), über das die Messung des Membranpotentials der untersuchten Zelle vorgenommen, dieses aber auch durch Strominjektion manipuliert werden konnte. Eine der WHEATSTONE-SCHEN Brücke analoge Schaltung erlaubte die Kompensation des Elektrodenwiderstandes (MÜLLER et al., 1999; SUTOR et al., 2003). Zudem konnte die Elektrodenkapazität neutralisiert werden. Der Verstärker konnte nach Herstellung des Ganzzellmodus prinzipiell in der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) oder in der Stromklemme (Current-Clamp) betrieben werden. Im Voltage-Clamp-Modus wird das Membranpotential der Zelle über einen Kompensationsstrom auf einem definierten Wert gehalten, was unmittelbare Rückschlüsse auf die Leitfähigkeiten der Membran, wie beispielsweise Ionenströme, erlaubt. Im Current-Clamp-Modus wird der Strom durch die Membran über den Verstärker vorgegeben. Das Membranpotential bleibt also variabel, was eine Untersuchung der Erregungsmuster der Zelle unter physiologischeren Bedingungen erlaubt. Sämtliche intrazellulären Ableitungen dieser Arbeit wurden als Current-Clamp-Messungen durchgeführt.

Für die extrazellulären Messungen wurde ebenfalls ein SEC-Verstärker¹⁹ verwendet. Ein 8-Kanal-Stimulator²⁰ diente zur Generation von Pulsen, deren Dauer, Frequenz oder Intensität exakt gesteuert werden konnte. Die über die Messelektroden erfassten Signale wurden bei intrazellulärer Messung mit 10 kHz und bei extrazellulärer Messung mit 500 Hz gefiltert und auf Oszilloskopen²¹ dargestellt. Die Digitalisierung der Signale erfolgte mittels einer Software²², die sowohl die Versuchssteuerung, als auch das Abspeichern der

¹⁷Luigs und Neumann, Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland

¹⁸SEC-10L, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland

¹⁹SEC-10, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland

²⁰Master-8, A.M.P.I, Jerusalem, Israel

²¹HM407, Hameg Instruments GmbH, Mainhausen, Deutschland

²²CellWorks 5.1, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland

| Substanz | Summenformel | Konz. [mM] | IUPAC-Name |
|------------------------------|--------------------------------|------------|--|
| Kaliumchlorid | KCl | 4.0 | KCl |
| Natriumchlorid | NaCl | 2.0 | NaCl |
| EGTA | $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$ | 0.2 | 2-[2-[2-[2-bis(carboxymethyl)amino]ethoxy]ethoxy]ethyl-(carboxymethyl)amino]essigsäure |
| Kaliummethylsulfat | CH_3KO_4S | 135.0 | CH_3KO_4S |
| HEPES (K ⁺ -Salz) | $C_8H_{17}KN_2O_4S$ | 10.0 | Kalium 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonat |
| ATP (Mg ²⁺ -Salz) | $C_{10}H_{14}MgN_5O_{13}P_3$ | 4.0 | Magnesium [[[2R,3S,4R,5R)-5-(6-aminopurin-9-yl)-3,4-dihydroxyolan-2-yl]methoxy-hydroxyphosphoryl]oxy-oxidophosphoryl]hydrogenphosphat |
| NaGTP | $C_{10}H_{13}N_5Na_3O_{14}P_3$ | 0.5 | Trinatrium [[[2R,3S,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-3H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxyolan-2-yl]methoxy-hydroxyphosphoryl]oxy-oxidophosphoryl]phosphat |
| Phosphokreatin | $C_4H_{10}N_3O_5P$ | 10.0 | 2-[methyl-(E)-N'-phosphonocarbamidoyl]amino]essigsäure |

Tabelle 2.8 Zusammensetzung der »Intrazellulärlösung«

gewonnenen Daten ermöglichte. Hierzu wurde ein Multifunktions-Datenerfassungsmodul²³ mit einer Digitalisierungsrate von 2-5 kHz verwendet.

Pharmaka und Substanzapplikation Von den im Versuch eingesetzten, pharmakologisch wirksamen Substanzen wurden hydrophile in H₂O, lipophile in DMSO gelöst, in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. 1-Heptanol und 1-Octanol wurden bei Raumtemperatur gelagert und ungelöst angewendet. Die Applikation der Substanzen erfolgte durch Zugabe zur Perfusionslösung. Da die aCSF mit 2 mL × min⁻¹ zirkulierte, kann davon ausgegangen werden, dass die Pharmaka nach spätestens 5 Minuten ihren Wirkort in der Ableitkammer erreichten. Die Tabellen 2.9 und 2.10 weisen die verwendeten Substanzen aus. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich jeweils um die Endkonzentrationen in der Badlösung.

| Mechanismus | Substanz | Konz. [mM] | Lösung | Bezug |
|--|----------------|------------------------|------------------|---------------------|
| K ⁺ -Kanal-Blockade (u. a.) | 4-Aminopyridin | 100 × 10 ⁻³ | H ₂ O | Sigma ^a |
| Rezeptorantagonisten | | | | |
| kompetitiv NMDA | D-AP5 | 10 × 10 ⁻³ | H ₂ O | Tocris ^b |
| kompetitiv AMPA | CNQX | 10 × 10 ⁻³ | DMSO | Tocris |
| Gap Junction Blocker | | | | |
| | Carbenoxolon | 50 × 10 ⁻³ | H ₂ O | Sigma |
| | Heptan-1-ol | 2 | — | Sigma |
| | Octan-1-ol | 2 | — | Sigma |
| | Mefloquin | 50 × 10 ⁻³ | H ₂ O | Sigma |

^a Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, Missouri, USA

^b Tocris Bioscience, Bristol, UK

Tabelle 2.9 Verwendete Pharmaka: Konzentration und Wirkmechanismus

2.4.1 Extrazelluläre Ableitungen

Für die extrazellulären Messungen wurden im Gehirnschnittpräparat zunächst die Schichten des Cortex unter dem Mikroskop von einander abgegrenzt. Danach wurde eine bipolare

²³NI PCI-6024E, National Instruments Corporation, Austin, Texas, USA

| Substanz | Summenformel | IUPAC-Name |
|----------------|-----------------------|--|
| 4-Aminopyridin | $C_5H_6N_2$ | Pyridin-4-amin |
| D-AP5 | $C_5H_{12}NO_5P$ | 2-amino-5-phosphonopentansäure |
| CNQX | $C_9H_4N_4O_4$ | 7-nitro-2,3-dioxo-1,4-dihydroquinoxalin-6-carbonitril |
| Carbenoxolon | $C_{34}H_{50}O_7$ | (2S,4aS,6aS,6bR,8aR,10S,12aS,12bR,14bR)-10-(3-carboxypropanoyloxy)-2,4a,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-13-oxo-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,12b,13,14b-icosahydropicen-2-carboxylsäure |
| 1-Heptanol | $C_7H_{16}O$ | Heptan-1-ol |
| 1-Octanol | $C_8H_{18}O$ | Octan-1-ol |
| Mefloquin | $C_{17}H_{16}F_6N_2O$ | (S)-[2,8-bis(trifluoromethyl)quinolin-4-yl]-[(2R)-piperidin-2-yl]methanol |

Tabelle 2.10 Verwendete Pharmaka: Summenformeln und IUPAC-Namen

Stimulationselektrode vorsichtig in der Schicht V platziert. Die Ableitelektrode wurde auf einer gedachten, senkrechten Verbindungslinie zwischen Stimulationselektrode und Oberfläche des Cortex in die Schicht II/III eingebracht. Über die Stimulationselektrode wurde alle 20 Sekunden ein Strompuls von 250-500 μ A (Dauer: 50-100 μ s) appliziert und die evozierten neuronalen Antworten für 20 Minuten auf dem Oszilloskop überwacht. Nach Stabilisierung von Amplitude und Zeitverlauf des Signals wurde die Reizung beendet und die eigentliche Messung über 170 Minuten gestartet und aufgezeichnet. Tabelle 2.11 gibt das Messprotokoll wieder.

| Messzeit [min] | Ablauf | Konz. [μM] |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Elektrodenpositionierung | Pulsgabe 30 min | |
| 0 | START | |
| | + 4-Aminopyridin | 100 |
| | + CNQX | 10 |
| | + D-AP5 | 10 |
| 30 | + GJ.-Blocker | verschieden |
| 90 | – GJ.-Blocker ^a | |
| 170 | STOP | |

^a Auswaschen, keine Rezirkulation der Perfusionslösung für 15 min

Tabelle 2.11 Feldpotential-Messungen: Messprotokoll

2.4.2 Kombinierte intra- und extrazelluläre Ableitungen

Patch-Clamp-Technik Sämtliche intrazellulären Ableitungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik vorgenommen. Die Patch-Clamp-Technik wurde ab dem Jahr 1976 von NEHER und SAKMANN entwickelt, die für ihre Arbeit 1991 mit dem »Nobelpreis für Physiologie oder Medizin« ausgezeichnet wurden. Ihr Prinzip beruht darauf, dass ein »Fleck« (Patch) einer biologischen Membran mit einer speziellen, extrem glatten und nur einmal verwendeten Mikropipette so angesaugt wird, dass zwischen Pipette und Zellmembran ein elektrischer Widerstand im $G\Omega$ -Bereich entsteht. Dieser wird als »Gigaseal« (seal: Dichtung) bezeichnet (HAMILL et al., 1981). Im Vergleich zu früheren Techniken ermöglicht das Patch-Clamping somit die elektrische und mechanische Isolierung eines Membranflecks von seiner Umgebung, die sich durch eine hohe Stabilität und drastische Reduktion des elektrischen Rauschens bei Messvorgängen auszeichnet. Erst diese Vorgehensweise ermöglichte zahlreiche Errungenschaften elektrophysiologischer Forschung, wie die genaue Untersuchung einzelner Ionenkanäle, aber auch die Aufklärung intrazellulärer Signalkaskaden (VERKHRATSKY et al., 2006). Grundsätzlich sind mit der Patch-Clamp-Technik durch unterschiedliche Manipulation verschiedene Konfigurationen zwischen Membran und Pipette möglich, die je nach Fragestellung variiert werden

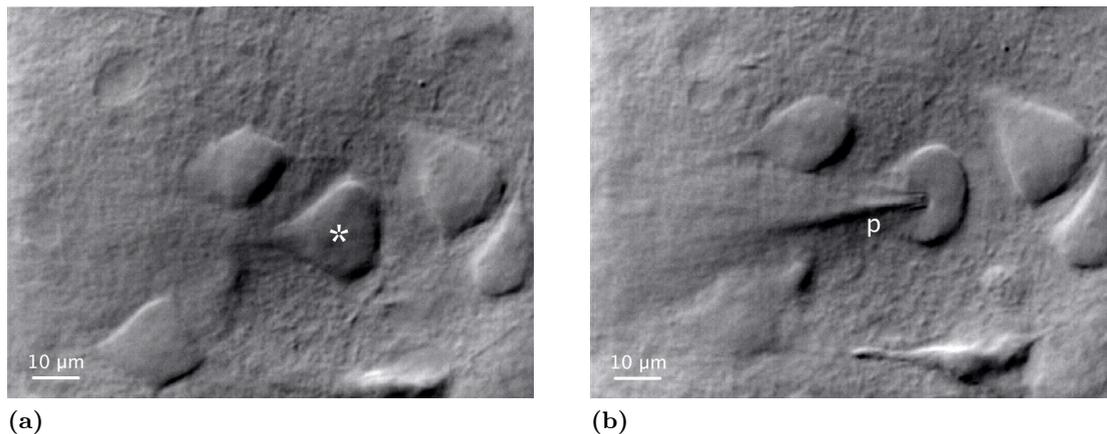


Abbildung 2.1 (a)-(b): Interneuron der Schicht V (Stern) im DIC-Infrarotbild, Vergrößerung 160-fach, (a) vor Messbeginn, (b) selbes Neuron, nach Herstellung des Gigaseals mit der Messpipette »p« in Ganzzell-Konfiguration.

können. In dieser Arbeit wurden intrazelluläre Ableitungen im Ganzzell-Modus (Whole-Cell-Konfiguration) vorgenommen. Dies bedeutet, dass ein Membranfleck angesaugt (Cell-attached-Konfiguration) und dann durch erneutes Ansaugen durchbrochen wird (Whole-Cell-Konfiguration), wodurch eine direkte Verbindung zwischen der Messpipette und dem Zellinneren entsteht. Bleibt hierbei der Seal erhalten, sind die Leckströme gering und es lässt sich nun messen, welcher Strom durch die gesamte verbleibende Membranfläche der Zelle fließt. Es werden also gut isolierte und haltbare Ableitungen des Membranpotentials der »gepatchten« Zelle möglich, die darüber hinaus Möglichkeiten zur elektrischen Manipulation bieten.

Durchführung der Messungen Alle intrazellulären Messungen wurden mit extrazellulären Ableitungen kombiniert, so dass für jedes untersuchte Neuron das Membranpotential der Zelle mit dem Feldpotential des gesamten Gehirnschnittpräparates korreliert werden konnte. Diese kombinierten Patch-Clamp- und Feldpotential-Messungen wurden an Neuronen der Schichten II bis V des frontalen Cortex durchgeführt. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf supra- und infragranulären Pyramidenzellen.

Nach Auswahl einer geeigneten Zelle unter dem Mikroskop wurde zunächst die Feldelektrode in die Badlösung eingetaucht und vorsichtig, nahe dem interessierenden Neuron, im Extrazellularraum platziert. Im Anschluss wurde die Patch-Pipette in die Badlösung gebracht. Sie wurde senkrecht über dem zu messenden Neuron positioniert und schrittweise

vorsichtig herabgefahren. Dabei war an der Pipettenspitze über ein Schlauchsystem mit aufgesetzter Spritze²⁴ (1 mL) ein Überdruck angelegt, der ein Ansaugen kleinster Partikel in der Messkammer verhinderte und beim Durchfahren des Gehirnschnittpräparates umliegendes Gewebe beiseite drückte. Zur Erfassung des elektrischen Widerstandes wurde über die Elektrode ständig ein Rechteckstrompuls (30 pA, 60 ms) in den Extrazellarraum abgegeben. Bei 160-facher mikroskopischer Vergrößerung wurde in wenigen Mikrometer Entfernung zur Zelle der Überdruck weggenommen und die Pipette soweit abgesenkt, bis sich auf dem Oszilloskop eine Widerstandserhöhung zeigte. Zeitgleich zur Widerstandserhöhung konnte an der Zelle selbst meist ein sichtbares Eindellen der Zellmembran (dimpling) beobachtet werden. Hierauf wurde umgehend ein Unterdruck an die Pipette gelegt, die Zellmembran somit in die Pipettenspitze gesaugt und der Gigaseal etabliert, was das Zustandekommen der Cell-Attached-Konfiguration anzeigte. Durch minimale Erhöhung des Sogs oder Abgabe eines entsprechenden Strompulses wurde der gepatchte Membranfleck durchbrochen und die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt, der elektrische Widerstand fiel hierbei in den $M\Omega$ -Bereich ab. Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft den Blick durch das Mikroskop unmittelbar vor und nach Herstellung einer Ableitesituation.

Nach Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration erfolgte die weitere Messung im Current-Clamp-Modus. Zunächst wurden mit Hilfe vordefinierter, softwaregesteuerter Messalgorithmen Parameter zur elektrophysiologischen Charakterisierung des Neurons ermittelt (Ruhemembranpotential RMP , Eingangswiderstand R_N , somatische Membranzeitkonstante τ , Entladungsverhalten und Strom-Spannungs-Kennlinie (IV -Kurve)). Im Anschluss wurde das Membranpotential der Zelle für 5 Minuten beobachtet. Bei regelrechtem und stabilem RMP wurde die eigentliche Messung zur pharmakologisch induzierten, synchronisierten neocorticalen Aktivität gestartet. Das Messprotokoll ist in Tabelle 2.12 wiedergegeben. Über die gesamte Messdauer wurden das Membranpotential des Neurons, die applizierten Ströme und die extrazellulär abgeleiteten Feldpotentiale fortlaufend digitalisiert und zur Auswertung gespeichert.

²⁴Omnifix-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

| Messzeit [min] | Prozedere | Konz. [μM] |
|------------------------------|--|-------------------------|
| Positionierung Feldelektrode | | |
| Whole-Cell-Konfiguration | Bestimmung der Parameter zur Zellcharakterisierung | |
| 0 | START Beobachtung des <i>RMP</i> | |
| 5 | + 4-Aminopyridin | 100 |
| | + CNQX | 10 |
| | + D-AP5 | 10 |
| 35 | STOP | |

Tabelle 2.12 Kombinierte Patch-Clamp- und Feldpotential-Ableitungen: Messprotokoll

2.5 Datenauswertung

Software Zur Steuerung der Signalverstärker wurde CellWorks 5.1²⁵ eingesetzt. Es diente auch der Digitalisierung der Meßdaten, die in das ASCII-Format konvertiert und in Igor Pro 6²⁶ importiert wurden, mit dem die elektrophysiologische Analyse erfolgte. Hierbei wurde das Analysepaket NeuroMatic 1.91²⁷ verwendet. Die Sortierung der Daten sowie Berechnungen erfolgten mit Excel²⁸ 2007 und 2011. In GraphPad Prism 5²⁹ wurden die Daten statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt.

²⁵npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland

²⁶WaveMetrics Inc., Portland, Oregon, USA

²⁷Jason Rothman, ThinkRandom.com

²⁸Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

²⁹GraphPad Software, La Jolla, California, USA

Neuronenklassifizierung Die intrazellulär abgeleiteten Zellen wurden anhand morphologischer und elektrophysiologischer Parameter (MCCORMICK et al., 1985) folgenden Neuronenklassen zugeordnet:

- Supragranuläre Pyramidenzellen
- Infragranuläre Pyramidenzellen
- Interneurone

Pyramidenzellen wurden nur den ersten beiden Gruppen zugeordnet, wenn sie ein reguläres Entladungsverhalten zeigten. Die morphologische Zuordnung erfolgte anhand eines oder mehrerer DIC-Infrarotbilder. Die elektrophysiologische Zuordnung geschah anhand folgender Parameter:

- Ruhemembranpotential (RMP)
- Eingangswiderstand (R_N)
- Somatische Membranzeitkonstante (τ)
- Entladungsverhalten
- Strom-Spannungs-Kennlinie (IV -Kurve)

R_N und τ werden auch als »passive elektrotonische Eigenschaften« bezeichnet. Zu ihrer Messung wurde im Current-Clamp-Modus ein hyperpolarisierender Rechteckstrompuls (20 pA, 800 ms) intrazellulär injiziert und die resultierende Spannungsantwort gemessen. Zur Rauschunterdrückung wurden 20 dieser Antworten gemittelt. Die Bestimmung des RMP erfolgte durch Messung der absoluten Potenzialamplitude zur Referenz (0 mV) unmittelbar vor der Strominjektion. Hiermit ergab sich R_N aus dem OHMSCHEN Gesetz; $R_N = \Delta V \times \Delta I^{-1}$ mit $\Delta I = 20$ pA. Die Spannungsdifferenz ΔV entsprach der Amplitude der durch den Strompuls induzierten Spannungsantwort, gemessen mindestens 700 ms nach Beginn der Strominjektion, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Spannungsantwort ein Gleichgewicht erreicht hatte. Die somatische Membranzeitkonstante τ wurde durch Anpassen einer exponentiellen Funktion an den Spannungsabfall nach Ausschalten des Strompulses ermittelt. Zur Beurteilung des Entladungsverhaltens und Erstellung der IV -Kurve wurde das Neuron schrittweise mit überschwellig depolarisierenden Strompulsen gereizt (WAGNER, 2012; WERTHAT, 2012).

Erfassung der synchronisierten neocorticalen Aktivität Die synchronisierte neocorticale Aktivität wurde als wellenförmige Abweichung vom desynchronisierten Feldpotential bzw. als wellenförmige Abweichung vom Ruhemembranpotential des intrazellulär abgeleiteten Neurons definiert. Für die Detektion wurden die digitalisierten Ableitungen manuell nach Ereignissen abgesucht und diese jeweils mit ihrer Amplitude A , Dauer Δt und dem Zeitpunkt des Auftretens ab Messbeginn erfasst. Bestand ein Ereignis aus Amplituden in positiver und negativer Richtung, so gibt die Amplitude A im Regelfall den Betrag der Gesamtamplitude wieder (Maximum-Minimum-Abstand). Ausgenommen hiervon ist die Bestimmung des Umkehrpotentials, bei der die Richtung der Amplitude berücksichtigt wurde (bei positiver und negativer Amplitude innerhalb desselben Ereignisses wurde die Differenz gebildet). In die Auswertung einbezogen wurden alle Ereignisse, die vom desynchronisierten Feldpotential bzw. vom Ruhemembranpotential des Neurons abwichen, charakteristisch für die Aktivität waren und nicht einem Artefakt zugeordnet werden mussten. Für die Feldpotentialableitungen galt als Richtwert für die Mindestamplitude ein Betrag von ≥ 0.05 mV. Bei beiden Messungen wurden Nachpotentiale direkt im Anschluss an die Hauptaktivität dieser zugeordnet und nicht als gesonderte Ereignisse gewertet. Ebenso stellten Aktionspotentiale keine eigenständigen Ereignisse dar, unabhängig davon, ob sie mit einem Ereignis oder ektop auftraten. Synchron zur intrazellulären Messung wurde das Feldpotential und der über die Patchpipette applizierte Strom registriert. Abbildung 2.2 zeigt repräsentative Beispiele für gemessene Parameter anhand eines kombiniert intra- und extrazellulär abgeleiteten Ereignisses.

Statistische Analyse Die im Ergebnisteil der Arbeit wiedergegebenen Mittelwerte sind mit Standardfehler (\pm) angegeben. Zur statistischen Analyse kamen folgende Verfahren zur Anwendung:

- Einfaktorielle Varianzanalyse (einfache ANOVA) für nicht-wiederholte Messungen
- Einfaktorielle Varianzanalyse (einfache ANOVA) für Messwiederholungen
- Zweifaktorielle Varianzanalyse (zweifache ANOVA) für Messwiederholungen
- Lineare Regression

Sollten in den Varianzanalysen die Mittelwerte einzelner Gruppen einer oder mehrerer Messreihen untereinander verglichen werden, wurde das jeweils geeignete Nachtestverfahren (nach BONFERRONI für den Vergleich mehrerer Gruppen gegeneinander, nach

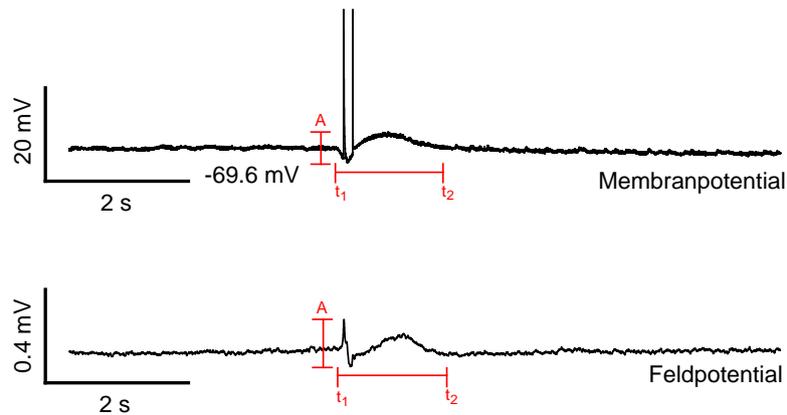


Abbildung 2.2 Ausmessen eines Ereignisses in synchronen intra- und extrazellulären Ableitungen; $A_{iz} = 6.05 \text{ mV}$, $\Delta t_{iz} = 1.50 \text{ mV}$, $A_{ez} = 0.18 \text{ mV}$, $\Delta t_{ez} = 1.47 \text{ mV}$. Mit Ausnahme der Umkehrpotentialbestimmung wurden die Amplituden als Maximum-Minimum-Abstand gemessen. Aktionspotentialentladungen gehen nicht in die Auswertung ein.

DUNNETT für den Vergleich mehrerer Interventionsgruppen gegen genau eine Kontrollgruppe) eingesetzt, um eine α -Fehler-Kumulierung zu vermeiden. Für die einfachen Varianzanalysen sind für das Signifikanzniveau P -Werte, für die Nachtestverfahren die 95-Prozent-Konfidenzintervalle angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 Prozent für alle Untersuchungen festgelegt ($P < 0.05$). Testergebnisse mit $P < 0.05$ sind in Abbildungen durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Blockiert man in *in vitro* Experimenten an Gehirnschnittpräparaten von Säugetieren die glutamaterge synaptische Transmission durch D-AP5 (NMDA-Rezeptoren) und CNQX (AMPA/Kainat-Rezeptoren) und appliziert den K^+ -Kanal-Blocker 4-Aminopyridin (4-AP), kann mittels Feldpotentialmessungen und/oder intrazellulären Ableitungen eine synchronisierte neuronale Aktivität beobachtet werden (THESLEFF, 1980; RUTECKI et al., 1987; YANG und BENARDO, 2002). Diese Aktivität lässt sich auch in der Großhirnrinde erzeugen und breitet sich vom Zentrum ihrer Entstehung wellenhaft über den gesamten Neocortex aus (ARAM et al., 1991; BENARDO, 1997; DEFazio und HABLITZ, 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006). Sie ist synaptischen Ursprungs und wird durch $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelt (ARAM et al., 1991; AVOLI et al., 1994). Diese Ereignisse werden im Folgenden als »GABA-Wellen« bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese GABA-Wellen an Wildtyp-, CX36KO- und Cx45KO-Mäusen untersucht. Die Ergebnisse werden in zwei Abschnitten dargestellt: Abschnitt 3.1 beschreibt den Zeitverlauf der GABA-Wellen sowie die Korrelation zwischen extrazellulär registrierter Netzwerkaktivität und rhythmischer Aktivität in einem einzelnen Neuron. In Abschnitt 3.2 wird die Entwicklung der GABA-Wellen in langdauernden Feldpotentialmessungen (170 Minuten) und ihre pharmakologische Beeinflussbarkeit durch Gap Junction Blocker beschrieben.

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der GABA-Wellen

Zur Charakterisierung der GABA-Wellen wurden simultan Einzelzellmessungen und Feldpotentialregistrierungen an Gehirnschnittpräparaten des frontalen Cortex von Mäusen

(P16-P30) mit unterschiedlichem Genotyp durchgeführt. Die abgeleiteten Neurone der Genotypen Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO wurden morphologisch und elektrophysiologisch klassifiziert. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf supra- und infragranulären Pyramidenzellen. Im Anschluss wurde die durch 4-AP induzierte, synchronisierte neocorticale Aktivität über einen Zeitraum von 30 Minuten untersucht.

3.1.1 Beschreibung der untersuchten Neuronenpopulation

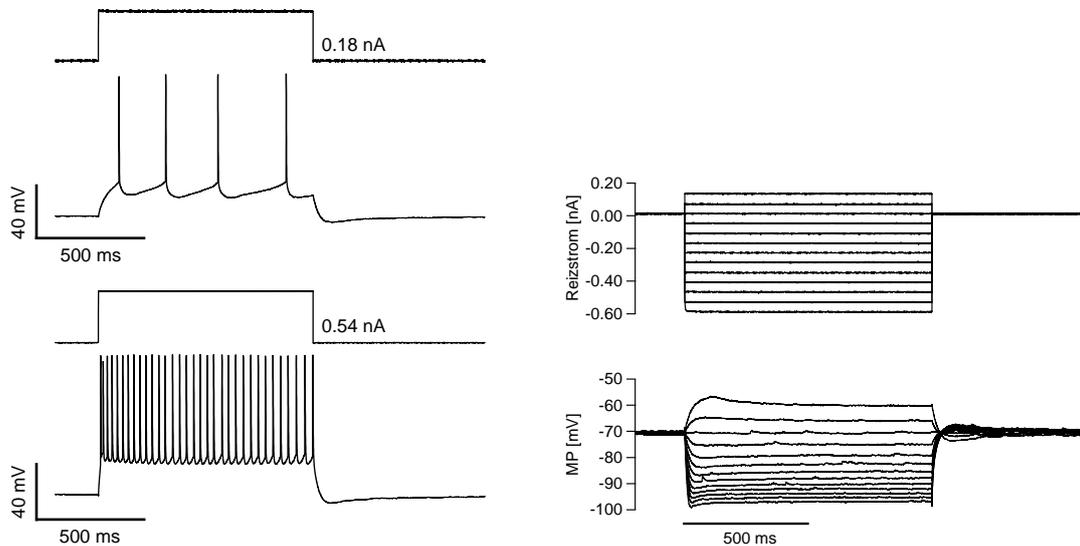
Es wurden 94 Neurone der Schichten II bis V aller drei Genotypen intrazellulär abgeleitet und nach morphologischen und elektrophysiologischen Kriterien klassifiziert (MCCORMICK et al., 1985). Die Charakterisierung der Zellen ergab eine Aufteilung in folgende Untergruppen:

- Supragranuläre Pyramidenzellen, reguläres Entladungsverhalten (PyrRS supra.)
- Infragranuläre Pyramidenzellen, reguläres Entladungsverhalten (PyrRS infra.)
- Interneurone, alle Subtypen, Schichten II bis V

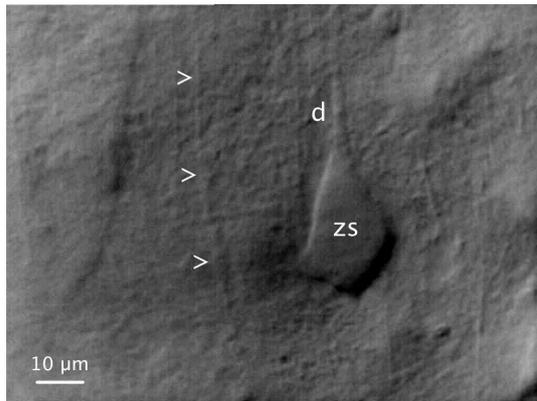
Die Gruppe der Interneurone war somit sehr heterogen, so dass ihre Subtypen nicht für Gruppenvergleiche herangezogen wurden. Von den abgeleiteten Pyramidenzellen wurden vier als sog. »bursting pyramidal cells« identifiziert. Bei überschwelliger Depolarisation traten in diesen Neuronen zu Beginn des Strompulses kurze, hochfrequente Aktionspotentialentladungen (»bursts«) auf. Dieser Neurontyp kommt selten vor und wurde daher keiner der genannten Gruppen zugeordnet.

3.1.1.1 Die Neuronencharakterisierung am Beispiel einzelner Zellen

Für jedes untersuchte Neuron wurden zur Charakterisierung neben dem Eingangswiderstand die Parameter Entladungsverhalten, DIC-Infrarotbild und Strom-Spannungs-Beziehung ermittelt. Die Abbildungen 3.1 (supragranuläre Pyramidenzelle, Schicht III, Cx36KO), 3.2 (infragranuläre Pyramidenzelle, Schicht V, Cx45KO) und 3.3 (regulär entladendes Interneuron, Schicht IV, Cx36KO) zeigen diese Parameter exemplarisch für je ein Neuron aus den drei genannten Neuronenklassen. Im Vergleich der Abbildungen 3.1a/3.2a mit den Abbildungen 3.1b/3.2b (Entladungsverhalten) sowie 3.1d und 3.2d

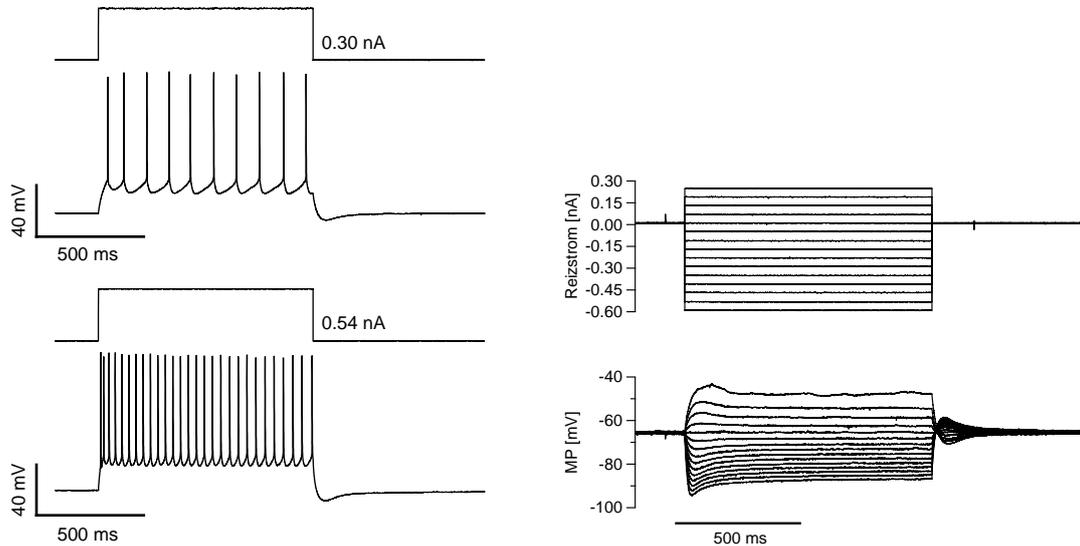


(a) Entladungsverhalten des Neurons in Abhängigkeit von der Reizstromstärke. (b) Übereinandergelagerte Rechteckstrompulse (oben) und entsprechende Spannungsantworten des Neurons (unten).



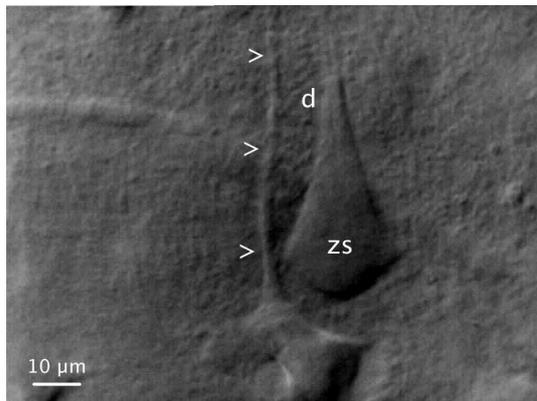
(c) Zellsoma »zs« und apikaler Dendrit »d« im DIC-Infrarotbild. (d) Strom-Spannungs-Beziehung, rot: initiale Phase, blau: steady state.

Abbildung 3.1 (a)-(d): Charakterisierung einer supragranulären Pyramidenzelle, Schicht III, Cx36KO; RMP : -70.9 mV, R_N : 73.55 M Ω , τ : 20.45 ms. (c) Die Pfeilspitzen (»><«) kennzeichnen einen weiteren Neuriten (Axon oder Dendrit), der Richtung *Pia mater* (oberer Bildrand) verläuft.



(a) Entladungsverhalten des Neurons in Abhängigkeit von der Reizstromstärke.

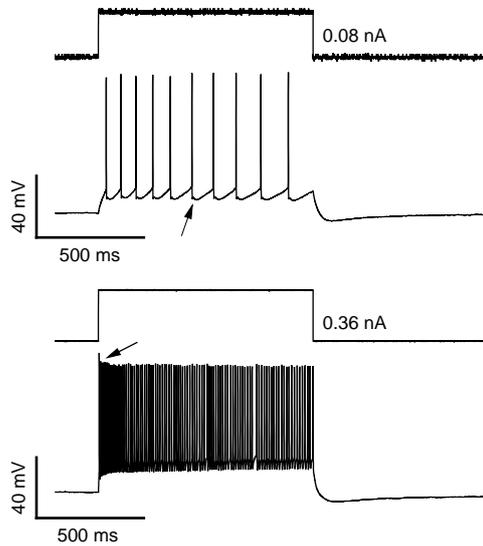
(b) Übereinandergelagerte Rechteckstrompulse (oben) und entsprechende Spannungsantworten des Neurons (unten).



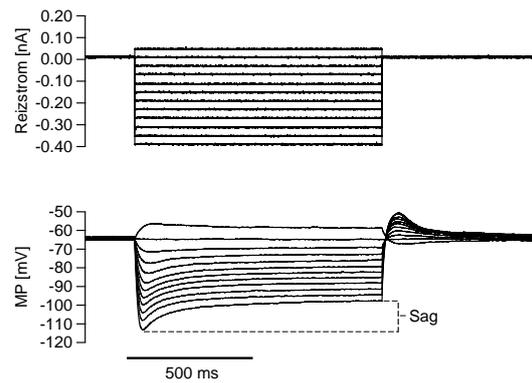
(c) Zellsoma »zs« und apikaler Dendrit »d« im DIC-Infrarotbild.

(d) Strom-Spannungs-Beziehung, rot: initiale Phase, blau: steady state.

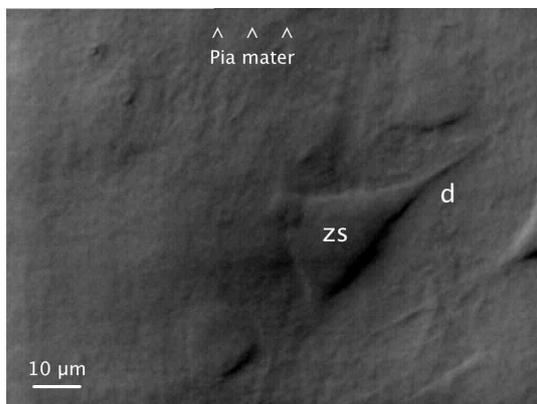
Abbildung 3.2 (a)-(d): Charakterisierung einer infragranulären Pyramidenzelle, Schicht V, Cx45KO; RMP : -66.4 mV, R_N : 49.61 M Ω , τ : 14.85 ms. (c): Die Pfeilspitzen (>>) kennzeichnen einen weiteren Dendriten, der Richtung *Pia mater* (oberer Bildrand) verläuft.



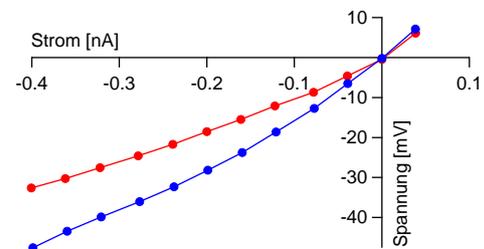
(a) Entladungsverhalten des Neurons in Abhängigkeit von der Reizstromstärke.



(b) Übereinandergelagerte Rechteckstimpulse (oben) und entsprechende Spannungsantworten des Neurons (unten).



(c) Zellsoma »zs« im DIC-Infrarotbild.



(d) Strom-Spannungs-Beziehung, rot: initiale Phase, blau: steady state.

Abbildung 3.3 (a)-(d): Regulär entladendes Interneuron, Schicht IV, Cx36KO.

(Strom-Spannungs-Beziehung) wird deutlich, wie sich supra- und infragranuläre Pyramidenzellen in ihren elektrophysiologischen Charakteristika ähnelten. Morphologisch wiesen beide Zellen (vgl. Abb. 3.1c und 3.2c) das typische, pyramidenförmige Zellsoma (zs) sowie den kräftigen Stamm des apikalen Dendritenbaumes (d) auf, der Richtung *Pia mater* (oberer Bildrand) verläuft. Es zeigte sich außerdem, dass infragranuläre Pyramidenzellen deutlich größer waren als supragranuläre Pyramidenzellen.

Am Beispiel eines regulär entladenden Interneurons (s. Abb. 3.3) werden typische Unterschiede zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen deutlich. Morphologisch fällt in Abbildung 3.3c das Fehlen des apikalen Dendritenbaumes auf; der sichtbare Dendrit ist nicht, wie bei Pyramidenzellen üblich (s. Abb. 3.1c und 3.2c) zur Cortexoberfläche (oberer Bildrand) orientiert. Elektrophysiologisch erkennt man hinsichtlich des Entladungsverhaltens die für einige Interneurone typische schnelle Nachhyperpolarisation nach dem Aktionspotential (Abbildung 3.3a, oberer Pfeil). Außerdem zeigte sich eine im Vergleich insgesamt höhere Aktionspotentialfrequenz bei gleichen Reizstromstärken sowie eine Abnahme von Amplitude und Frequenz der Aktionspotentiale mit der Zeit (s. Abb. 3.3a, unterer Pfeil). In Abbildung 3.3b erkennt man, wie durch den größten hyperpolarisierenden Strompuls in der Spannungsantwort zunächst ein negatives Maximum entstand, das mit der Zeit auf ein positiveres, neues Gleichgewicht abfiel. Dieser Abfall wird als »Sag« bezeichnet (STAFSTROM et al., 1984). Seine Ursache ist ein langsam aktivierender und einwärtsgerichteter Kationenstrom (H - oder Q -Strom), der durch die Hyperpolarisation des Membranpotentials angeregt wird (CONSTANTI und GALVAN, 1983). Dieser »Sag« war bei Interneuronen des Neocortex deutlich länger und stärker ausgeprägt als bei Pyramidenzellen (zum Vergleich s. Abb. 3.1b und 3.2b).

3.1.1.2 Betrachtung der untersuchten Neuronenpopulation insgesamt

Die Tabelle 3.1 zeigt die Anzahl n , das Alter (Tage P postnatal) sowie die erhobenen elektrophysiologischen Parameter Ruhemembranpotential (RMP), Eingangswiderstand (R_N) und somatische Membranzeitkonstante (τ) der drei Neuronenklassen in den Genotypen Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO. Genotypübergreifend wurden insgesamt 46 supragranuläre Pyramidenzellen mit regulärem Entladungsverhalten abgeleitet. Das RMP lag bei -68 ± 0.65 mV, R_N bei 132 ± 6.6 M Ω , τ bei 26 ± 1.1 ms und das Alter bei $P22 \pm 0.46$ Tagen. Die Gesamtzahl infragranulärer Pyramidenzellen betrug 25, das RMP lag bei -66 ± 0.54 mV, für R_N ergaben sich 113 ± 9.0 M Ω , für τ 23 ± 1.4 ms, für das Alter

| Genotyp | Parameter | PyrRS supra. | PyrRS infra. | Interneurone |
|---------|---------------------|----------------|----------------|---------------|
| Wildtyp | n | 18 | 9 | 4 |
| | RMP [mV] | -68 ± 1.1 | -65 ± 0.78 | -74 ± 3.2 |
| | R_N [M Ω] | 127 ± 7.7 | 105 ± 19 | 147 ± 31 |
| | τ [ms] | 25 ± 1.5 | 23 ± 2.2 | 16 ± 5.8 |
| | Alter [P] | 20 ± 0.47 | 22 ± 0.7 | 21 ± 0.95 |
| Cx36KO | n | 20 | 7 | 8 |
| | RMP [mV] | -69 ± 0.81 | -66 ± 1.3 | -67 ± 1.2 |
| | R_N [M Ω] | 118 ± 11 | 131 ± 9.0 | 107 ± 24 |
| | τ [ms] | 23 ± 1.6 | 26 ± 3.3 | 24 ± 3.5 |
| | Alter [P] | 24 ± 0.64 | 24 ± 0.92 | 22 ± 1.0 |
| Cx45KO | n | 8 | 9 | 7 |
| | RMP [mV] | -67 ± 1.9 | -66 ± 0.91 | -68 ± 1.5 |
| | R_N [M Ω] | 179 ± 12 | 107 ± 15 | 162 ± 26 |
| | τ [ms] | 31 ± 5.9 | 21 ± 2.1 | 24 ± 3.7 |
| | Alter [P] | 22 ± 1.2 | 23 ± 1.4 | 21 ± 1.7 |

Tabelle 3.1 Charakterisierung der Neuronenpopulation: Wildtyp, CX36KO, Cx45KO. n : Anzahl, RMP : Ruhemembranpotential, R_N : Eingangswiderstand, τ : somatische Membranzeitkonstante, P : Tage postnatal.

P23 \pm 0.61 Tage. Insgesamt wurden 19 Interneurone abgeleitet. Hierunter befanden sich 13 Interneurone mit regulärem Entladungsverhalten (regular spiking non-pyramidal neurons), vier Interneurone mit verzögertem Entladungsverhalten (late spiking interneurons), zwei schnell entladende Interneurone (fast spiking interneurons) und ein Interneuron mit niedrigschwelligem Entladungsverhalten (low threshold spiking interneuron) (McCORMICK et al., 1985). In der Interneuron-Gruppe lag das *RMP* bei -69 ± 1.2 mV, für R_N ergaben sich 136 ± 15 M Ω und für τ 23 ± 2.3 ms. Das Alter der Schnittpräparate lag bei P22 \pm 0.77 Tagen.

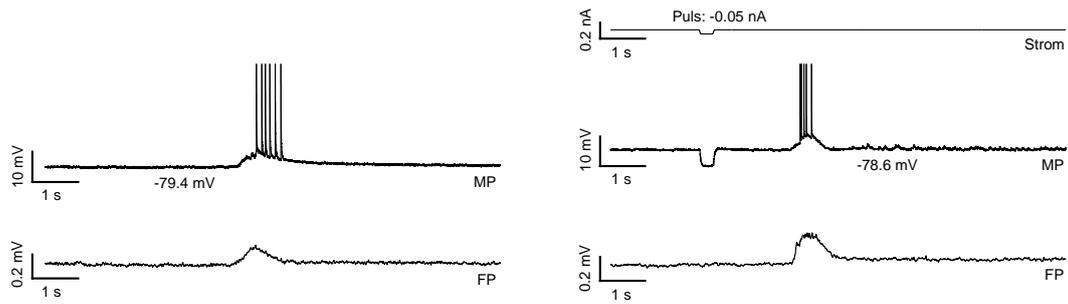
3.1.2 Der Zeitverlauf der GABA-Wellen

Zunächst sollte der typische Zeitverlauf der GABA-Wellen in intra- und extrazellulären Ableitungen beschrieben werden. Dies geschah anhand von 31 langdauernden Feldpotentialableitungen sowie 100 simultanen intra- und extrazellulären Ableitungen über 30 Minuten. In allen drei untersuchten Genotypen waren in sämtlichen Messungen GABA-Wellen zu beobachten, wobei jedes derartige Ereignis durch seine Amplitude A und seine Dauer Δt definiert war. Sowohl intra- als auch extrazellulären Ereignissen folgten gelegentlich kleinere Nachpotentiale, was vor allem bei GABA-Wellen größerer Amplitude der Fall war und de- wie hyperpolarisierende Ereignisse gleichermaßen betraf. Die GABA-Wellen traten mit unterschiedlicher Polarität auf, wobei zwischen intra- und extrazellulären Ableitungen unterschieden werden musste.

3.1.2.1 Die Polarität der GABA-Wellen in intrazellulären Ableitungen

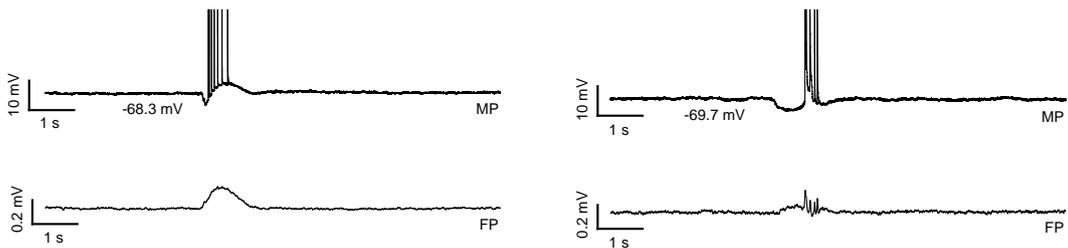
In intrazellulären Ableitungen konnten drei grundlegende Zeitverläufe von GABA-Wellen identifiziert werden:

- GABA-Wellen mit rein depolarisierender Komponente
- GABA-Wellen mit rein hyperpolarisierender Komponente
- GABA-Wellen mit depolarisierender und hyperpolarisierender Komponente



(a) Cx45-Knockout, Pyramidenzelle, Schicht III.

(b) Wildtyp, Pyramidenzelle, Schicht II/III.



(c) Cx36-Knockout, Pyramidenzelle, Schicht V.

(d) Cx36-Knockout, Pyramidenzelle, Schicht III.

Abbildung 3.4 (a)-(d): Repräsentative Zeitverläufe intrazellulärer GABA-Wellen, dargestellt mit der simultan abgeleiteten Feldpotentialmessung und in (b) mit Strominjektion in das Neuron. Aktionspotentiale sind nicht in voller Höhe abgebildet.

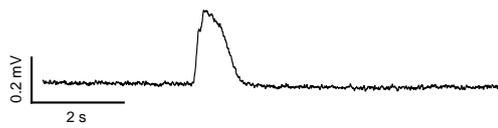
Eine GABA-Welle galt als beendet, sobald sich das Ruhemembranpotential wieder eingestellt hatte. Abbildung 3.4 zeigt repräsentative intrazelluläre Zeitverläufe von GABA-Wellen aus simultan abgeleiteten intra- und extrazellulären Messungen an neocorticalen Neuronen. In intrazellulären Ableitungen war die Polarität der GABA-Wellen eine Funktion des Membranpotentials zum Zeitpunkt ihrer Entstehung. Dies bedeutet, negativere Membranpotentiale führten zu depolarisierenden (s. Abb. 3.4a und 3.4b), positivere Membranpotentiale zu hyperpolarisierenden Ereignissen (s. Abb. 3.4d). Bei bestimmten Werten für das Membranpotential konnten GABA-Wellen mit positiver und negativer Komponente registriert werden (s. Abb. 3.4c). Somit existierte für die GABA-Wellen ein Umkehrpotential, auf das in Abschnitt 3.1.2.3 näher eingegangen wird. Ferner ist zu beachten, dass in Abbildung 3.4b für den intrazellulär applizierten Strompuls ein Korrelat in der intrazellulären Ableitung, nicht aber in der extrazellulären Ableitung existierte. Dies zeigt, dass es sich bei der Feldpotentialableitung tatsächlich um eine Messung des Summenpotentials einer Vielzahl von Neuronen handelte. In Bezug auf die Korrelation von Aktionspotentialentladung und GABA-Wellen konnten drei verschiedene Konstellationen unterschieden werden:

- Aktionspotentialentladung im Verlauf der GABA-Wellen
- Sporadische ektope Aktionspotentialentladungen ohne Bezug zu GABA-Wellen
- Dauerentladungen ektooper Aktionspotentiale ohne Bezug zu GABA-Wellen

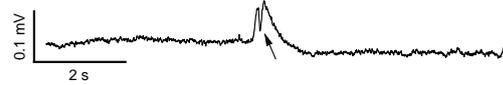
Aktionspotentialentladungen während der GABA-Wellen traten häufig auf und entstanden nicht nur aus depolarisierenden, sondern auch aus hyperpolarisierenden Ereignissen (s. Abb. 3.4d). Sporadische ektope Aktionspotentialentladungen ohne Bezug zu GABA-Wellen konnten ebenfalls häufig beobachtet werden; sie wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen ausführlich beschrieben (KEROS und HABLITZ, 2005). Ektope Aktionspotential-Dauerentladungen ohne Bezug zu GABA-Wellen stellten hingegen ein seltenes Ereignis dar. Auf eine mehrfach reversible, spontane Dauerentladung einzelner Neurone unter 4-AP wird in Abschnitt 3.1.2.4 näher eingegangen.

3.1.2.2 Die Polarität der GABA-Wellen in extrazellulären Ableitungen

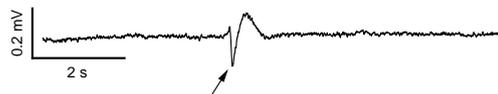
In Feldpotentialableitungen zeigten sich die GABA-Wellen als spontane, synchronisierte Spannungsabweichungen, deren Polarität durch die temporäre Stromquellen- und Stromsenkenverteilung im Extrazellulärraum bestimmt wurde. Diese beruhte auf der



(a) Amplitude positiv, ein Gipfel.



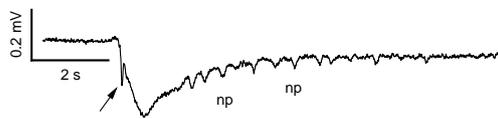
(b) Amplitude positiv, zwei Gipfel.



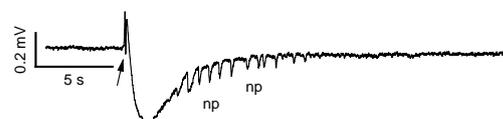
(c) Amplitude positiv-negativ-positiv.



(d) Amplitude positiv-negativ.



(e) Amplitude negativ, Nachpotentiale (»np«).



(f) Amplitude positiv-negativ, Nachpotentiale (»np«).

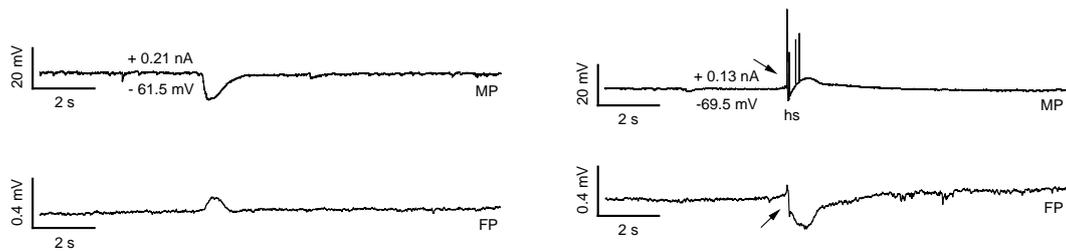
Abbildung 3.5 (a)-(f): Typische Zeitverläufe von GABA-Wellen in neocorticalen Feldpotentialableitungen. (b)-(f): Pfeile: Populations-Spikes. (e)-(f): »np«: Nachpotentiale.

synaptischen Aktivität in einer Vielzahl von Neuronen. Über lange Messzeiträume wurden außerdem charakteristische Veränderungen der Zeitverläufe als Ausdruck einer Umstrukturierung im GABAergen neocorticalen Netzwerk registriert. Auf sie wird in Abschnitt 3.2.1 im Rahmen der Analyse der langdauernden Feldpotentialmessungen eingegangen. Aus extrazellulären Ableitungen im Hippocampus (CA1) ist bekannt, dass die Aktionspotentialaktivität einer Zellpopulation in der Feldpotentialmessung als »Populations-Spike« (population spike) registriert werden kann (BUCKLE und HAAS, 1982). Solche Populations-Spikes waren sowohl in den simultan als auch einzeln abgeleiteten Feldpotentialen dieser Arbeit nachweisbar. Abbildung 3.5 zeigt Beispiele für typische Zeitverläufe extrazellulär abgeleiteter GABA-Wellen; die Pfeile markieren jeweils Populations-Spikes.

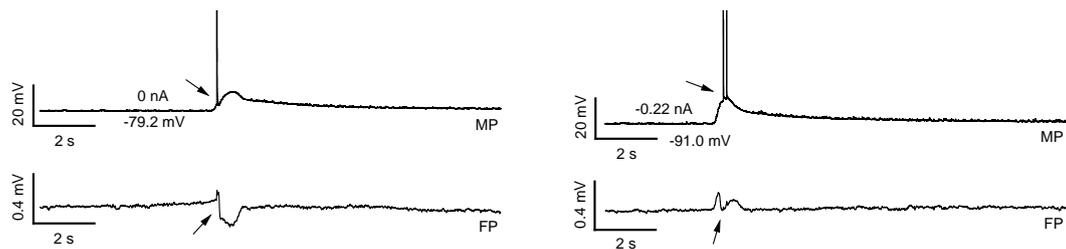
3.1.2.3 Das Umkehrpotential der GABA-Wellen

In intrazellulären Ableitungen ließen sich für positivere Ausgangsmembranpotentiale hyperpolarisierende, für negativere Ausgangsmembranpotentiale depolarisierende GABA-Wellen beobachten. Dieser Effekt trat auch auf, wenn das *RMP* im Current-Clamp-Modus manipuliert und über positive oder negative intrazelluläre Strominjektion auf neue Membranpotentiale eingestellt wurde. Beispiele für Zeitverläufe von GABA-Wellen auf unterschiedlich »geklemmten« Membranpotentialen im selben Neuron sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Hinsichtlich der Amplitudengrößen der GABA-Wellen ergab sich, dass diese eine lineare Funktion des Membranpotentials der Form $y = a + bx + u$ zum Zeitpunkt der Entstehung der GABA-Wellen waren. Die GABA-Wellen verfügten also über ein Umkehrpotential, das bestimmt werden sollte. In Abbildung 3.6 ist außerdem zu erkennen, wie auch aus hyperpolarisierenden GABA-Wellen Entladungen entstehen können (»hs«, 3.6b). Entladungen während der GABA-Wellen gehen mit Populations-Spikes in der simultan abgeleiteten Feldpotentialmessung einher (s. Abb. 3.6b, 3.6c, 3.6d; Pfeile).

Zur Bestimmung des Umkehrpotentials der GABA-Wellen wurden 1948 GABA-Wellen aus 48 Neuronen ausgewertet, die innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission entstanden waren. Wurden für jeden Genotyp (Wildtyp, Cx36KO, und Cx45KO) alle Neuronenklassen zusammengefasst betrachtet, ergab dies für den Wildtyp ein Umkehrpotential von -74 ± 1.6 mV, für den Cx36KO von -74 ± 0.91 mV und für den Cx45KO von -71 ± 2.4 mV. In der Varianzanalyse mit dem Nachtestverfahren nach BONFERRONI ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen (95 %-KI: für Wildtyp *vs.*



(a) Depolarisation auf -61.5 mV: rein negative GABA-Welle. (b) Depolarisation auf -69.5 mV: zu erkennen ist eine negative und eine positive Komponente.



(c) Ruhemembranpotential -79.2 mV: positive GABA-Welle. (d) Hyperpolarisation auf -91.0 mV: positive GABA-Welle.

Abbildung 3.6 (a)-(d): Beispiele für GABA-Wellen zur Bestimmung des Umkehrpotentials im selben Neuron (Pyramidenzelle, Schicht II/III, Cx36KO), 10-20 Minuten nach Substanzapplikation. (b): »hs«: Entladungen, die aus der Hyperpolarisation entstanden. (b)-(d): Pfeile: Aktionspotentiale simultan zum Populations-Spike in der Feldpotentialableitung.

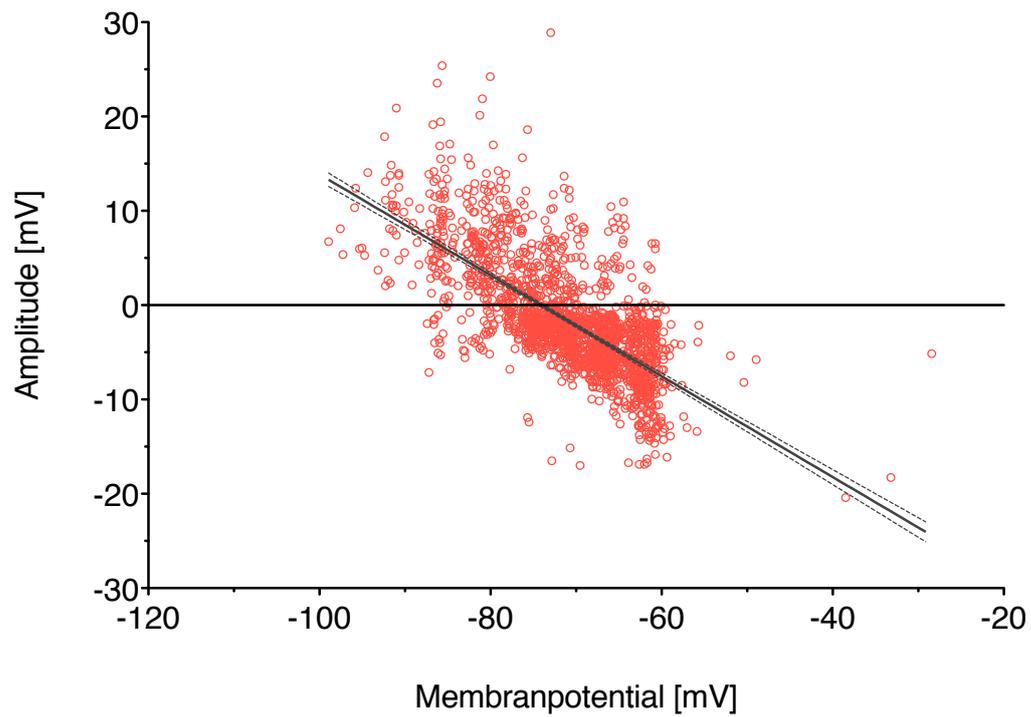


Abbildung 3.7 Regressionsgerade und 99-Prozent-Konfidenzband für das Umkehrpotential (-73.40 ± 0.83 mV) von 1948 GABA-Wellen (48 Neurone; Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO).

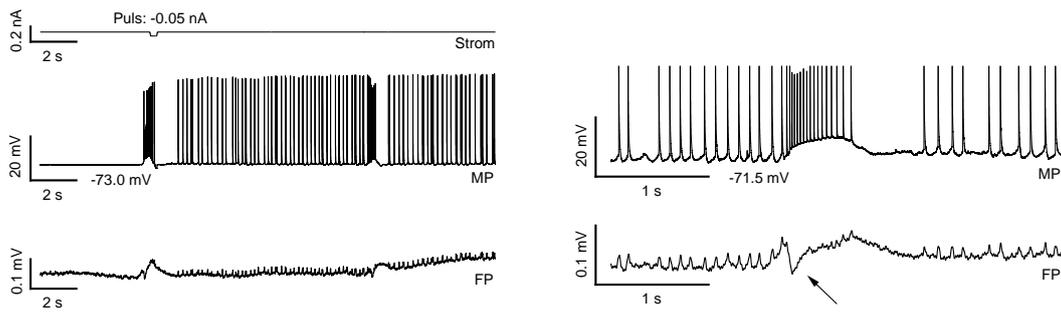
Cx36KO -4.232 bis 5.198 , für Wildtyp *vs.* Cx45KO -8.481 bis 3.089 und für Cx36KO *vs.* Cx45KO -8.652 bis 2.294). Wurde das Umkehrpotential einzelner Neuronenklassen (supragranuläre Pyramidenzellen (PyrRS supra.), infragranuläre Pyramidenzellen (PyrRS infra.), Interneurone) genotypübergreifend verglichen, so ergab sich für GABA-Wellen in supragranulären Pyramidenzellen ein Umkehrpotential von -75 ± 1.1 mV, in infragranulären Pyramidenzellen von -73 ± 1.1 mV und in der Gruppe der Interneurone von -71 ± 1.9 mV. Hier zeigte sich in der Varianzanalyse mit dem Nachtestverfahren nach BONFERRONI kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Neuronenklassen (95 %-KI: PyrRS supra. *vs.* PyrRS infra. -7.091 bis 3.076 , PyrRS supra. *vs.* Interneurone -9.437 bis 0.07328 und PyrRS infra. *vs.* Interneurone -8.066 bis 2.717).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zur Bestimmung des Umkehrpotentials insgesamt die Messungen aus den verschiedenen Neuronenklassen (PyrRS supra., PyrRS infra. und Interneurone) sowie Genotypen (Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO) zusammengefasst ausgewertet. Hiernach lag das zell- und genotypübergreifende Umkehrpotential der GABA-Wellen bei -73.40 ± 0.83 mV. Abbildung 3.7 zeigt die 1948 Datenpunkte mit der zugehörigen linearen Regressionsgerade und dem 99-Prozent-Konfidenzband. Die Steigung der Regressionsgeraden (-0.5349 ± 0.01263) war signifikant von Null verschieden ($P < 0.0001$), der Korrelationskoeffizient r nach PEARSON betrug -0.6925 .

3.1.2.4 Mehrfach reversible Dauerentladungen neocorticaler Neurone unter 4-Aminopyridin

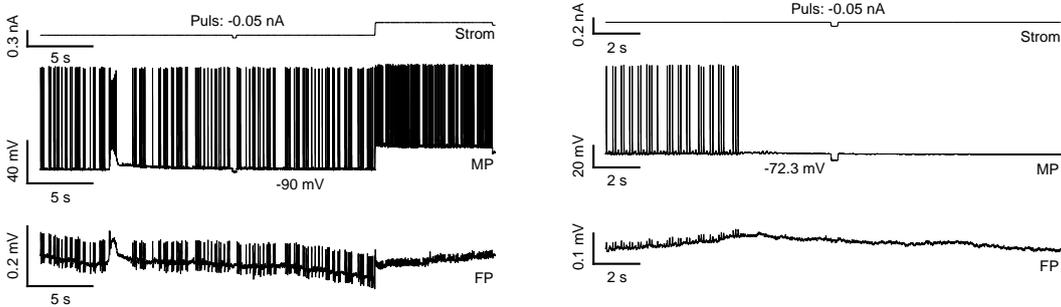
Innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission ließen sich neben GABA-Wellen auch ektope Aktionspotentiale identifizieren, die spontan aus dem Membranpotential generiert wurden und keinen Bezug zu GABA-Wellen hatten. Diese waren von Aktionspotentialen zu unterscheiden, die während der GABA-Wellen auftraten und sowohl aus der Depolarisation als auch aus der Hyperpolarisation entstehen konnten (Beispiele s. Abb. 3.6b, 3.6c und 3.6d). In der Regel handelte es sich bei ektopen Aktionspotentialen um sporadische Einzelereignisse oder kurze Entladungen (bursts), deren Ursache vermutlich eine generelle Absenkung der Erregungsschwelle in Neuronen durch 4-AP ist (KEROS und HABLITZ, 2005).

In der vorliegenden Arbeit allerdings konnten darüber hinaus sechs Neurone abgeleitet werden, die neben der Entstehung von GABA-Wellen auch eine – nach Aus- und wieder



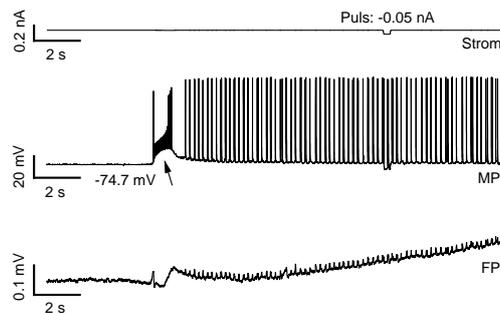
(a) 500 s nach Einwaschen von 4-AP, CNQX und D-AP5: Beginn von GABA-Wellen und ektope Aktionspotentialen.

(b) Ca. 60 s nach (a): Vergrößerte Ansicht einer GABA-Welle mit vor- und nachgelagerten ektope Aktionspotentialen während der GABA-Welle. Pfeil: Populations-Spike.



(c) Aktionspotentialentladungen auch unter Hyperpolarisation der Zellmembran auf -90 mV.

(d) 410 s nach Auswaschen der Pharmaka: Sistieren von GABA-Wellen und ektope Aktionspotentialen.



(e) 400 s nach erneutem Einwaschen der Pharmaka: erneut GABA-Wellen und ektope Aktionspotentialen.

Abbildung 3.8 (a)-(e): Reversibles ektope Entladungsverhalten unter 4-AP, FS-Interneuron, Schicht II, Wildtyp. Beachtenswert in technischer Hinsicht ist die in (c) erkennbare Abnahme der Frequenz des Aktionspotentialkorrelats in der Feldpotentialableitung bei Zunahme der intrazellulären Aktionspotentialfrequenz nach Rückkehr des Neurons auf das *RMP*. Dieser Effekt ist durch Filtereinstellungen am Signalverstärker bedingt. (e), Pfeil: Während der GABA-Welle steigt die Aktionspotentialfrequenz dergestalt, dass es zu einem Kurzschluss der Aktionspotentiale kommt.

Einwaschen der applizierten Pharmaka – mehrfach reversible, permanente Entladung von Aktionspotentialen zeigten. Solche Neurone wurden in jedem der drei Genotypen identifiziert ($3 \times$ Wildtyp, $2 \times$ Cx45KO und $1 \times$ Cx36KO). Es handelte sich um vier Pyramidenzellen mit regulärem und um eine Pyramidenzelle mit »burst«-artigem Entladungsverhalten (bursting pyramidal neuron, IB-Neuron) aus sowohl supragranulären ($n = 2$) wie infragranulären ($n = 3$) neocorticalen Schichten. Außerdem zeigte ein FS-Interneuron (fast spiking interneuron) der Schicht II dieses Entladungsverhalten. Exemplarisch ist dieses mehrfach reversible, spontane Entladungsverhalten in Abbildung 3.8 dargestellt: Unter Einfluss von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission entstanden sowohl GABA-Wellen, die in ihrem Zeitverlauf von Aktionspotentialen begleitet wurden, als auch eine andauernde, ektope Dauerentladung von Aktionspotentialen ohne Bezug zu GABA-Wellen. Eine Hyperpolarisation der Zelle auf -90 mV im Current-Clamp Modus führte nicht zu einem Sistieren der Aktivität; lediglich eine Reduktion der Frequenz der Aktionspotentiale konnte beobachtet werden (s. Abb. 3.8c). Diese Dauerentladungen waren mehrfach reversibel: nach Auswaschen von 4-AP, CNQX und D-AP5 kamen sowohl die GABA-Wellen als auch die ektope Aktionspotentiale zum Erliegen (s. Abb. 3.8d); erneutes Ein- und Auswaschen führten wiederum zu Auf- und Abklingen beider Aktivitätsmuster (s. Abb. 3.8e).

3.1.3 Analyse der GABA-Wellen in simultanen intra- und extrazellulären Ableitungen verschiedener Genotypen

3.1.3.1 Entwicklung der Frequenz der GABA-Wellen über 30 Minuten

Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich die Frequenz der GABA-Wellen zwischen den drei untersuchten Genotypen zelltypübergreifend unterschied. Hierzu wurden über 30 Minuten simultane intra- und extrazellulären Ableitungen nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission durchgeführt. Sowohl in der Kontrollgruppe (Wildtyp, $n = 33$) als auch im Cx36KO ($n = 35$) und im Cx45KO ($n = 26$) traten GABA-Wellen auf. In jedem der untersuchten Genotypen wurde intrazellulär eine höhere Frequenz an Ereignissen registriert als extrazellulär. Abbildung 3.9 zeigt die durchschnittliche Frequenz der GABA-Wellen in Messzeitblöcken von jeweils 10 Minuten in Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO. Innerhalb des 30-minütigen Messzeitraumes stieg und fiel die Frequenz der GABA-Wellen also sowohl intra- als auch extrazellulär in

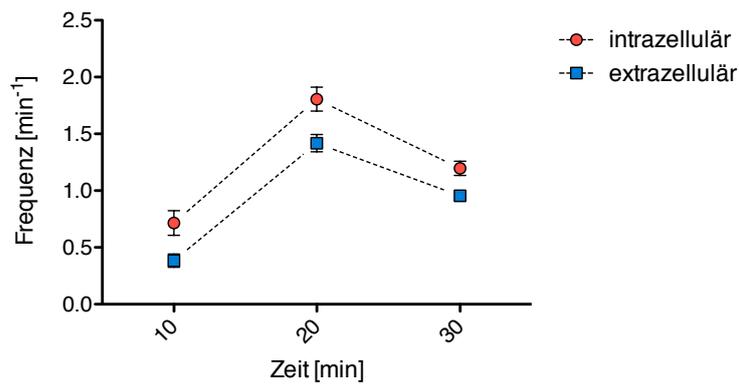
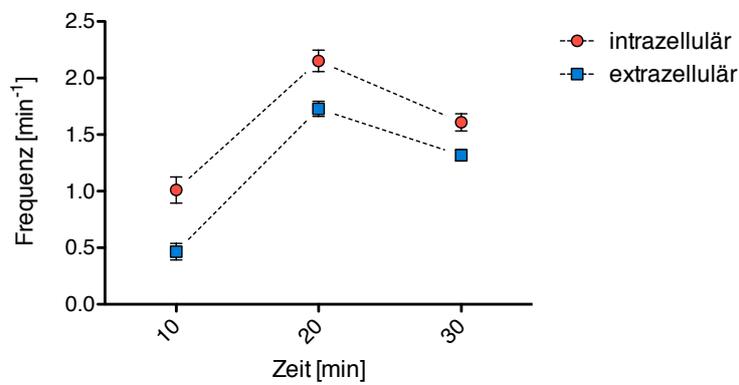
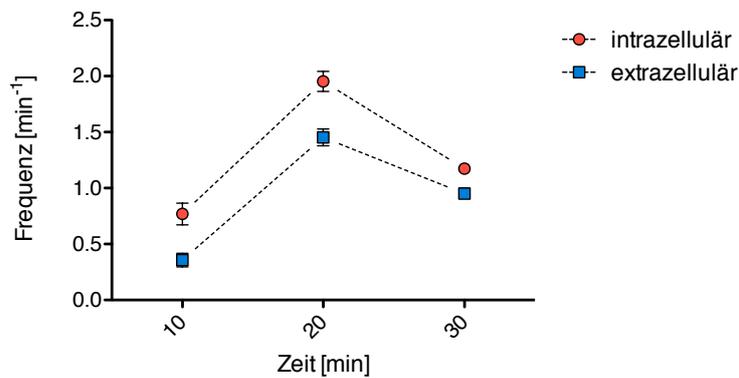
(a) Kontrolle (Wildtyp), $n = 33$, Datenpunkte: 10 min \emptyset (b) Cx36KO, $n = 35$, Datenpunkte: 10 min \emptyset (c) Cx45KO, $n = 26$, Datenpunkte: 10 min \emptyset

Abbildung 3.9 Entwicklung der Frequenz der GABA-Wellen über 30 min in Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO. Simultan abgeleitete intra- und extrazelluläre Messungen aus 94 Gehirnschnittpräparaten.

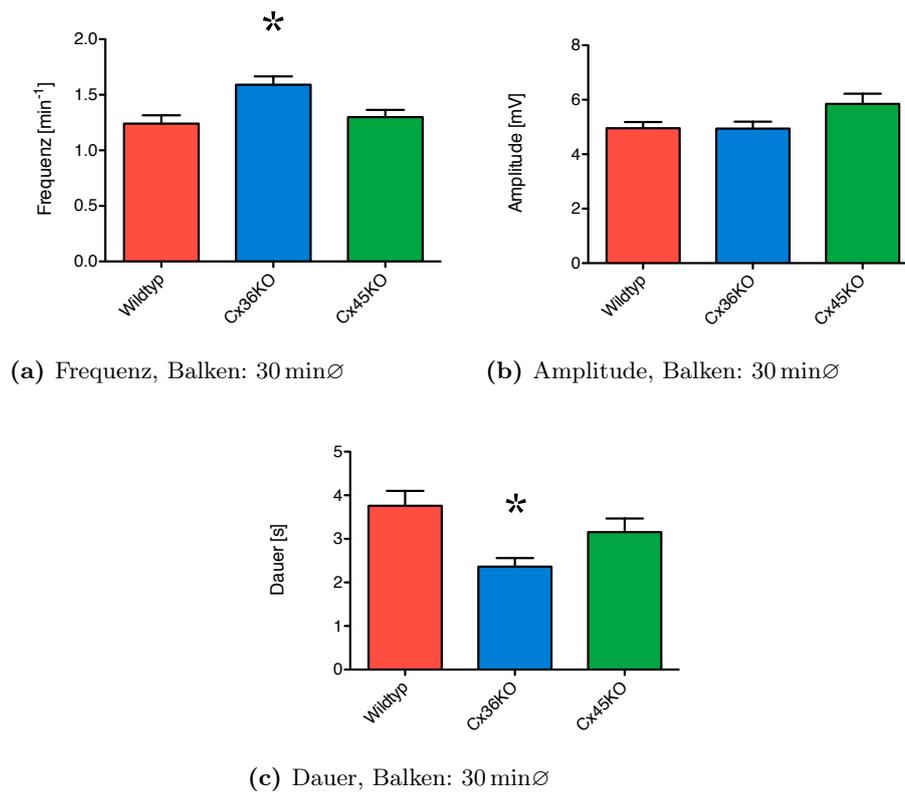


Abbildung 3.10 (a)-(c): Parameter der GABA-Wellen in den intrazellulären Ableitungen von Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO innerhalb von 30 Minuten. Für Frequenz und Dauer der GABA-Welle fanden sich für den Cx36KO statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

charakteristischer Weise: es zeigte sich ein Anstieg von 0-10 Minuten, ein Maximum bei 10-20 Minuten und ein Abfall bei 20-30 Minuten. Dieser An- und Abstieg entsprach dem Verlauf, der auch in Abschnitt 3.2.1 für die langdauernden Feldpotentialableitungen beobachtet werden konnte.

3.1.3.2 Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen in intrazellulären Messungen

Weiterhin wurde betrachtet, inwieweit sich die Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen, die innerhalb von 30 Minuten nach Messbeginn intrazellulär auftraten, zwischen den verschiedenen Genotypen unterschieden. Die Ergebnisse dieser Messungen

sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Frequenz der GABA-Wellen betrug im Wildtyp ($n = 33$) $1.2 \pm 0.076 \text{ min}^{-1}$, im Cx36KO ($n = 35$) $1.6 \pm 0.076 \text{ min}^{-1}$ und im Cx45KO ($n = 26$) $1.3 \pm 0.066 \text{ min}^{-1}$. Für den Cx36KO ergab sich somit in der Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Nachtestverfahren nach DUNNETT eine statistisch signifikant höhere Frequenz im Vergleich zum Wildtyp (95 %-KI: -0.5770 bis -0.1242). Der Unterschied der Frequenz zwischen Wildtyp und Cx45KO war hingegen statistisch nicht signifikant (95 %-KI: -0.3035 bis 0.1858). Die Amplitude betrug in der Kontrollgruppe $5.0 \pm 0.22 \text{ mV}$, im Cx36KO $4.9 \pm 0.26 \text{ mV}$ und im Cx45KO $5.8 \pm 0.38 \text{ mV}$. Hier fanden sich weder im Vergleich von Wildtyp mit dem Cx36KO (95 %-KI: -0.8404 bis 0.8704), noch im Vergleich von Wildtyp und Cx45KO statistisch signifikante Unterschiede (95 %-KI: -1.815 bis 0.03430). Die Dauer der GABA-Wellen betrug in der Kontrollgruppe $3.8 \pm 0.34 \text{ s}$, im Cx36KO $2.4 \pm 0.20 \text{ s}$ und im Cx45KO $3.2 \pm 0.31 \text{ s}$. Sie war hierbei im Cx36KO statistisch signifikant niedriger als im Wildtyp (95 %-KI: 0.5248 bis 2.271), der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und dem Cx45KO war statistisch nicht signifikant (95 %-KI: -0.3369 bis 1.550).

3.1.3.3 Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen in extrazellulären Messungen

Analog zu Abschnitt 3.1.3.2 wurde betrachtet, inwieweit sich die Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen, die innerhalb von 30 Minuten nach Messbeginn extrazellulär auftraten, zwischen den untersuchten Genotypen unterschieden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die Frequenz der GABA-Wellen betrug im Wildtyp ($n = 33$) $0.92 \pm 0.043 \text{ min}^{-1}$, im Cx36KO ($n = 35$) $1.2 \pm 0.052 \text{ min}^{-1}$ und im Cx45KO ($n = 26$) $0.92 \pm 0.051 \text{ min}^{-1}$. Somit lag die Frequenz in den extrazellulären Ableitungen in allen drei Genotypen niedriger als in den intrazellulären Messungen. Auch für die extrazellulären Messungen ergab sich für den Cx36KO in der Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Nachtestverfahren nach DUNNETT eine statistisch signifikant höhere Frequenz verglichen mit dem Wildtyp (95 %-KI: -0.4014 bis -0.1016). Wie auch bei den intrazellulären Messungen war der Unterschied der Frequenzen zwischen Wildtyp und Cx45KO statistisch nicht signifikant (95 %-KI: -0.1629 bis 0.1611). Auch die extrazellulär abgeleitete Amplitude war in allen drei Genotypen niedriger als die intrazellulär abgeleitete. Sie betrug in der Kontrollgruppe $1.5 \pm 0.073 \text{ mV}$, im Cx36KO $1.3 \pm 0.031 \text{ mV}$ und im Cx45KO $1.4 \pm 0.058 \text{ mV}$. Hier fand sich beim Vergleich von Wildtyp und Cx36KO ein statistisch signifikanter Unterschied (95 %-KI: 0.02989 bis 0.3719). Im Vergleich

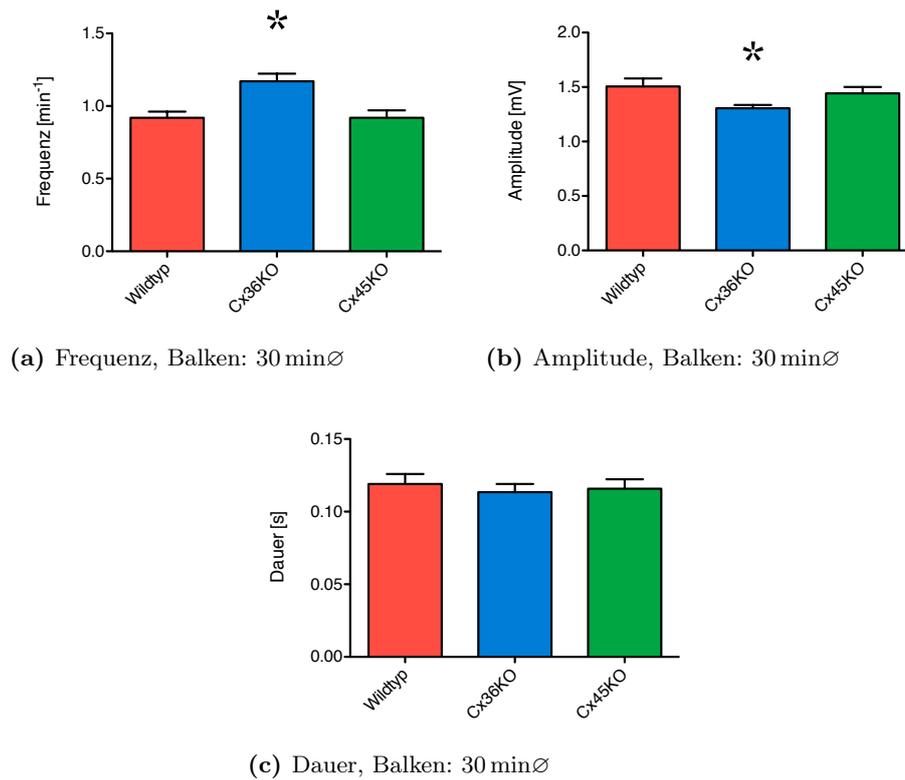


Abbildung 3.11 Parameter der GABA-Wellen in den extrazellulären Ableitungen von Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO innerhalb von 30 Minuten. Für Frequenz und Amplitude der GABA-Wellen fanden sich im Cx36KO statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

von Wildtyp und Cx45KO zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (95 %-KI: -0.1215 bis 0.2482). Die Dauer der GABA-Wellen betrug in der Kontrollgruppe 0.12 ± 0.0069 s, im Cx36KO 0.11 ± 0.0056 s und im Cx45KO 0.12 ± 0.0066 s. Hier gab es weder zwischen Wildtyp und Cx36KO (95 %-KI: -0.01381 bis 0.02514), noch zwischen Wildtyp und Cx45KO statistisch signifikante Unterschiede (95 %-KI: -0.01772 bis 0.02437).

3.1.3.4 Vergleich der GABA-Wellen zwischen verschiedenen Zelltypen im Wildtyp

Es sollte nun untersucht werden, ob sich innerhalb der Kontrollgruppe (Wildtyp) im Zeitraum von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission ein Unterschied in Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen ergab. Hierzu wurden folgende Populationen betrachtet: 1. supragranuläre Pyramidenzellen, 2. infragranuläre Pyramidenzellen und 3. Interneurone. Der Vergleich wurde anhand 18 supragranulärer Pyramidenzellen (reguläres Entladungsverhalten, PyrRS supra.), 9 infragranulärer Pyramidenzellen (reguläres Entladungsverhalten, PyrRS infra.) und 4 Interneuronen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Bei den supragranulären Pyramidenzellen fand sich eine nahezu identische Frequenz der GABA-Wellen ($1.3 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$) wie bei den infragranulären Pyramidenzellen ($1.3 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$). Die Frequenz in den Interneuronen lag niedriger, bei $0.97 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$. Ebenfalls ähnliche Werte fanden sich für die Amplituden bei supragranulären ($4.8 \pm 0.35 \text{ mV}$) und infragranulären Pyramidenzellen ($4.8 \pm 0.19 \text{ mV}$). In den Interneuronen lag diese mit $6.1 \pm 0.68 \text{ mV}$ höher. Auch die Dauer war bei Interneuronen länger ($5.3 \pm 1.3 \text{ s}$) als bei supragranulären ($3.7 \pm 0.45 \text{ s}$) oder infragranulären Pyramidenzellen ($3.2 \pm 0.61 \text{ s}$). Hierbei fand sich in der Varianzanalyse (einfache ANOVA) allerdings kein signifikanter Unterschied für Frequenz ($P = 0.4282$), Amplitude ($P = 0.1897$) oder Dauer der GABA-Wellen ($P = 0.2134$). Auch im BONFERRONI-Nachtestverfahren ergab der Vergleich der einzelnen Neuronengruppen untereinander (PyrRS supra. *vs.* PyrRS infra., PyrRS supra. *vs.* Interneurone und PyrRS infra. *vs.* Interneurone) weder für Frequenz (95 %-KI: -0.5178 bis 0.4122 bzw. -0.3379 bis 0.9213 und -0.3400 bis 1.029), noch für Amplitude (95 %-KI: -1.360 bis 1.269 bzw. -3.066 bis 0.4933 und -3.176 bis 0.6939) oder Dauer (95 %-KI: -1.583 bis 2.527 bzw. -4.436 bis 1.129 und -5.150 bis 0.8994) einen statistisch signifikanten Unterschied.

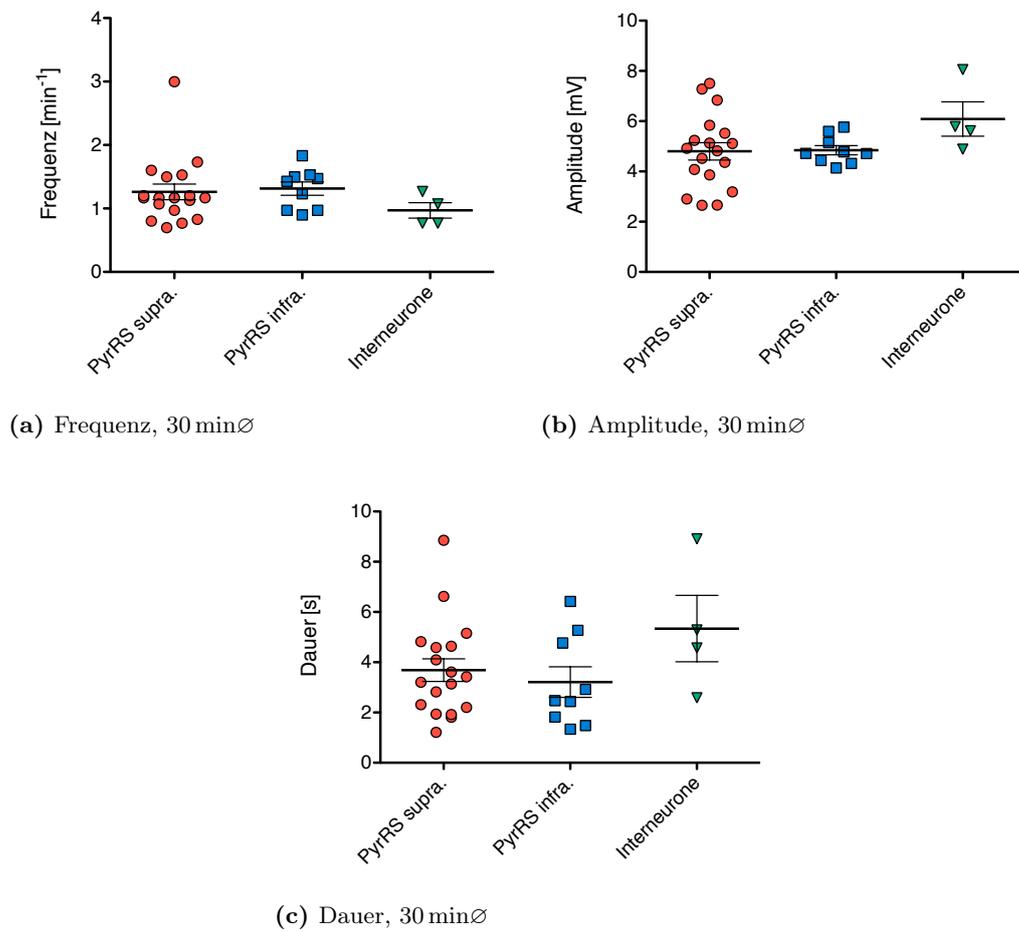


Abbildung 3.12 Vergleich der GABA-Wellen zwischen supragranulären Pyramidenzellen, infragranulären Pyramidenzellen und der Interneuron-Gruppe innerhalb von 30 Minuten im Wildtyp. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellpopulationen.

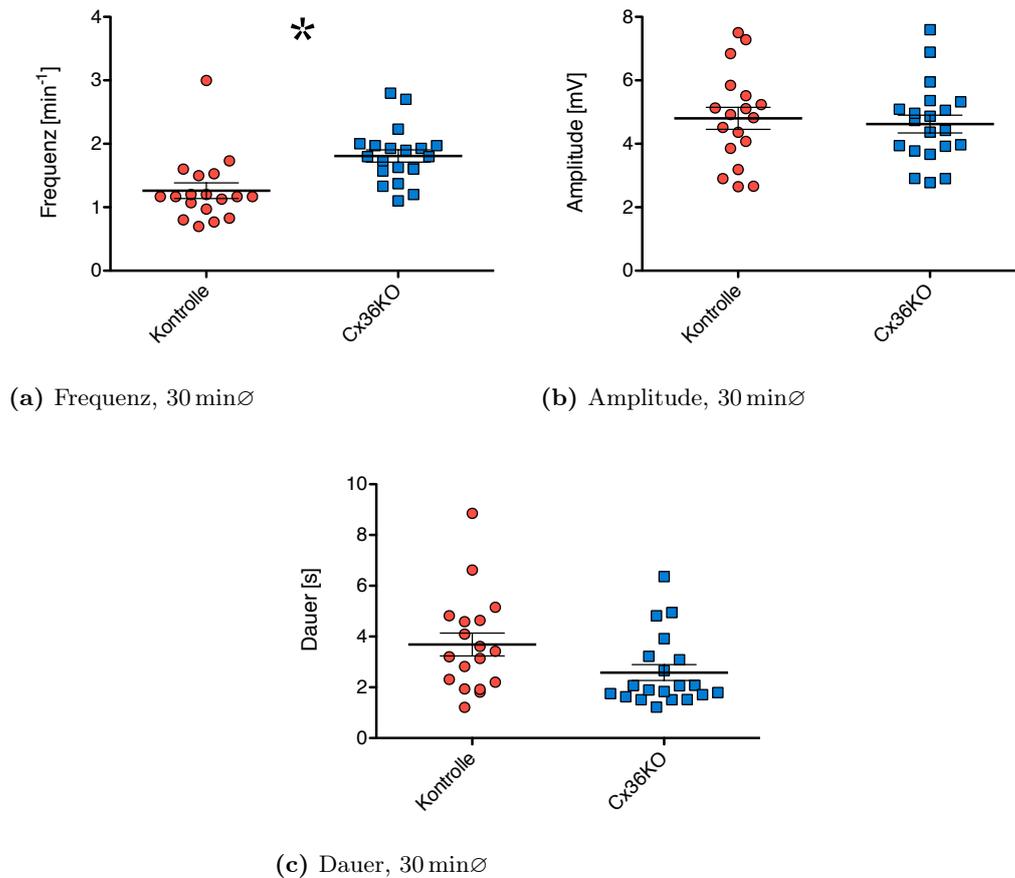


Abbildung 3.13 Supragranuläre Pyramidenzellen: Kontrolle *vs.* Cx36KO. Die GABA-Wellen waren im Cx36KO durch eine statistisch signifikant höhere Frequenz im Vergleich zu den supragranulären Pyramidenzellen im Wildtyp gekennzeichnet.

3.1.3.5 Cx36KO und Cx45KO *vs.* Wildtyp: supragranuläre Pyramidenzellen

Nun sollte betrachtet werden, inwiefern sich GABA-Wellen, die in supragranulären Pyramidenzellen auftraten, unterschieden, wenn sie in verschiedenen Genotypen abgeleitet wurden.

Cx36KO *vs.* Wildtyp Es wurde überprüft, ob sich Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen in supragranulären Pyramidenzellen der Kontrollgruppe (Wildtyp, $n = 18$) von derjenigen im Cx36KO ($n = 20$) innerhalb von 30 Minuten nach Applikation

von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission unterschieden. Die grafische Darstellung findet sich in Abbildung 3.13. Die Frequenz war in der Kontrollgruppe mit $1.3 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$ in der Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Nachtestverfahren nach DUNNETT signifikant niedriger als im Cx36KO mit $1.8 \pm 0.097 \text{ min}^{-1}$ (95 %-KI: -0.8956 bis -0.2000). Die Amplituden (Kontrolle: $4.8 \pm 0.34 \text{ mV}$, Cx36KO: $4.6 \pm 0.28 \text{ mV}$) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (95 %-KI: -0.8732 bis 1.225). Auch für die Dauer der GABA-Wellen (Kontrolle: $3.7 \pm 0.45 \text{ s}$, Cx36KO: $2.6 \pm 0.31 \text{ s}$) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (95 %-KI: -0.07878 bis 2.289).

Cx45KO vs. Wildtyp Es wurde verglichen, ob sich Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen zwischen supragranulären Pyramidenzellen der Kontrollgruppe (Wildtyp, $n = 18$) von derjenigen im Cx45KO ($n = 8$) innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission unterschieden. Hierbei ergaben sich in der Varianzanalyse (ANOVA) im Nachtestverfahren nach DUNNETT keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Frequenz der GABA-Wellen betrug $1.3 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$ im Wildtyp, verglichen mit $1.4 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$ im Cx45KO (95 %-KI: -0.6132 bis 0.2966). Für die Amplitude fand sich ein Wert von $4.8 \pm 0.35 \text{ mV}$ in der Kontrollgruppe gegenüber $5.8 \pm 0.59 \text{ mV}$ im Cx45KO (95 %-KI: -2.331 bis 0.4134). Die Dauer betrug in der Kontrollgruppe $3.7 \pm 0.45 \text{ s}$, im Cx45KO $3.8 \pm 0.42 \text{ s}$ (95 %-KI: -1.664 bis 1.433).

3.1.3.6 Cx36KO und Cx45KO vs. Wildtyp: infragranuläre Pyramidenzellen

Es wurde weiterhin untersucht, inwiefern sich GABA-Wellen in infragranulären Pyramidenzellen zwischen den untersuchten Genotypen unterschieden.

Cx36KO vs. Wildtyp Es wurde verglichen, ob sich Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen zwischen infragranulären Pyramidenzellen der Kontrollgruppe (Wildtyp, $n = 9$) von derjenigen im Cx36KO ($n = 7$) innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission unterschieden. Hierbei ergaben sich in der Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Nachtestverfahren nach DUNNETT keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Frequenz der GABA-Welle betrug in der Kontrollgruppe $1.3 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$ im Vergleich zum Cx36KO mit

$1.3 \pm 0.085 \text{ min}^{-1}$ (95 %-KI: -0.3197 bis 0.3372). Für die Amplitude ergaben sich $4.8 \pm 0.19 \text{ mV}$ in der Kontrollgruppe im Vergleich zu $6.1 \pm 0.88 \text{ mV}$ im Cx36KO (95 %-KI: -2.976 bis 0.4381). Die Dauer der GABA-Wellen betrug in der Kontrollgruppe $3.2 \pm 0.61 \text{ s}$ und $2.2 \pm 0.20 \text{ s}$ im Cx36KO (95 %-KI: -0.6194 bis 2.748).

Cx45KO vs. Wildtyp Es wurde verglichen, ob sich Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen zwischen infragranulären Pyramidenzellen der Kontrollgruppe ($n = 9$) von der im Cx45KO ($n = 9$) innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission unterschieden. Wie im Cx36KO fanden sich auch hierbei in der Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Nachtestverfahren nach DUNNETT keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Frequenz der GABA-Wellen betrug $1.3 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$ in der Kontrollgruppe verglichen mit $1.3 \pm 0.089 \text{ min}^{-1}$ im Cx45KO (95 %-KI: -0.3306 bis 0.2839). Für die Amplitude ergaben sich im Wildtyp $4.8 \pm 0.19 \text{ mV}$ gegenüber dem Cx45KO mit $5.5 \pm 0.38 \text{ mV}$ (95 %-KI: -2.211 bis 0.9824). Die Dauer betrug in der Kontrollgruppe $3.2 \pm 0.61 \text{ s}$, im Cx45KO $2.5 \pm 0.46 \text{ s}$ (95 %-KI: -0.8140 bis 2.336).

3.1.3.7 Cx36KO und Cx45KO vs. Wildtyp: Interneurone

Es wurde betrachtet, inwiefern sich die GABA-Wellen in der Interneuron-Gruppe zwischen den untersuchten Genotypen unterschieden.

Cx36KO vs. Wildtyp Es wurde verglichen, ob sich Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen zwischen Interneuronen der Kontrollgruppe (Wildtyp, $n = 4$) von derjenigen im Cx36-Knockout ($n = 8$) innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission unterschieden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Nachtestverfahren nach DUNNETT ergab statistisch signifikante Unterschiede für die mittlere Dauer der GABA-Wellen. Sie war mit $5.3 \pm 1.3 \text{ s}$ in der Kontrollgruppe signifikant länger als im Cx36KO mit $2.0 \pm 0.29 \text{ s}$ (95 %-KI: 0.6536 bis 6.004). Hingegen zeigten sich für Frequenz und Amplitude keine signifikanten Unterschiede. Die Frequenz betrug in der Kontrollgruppe $0.97 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$ im Vergleich zu $1.3 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$ im Cx36KO (95 %-KI:

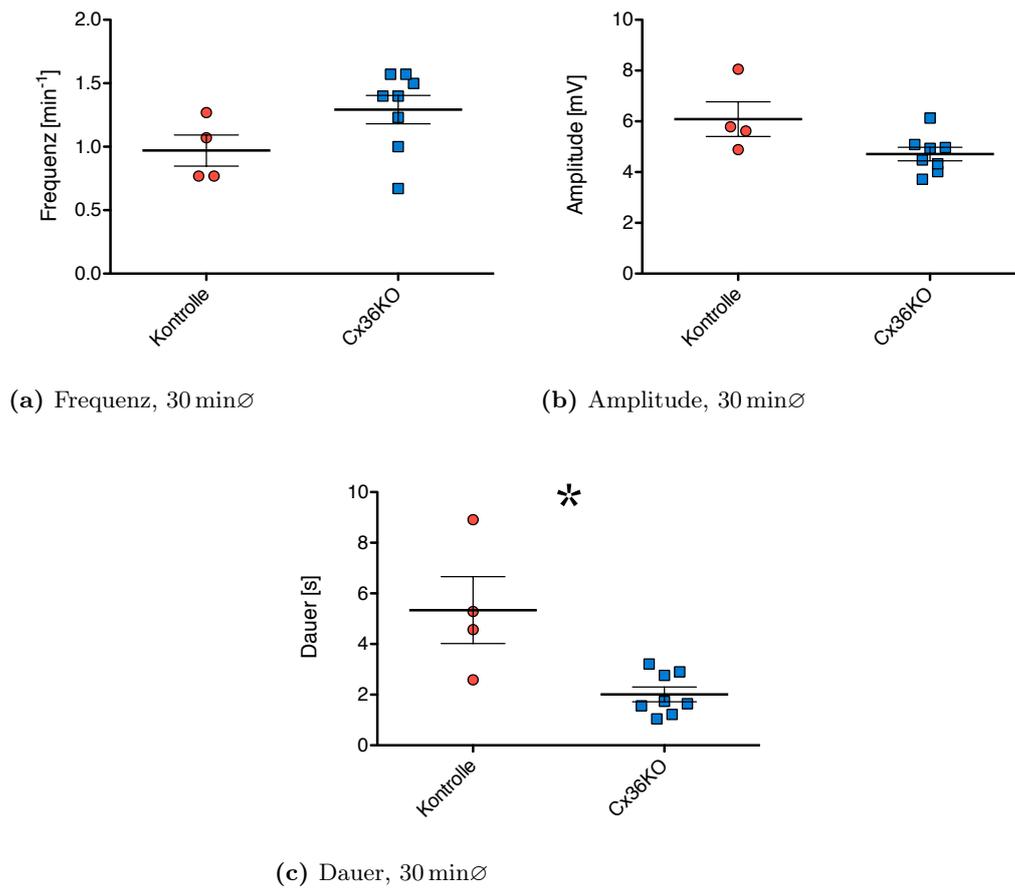


Abbildung 3.14 Interneuron-Gruppe: Kontrolle *vs.* Cx36KO. Die Dauer der GABA-Wellen war im Cx36KO signifikant niedriger als im Wildtyp.

-0.7811 bis 0.1361). Die Amplitude lag in der Kontrollgruppe bei 6.1 ± 0.68 mV, im Cx36KO bei 4.7 ± 0.27 mV (95 %-KI: -1.548 bis 4.303).

Cx45KO vs. Wildtyp Es wurde verglichen, ob sich Frequenz, Amplitude oder Dauer der GABA-Wellen zwischen infragranulären Pyramidenzellen der Kontrollgruppe ($n = 4$) von derjenigen im Cx45KO ($n = 7$) innerhalb von 30 Minuten nach Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission unterschieden. Hierbei ergaben sich in der Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Nachtestverfahren nach DUNNETT keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Frequenz betrug in der Kontrollgruppe 0.97 ± 0.12 min⁻¹ im Vergleich zum Cx45KO mit 1.2 ± 0.12 min⁻¹ (95 %-KI: -0.6608 bis 0.2780). Für die Amplitude ergab sich im Wildtyp ein Wert von 6.1 ± 0.68 mV gegenüber dem Cx45KO mit 6.7 ± 1.1 mV (95 %-KI: -3.606 bis 2.384). Die Dauer lag bei 5.3 ± 1.3 s im Wildtyp und 3.7 ± 0.79 s im Cx45KO (95 %-KI: -1.064 bis 4.412).

3.2 Die GABA-Wellen in langdauernden Feldpotentialableitungen

3.2.1 Die Entwicklung der GABA-Wellen im Wildtyp

Die Induktion und Etablierung der GABA-Wellen wurde im Wildtyp über einen längeren Zeitraum untersucht. Hierzu wurden Feldpotentialableitungen an Gehirnschnittpräparaten des Wildtyps ($n = 3$) nach Zugabe von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission über 170 Minuten ausgewertet. Erfasst wurde die mittlere Auftrittsfrequenz f , die Amplitude A und die Dauer Δt der GABA-Wellen. Diese Parameter zeigten über die Zeit charakteristische Veränderungen, die in den Diagrammen der Abbildung 3.15 dargestellt sind. Die Frequenz betrug über die gesamte Messzeit im Mittel 0.73 ± 0.058 min⁻¹. Hierbei fiel der Mittelwert der 10-Minuten-Messblöcke mit fortschreitender Zeit ab, und zwar von 1.5 ± 0.42 min⁻¹ bei 10-20 Minuten auf 0.43 ± 0.088 min⁻¹ bei 160-170 Minuten. Dieser Abfall der 17 Mittelwerte war in der Varianzanalyse (einfache ANOVA für Messwiederholungen) statistisch signifikant ($P = 0.0030$). Wurde der erste 10-Minuten-Mittelwert in der ANOVA nicht berücksichtigt (Toleranzzeit von 10 Minuten von der Applikation der Pharmaka bis zum sicheren Wirkeintritt in der Ableitkammer),

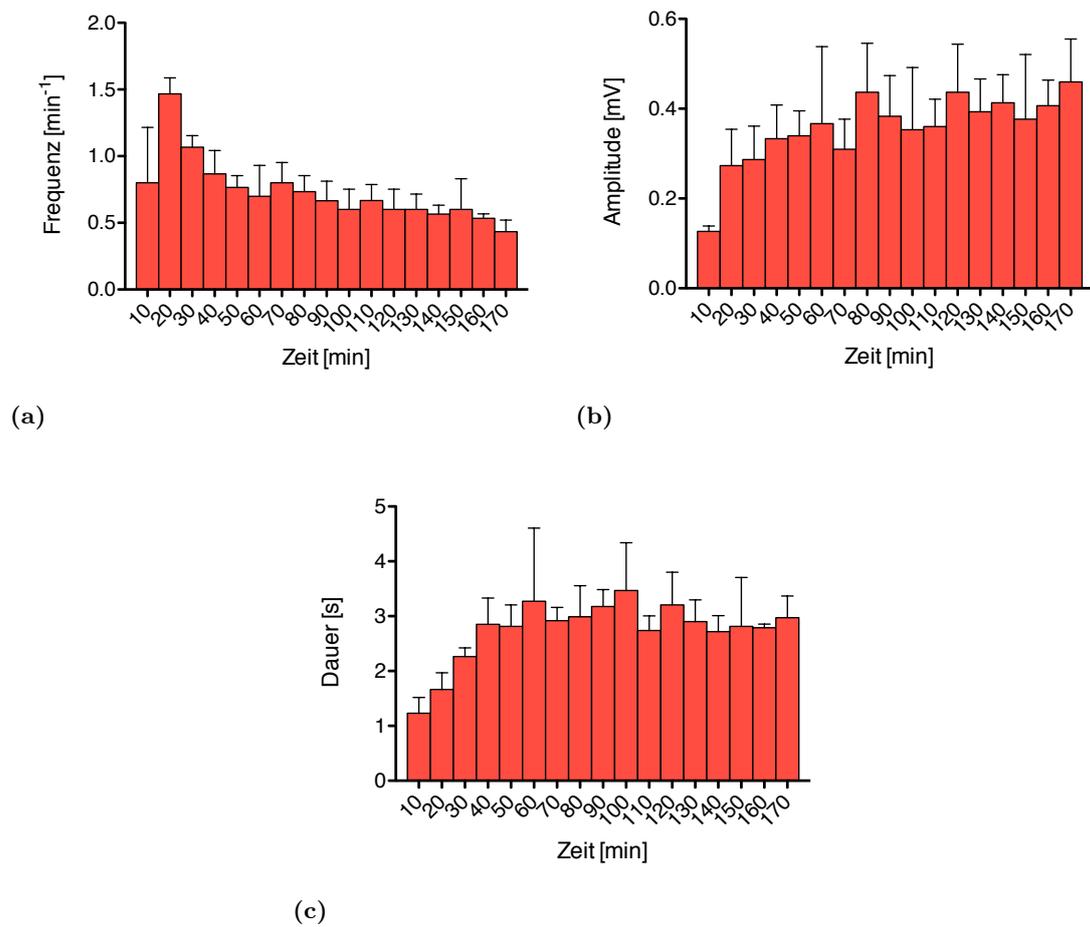


Abbildung 3.15 (a)-(c): Entwicklung von Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen in Feldpotentialableitungen des Wildtyps ($n = 3$) über 170 Minuten. Jeder Balken stellt einen Messzeitraum von 10 Minuten dar (Bins).

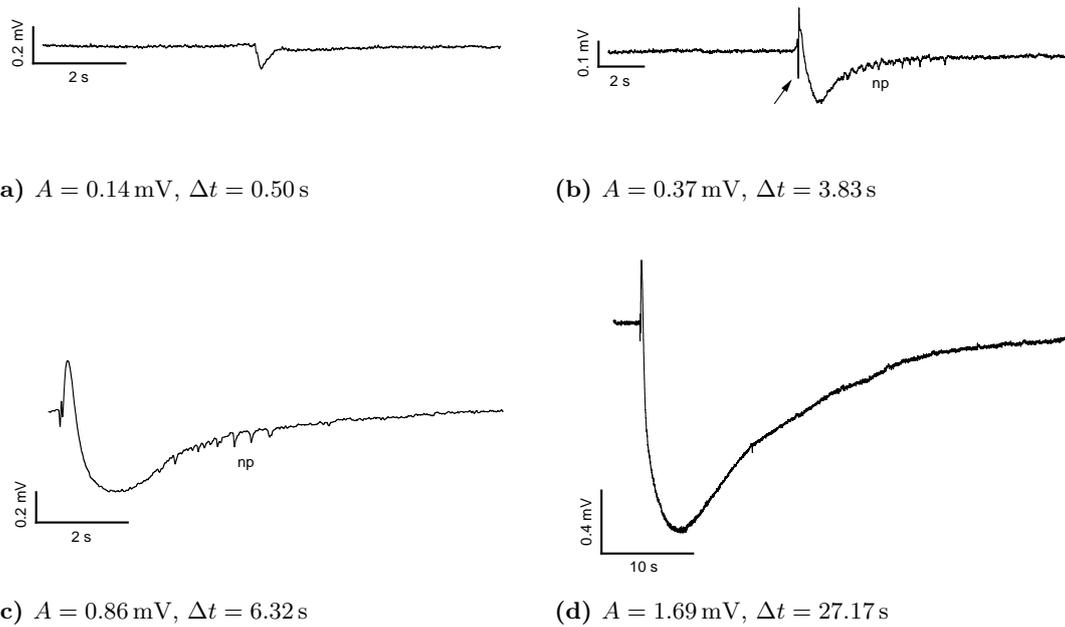


Abbildung 3.16 (a)-(d): Typische Entwicklung von GABA-Wellen im selben Schnittpräparat (a) nach ca. 5 Minuten, (b) nach ca. 65 Minuten und (c) nach ca. 135 Minuten: deutliche Zunahme von Amplitude und Dauer. (d): Außergewöhnlich große GABA-Welle nach ca. 155 Minuten. (b): Pfeil: Populations-Spike. (b) und (c): Nachpotentiale (»np«).

also nur über die Messzeit von 10-170 Minuten ausgewertet, ergab sich ein statistisch signifikanter Abfall mit niedrigerem P -Wert ($P < 0.0001$). Für beide Fälle ergab sich im Nachtestverfahren ein signifikanter linearer Abwärtstrend zwischen den Mittelwerten der Messzeiträume (Bins) ($P < 0.0001$). Die mittlere Amplitude der GABA-Wellen über die gesamte Messzeit betrug 0.36 ± 0.019 mV. Die mittlere Amplitude stieg dabei von 0.27 ± 0.012 mV bei 0-10 Minuten auf 0.46 ± 0.095 mV bei 160-170 Minuten. Dieser Anstieg der 17 Mittelwerte war in der Varianzanalyse (einfache ANOVA für Messwiederholungen) statistisch signifikant ($P = 0.0227$). Im Nachtestverfahren ergab sich ein signifikanter linearer Anstiegstrend zwischen den Mittelwerten der Bins ($P < 0.0001$). Auch für die mittlere Dauer war ein Anstieg zu verzeichnen. Sie betrug über die gesamte Messzeit im Mittel 2.8 ± 0.14 s und stieg dabei von 1.2 ± 0.29 s bei 0-10 Minuten auf 3.0 ± 0.40 s bei 160-170 Minuten. Dieser Anstieg war in der Varianzanalyse (einfache ANOVA für Messwiederholungen) statistisch nicht signifikant ($P = 0.1732$), jedoch zeigte sich im Nachtestverfahren ein signifikanter linearer Anstiegstrend zwischen den Mittelwerten der Bins ($P = 0.0129$). Abbildung 3.16 zeigt repräsentative Beispiele für GABA-Wellen in Feldpotentialableitungen zu frühen und späteren Messzeitpunkten; der Anstieg von Amplitude und Dauer über die Zeit wird deutlich.

3.2.2 Gap Junction Blocker im Wildtyp

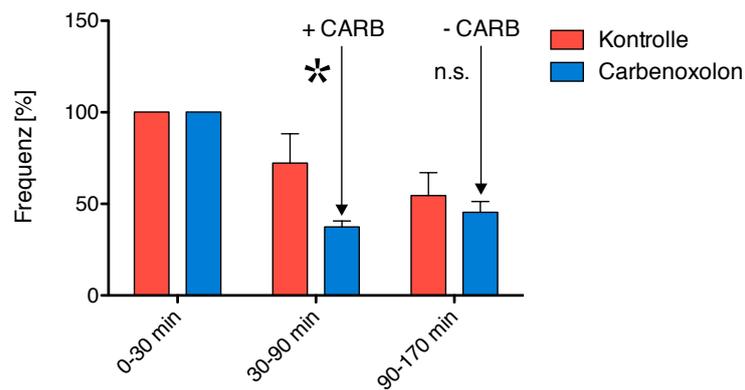
Nach Betrachtung der Entwicklung der GABA-Wellen über 170 Minuten im Wildtyp wurde nun untersucht, wie sich Gap Junction Blocker innerhalb dieses Zeitraums auf die GABA-Wellen auswirken. Hierzu wurden Feldpotentialableitungen neocorticaler Schnittpräparate nach der Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission über 170 Minuten aufgezeichnet. Nach 30 Minuten wurde einer der folgenden Gap Junction Blocker zur Perfusionslösung gegeben: 1. Carbenoxolon ($50 \mu\text{M}$), 2. 1-Heptanol (2 mM), 3. Mefloquin ($50 \mu\text{M}$) und 4. 1-Octanol (2 mM). Die Substanzen verblieben für 60 Minuten in diesen Konzentrationen in der Zirkulation, anschließend wurden sie ausgewaschen bzw. ein Auswaschversuch unternommen. Nach Auswaschbeginn wurde die Feldpotentialableitung für weitere 80 Minuten aufgezeichnet. Die so erhobenen Messdaten wurden mit der Entwicklung der GABA-Wellen über 170 Minuten ohne Applikation von Gap Junction Blockern verglichen. Für diesen Vergleich sind sowohl für die Kontroll- als auch für die Interventionsgruppe die Parameter der GABA-Wellen in jedem 10-minütigen Messintervall als prozentualer Anteil vom Durchschnitt der Messwerte des Zeitintervalls 0-30 Minuten angegeben.

3.2.2.1 Carbenoxolon

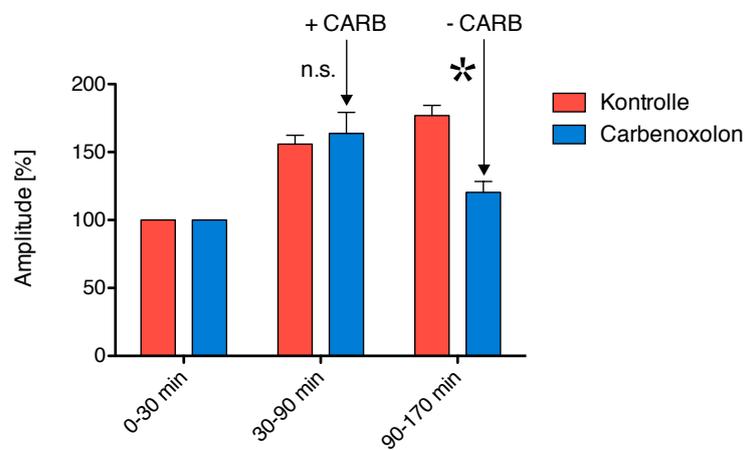
Abbildung 3.17 zeigt die Entwicklung der GABA-Wellen in den Gehirnschnittpräparaten der Carbenoxolon-Gruppe ($n = 5$, $50\mu\text{M}$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($n = 3$). Hierbei zeigte sich in der Carbenoxolon-Gruppe eine Reduktion der Frequenz auf 37.31 ± 3.194 Prozent im Zeitraum 30-90 Minuten (Beginn Einwaschen bis Beginn Auswaschen von Carbenoxolon), im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 72.24 ± 15.95 Prozent. In der Varianzanalyse (zweifache ANOVA für Messwiederholungen) mit dem Nachtestverfahren nach BONFERRONI war dieser Unterschied statistisch signifikant (95 %-KI: -61.31 bis -8.541). Nach Auswaschbeginn von Carbenoxolon stieg die Frequenz in der Interventionsgruppe auf 45.29 ± 5.895 Prozent im Vergleich zu 54.38 ± 12.56 Prozent in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (95 %-KI: -35.48 bis 17.29). Für die Amplituden ergab sich im Zeitraum 30-90 Minuten kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen (163.7 ± 15.65 % in der Interventionsgruppe *vs.* 155.9 ± 6.511 % in der Kontrollgruppe; 95 %-KI: -29.55 bis 45.14). Allerdings ergab sich bei dem Versuch, Carbenoxolon auszuwaschen, im Zeitraum 90-170 Minuten ein Anstieg der Amplituden auf lediglich 120.4 ± 7.99 Prozent in der Interventionsgruppe im Vergleich zu 177.0 ± 7.419 Prozent in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (95 %-KI: -93.96 bis -19.26). Keinen Einfluss hatte die Applikation von Carbenoxolon auf die Dauer der GABA-Wellen. Hier zeigte sich zwischen Interventions- und Kontrollgruppe weder im Zeitraum 30-90 Minuten (142.4 ± 17.8 % *vs.* 181.1 ± 36.62 %) noch im Zeitraum 90-170 Minuten (109.8 ± 7.774 % *vs.* 178.1 ± 38.91 %) ein signifikanter Unterschied (95 %-KI: -110.1 bis 32.62 und -139.7 to 3.017).

3.2.2.2 1-Heptanol

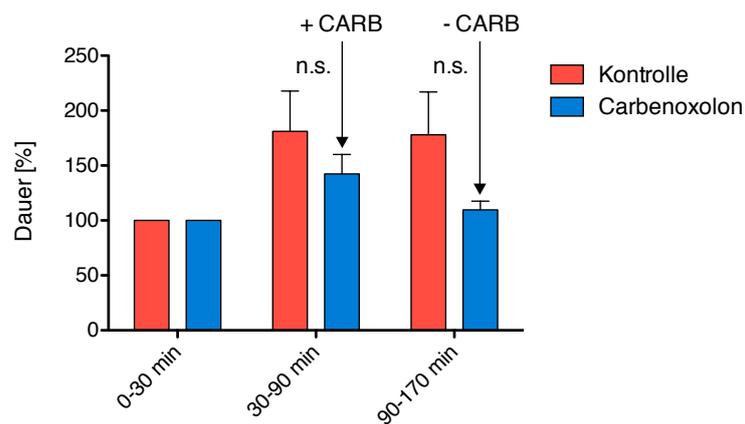
Abbildung 3.18 zeigt die Entwicklung der GABA-Wellen in den Gehirnschnittpräparaten der 1-Heptanol-Gruppe ($n = 5$, 2mM) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($n = 3$). In der Interventionsgruppe fiel die Frequenz im Zeitintervall von 30-90 Minuten (Beginn Einwaschen bis Beginn Auswaschen von 1-Heptanol) auf 24.47 ± 7.071 Prozent verglichen mit 72.24 ± 15.95 Prozent in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war in der Varianzanalyse (zweifache ANOVA für Messwiederholungen) mit dem Nachtestverfahren nach BONFERRONI statistisch signifikant (95 %-KI: -81.46 bis -14.07). Hingegen stieg die



(a) GABA-Wellen: Frequenz

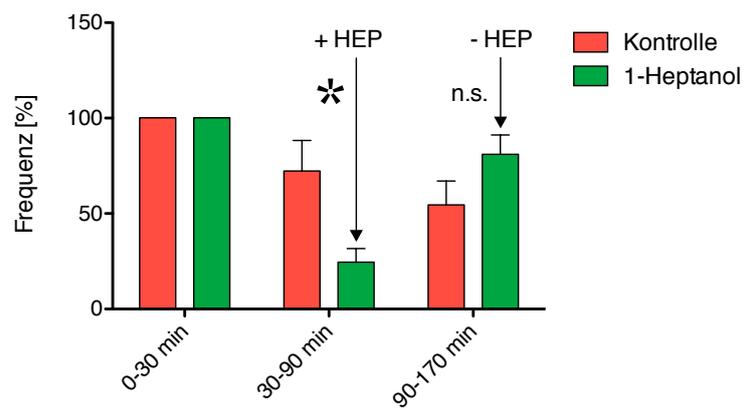


(b) GABA-Wellen: Amplitude

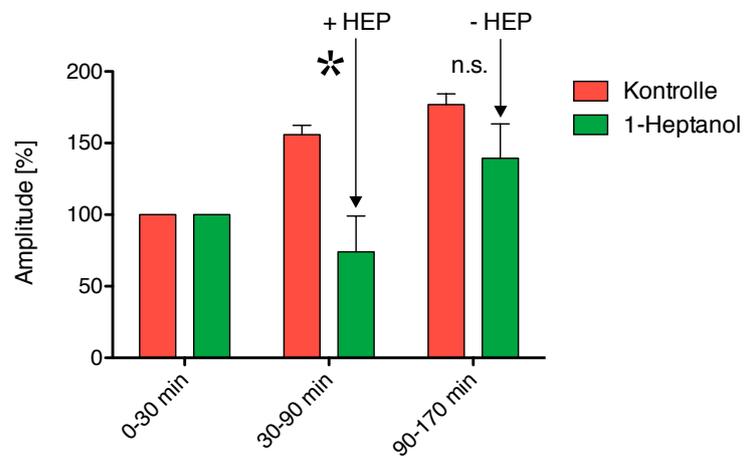


(c) GABA-Wellen: Dauer

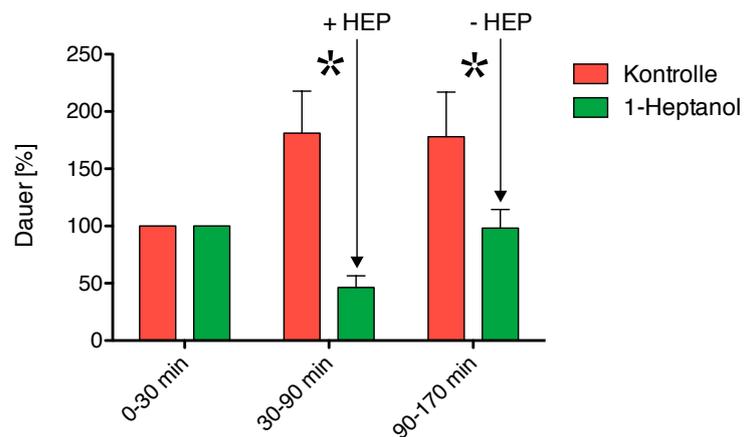
Abbildung 3.17 (a)-(c): GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: Kontrollgruppe *vs.* Carbenoxolon-Gruppe, (a) Frequenz: Abnahme unter Carbenoxolon, (b) Amplitude: Abnahme nach Auswaschen von Carbenoxolon, (c) Dauer: kein signifikanter Effekt durch Carbenoxolon. Frequenz, Amplitude und Dauer jeweils in Prozent des Mittelwertes 0-30 Minuten.



(a) GABA-Wellen: Frequenz



(b) GABA-Wellen: Amplitude



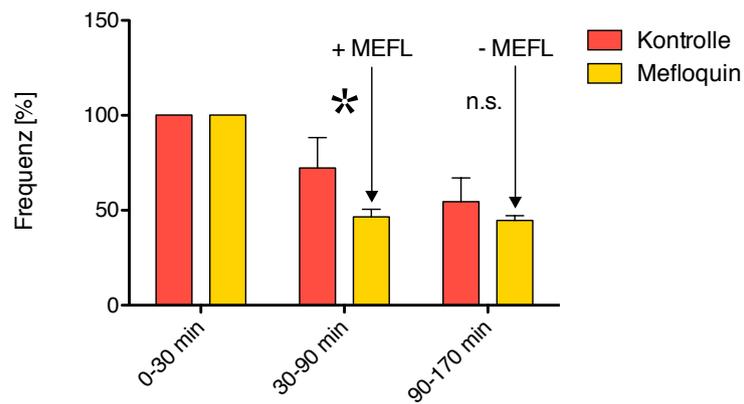
(c) GABA-Wellen: Dauer

Abbildung 3.18 (a)-(c): GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: Kontrollgruppe *vs.* 1-Heptanol-Gruppe, (a) Frequenz: Abnahme unter 1-Heptanol, (b) Amplitude: Abnahme unter 1-Heptanol, (c) Dauer: Abnahme unter und nach Auswaschbeginn von 1-Heptanol. Frequenz, Amplitude und Dauer jeweils in Prozent des Mittelwertes 0-30 Minuten.

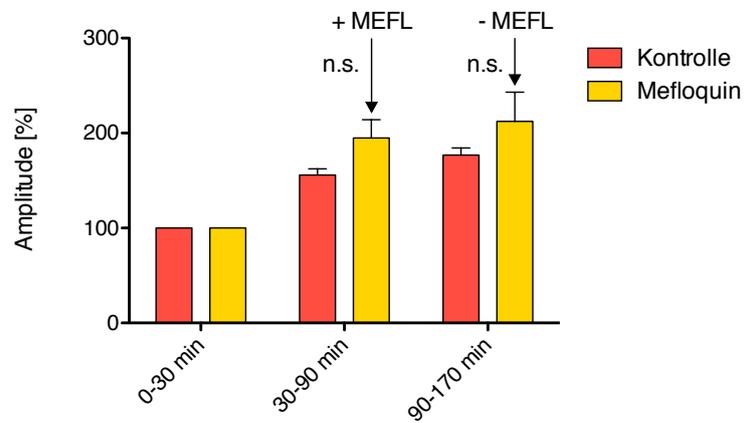
Frequenz nach dem Auswaschbeginn von 1-Heptanol in der Interventionsgruppe stärker als in der Kontrollgruppe ($80.97 \pm 10.06\%$ vs. $54.38 \pm 12.56\%$); dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (95 %-KI: -7.102 bis 60.28). Für die Amplitude und die Dauer ergab sich im Zeitraum von 30-90 Minuten ebenfalls eine signifikante Reduktion in der 1-Heptanol-Gruppe. Die Amplitude fiel in der Interventionsgruppe auf 74.16 ± 24.95 Prozent, während sie in der Kontrollgruppe auf 155.9 ± 6.511 Prozent anstieg (95 %-KI: -152.8 bis -10.62). Nach Auswaschbeginn von 1-Heptanol näherten sich beide Mittelwerte wieder an (Intervention: $139.3 \pm 23.95\%$, Kontrolle: $177.0 \pm 7.419\%$) und waren nicht mehr signifikant von einander verschieden (95 %-KI: -108.7 bis 33.56). Die Dauer wurde durch 1-Heptanol ebenfalls signifikant reduziert. Hier zeigte sich im Zeitintervall 30-90 Minuten in der Interventionsgruppe ein Abfall auf 46.27 ± 10.32 Prozent, während sie in der Kontrollgruppe einen Anstieg auf 181.1 ± 36.62 Prozent zeigte (95 %-KI: -206.0 bis -63.75). Dieser Unterschied blieb auch nach dem Auswaschbeginn von 1-Heptanol statistisch signifikant ($98.21 \pm 16.19\%$ vs. $178.1 \pm 38.91\%$; 95 %-KI: -151.0 bis -8.790).

3.2.2.3 Mefloquin

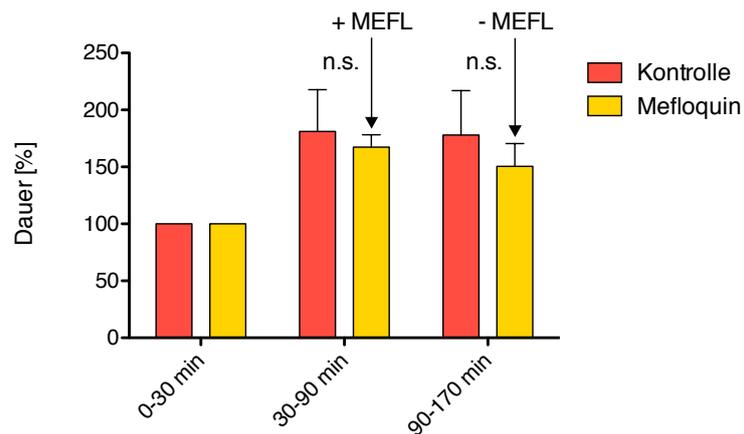
Abbildung 3.19 zeigt die Entwicklung der GABA-Wellen in den Gehirnschnittpräparaten der Mefloquin-Gruppe ($n = 5$, $50 \mu\text{M}$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($n = 3$). Die Frequenz fiel im Zeitintervall 30-90 Minuten (Beginn Einwaschen bis Beginn Auswaschen von Mefloquin) auf 46.45 ± 4.023 Prozent im Vergleich zu 72.24 ± 15.95 Prozent in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war in der Varianzanalyse (zweifache ANOVA für Messwiederholungen) mit dem Nachtestverfahren nach BONFERRONI statistisch signifikant (95 %-KI: -50.34 bis -1.245). Nach Auswaschbeginn von Mefloquin (90 – 170 min) näherten sich die Mittelwerte wieder an ($44.54 \pm 2.462\%$ in der Interventionsgruppe vs. $54.38 \pm 12.56\%$ in der Kontrollgruppe) und waren statistisch nicht mehr signifikant voneinander verschieden (95 %-KI: -34.39 bis 14.70). Die Amplituden unterschieden sich weder unter Mefloquin (30-90 min; Intervention $194.8 \pm 19.25\%$, Kontrolle $155.9 \pm 6.511\%$) noch nach dessen Auswaschbeginn (90-170 min; Intervention $212.3 \pm 30.81\%$, Kontrolle $177.0 \pm 7.419\%$) signifikant voneinander (95 %-KI: -35.73 bis 113.5 bzw. -39.28 bis 110.0). Für die Dauer ergab sich ebenfalls weder unter Mefloquin (30-90 min) noch nach dessen Auswaschbeginn (90-170 min) ein signifikanter Unterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe ($167.4 \pm 10.80\%$ vs. $181.1 \pm 36.62\%$ von 30-90 min, 95 %-KI -89.08 bis 61.62 ; $150.6 \pm 20.06\%$ vs. $178.1 \pm 38.91\%$ von 90-170 min, 95 %-KI -102.9 bis 47.81).



(a) GABA-Wellen: Frequenz



(b) GABA-Wellen: Amplitude



(c) GABA-Wellen: Dauer

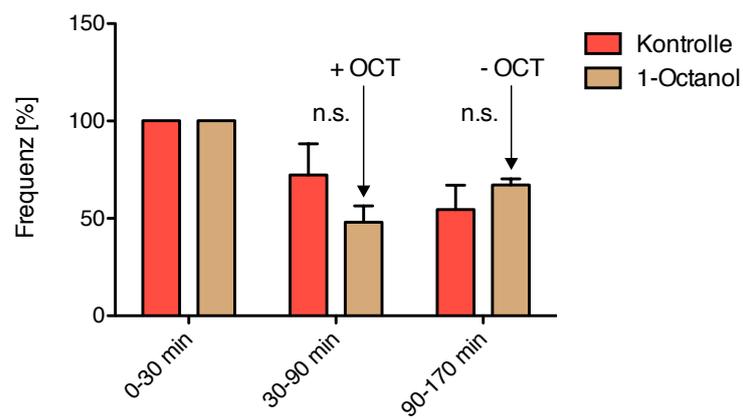
Abbildung 3.19 (a)-(c): GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: Kontrollgruppe vs. Mefloquin, (a) Frequenz: Abnahme unter Mefloquin, (b) Amplitude: kein signifikanter Effekt durch Mefloquin, (c) Dauer: kein signifikanter Effekt durch Mefloquin. Frequenz, Amplitude und Dauer jeweils in Prozent des Mittelwertes 0-30 Minuten.

3.2.2.4 1-Octanol

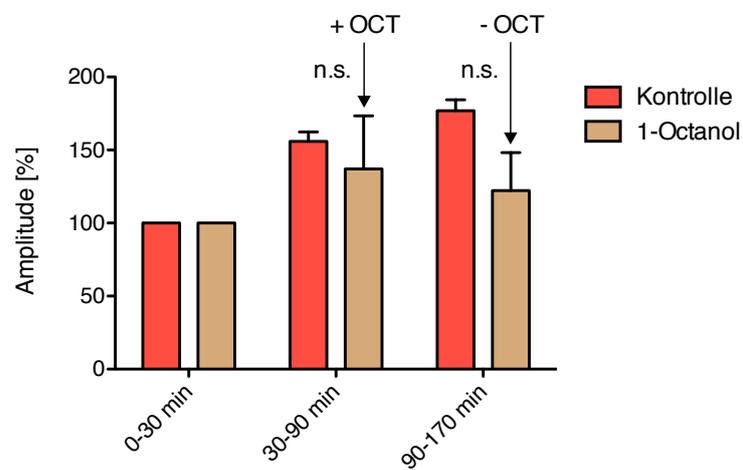
Abbildung 3.20 zeigt die Entwicklung der GABA-Wellen in den Gehirnschnittpräparaten der 1-Octanol-Gruppe ($n = 4$, 2 mM) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($n = 3$). Die Frequenz nahm in der 1-Octanol-Gruppe im Zeitintervall 30-90 Minuten (Beginn Einwaschen bis Beginn Auswaschen von 1-Octanol) auf 47.91 ± 8.388 Prozent ab, verglichen mit der Abnahme auf 72.24 ± 15.95 Prozent in der Kontrollgruppe. In der Varianzanalyse (zweifache ANOVA für Messwiederholungen) mit dem Nachtestverfahren nach BONFERRONI war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (95 %-KI: -55.47 bis 6.802). Ebenfalls nicht signifikant war ein Anstieg der Frequenz nach Auswaschbeginn von 1-Octanol auf 67.07 ± 3.114 Prozent im Vergleich zu 54.38 ± 12.56 Prozent in der Kontrollgruppe (95 %-KI: -18.45 bis 43.82). Die Amplitude stieg in der 1-Octanol-Gruppe im Zeitintervall 30-90 Minuten auf 137.1 ± 36.38 Prozent im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 155.9 ± 6.511 Prozent. Im Zeitraum 90-170 Minuten, also nach dem Auswaschen von 1-Octanol, betrug die Amplitude 122.3 ± 25.98 Prozent in der Interventionsgruppe im Vergleich zu 177.0 ± 7.419 Prozent in der Kontrollgruppe. Beide Unterschiede waren in der statistischen Analyse nicht signifikant (95 %-KI: -102.1 bis 64.47 und -137.9 bis 28.58). Von 30-90 Minuten zeigte sich für die Dauer ein Wert von 97.08 ± 27.19 Prozent in der Interventionsgruppe im Vergleich zu 181.1 ± 36.62 Prozent in der Kontrollgruppe. Auch nach Auswaschbeginn von 1-Octanol blieb die Dauer im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert auf 99.43 ± 27.64 Prozent gegenüber 178.1 ± 38.91 Prozent in der Kontrollgruppe. Diese Werte waren statistisch nicht signifikant verschieden (95 %-KI: -183.7 bis 15.57 und -178.3 bis 20.93).

3.2.3 Carbenoxolon in Cx36KO- und Cx45KO-Mäusen

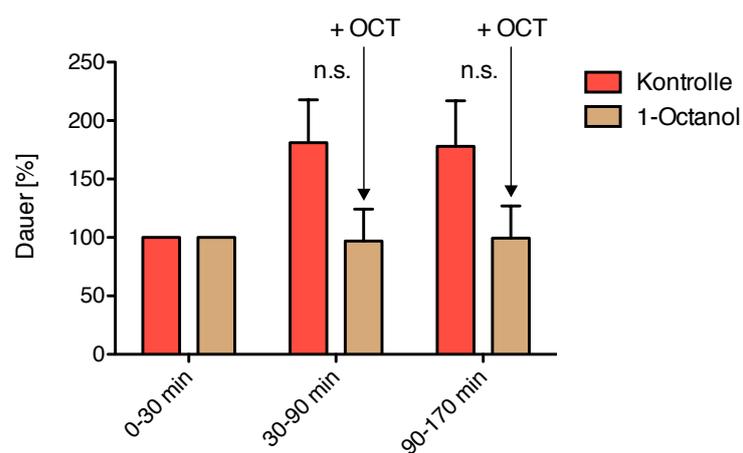
Nachdem gezeigt wurde, wie sich unterschiedliche Gap Junction Blocker auf die GABA-Wellen im Wildtyp auswirken (s. Abschn. 3.2.2), wurde nun untersucht, welchen Effekt der Gap Junction Blocker Carbenoxolon auf GABA-Wellen in Gehirnschnittpräparaten von Cx36KO- und Cx45KO-Mäusen hat. Hierzu wurden Feldpotentialmessungen der drei Genotypen (Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO) nach der Applikation von 4-AP und Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission über 170 Minuten abgeleitet. Wie in Abschnitt 3.2.2.1 befand sich Carbenoxolon von Minute 30 bis Minute 90 in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ in der Zirkulation; danach wurde das Auswaschen der Substanz



(a) GABA-Wellen: Frequenz



(b) GABA-Wellen: Amplitude



(c) GABA-Wellen: Dauer

Abbildung 3.20 (a)-(c): GABA-Wellen und Gap Junction Blocker: Kontrollgruppe vs. 1-Octanol, (a-c) Frequenz, Amplitude und Dauer: kein signifikanter Effekt durch 1-Octanol. Einzelne Parameter jeweils in Prozent des Mittelwertes 0-30 Minuten.

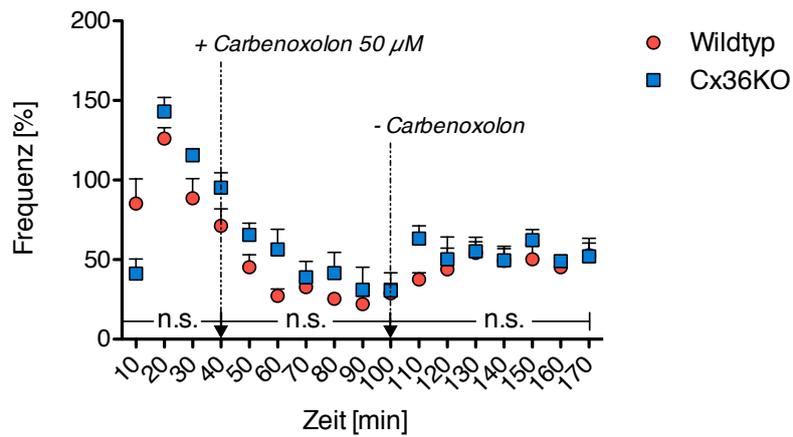
begonnen. Analog zu Abschnitt 3.2.2 sind sowohl für die Kontroll- als auch für die Interventionsgruppe die Parameter der GABA-Wellen in jedem 10-Minuten-Messintervall als prozentualer Anteil vom Durchschnitt der Messwerte des Zeitintervalls 0-30 Minuten angegeben.

3.2.3.1 Carbenoxolon: Cx36-Knockout *vs.* Wildtyp

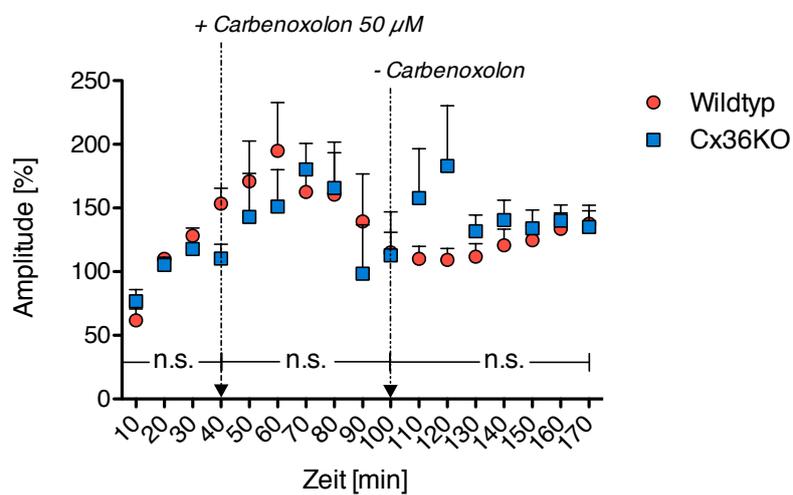
Es wurde der Effekt von Carbenoxolon auf die GABA-Wellen in 5 Gehirnschnittpräparaten des Cx36KO mit derjenigen auf 5 Gehirnschnittpräparate des Wildtyps verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt. In der Varianzanalyse (zweifache ANOVA für Messwiederholungen) ergab sich über 170 Minuten kein signifikanter Unterschied für Frequenz ($P = 0.2192$), Amplitude ($P = 0.8990$) oder Dauer ($P = 0.2419$) der GABA-Welle zwischen Cx36KO und Wildtyp. Die Zeitabschnitte vor Einwaschen (0-30 Minuten), nach Einwaschen (30-90 Minuten) und nach Auswaschbeginn (90-170 Minuten) von Carbenoxolon wurden im Nachtestverfahren nach BONFERRONI einer zweifachen ANOVA für Messwiederholungen verglichen. Auch hierbei zeigte sich für Amplitude, Dauer und Frequenz sowohl im Zeitintervall 0-30 Minuten (95 %-KI für f : -20.09 bis 20.09 , für A : -49.07 bis 49.07 und für Δt : -37.95 bis 37.95), sowie 30-90 Minuten (95 %-KI für f : -2.565 bis 37.62 , für A : -71.25 bis 26.90 und für Δt : -63.66 bis 12.24) als auch für den Zeitraum 90-170 Minuten (95 %-KI für f : -13.89 bis 26.29 , für A : -27.49 bis 70.66 und für Δt : -53.71 bis 22.19) kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Untersuchungsgruppen.

3.2.3.2 Carbenoxolon: Cx45-Knockout *vs.* Wildtyp

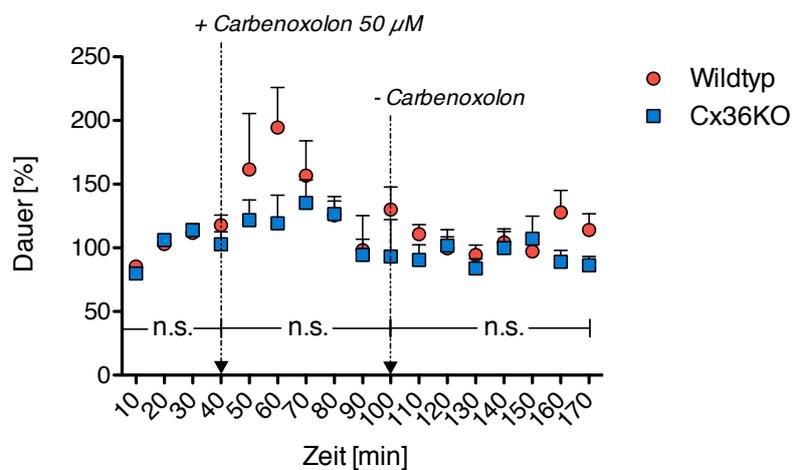
Es wurde der Effekt von Carbenoxolon auf die GABA-Wellen in 5 Gehirnschnittpräparaten des Cx45KO mit derjenigen auf 5 Gehirnschnittpräparate des Wildtyps verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 dargestellt. In der Varianzanalyse (zweifache ANOVA für Messwiederholungen) ergab sich über 170 Minuten kein signifikanter Unterschied für Frequenz ($P = 0.9831$) und Dauer ($P = 0.1722$) der GABA-Wellen zwischen Cx45KO und Wildtyp. Für die Amplitude ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied ($P = 0.0182$). Die Zeitabschnitte vor Einwaschen (0-30 Minuten), nach Einwaschen (30-90 Minuten) und nach Auswaschbeginn (90-170 Minuten) von Carbenoxolon wurden im Nachtestverfahren



(a) Frequenz: Detailansicht

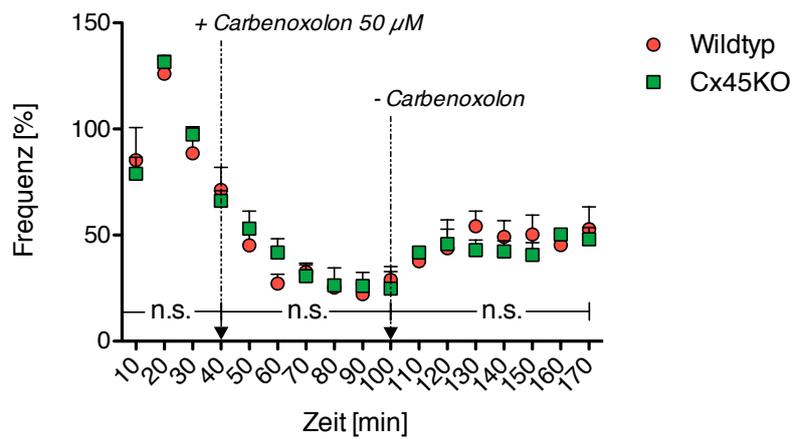


(b) Amplitude: Detailansicht

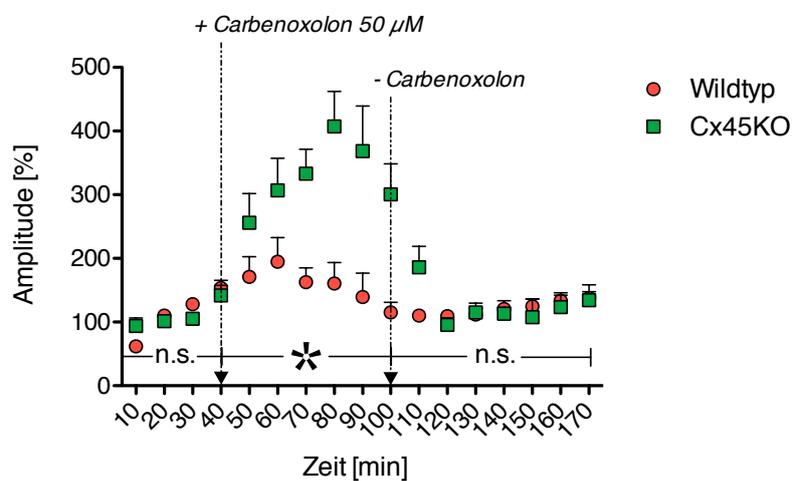


(c) Dauer: Detailansicht

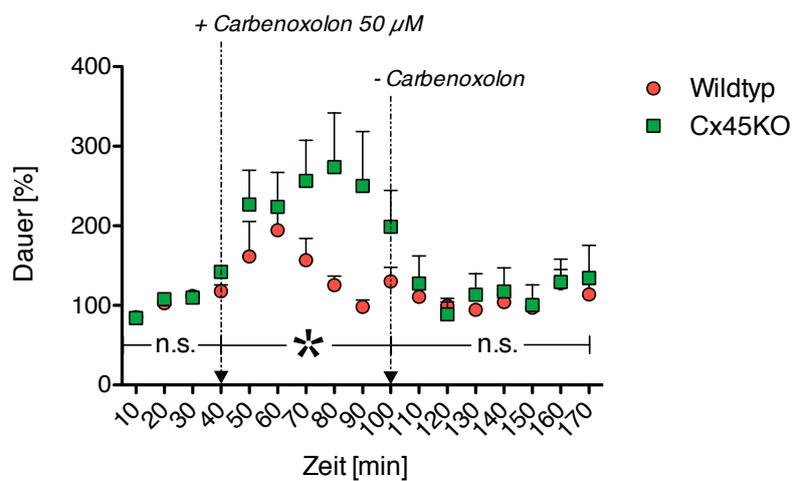
Abbildung 3.21 (a)-(c): Cx36KO vs. Wildtyp: Effekt von Carbenoxolon auf Frequenz (a), Amplitude (b) und Dauer (c) der GABA-Wellen. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede. Einzelne Parameter jeweils in Prozent des Mittelwertes 0-30 Minuten.



(a) Frequenz: Detailansicht



(b) Amplitude: Detailansicht



(c) Dauer: Detailansicht

Abbildung 3.22 (a)-(c): Cx45KO vs. Wildtyp: Effekt von Carbenoxolon auf Frequenz (a), Amplitude (b) und Dauer (c) der GABA-Wellen. Für Amplitude und Dauer finden sich signifikante Unterschiede unter Carbenoxolon. Einzelne Parameter jeweils in Prozent des Mittelwertes 0-30 Minuten.

nach BONFERRONI einer zweifachen ANOVA für Messwiederholungen verglichen. Für die Frequenz ergab sich vor Einwaschen (0-30 Minuten), nach Einwaschen (30-90 Minuten) und nach Auswaschbeginn (90-170 Minuten) von Carbenoxolon kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen (95 %-KI: -14.26 bis 14.26 , -10.90 bis 17.63 und 17.41 bis 11.11). Allerdings zeigte sich nach Einwaschen von Carbenoxolon eine Zunahme von Amplitude (auf 302.3 ± 43.91 %) und Dauer (228.9 ± 45.98 %) der GABA-Wellen im Cx45KO verglichen mit dem Wildtyp (A : 163.7 ± 15.65 % und Δt : 142.4 ± 17.80 %). Beide Unterschiede waren statistisch signifikant (95 %-KI für A : 69.45 bis 207.9 und für Δt : 5.915 bis 167.1). Im Zeitraum vor der Applikation und nach Auswaschbeginn von Carbenoxolon unterschieden sich sowohl Amplitude (95 %-KI: -69.21 bis 69.21 und -39.81 bis 98.62) als auch Dauer (95 %-KI: -80.58 bis 80.58 und -60.25 bis 100.9) nicht signifikant von einander.

4 Diskussion

4.1 Methodische Betrachtung

4.1.1 Elektrophysiologie und Genotypisierung

Extra- und intrazelluläre Ableitungen zur Erfassung neuronaler (Netzwerk-)Aktivität in Gehirnschnittpräparaten *in vitro* sind etablierte Arbeitstechniken der Pysiologie (NUMBERGER und DRAGUHN, 1996; VERKHRATSKY et al., 2006). Methodisch entsprach das Vorgehen in dieser Arbeit hierbei üblichen Laborstandards; es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse mit anderen Arbeiten weitgehend vergleichbar sind. Zur Genotypisierung von Versuchstieren ebenfalls unumstritten ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (MULLIS und FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988; MULLIS, 1990). Sowohl Primer als auch PCR-Protokolle wurden von dem Institut übernommen, das die Deletion des Gens generiert hatte, so dass eine einwandfreie Zuordnung der Versuchstiere zum jeweiligen Genotyp möglich war (MAXEINER, 2005; WELLERSHAUS et al., 2008).

4.1.2 Auswahl der connexindefizienten Mausstämme

Gap Junction vermittelte Kopplung findet im Neocortex vor allem zwischen inhibitorischen Interneuronen statt (FUKUDA und KOSAKA, 2000; GALARRETA und HESTRIN, 2001a). Auch Gliazellen, insbesondere Astrozyten, sind über Gap Junctions gekoppelt (WASSEFF und SCHERER, 2011; SCEMES und SPRAY, 2012), in geringem Ausmaß auch Pyramidenzellen (WANG et al., 2010). Gap Junctions sind aus Connexin-Untereinheiten aufgebaut, von denen Cx36 die in Neuronen mit Abstand bedeutendste Isoform ist (SÖHL et al., 2005). Eine weitere Connexin-Expression in adulten neocorticalen Neuronen ist

bis heute nur für Cx45 gesichert (MAXEINER et al., 2003; CONDORELLI et al., 2003; SÖHL et al., 2004). Darüber hinaus wird eine mögliche Relevanz von Cx30.2 diskutiert, im zentralen Nervensystem ist es bisher allerdings nur in inhibitorischen Interneuronen des Hippocampus nachgewiesen worden (KREUZBERG et al., 2008). Ob es im Neocortex exprimiert wird, ist unklar.

Bei der hier betrachteten, synchronisierten neocorticalen Aktivität handelt es sich um ein Phänomen, das über GABAerge Interneurone vermittelt wird (ARAM et al., 1991; AVOLI et al., 1994). Um die Beteiligung elektrischer Synapsen an diesem Phänomen zu untersuchen, wurden daher Versuchstiere ausgewählt, die für die bekannten neocorticalen, neuronalen Connexine defizient sind. Nachgewiesen ist, dass die Gap Junction vermittelte Kopplung zwischen Interneuronen des Neocortex durch einen Knockout des Cx36-Gens nahezu vollständig aufgehoben wird (DEANS et al., 2001). Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch die Verwendung eines Cx36- und eines Cx45-defizienten Mausstammes die elektrische Kopplung zwischen Neuronen des Neocortex sehr umfassend beurteilt werden kann. Eine weitergehende Untersuchung hätte zwar durch die Betrachtung zusätzlicher Deletionen (z. B. eines Cx30.2-Knockouts) oder deren Kombination (z. B. eines Cx36/Cx45-Doppel-Knockouts) erfolgen können. Ein Cx30.2-Knockout stand allerdings zum Zeitpunkt der Experimente dieser Arbeit nicht zur Verfügung; die Existenz eines Cx36/Cx45-Doppel-Knockouts ist bis heute nicht publiziert. Auch ist aufgrund der dominierenden Rolle von Cx36 fraglich, ob eine solche, weitergehende Untersuchung einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn brächte.

4.1.3 Datenbasis

Die wesentlichen Experimente zur Beschreibung der Parameter der GABA-Wellen in Wildtyp, Cx36KO und Cx45KO weisen eine Stichprobengröße auf, die eine gute statistische Aussagekraft besitzt. Lediglich bei den langen Feldpotentialmessungen über 170 Minuten ist die (durch den hohen experimentellen Aufwand bedingte) geringe Stichprobengröße kritisch zu beurteilen. Ähnliches trifft für die Vergleiche zwischen einzelnen Neuronengruppen zu. Hier muss festgehalten werden, dass sich die vorliegende Arbeit auf supra- und infragranuläre Pyramidenzellen konzentrierte, was die geringe Anzahl abgeleiteter Interneurone erklärt. Für Aussagen über diese Zellpopulation, die trotz ihrer Heterogenität in einer einzigen Untersuchungsgruppe zusammengefasst werden musste, ist die vorliegende Arbeit nicht geeignet.

4.2 GABA-Wellen im adulten Neocortex der Wildtypmaus

4.2.1 Bedeutung der Untersuchung am Neocortex der Maus

Die synchronisierte neuronale Aktivität unter 4-Aminopyridin (4-AP) ist bisher in zahlreichen Regionen des Gehirns untersucht worden, darunter Rückenmark und entohirntaler Cortex, schwerpunktmäßig allerdings im Hippocampus (BUCKLE und HAAS, 1982; RUTECKI et al., 1987; AVOLI et al., 1996; KANG et al., 1998; LAMSA und TAIRA, 2003; ZSIROS et al., 2007; CHAPMAN et al., 2009; GONZALEZ-SULSER et al., 2011). Auch Arbeiten, die neuronale Synchronisation im Cx36-Knockout untersuchen, beziehen sich häufig auf den Hippocampus (MAIER et al., 2002; PAIS et al., 2003; BEAUMONT und MACCAFERRI, 2011). Für das 4-AP-Modell im Neocortex der Maus liegt bisher nur eine Arbeit vor, die sich aber auf die Phase der Entwicklung (*P6* bis *P9*) bezieht (RHEIMS et al., 2008); die Synchronisation neuronaler Netzwerke im Neocortex ist im Cx36-Knockout bisher nur wenig (HORMUZDI et al., 2001; DEANS et al., 2001) und im Cx45-Knockout gar nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit erweitert somit den Stand des Wissens in bisher wenig beleuchteten Bereichen: sie legt Messdaten aus dem Neocortex der Maus in Wildtyp, sowie Cx36- und Cx45-Knockout vor.

4.2.2 Generierung der GABA-Wellen

Die synchronisierte neuronale Aktivität (»GABA-Wellen«) wurde durch Applikation von 4-AP (100 μM), sowie Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission durch CNQX (10 μM) und D-AP5 (10 μM) hervorgerufen. In der Literatur sind am Neocortex für 4-AP Konzentrationen von 50-100 μM , für CNQX von 10-20 μM und für D-AP5 von 10-30 μM üblich (ARAM et al., 1991; BENARDO, 1997; LOUVEL et al., 2001; YANG und BENARDO, 2002; AVOLI et al., 2003; KEROS und HABLITZ, 2005; DEFazio und HABLITZ, 2005; GIGOUT et al., 2006). Die GABA-Wellen wurden somit nach einem etablierten Verfahren erzeugt; die verwendeten Substanzen und Konzentration sind mit denjenigen aus bisher verfügbaren Publikationen vergleichbar.

4.2.3 Charakteristika der GABA-Wellen

In den intra- und extrazellulären Ableitungen traten in allen untersuchten Gehirnschnittpräparaten GABA-Wellen auf. Die Tatsache, dass diese auch in allen betrachteten Zelltypen detektiert werden konnten, zeigt, dass es sich hierbei nicht nur um ein auf Interneurone beschränktes Phänomen handelt, sondern dass auch die Pyramidenzellen, die von diesen reguliert werden, an der Erzeugung der GABA-Wellen beteiligt sind. Dabei entsprach der Zeitverlauf der GABA-Wellen in intra- und extrazellulären Messungen den Zeitverläufen, die in der Literatur bereits beschrieben worden sind. Insbesondere konnte der von BUCKLE und HAAS (1982) in Feldpotentialmessungen beschriebene Populations-Spike auch im Neocortex identifiziert werden.

Überraschenderweise sind bisher kaum genauere Angaben über Frequenz, Amplitude und Dauer der synchronisierten neocorticalen Aktivität innerhalb definierter Zeiträume, vor allem in der Maus, bekannt. In der Literatur werden für die Frequenz der Ereignisse im Neocortex verschiedener Spezies (unter verschiedenen experimentellen Konstellationen) Werte von 0.48 bis 6 pro Minute angegeben (ARAM et al., 1991; AVOLI et al., 1994; BENARDO, 1997; LOUVEL et al., 2001; GIGOUT et al., 2006; GONZALEZ-SULSER et al., 2011). Wesentlich seltener wird über Amplitude und Dauer der GABA-Wellen berichtet. Für Feldpotentialmessungen ist für die Amplitude eine Spannweite von 0.2 bis 4 mV bekannt (LOUVEL et al., 2001; GIGOUT et al., 2006), für die Dauer von 0.2 bis 11.7 s (AVOLI et al., 1994; YANG und BENARDO, 2002). In intrazellulären Ableitungen sind für keinen der beiden letztgenannten Parameter nähere Angaben publiziert. Diese Lücke wird durch die vorliegende Arbeit geschlossen: erstmals werden diese drei Parameter in synchronen intra- und extrazellulären Ableitungen über 30 Minuten dargestellt. Die Mittelwerte für Frequenz und Amplitude liegen hierbei innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs, lediglich die Dauer liegt in den hier dargestellten Ergebnissen niedriger. Diese Abweichung könnte auf Unterschiede zwischen den Spezies, verschiedene Substanzkonzentrationen und Messprotokolle oder abweichende Auswertevorschriften zurückzuführen sein. Für die Frequenz ist beispielsweise nachgewiesen, dass sie von Alter der Versuchstiere abhängig ist (WONG und YAMADA, 2001).

4.2.3.1 Entwicklung der GABA-Wellen über die Zeit

In der Literatur finden sich zwar Arbeiten, die zur Klärung bestimmter Sachverhalte ebenfalls Messungen zur synchronisierten neuronalen Aktivität unter 4-AP über längere Zeiträume durchgeführt haben, eine systematische Betrachtung der Entwicklung der Parameter Frequenz, Amplitude und Dauer ist dabei allerdings bis heute nicht publiziert. In der vorliegenden Arbeit ergibt sich für die Frequenz in intra- wie extrazellulären Ableitungen über 30 Minuten ein charakteristisches Bild: der Anstieg von 10-20 Minuten erklärt sich durch den Einwaschvorgang der Pharmaka, die erst ihren Wirkort in der Ableitkammer über das Zirkulationssystem erreichen müssen. Der folgende Abfall bis 40 Minuten in den kombinierten intra- und extrazellulären Ableitungen, bzw. bis 170 Minuten in den langen Feldpotentialmessungen könnte – für sich alleine betrachtet – durch eine höhere Vitalität der Neurone zu Messbeginn erklärt werden. In Zusammenschau mit der Entwicklung von Amplitude und Dauer der GABA-Wellen ergibt sich jedoch ein anderes Bild: Die Abnahme der Frequenz bei gleichzeitiger Zunahme von Dauer und Amplitude spricht vielmehr für eine Zunahme der neuronalen Synchronisation im Gehirnschnittpräparat. Diese Ergebnisse zeigen also, dass es unter Langzeiteinwirkung von 4-AP bei gleichzeitiger Blockade der exzitatorischen Aminosäurerezeptoren zu einer Reorganisation und Umprogrammierung GABAerger Netzwerke im Neocortex kommt.

In den extrazellulären Ableitungen dieser Arbeit fand sich in jedem Messzeitraum eine geringere Frequenz der GABA-Wellen als in den intrazellulären Ableitungen. Diese Beobachtung kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann in intrazellulären Ableitungen jedes Ereignis sehr klar vom Membranpotential abgegrenzt werden, wohingegen extrazelluläre Messungen prinzipiell stärker störanfällig und mit einem höheren Maß an Rauschen behaftet sind. Die niedrigere Frequenz in den extrazellulären Ableitungen könnte also Folge der konservativen Auswertevorschriften sein, die verhindern sollten, dass Artefakte fälschlicherweise als Ereignisse aufgefasst werden. Zum anderen wurde die Feldelektrode in der Nähe des interessierenden Neurons in das Gehirnschnittpräparat eingebracht, so dass es in einigen Fällen vorkommen konnte, dass sie in einem Gebiet mit nur wenigen aktiven Neuronen zu liegen kam. Daher sind Konstellationen möglich, in denen intrazellulär eine hohe Aktivität gemessen wird, während extrazellulär nur wenige Neurone zur Amplitude in der Feldpotentialableitung beitragen, so dass diese den Grenzwert der Auswertevorschriften nicht überschreitet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nicht jede GABA-Welle in einer Einzelzelle tatsächlich mit einer Synchronisation

des gesamten Netzwerkes einhergeht. Wenn extrazellulär nur Teile des Netzwerkes erfasst wurden, könnten diese unter der Auflösungsgrenze der Ableitung geblieben sein.

4.2.3.2 Auswirkungen von Gap Junction Blockern auf die GABA-Wellen im Wildtyp

In der Vergangenheit ist sowohl in mRNA-Expressionsstudien (SZENTE et al., 2002; GAJDA et al., 2003; ZAPPALÀ et al., 2006; GAJDA et al., 2006) als auch durch Versuche mit Substanzen zur pharmakologischen Blockade von Gap Junctions eine Beteiligung elektrischer Synapsen an der Vermittlung der synchronisierten neuronalen Aktivität durch 4-AP unterstellt worden. Eine Reduktion dieser Aktivität ist für spezifische (GAJDA et al., 2005; GIGOUT et al., 2006; CHAPMAN et al., 2009) und unspezifische Gap Junction Blocker gezeigt (ROSS et al., 2000; YANG und MICHELSON, 2001; TRAUB et al., 2001; GIGOUT et al., 2006; ZSIROS et al., 2007; MEDINA-CEJA et al., 2008). Bekannt ist, dass die Gap-Junction-Blocker Carbenoxolon, 1-Heptanol und 1-Octanol auch am Neocortex zu einer Beeinträchtigung »epileptiformer Aktivität« führen (BIKSON et al., 1999; ROSS et al., 2000; YANG und MICHELSON, 2001). Diese Befunde konnte auch in dieser Arbeit am Neocortex der Maus nachvollzogen werden. Die Versuche wurden mit verschiedenen Pharmaka durchgeführt, da bis heute kein »perfekter« Gap Junction Blocker existiert, sondern alle bekannten Substanzen eine vielfältige Pharmakodynamik und teilweise geringe Selektivität aufweisen.

Carbenoxolon Bei Carbenoxolon handelt es sich um den etabliertesten Gap Junction Blocker. Es ist zu diesem Zweck in zahlreichen Hirnregionen eingesetzt worden (BIKSON et al., 1999; ROSS et al., 2000; YANG und MICHELSON, 2001; TRAUB et al., 2001; GIGOUT et al., 2006). Die Reduktion der Frequenz der GABA-Wellen durch Carbenoxolon in dieser Arbeit war unter der Annahme, dass Gap Junctions an der Vermittlung der synchronisieren neocorticalen Aktivität beteiligt sind, zu erwarten. Bemerkenswert ist, dass es nach Beginn des Auswaschens von Carbenoxolon zusätzlich auch zu einer bis dahin nicht vorhandenen Reduktion der Amplitude der GABA-Wellen kam. Hierfür spielen möglicherweise Langzeiteffekte von Carbenoxolon eine Rolle. In der Literatur wird Carbenoxolon teilweise in Konzentrationen bis zu 500 μM eingesetzt (GIGOUT et al., 2006). Die Zugabe in das Zirkulationssystem führt allerdings zu deutlicher Schaumbildung. Um diese (und damit die Gefährdung des Experiments durch Luftblasen im Zirkulationssystem)

zu verhindern, wurde Carbenoxolon in Konzentrationen von nur 50 μM eingesetzt. Auch in dieser Konzentration war es zur Reduktion der Frequenz der GABA-Wellen effektiv; außerdem konnte es zumindest partiell ausgewaschen werden.

Als Gap Junction Blocker muss Carbenoxolon, obwohl es die hierfür gebräuchlichste Substanz ist, kritisch betrachtet werden. Chemisch gesehen ist Carbenoxolon ein synthetisches Derivat der Glycyrrhetinsäure und hat daher mineralcortikoide Effekte (JUSZCZAK und SWIERGIEL, 2009), was zu unerwünschten Wirkungen führen kann. Darüber hinaus ist seine Blockadewirkung in Bezug auf Connexine unselektiv. Von Carbenoxolon ist bekannt, dass es spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (EC_{50} : 48 μM) (VESSEY et al., 2004) und NMDA-abhängige Ströme (EC_{50} : 104 μM) (CHEPKOVA et al., 2008) blockiert und die 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD) (ab 1-10 μM), ein Enzym, das im Körper der Inaktivierung von Steroidhormonen dient, inhibiert (BUJALSKA et al., 1997). In Konzentrationen ab 50 μM blockt Carbenoxolon P2X7-Rezeptoren (SUADICANI et al., 2006), einen Subtyp ATP-gesteuerter nichtselektiver Kationenkanäle in Säugetieren (CODDOU et al., 2011). Die reduzierte Konzentration in der vorliegenden Arbeit dient also auch dazu, diese unerwünschten Interaktionen möglichst gering zu halten. Dennoch ist festzuhalten, dass bei einem Effekt, der unter Carbenoxolon beobachtet wird, nie mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass dieser Effekt auf eine Blockade elektrischer Synapsen zurückzuführen ist.

1-Heptanol und 1-Octanol Als hocheffektiv in der Blockade der synchronisierten neocortikalen Aktivität erwies sich 1-Heptanol, das bereits im Hippocampus als Gap Junction Blocker eingesetzt wurde (BIKSON et al., 1999). Es hatte in einer Konzentration von 2 mM einen Effekt auf alle 3 Parameter der GABA-Wellen, reduzierte also Frequenz, Amplitude und Dauer signifikant. Bemerkenswert ist, dass es nach dem Auswaschbeginn zu einem Anstieg der Frequenz der GABA-Wellen kam, der signifikant über der Frequenz in der Kontrollgruppe lag, und sich deren Niveau erst langsam (über ca. 40 Minuten) wieder annäherte. Es entsteht der Eindruck, dass das neuronale Netzwerk die unterdrückte Aktivität gewissermaßen »nachholt«. Auch ist dieser Umstand ein weiterer Hinweis auf die Vitalität der Schnittpräparate über lange Messzeiträume. Interessanterweise war der Effekt von 1-Heptanol auf Frequenz und Amplitude nach Auswaschbeginn reversibel, wohingegen der Effekt auf die Dauer bis zum Ende des Experiments anhielt. Es lässt sich also vermuten, dass 1-Heptanol nur zum Teil aus neocorticalen Schnittpräparaten

auswaschbar ist. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine teilweise irreversible Integration dieses Alkanols in die Plasmamembran der Nervenzellen sein.

Im Gegensatz zu 1-Heptanol hatte 1-Octanol in einer Konzentration von 2 mM keinen Effekt auf die GABA-Wellen. Diese Tatsache überrascht insoweit, als dass in der Literatur ein Effekt auf die synchronisierte neocorticale Aktivität im Gehirnschnittpräparat bereits in geringeren Konzentrationen (1 mM) beschrieben worden ist (GIGOUT et al., 2006). GIGOUT et al. (2006) untersuchten allerdings humane Gehirnschnittpräparate, die von Patienten stammten, die an Temporallappenepilepsie oder fokaler corticaler Dysplasie erkrankt waren. Für die abweichenden Ergebnisse könnten also Unterschiede zwischen den Spezies, dem Alter der Präparate, dem Versuchsablauf sowie Unterschiede zwischen initial gesunden und erkrankten Gehirnen von Bedeutung sein. Es muss aber auch der geringe Stichprobenumfang in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden.

Wie Carbenoxolon müssen auch 1-Heptanol und 1-Octanol als Gap Junction Blocker kritisch betrachtet werden. Es existiert kein Nachweis, dass eine der beiden Substanzen in Säugetieren selektiv auf Gap Junctions wirkt (SPRAY et al., 2002). Zwar ist bekannt, dass sowohl 1-Heptanol (1-3 mM) als auch 1-Octanol (0.5-1 mM) Gap Junctions blockieren können (GUAN et al., 1997; WEINGART und BUKAUSKAS, 1998; JOHNSTON et al., 1980). Diese Blockade geht aber mit einer Reihe weiterer, möglicherweise unerwünschter Wirkungen einher. 1-Heptanol (1.5-3 mM) inhibiert Kainat-Rezeptor-Antworten (DILDY-MAYFIELD et al., 1996) und spannungssensitive Ca^{2+} -Ströme (150 μM), außerdem werden calciumaktivierte K^+ -Kanäle aktiviert (150 μM) (MATCHKOV et al., 2004). 1-Octanol verstärkt GABA_A - und Glycin Rezeptor-Antworten (0.1-0.4 mM) und inhibiert NMDA (0.1-0.4 mM), AMPA (0.2-0.5 mM) und Kainat-Rezeptoren (0.1-0.4 mM) (DILDY-MAYFIELD et al., 1996). Es hat eine Blockadewirkung auf Calciumkanäle vom T-Typ (EC_{50} : 122 μM) (TODOROVIC und LINGLE, 1998). Beide Substanzen inhibieren px27-Rezeptoren (1.5 mM) (SUADICANI et al., 2006). Es handelt sich also um Substanzen, die weder für bestimmte Connexin-Isoformen, noch für Gap Junctions allgemein, selektiv sind.

Mefloquin Eine weitere Gruppe von Pharmaka, die häufig als Gap Junction Blocker eingesetzt werden, sind Quinin und seine Derivate, denen eine spezifischere Wirkung auf Cx36 zugeschrieben wird (JUSZCZAK und SWIERGIEL, 2009). Die neueste Substanz aus dieser Gruppe ist Mefloquin, das in der Medizin zur Prophylaxe und Therapie der Malaria eingesetzt wird. Es soll selektiv Gap Junctions blockieren, die aus Cx36

und Cx50 aufgebaut sind (CRUIKSHANK et al., 2004). Diese Vermutung beruht sowohl auf Untersuchungen an Zellkulturen (transfizierte N2A Neuroblastomzellen) als auch auf Versuchen an Gehirnschnittpräparaten aus dem Hippocampus der Ratte. Dort ist gezeigt worden, dass Mefloquin (25 μM) die Gap Junction vermittelte Kopplung zwischen Interneuronen – ohne Veränderung ausgelöster IPSP und EPSP oder intrinsischer Eigenschaften – blockiert (CRUIKSHANK et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit führte Mefloquin (50 μM) zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz der GABA-Wellen; dieser Effekt war nach Auswaschen reversibel. Dieses Ergebnis stützt ebenfalls die Hypothese, dass Gap Junctions für die Entstehung der GABA-Wellen von Bedeutung sind. Allerdings muss beachtet werden, dass Mefloquin in der hier verwendeten Konzentration auch auf andere Connexin-Isoformen wirkt: ab 30 μM kommt es neben der Blockade von Cx36 auch zu einem nahezu vollständigen Block von Cx43 und zu einer signifikanten Blockade von Cx26 und Cx32 (CRUIKSHANK et al., 2004). Außerdem sind, wie für alle Gap Junction Blocker, auch für Mefloquin möglicherweise unerwünschte Wirkmechanismen beschrieben: es kann die IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung (EC_{50} : 42 μM) (LEE und GO, 1996) und die Aktivität der Acetylcholinesterase inhibieren (LIM und GO, 1986), außerdem wurde eine Blockade von Adenosin $\text{A}_{2\text{A}}$ - (WEISS et al., 2003) und P2X7-Rezeptoren (1 nM) beschrieben (SUADICANI et al., 2006). Ferner kann es unter Mefloquin zu einer Inhibition ATP-sensitiver K^+ -Kanäle (EC_{50} : 3 μM) und von P-Glykoproteinen (EC_{50} : 1-20 μM) kommen (PHAM et al., 2000).

4.3 Gap Junctions und neocorticale Synchronisation im 4-Aminopyridin-Modell

Pharmakologischer Haupteffekt von 4-AP in Gehirnschnittpräparaten ist die Blockade spannungsabhängiger K^+ -Kanäle (SPAIN et al., 1991a,b; KOBAYASHI et al., 2008; ZAHN et al., 2008). Die synchronisierte neuronale Aktivität, die bei Applikation von 4-AP unter Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission entsteht, wird über GABAerge Interneurone vermittelt, wobei die größte Bedeutung GABA_A -Rezeptoren zukommt (ARAM et al., 1991; PERREAULT und AVOLI, 1992; AVOLI et al., 1994, 1996; LOUVEL et al., 2001; LAMSA und TAIRA, 2003; AVOLI et al., 2003), GABA_B -Rezeptoren sind für einige Komponenten verantwortlich und haben modulierende Funktion (BENARDO, 1997; KANG et al., 1998; KANTROWITZ et al., 2005; GONZALEZ-SULSER et al., 2011; PANUCCIO et al., 2012). Dies trifft so auch für den Neocortex zu (ARAM et al., 1991; AVOLI et al., 1994;

BENARDO, 1997; LOUVEL et al., 2001; YANG und BENARDO, 2002; KEROS und HABLITZ, 2005; GIGOUT et al., 2006). Sowohl durch Ergebnisse aus mRNA-Expressionsstudien (SZENTE et al., 2002; GAJDA et al., 2003; ZAPPALÀ et al., 2006; GAJDA et al., 2006) als auch durch Versuche mit Gap Junction Blockern wurde elektrischen Synapsen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung dieser synchronisierten neuronalen Aktivität unterstellt (ROSS et al., 2000; YANG und MICHELSON, 2001; TRAUB et al., 2001; GIGOUT et al., 2006; ZSIROS et al., 2007; MEDINA-CEJA et al., 2008). Die größte Bedeutung wurde hierbei Gap Junctions zugeschrieben, die aus Cx36 aufgebaut sind, unter anderem deshalb, weil Cx36 das mit Abstand bedeutendste neuronale Connexin darstellt (CONDORELLI et al., 1998; TEUBNER et al., 2000; RASH et al., 2000; BELLUARDO et al., 2000; MEIER et al., 2002; WILLECKE et al., 2002; SÖHL et al., 2004). Auch Versuche mit Substanzen, die eine spezifische Blockade von Cx36 ermöglichen sollen (z. B. Quinidin oder Mefloquin), wiesen in diese Richtung (GAJDA et al., 2005; GIGOUT et al., 2006; CHAPMAN et al., 2009). Aus der Literatur ist bekannt, dass Cx36-Knockout-Mäuse über nahezu keine elektrischen Synapsen zwischen corticalen Interneuronen verfügen (DEANS et al., 2001). Ein weiteres Connexin, für das eine – wenn auch wesentlich geringere – Expression in bestimmten Interneuronen und Pyramidenzellen des Neocortex nachgewiesen ist, ist Cx45 (CONDORELLI et al., 2003; MAXEINER et al., 2003; SÖHL et al., 2004, 2005).

Dies war der Hintergrund, vor dem in der vorliegenden Arbeit Versuche zur synchronisierten neocorticalen Aktivität im 4-AP-Modell am Wildtyp sowie im Cx36KO und im Cx45KO durchgeführt wurden. Aufgrund seiner geringen Expression war für Cx45 keine wesentliche Bedeutung für die Induktion der GABA-Wellen zu vermuten. Somit überrascht es nicht, dass sich bei den hier dargestellten Versuchen kein Unterschied in den Parametern der GABA-Wellen zwischen Wildtyp und Cx45KO ergab. Anderes gilt für Cx36. Hier war auf Basis der Erkenntnisse aus der Literatur zu vermuten, dass sich im Cx36KO eine geringere Aktivität der GABA-Wellen zeigt. Überraschenderweise kam es jedoch sowohl in extra- als auch in intrazellulären Ableitungen zu einer signifikant höheren Frequenz der GABA-Wellen als im Wildtyp. Diese Tatsache steht in Widerspruch zu den Ergebnissen der Versuchsreihe mit Gap Junction Blockern, die insgesamt darauf hindeuten, dass die Blockade von Gap Junctions im Neocortex zu einer Reduktion der Frequenz der GABA-Wellen führt. Zu diesem Widerspruch lassen sich mehrere Überlegungen anstellen. Es ist denkbar, dass die Reduktion der Frequenz der GABA-Wellen durch Gap Junction Blocker nicht auf der Blockade von Gap Junctions beruht, sondern auf den vielfältigen übrigen Wirkungen, die jede der verwendeten Substanzen in der eingesetzten Konzentration aufweist. Diese Interpretation spräche dafür, dass die Bedeutung von

Gap Junctions für die Entstehung der GABA-Wellen im 4-AP-Modell bisher überschätzt wurde und im Neocortex so nicht gegeben ist. Hierbei müsste der direkte Nachweis von GABA-Wellen im Cx36KO als valider angesehen werden als der wesentlich indirektere Hinweis aus Versuchen mit Gap Junction Blockern. Dies alleine erklärt allerdings noch nicht, weshalb die Frequenz der GABA-Wellen durch den Knockout von Cx36 nicht nur nicht vermindert wird, sondern im Gegenteil sogar signifikant höher liegt als im Wildtyp. Um dies interpretieren zu können, müssen auch Amplitude und Dauer der GABA-Wellen im Cx36KO näher betrachtet werden.

4.3.1 Connexin 36

Interessanterweise hat sich im Cx36KO eine höhere Frequenz der GABA-Wellen gezeigt als in Wildtyp und C45KO. Betrachtet man nur den Parameter Frequenz isoliert, lässt sich diese Erhöhung nicht sinnvoll deuten. Diese erhöhte Frequenz war allerdings in intrazellulären Ableitungen mit einer Reduktion der Dauer, in extrazellulären Ableitungen mit einer Reduktion der Amplitude vergesellschaftet. Es kommt im Cx36KO also zu einer höheren Anzahl von Ereignissen, die jedoch insgesamt kleiner und kürzer sind als in Versuchstieren, die Cx36 exprimieren. Eine Abnahme der Frequenz bei gleichzeitiger Zunahme der Amplitude oder Dauer ist ein Hinweis auf eine zunehmende Synchronisation in neuronalen Netzwerken. Folglich zeigt im Umkehrschluss die Zunahme der Frequenz bei gleichzeitiger Abnahme von Amplitude oder Dauer ein geringeres Maß an Synchronisation im Neocortex an. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass Cx36 für die Entstehung der GABA-Wellen nicht essentiell ist, wohl aber für die Synchronisation der Aktivität in neocorticalen Netzwerken eine signifikante Rolle spielt. Dieses Erkenntnis lässt sich auch gut mit einer aktuellen Arbeit von BEAUMONT und MACCAFERRI (2011) in Einklang bringen, die im Hippocampus von Cx36-Knockout-Mäusen keine kritische Rolle von Cx36 für die Entstehung synchronisierter Entladungen finden konnten. Diese Autoren vermuten, dass der von ihnen ebenfalls beobachtete Effekt von Carbenoxolon auf einer Blockade von GABA_A-Rezeptoren durch Carbenoxolon beruht.

Die genaue Betrachtung der Aktivität in einzelnen Zelltypen ergab, dass der Unterschied zwischen Wildtyp und Cx36KO in Bezug auf die Frequenz auf einem Unterschied zwischen supragranulären Pyramidenzellen, in Bezug auf die Dauer auf einem Unterschied zwischen Interneuronen beruht. Der direkte Einfluss auf die Interneurone ergibt sich durch deren extensive Kopplung über elektrische Synapsen. Der Wegfall der Kopplung in

den Interneuronen hat aber offenbar auch Einfluss auf die Pyramidenzellen, die von diesen reguliert werden. In der Literatur sind auch an anderer Stelle schon schichtspezifische (AVOLI et al., 1994; YANG und BENARDO, 2002; RHEIMS et al., 2008) und zelltypspezifische Unterschiede (DEFAZIO und HABLITZ, 2005; KEROS und HABLITZ, 2005; ZIBURKUS et al., 2006) für die synchronisierte neuronale Aktivität unter 4-AP beschrieben worden. Beispielsweise wurde von KEROS und HABLITZ (2005) gezeigt, dass vor allem Interneurone der Schicht I für die GABA-Wellen bedeutsam sind. Bei der Betrachtung einzelner Neuronengruppen in dieser Arbeit muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Stichprobenanzahl für einen repräsentativen Vergleich nicht ausreichend ist. Auch die Zusammenfassung der sehr heterogenen Gruppe der Interneurone kann mögliche schicht- oder typspezifische Unterschiede innerhalb dieser Population verschleiern.

4.3.2 Connexin 45

Aufgrund seiner erheblich geringeren neocorticalen Expression im Vergleich zu Cx36 ist für Cx45 bisher keine entscheidende Bedeutung bei der synchronisierten neocorticalen Aktivität vermutet worden. Dies hat sich insofern bestätigt, als dass es bezüglich der Parameter der GABA-Wellen keinen signifikanten Unterschied zwischen Cx45KO und Wildtyp gab. Allerdings ergab die vergleichende Applikation von Carbenoxolon zwischen Wildtyp und Cx45KO einen überraschenden Effekt: werden mittels Carbenoxolon sämtliche Gap Junctions unselektiv blockiert, zeigt sich im Cx45KO eine reversible Zunahme von Dauer und Amplitude der GABA-Wellen. Auch für dieses Phänomen lassen sich mehrere Erklärungsansätze finden. Es könnte zum einen auf einen Effekt auf den astrozytären »spatial buffer« für extrazelluläres K^+ durch den Knockout von Cx45 zurückgeführt werden. Vor dem Hintergrund, dass für C45 bis heute keine Expression in Astrozyten nachgewiesen ist, erscheint dies allerdings eher unwahrscheinlich. Interessanter und wahrscheinlicher ist, dass es sich hierbei um einen ersten Hinweis auf eine bisher unbekannte Bedeutung von Cx45 in der Regulation synchronisierter neocorticaler Aktivität handeln könnte. Cx45 könnte in einer speziellen Subpopulation von Interneuronen exprimiert werden, die einer übermäßigen Synchronisation neocorticaler Netzwerke entgegenwirkt. Die Aussagekraft dieses Experiments ist aufgrund des geringen Stichprobenumfangs begrenzt, sollte jedoch zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung Anlass geben.

4.3.3 Mögliche Beteiligung astrozytärer Netzwerke

Die Tatsache, dass der unselektive Gap Junction Blocker Carbenoxolon sowohl im Cx36KO als auch im Wildtyp die Aktivität der GABA-Wellen in nahezu gleicher Art und Weise supprimiert, unterstützt zum einen die oben ausgeführte These, dass dieser Effekt nicht auf der Blockade von elektrischen Synapsen, sondern möglicherweise in der direkten Wirkung von Carbenoxolon auf andere Bestandteile der synaptischen Übertragung beruht. Jüngst vermuteten BEAUMONT und MACCAFERRI (2011), dass der Effekt von Carbenoxolon auf die synchronisierte Aktivität im Hippocampus auf eine direkten Inhibition von GABA_A-Rezeptoren zurückzuführen ist. Jedoch blockiert Carbenoxolon auch eine Vielzahl von Connexin-Kanälen unselektiv, was eine weitere Möglichkeit eröffnet: möglicherweise sind astrozytäre Netzwerke, die die Connexine Cx26, Cx30 und Cx43 exprimieren, an der neuronalen Synchronisation im 4-AP-Modell beteiligt, denn die Expression dieser Connexin-Isoformen ist im Cx36KO und Cx45KO gleichermaßen vorhanden. Auch dieser Befund lässt sich gut mit aktueller Literatur in Einklang bringen, da sich zunehmend zeigt, dass die Bedeutung von Astrozyten für die Regulation neuronaler Netzwerke in der Vergangenheit generell unterschätzt worden ist und in jünster Zeit auch für die Regulation synchronisierter Aktivität verstärkt diskutiert wird (NEDERGAARD et al., 2003; TIAN et al., 2005; KANG et al., 2005; PEREA und ARAQUE, 2005).

4.4 Die GABA-Wellen als chloridabhängige Vorgänge

Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte Umkehrpotential der GABA-Wellen (-73.5 mV) deckt sich mit aus der Literatur bekannten Bestimmungen des Umkehrpotentials in neocorticalen Neuronen anderer Spezies. Dort wurden für den Neocortex der Ratte Umkehrpotentiale von -72.1 bis -82.5 mV angegeben (BARKAI et al., 1995; BENARDO, 1997). Nach der NERNST-Gleichung gilt für das Gleichgewichtspotential E_{eq} eines Ions an biologischen Membranen

$$E_{eq, Ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Ion]_{ez}}{[Ion]_{iz}}$$

mit der allgemeinen Gaskonstante $R = 8.31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, der absoluten Temperatur T in Kelvin, der Ionenwertigkeit z und der FARADAY-Konstante $F = 96485,34 \text{ C mol}^{-1}$. Bei 28°C ergibt sich mit den in dieser Arbeit verwendeten Stoffkonzentrationen für Chlorid ein Gleichgewichtspotential $E_{\text{Cl}^-} = -80.2 \text{ mV}$. Das ermittelte Umkehrpotential von -73.5 mV deutet somit an, dass es sich bei den GABA-Wellen am ehesten um einen chloridabhängigen Vorgang handelt.

4.5 Reversible ektope Dauerentladung neocorticaler Neurone in Gegenwart von 4-Aminopyridin

Ektope Aktionspotentiale unter 4-AP sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben worden (KEROS und HABLITZ, 2005). Allerdings wurde bisher vermutet, dass es sich hierbei um ein Phänomen handelt, das ausschließlich in Interneuronen auftritt und Pyramidenzellen nicht betrifft. Die vorliegende Arbeit zeigt nun erstmals, dass sowohl Interneurone als auch Pyramidenzellen unter 4-AP mehrfach reversible Dauerentladungen von Aktionspotentialen zeigen können. Während die GABA-Wellen synaptischen Ursprungs ist, scheinen diese ektope Aktionspotentiale durch nicht-synaptischen Mechanismen generiert zu werden, die durch eine direkte Wirkung von 4-AP auf einzelne Neurone zustande kommen. Es handelt sich hierbei offenbar um ein seltenes Ereignis, das nur bei 6 Prozent der abgeleiteten Zellen nachgewiesen werden konnte. Da dieses Phänomen in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde, könnten weitere Untersuchungen zeigen, ob es sich hierbei möglicherweise um ein Phänomen handelt, das auf den Neocortex oder die Maus beschränkt ist.

4.6 Die GABA-Wellen: »epileptiforme« Aktivität?

In frühen Publikationen zur synchronisierten neuronalen Aktivität durch 4-AP wurden die beobachteten Ereignisse häufig als »plötzliche, depolarisierende Verschiebung« (paroxysmal depolarizing shift, PDS) des Membranpotentials bezeichnet (BUCKLE und HAAS, 1982; KITA et al., 1985). Für den charakteristischen Zeitverlauf der Aktivität wurde von einigen Autoren der Begriff »Wellen« (waves of activity) vorgeschlagen (BANDYOPADHYAY et al., 2006). In der Folgezeit hat sich in der Literatur allerdings die Bezeichnung

»epileptiforme Aktivität« (epileptiform activity) für die unter *in-vitro*-Bedingungen beobachteten Phänomene durchgesetzt (RUTECKI et al., 1987; PERREAULT und AVOLI, 1992; AVOLI et al., 1994; SINISCALCHI et al., 1997; MAIER et al., 2002; D'ANTUONO et al., 2004; DOUGALIS et al., 2004; AYALA und TAPIA, 2005). Im *in-vivo*-Experiment (unter Narkose) sprechen einige Autoren sogar nicht mehr von »epileptiformen«, sondern von »epileptischen« Entladungen im EEG (EEG epileptic discharges) (MORA und TAPIA, 2005). Darüber hinaus wird das 4-AP-Modell als »*in-vivo*-Epilepsiemodell« (*in vivo* epilepsy model) (GAJDA et al., 2006) und »*in-vitro*-Epilepsiemodell« (*in vitro* epilepsy model) bezeichnet (GONZALEZ-SULSER et al., 2011; BEAUMONT und MACCAFERRI, 2011). Frühe Autoren hatten den Begriff »Epilepsie« noch vermieden und von »(krampf-)anfallsartigen Entladungen« (seizure-type discharges) gesprochen (GALVAN et al., 1982).

Von 4-AP ist zwar seit langem bekannt, dass es konvulsive Eigenschaften besitzt (MURRAY und NEWSOM-DAVIS, 1981). Abzugrenzen ist dies aber vom Begriff »Epilepsie«, der eine Gruppe von Erkrankungen meint, die primär klinisch diagnostiziert werden. Nach der aktuellen Definition der »International League Against Epilepsy« (ILAE) und des »International Bureau for Epilepsy« (IBE) ist ein cerebraler Krampfanfall ein klinisches Ereignis (BEGHI et al., 2005). Charakteristische Entladungsmuster im EEG sind hierbei ein mögliches, bei weitem aber nicht das einzige und auch nicht das entscheidende Element der Diagnostik. Für die Diagnose »Epilepsie« ist mindestens ein cerebraler Krampfanfall *in vivo* sowie das Bestehen einer andauernden, pathologischen Veränderung im Gehirn, die das Auftreten weiterer Anfälle begünstigt, erforderlich. Ausdrücklich nicht hinreichend für diese Diagnose sind typische Veränderungen im EEG alleine (BEGHI et al., 2005). Nach diesen Definitionen handelt sich bei der Applikation von 4-AP in Versuchstieren also sicherlich nicht um ein »Epilepsiemodell«; folglich kommt es auch nicht zu »epileptischen Entladungen«. Auch der Begriff »epileptiform« muss vor diesem Hintergrund kritisch gesehen werden. Dass die durch 4-AP *in vitro* ausgelösten Ereignisse tatsächlich durch Mechanismen zustande kommen, die mit Pathogenese und Pathophysiologie der Epilepsien in Zusammenhang stehen, ist unbewiesen. Vielmehr könnte man die synchronisierte Aktivität von Nervenzellen unter 4-AP als korrekte physiologische Reaktion auf einen adäquaten pharmakologischen Reiz interpretieren. Bei tatsächlich epileptischen Anfällen spielt erwiesenermaßen auch die Synchronisation von Nervenzellpopulationen eine Rolle. Sie ist aber weder alleiniges noch definierendes Element. Vielmehr ist neuronale Synchronisation auch im gesunden Organismus für zahlreiche Netzwerkleistungen des zentralen Nervensystems essentiell. Ab welchem Grad eine Synchronisation *in vitro* möglicherweise »epileptiform« ist, bleibt völlig unklar.

Der Begriff »epileptiform« stellt einen Zusammenhang zwischen der synchronisierten, neuronalen Aktivität unter 4-AP einerseits und einer definierten Gruppe von Erkrankungen andererseits her, der so nicht erwiesen ist. Das 4-AP-Modell hat im Rahmen der Grundlagenforschung in der Vergangenheit und Gegenwart wertvolle Erkenntnisse über Synchronisation und Rhythmisierung in neuronalen Netzwerken ermöglicht. In der tatsächlichen Epilepsieforschung spielt es hingegen kaum eine Rolle. Diese Tatsache sollte sich dann auch in einer adäquaten Terminologie widerspiegeln.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den K^+ -Kanal-Blocker 4-Aminopyridin (4-AP, 100 μ M) unter Blockade exzitatorischer Aminosäurerezeptoren (CNQX, 10 μ M; D-AP5, 10 μ M) eine synchronisierte, neuronale Aktivität in neocorticalen Gehirnschnittpräparaten der Maus *in vitro* ausgelöst. Diese Synchronisation wird zum größten Teil über $GABA_A$ - und zum kleineren Teil über $GABA_B$ -Rezeptoren vermittelt, was zur Bezeichnung »GABA-Wellen« geführt hat. Bekannt ist, dass vor allem Interneurone des Neocortex extensiv über Gap Junctions gekoppelt sind. Gap Junctions sind aus Connexin-Untereinheiten aufgebaut. Das bedeutendste neuronale Connexin ist Cx36; ebenfalls in Neuronen exprimiert wird Cx45. In der Vergangenheit haben mRNA-Expressionsstudien und elektrophysiologische Versuche mit pharmakologischen Gap Junction Blockern Hinweise auf eine herausragende Bedeutung elektrischer Synapsen für die synchronisierte neuronale Aktivität unter 4-Aminopyridin geliefert. Um die diesbezügliche Bedeutung von Gap Junctions direkt zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit GABA-Wellen in Wildtyp-, Cx36-Knockout- und Cx45-Knockout-Mäusen anhand intra- und extrazellulärer Ableitungen von Pyramidenzellen sowie Interneuronen des Neocortex verglichen. Die Ergebnisse der Arbeit sind im Folgenden kurz zusammengefasst:

1. Anhand von Feldpotentialableitungen über 170 Minuten konnte gezeigt werden, dass die Synchronisation neocorticaler Netzwerke im 4-Aminopyridin-Modell im Wildtyp mit fortschreitender Zeit zunimmt.
2. Der Vergleich von Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen über 30 Minuten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Cx45KO.
3. Der Vergleich von Frequenz, Amplitude und Dauer der GABA-Wellen zwischen Wildtyp und Cx36KO über 30 Minuten ergab für den Cx36KO eine in intra- und extrazellulären Ableitungen signifikant höhere Frequenz sowie eine in intrazellulären

Ableitungen signifikant niedrigere Dauer und in extrazellulären Ableitungen signifikant niedrigere Amplitude. Dies zeigt, dass der Knockout von Cx36 die Induktion der GABA-Wellen nicht beeinträchtigt, jedoch zu einem geringeren Ausmaß an Synchronisation im Neocortex der Maus führt.

4. Dieses geringere Ausmaß an Synchronisation im Cx36KO ist offenbar auf Unterschiede zwischen supragranulären Pyramidenzellen und Interneuronen in diesen Genotypen zurückzuführen.

5. Der Befund in 3. steht im Widerspruch zu Versuchen mit Gap Junction Blockern. Die Substanzen Carbenoxolon (50 μ M), 1-Heptanol (2 mM) und Mefloquin (50 μ M) führten zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz der GABA-Wellen im Wildtyp. Der Effekt von Carbenoxolon auf die Parameter der GABA-Wellen ist in Wildtyp und Cx36KO im gleichen Ausmaß vorhanden. Von sämtlichen Gap Junction Blockern ist bekannt, dass sie unerwünschte Wirkungen aufweisen und nur begrenzt oder gar nicht selektiv wirken. Die vorliegende Arbeit legt somit nahe, dass die Effekte von Gap Junction Blockern auf die synchronisierte neuronale Aktivität unter 4-Aminopyridin möglicherweise nicht auf der Blockade elektrischer Synapsen, sondern auf anderen Mechanismen, beispielsweise einer direkten Inhibition von GABA_A-Rezeptoren, beruhen. Gap Junction Blocker sind in der Vergangenheit möglicherweise zu unkritisch eingesetzt worden.

6. Unter Einfluss von Carbenoxolon kommt es im Cx45KO im Vergleich zum Wildtyp zu einer signifikanten Zunahme von Amplitude und Dauer der GABA-Wellen. Damit ergibt sich in dieser Arbeit ein erster Hinweis darauf, dass Cx45 möglicherweise in einer speziellen Subpopulation neocorticaler Neurone exprimiert wird, die eine entscheidende Rolle bei der Modulation synchronisierter Aktivität spielen könnte.

7. Die Amplitude der GABA-Wellen in intrazellulären Ableitungen ist eine lineare Funktion des Membranpotentials zum Zeitpunkt ihrer Entstehung. Das Umkehrpotential der GABA-Wellen im Neocortex der Maus lag in dieser Arbeit bei -73.40 ± 0.83 mV. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um einen chloridabhängigen Vorgang handelt.

8. Erstmals werden ektope, mehrfach reversible Dauerentladungen neocorticaler Pyramidenzellen und Interneurone unter 4-Aminopyridin beschrieben. Diese Dauerentladungen sind vermutlich nicht synaptischen Ursprungs, sondern durch eine direkte Wirkung von 4-Aminopyridin auf einzelne Neurone bedingt.

Literaturverzeichnis

ABASCAL F. und ZARDOYA R. (2013) *Evolutionary analyses of gap junction protein families*. *Biochim Biophys Acta* **1828**: 4–14.

ALEV C., URSCHEL S., SONNTAG S., ZOIDL G., FORT A.G., HÖHER T., MATSUBARA M., WILLECKE K., SPRAY D.C. und DERMIETZEL R. (2008) *The neuronal connexin36 interacts with and is phosphorylated by CaMKII in a way similar to CaMKII interaction with glutamate receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20964–20969.

ALVIÑA K. und KHODAKHAH K. (2010) *The therapeutic mode of action of 4-aminopyridine in cerebellar ataxia*. *J Neurosci* **30**: 7258–7268.

AMITAI Y., GIBSON J.R., BEIERLEIN M., PATRICK S.L., HO A.M., CONNORS B.W. und GOLOMB D. (2002) *The spatial dimensions of electrically coupled networks of interneurons in the neocortex*. *J Neurosci* **22**: 4142–4152.

ANASTASIADIS P.G. und BUTT S.J.B. (2011) *Decoding the transcriptional basis for GABAergic interneuron diversity in the mouse neocortex*. *Eur J Neurosci* **34**: 1542–1552.

ARAM J.A., MICHELSON H.B. und WONG R.K. (1991) *Synchronized GABAergic IPSPs recorded in the neocortex after blockade of synaptic transmission mediated by excitatory amino acids*. *J Neurophysiol* **65**: 1034–1041.

AVOLI M. (1986) *Inhibitory potentials in neurons of the deep layers of the in vitro neocortical slice*. *Brain Res* **370**: 165–170.

AVOLI M., BARBAROSIE M., LÜCKE A., NAGAO T., LOPANTSEV V. und KÖHLING R. (1996) *Synchronous GABA-mediated potentials and epileptiform discharges in the rat*

- limbic system in vitro*. J Neurosci **16**: 3912–3924.
- AVOLI M., LOUVEL J., MATTIA D., OLIVIER A., ESPOSITO V., PUMAIN R. und D'ANTUONO M. (2003) *Epileptiform synchronization in the human dysplastic cortex*. Epileptic Disord **5**: 45–50.
- AVOLI M., MATTIA D., SINISCALCHI A., PERREAULT P. und TOMAIUOLO F. (1994) *Pharmacology and electrophysiology of a synchronous GABA-mediated potential in the human neocortex*. Neuroscience **62**: 655–666.
- AYALA G.X. und TAPIA R. (2005) *Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy*. Eur J Neurosci **22**: 3067–3076.
- BACCI A., HUGUENARD J.R. und PRINCE D.A. (2005) *Modulation of neocortical interneurons: extrinsic influences and exercises in self-control*. Trends Neurosci **28**: 602–610.
- BANDYOPADHYAY S., SUTOR B. und HABLITZ J.J. (2006) *Endogenous acetylcholine enhances synchronized interneuron activity in rat neocortex*. J Neurophysiol **95**: 1908–1916.
- BANNISTER A.P. (2005) *Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex*. Neurosci Res **53**: 95–103.
- BARANOVA A., IVANOV D., PETRASH N., PESTOVA A., SKOBLOV M., KELMANSON I., SHAGIN D., NAZARENKO S., GERAYMOVYCH E., LITVIN O., TIUNOVA A., BORN T.L., USMAN N., STAROVEROV D., LUKYANOV S. und PANCHIN Y. (2004) *The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins*. Genomics **83**: 706–716.
- BARKAI E., FRIEDMAN A., GROSSMAN Y. und GUTNICK M.J. (1995) *Laminar pattern of synaptic inhibition during convulsive activity induced by 4-aminopyridine in neocortical slices*. J Neurophysiol **73**: 1462–1467.

- BEAUMONT M. und MACCAFERRI G. (2011) *Is connexin36 critical for GABAergic hypersynchronization in the hippocampus?*. J Physiol **589**: 1663–1680.
- BEGHI E., BERG A., CARPIO A., FORSGREN L., HESDORFFER D.C., HAUSER W.A., MALMGREN K., SHINNAR S., TEMKIN N., THURMAN D. und TOMSON T. (2005) *Comment on epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. Epilepsia **46**: 1698–1709.
- BEIERLEIN M., GIBSON J.R. und CONNORS B.W. (2000) *A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex*. Nat Neurosci **3**: 904–910.
- BEIERLEIN M., GIBSON J.R. und CONNORS B.W. (2003) *Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex*. J Neurophysiol **90**: 2987–3000.
- BELLUARDO N., MUDÒ G., TROVATO-SALINARO A., LE GURUN S., CHAROLLAIS A., SERRE-BEINIER V., AMATO G., HAEFLIGER J.A., MEDA P. und CONDORELLI D.F. (2000) *Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain*. Brain Res **865**: 121–138.
- BELOUSOV A.B. (2011) *The regulation and role of neuronal gap junctions during development*. Commun Integr Biol **4**: 579–581.
- BELOUSOV A.B., WANG Y., SONG J.H., DENISOVA J.V., BERMAN N.E. und FONTES J.D. (2012) *Neuronal gap junctions play a role in the secondary neuronal death following controlled cortical impact*. Neurosci Lett **524**: 16–19.
- BEN-ARI Y., KHALILOV I., REPRESA A. und GOZLAN H. (2004) *Interneurons set the tune of developing networks*. Trends Neurosci **27**: 422–427.
- BENARDO L.S. (1994) *Separate activation of fast and slow inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortex in vitro*. J Physiol **476**: 203–215.
- BENARDO L.S. (1997) *Recruitment of GABAergic inhibition and synchronization of inhibitory interneurons in rat neocortex*. J Neurophysiol **77**: 3134–3144.

- BENNETT M.R., FARNELL L. und GIBSON W.G. (2008) *A quantitative model of cortical spreading depression due to purinergic and gap-junction transmission in astrocyte networks*. *Biophys J* **95**: 5648–5660.
- BENNETT M.V. (1997) *Gap junctions as electrical synapses*. *J Neurocytol* **26**: 349–366.
- BENNETT M.V.L. und PEREDA A. (2006) *Pyramid power: principal cells of the hippocampus unite!*. *Brain Cell Biol* **35**: 5–11.
- BENNETT M.V.L. und ZUKIN R.S. (2004) *Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain*. *Neuron* **41**: 495–511.
- BERGER T.K., PERIN R., SILBERBERG G. und MARKRAM H. (2009) *Frequency-dependent disynaptic inhibition in the pyramidal network: a ubiquitous pathway in the developing rat neocortex*. *J Physiol* **587**: 5411–5425.
- BIBER C. (2004) Spontane unterschwellige Membranpotentialoszillationen und Impedanzresonanz in neokortikalen Neuronen der Ratte in vitro. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- BIKSON M., GHAI R.S., BARABAN S.C. und DURAND D.M. (1999) *Modulation of burst frequency, duration, and amplitude in the zero-Ca(2+) model of epileptiform activity*. *J Neurophysiol* **82**: 2262–2270.
- BITTMAN K., BECKER D.L., CICIRATA F. und PARNAVELAS J.G. (2002) *Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex*. *J Comp Neurol* **443**: 201–212.
- BITTMAN K., OWENS D.F., KRIEGSTEIN A.R. und LOTURCO J.J. (1997) *Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex*. *J Neurosci* **17**: 7037–7044.
- BLATOW M., CAPUTI A. und MONYER H. (2005) *Molecular diversity of neocortical GABAergic interneurons*. *J Physiol* **562**: 99–105.

- BLATOW M., ROZOV A., KATONA I., HORMUZDI S.G., MEYER A.H., WHITTINGTON M.A., CAPUTI A. und MONYER H. (2003) *A novel network of multipolar bursting interneurons generates theta frequency oscillations in neocortex*. *Neuron* **38**: 805–817.
- BROWN K.N., CHEN S., HAN Z., LU C.H., TAN X., ZHANG X.J., DING L., LOPEZ-CRUZ A., SAUR D., ANDERSON S.A., HUANG K. und SHI S.H. (2011) *Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex*. *Science* **334**: 480–486.
- BRUZZONE R. und DERMIETZEL R. (2006) *Structure and function of gap junctions in the developing brain*. *Cell Tissue Res* **326**: 239–248.
- BRUZZONE R., HORMUZDI S.G., BARBE M.T., HERB A. und MONYER H. (2003) *Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13644–13649.
- BUCHANAN K.A. und SJÖSTRÖM P.J. (2009) *A piece of the neocortical puzzle: the pyramid-Martinotti cell reciprocating principle*. *J Physiol* **587**: 5301–5302.
- BUCKLE P.J. und HAAS H.L. (1982) *Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat*. *J Physiol* **326**: 109–122.
- BUJALSKA I., SHIMOJO M., HOWIE A. und STEWART P.M. (1997) *Human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue*. *Steroids* **62**: 77–82.
- BUTT S.J.B., FUCCILLO M., NERY S., NOCTOR S., KRIEGSTEIN A., CORBIN J.G. und FISHELL G. (2005) *The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype*. *Neuron* **48**: 591–604.
- BUXHOEVEDEN D.P. und CASANOVA M.F. (2002) *The minicolumn hypothesis in neuroscience*. *Brain* **125**: 935–951.
- CALÌ C., BERGER T.K., PIGNATELLI M., CARLETON A., MARKRAM H. und GIUGLIANO M. (2008) *Inferring connection proximity in networks of electrically coupled cells by subthreshold frequency response analysis*. *J Comput Neurosci* **24**: 330–345.

- CALLAWAY E.M. (2003) *Cell type specificity of local cortical connections*. J Neurocytol **31**: 231–237.
- CAMPBELL D.L., QU Y., RASMUSSEN R.L. und STRAUSS H.C. (1993) *The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine*. J Gen Physiol **101**: 603–626.
- CHAPMAN R.J., CILIA LA CORTE P.F., ASGHAR A.U.R. und KING A.E. (2009) *Network-based activity induced by 4-aminopyridine in rat dorsal horn in vitro is mediated by both chemical and electrical synapses*. J Physiol **587**: 2499–2510.
- CHAPMAN R.J., LALL V.K., MAXEINER S., WILLECKE K., DEUCHARS J. und KING A.E. (2012) *Localization of neurones expressing the gap junction protein Connexin45 within the adult spinal dorsal horn: a study using Cx45-eGFP reporter mice*. Brain Struct Funct (2012 May 26 - Epub ahead of print).
- CHEPKOVA A.N., SERGEEVA O.A. und HAAS H.L. (2008) *Carbenoxolone impairs LTP and blocks NMDA receptors in murine hippocampus*. Neuropharmacology **55**: 139–147.
- CHOQUET D. und KORN H. (1992) *Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes*. J Gen Physiol **99**: 217–240.
- CINA C., BECHBERGER J.F., OZOG M.A. und NAUS C.C.G. (2007) *Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development*. J Comp Neurol **504**: 298–313.
- CINA C., MAASS K., THEIS M., WILLECKE K., BECHBERGER J.F. und NAUS C.C. (2009) *Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration*. J Neurosci **29**: 2009–2021.
- CODDOU C., YAN Z., OBSIL T., HUIDOBRO-TORO J.P. und STOJILKOVIC S.S. (2011) *Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels*. Pharmacol Rev **63**: 641–683.
- CONDORELLI D.F., PARENTI R., SPINELLA F., TROVATO SALINARO A., BELLUARDO N., CARDILE V. und CICIRATA F. (1998) *Cloning of a new gap junction gene (Cx36)*

- highly expressed in mammalian brain neurons.* Eur J Neurosci **10**: 1202–1208.
- CONDORELLI D.F., TROVATO-SALINARO A., MUDO G., MIRONE M.B. und BELLUARDO N. (2003) *Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells.* Eur J Neurosci **18**: 1807–1827.
- CONNORS B.W., BENARDO L.S. und PRINCE D.A. (1984) *Carbon dioxide sensitivity of dye coupling among glia and neurons of the neocortex.* J Neurosci **4**: 1324–1330.
- CONNORS B.W. und GUTNICK M.J. (1990) *Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons.* Trends Neurosci **13**: 99–104.
- CONNORS B.W., GUTNICK M.J. und PRINCE D.A. (1982) *Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro.* J Neurophysiol **48**: 1302–1320.
- CONNORS B.W. und LONG M.A. (2004) *Electrical synapses in the mammalian brain.* Annual review of neuroscience **27**(Bennett 1977): 393–418.
- CONNORS B.W., MALENKA R.C. und SILVA L.R. (1988) *Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABAA and GABAB receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat.* J Physiol **406**: 443–468.
- CONSTANTI A. und GALVAN M. (1983) *Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones.* J Physiol **335**: 153–178.
- COX R.H. (2005) *Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle.* Cell Biochem Biophys **42**: 167–195.
- CRUIKSHANK S.J., HOPPERSTAD M., YOUNGER M., CONNORS B.W., SPRAY D.C. und SRINIVAS M. (2004) *Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine.* Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 12364–12369.
- CUNNINGHAM M.O., ROOPUN A., SCHOFIELD I.S., WHITTAKER R.G., DUNCAN R., RUSSELL A., JENKINS A., NICHOLSON C., WHITTINGTON M.A. und TRAUB R.D. (2012) *Glissandi: transient fast electrocorticographic oscillations of steadily increasing*

- frequency, explained by temporally increasing gap junction conductance.* *Epilepsia* **53**: 1205–1214.
- D'ANTUONO M., LOUVEL J., KÖHLING R., MATTIA D., BERNASCONI A., OLIVIER A., TURAK B., DEVAUX A., PUMAIN R. und AVOLI M. (2004) *GABAA receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex.* *Brain* **127**: 1626–1640.
- DE CAMILLI P. und TAKEI K. (1996) *Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling.* *Neuron* **16**: 481–486.
- DE RIVERO VACCARI J.C., CORRIVEAU R.A. und BELOUSOV A.B. (2007) *Gap junctions are required for NMDA receptor dependent cell death in developing neurons.* *J Neurophysiol* **98**: 2878–2886.
- DEANS M.R., GIBSON J.R., SELITTO C., CONNORS B.W. und PAUL D.L. (2001) *Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36.* *Neuron* **31**: 477–485.
- DEFazio R.A. und HABLITZ J.J. (2005) *Horizontal spread of activity in neocortical inhibitory networks.* *Brain Res Dev Brain Res* **157**: 83–92.
- DEFELIPE J. (1997) *Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex.* *J Chem Neuroanat* **14**: 1–19.
- DEFELIPE J. (2002) *Cortical interneurons: from Cajal to 2001.* *Prog Brain Res* **136**: 215–38.
- DEFELIPE J., ALONSO-NANCLARES L. und ARELLANO J.I. (2003) *Microstructure of the neocortex: comparative aspects.* *J Neurocytol* **31**: 299–316.
- DEFELIPE J. und FARIÑAS I. (1992) *The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs.* *Prog Neurobiol* **39**: 563–607.

- DEISZ R.A. und PRINCE D.A. (1989) *Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABAB receptor feed-back on GABA release*. J Physiol **412**: 513–541.
- DEL CORSO C., IGLESIAS R., ZOIDL G., DERMETZEL R. und SPRAY D.C. (2012) *Calmodulin dependent protein kinase increases conductance at gap junctions formed by the neuronal gap junction protein connexin36*. Brain Res **1487**: 69–77.
- DERE E., ZHENG-FISCHHÖFER Q., VIGGIANO D., GIRONI CARNEVALE U.A., RUOCCO L.A., ZLOMUZICA A., SCHNICHEL S., WILLECKE K., HUSTON J.P. und SADILE A.G. (2008) *Connexin31.1 deficiency in the mouse impairs object memory and modulates open-field exploration, acetylcholine esterase levels in the striatum, and cAMP response element-binding protein levels in the striatum and piriform cortex*. Neuroscience **153**: 396–405.
- DERE E. und ZLOMUZICA A. (2012) *The role of gap junctions in the brain in health and disease*. Neurosci Biobehav Rev **36**: 206–217.
- DI GARBO A. (2008) *The electrical coupling confers to a network of interneurons the ability of transmitting excitatory inputs with high temporal precision*. Brain Res **1225**: 47–56.
- DI GARBO A., BARBI M. und CHILLEMI S. (2002) *Synchronization in a network of fast-spiking interneurons*. Biosystems **67**: 45–53.
- DILDY-MAYFIELD J.E., MIHIC S.J., LIU Y., DEITRICH R.A. und HARRIS R.A. (1996) *Actions of long chain alcohols on GABAA and glutamate receptors: relation to in vivo effects*. Br J Pharmacol **118**: 378–384.
- DOBRENIS K., CHANG H.Y., PINA-BENABOU M.H., WOODROFFE A., LEE S.C., ROZENTAL R., SPRAY D.C. und SCAMES E. (2005) *Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons*. J Neurosci Res **82**: 306–315.
- DODT H.U. und ZIEGLGÄNSBERGER W. (1990) *Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy*. Brain Res **537**: 333–336.

- DOUGALIS A., LEES G. und GANELLIN C.R. (2004) *The sleep lipid oleamide may represent an endogenous anticonvulsant: an in vitro comparative study in the 4-aminopyridine rat brain-slice model*. *Neuropharmacology* **46**: 541–554.
- DOUGLAS R.J. und MARTIN K.A.C. (2007) *Mapping the matrix: the ways of neocortex*. *Neuron* **56**: 226–238.
- DRUGA R. (2009) *Neocortical inhibitory system*. *Folia Biol* **55**: 201–217.
- ELIAS L.A.B., WANG D.D. und KRIEGSTEIN A.R. (2007) *Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex*. *Nature* **448**: 901–907.
- ELSTON G.N. (2003) *Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function*. *Cereb Cortex* **13**: 1124–1138.
- ELSTON G.N., BENAVIDES-PICCIONE R. und DEFELIPE J. (2001) *The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey*. *J Neurosci* **21**: RC163.
- ELSTON G.N., BENAVIDES-PICCIONE R., ELSTON A., MANGER P.R. und DEFELIPE J. (2011) *Pyramidal cells in prefrontal cortex of primates: marked differences in neuronal structure among species*. *Front Neuroanat* **5**: 2.
- EVANS W.H. und MARTIN P.E.M. (2002) *Gap junctions: structure and function (Review)*. *Mol Membr Biol* **19**: 121–136.
- FIELDS R.D. (2008) *Oligodendrocytes changing the rules: action potentials in glia and oligodendrocytes controlling action potentials*. *Neuroscientist* **14**: 540–543.
- FILIPPOV M.A., HORMUZDI S.G., FUCHS E.C. und MONYER H. (2003) *A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain*. *Eur J Neurosci* **18**: 3183–3192.
- FINO E. und YUSTE R. (2011) *Dense inhibitory connectivity in neocortex*. *Neuron* **69**: 1188–1203.

- FLORES C.E., NANNAPANENI S., DAVIDSON K.G.V., YASUMURA T., BENNETT M.V.L., RASH J.E. und PEREDA A.E. (2012) *Trafficking of gap junction channels at a vertebrate electrical synapse in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A **109**: E573–E582.
- FRICK A., FELDMEYER D. und SAKMANN B. (2007) *Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex*. J Physiol **585**: 103–116.
- FUKUDA T. (2007) *Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex*. Neuroscientist **13**: 199–207.
- FUKUDA T. und KOSAKA T. (2000) *The dual network of GABAergic interneurons linked by both chemical and electrical synapses: a possible infrastructure of the cerebral cortex*. Neurosci Res **38**: 123–130.
- FUKUDA T. und KOSAKA T. (2003) *Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat*. Neuroscience **120**: 5–20.
- FUSHIKI S., PEREZ VELAZQUEZ J.L., ZHANG L., BECHBERGER J.F., CARLEN P.L. und NAUS C.C.G. (2003) *Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice*. J Neuropathol Exp Neurol **62**: 304–314.
- GAJDA Z., GYENGÉSI E., HERMESZ E., ALI K.S. und SZENTE M. (2003) *Involvement of gap junctions in the manifestation and control of the duration of seizures in rats in vivo*. Epilepsia **44**: 1596–1600.
- GAJDA Z., HERMESZ E., GYENGÉSI E., SZUPERA Z. und SZENTE M. (2006) *The functional significance of gap junction channels in the epileptogenicity and seizure susceptibility of juvenile rats*. Epilepsia **47**: 1009–1022.
- GAJDA Z., SZUPERA Z., BLAZSÓ G. und SZENTE M. (2005) *Quinine, a blocker of neuronal cx36 channels, suppresses seizure activity in rat neocortex in vivo*. Epilepsia **46**: 1581–1591.

- GALARRETA M., ERDÉLYI F., SZABÓ G. und HESTRIN S. (2004) *Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors*. J Neurosci **24**: 9770–9778.
- GALARRETA M. und HESTRIN S. (1999) *A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses*. Nature **402**: 72–75.
- GALARRETA M. und HESTRIN S. (2001a) *Electrical synapses between GABA-releasing interneurons*. Nat Rev Neurosci **2**: 425–433.
- GALARRETA M. und HESTRIN S. (2001b) *Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons*. Science **292**: 2295–2299.
- GALARRETA M. und HESTRIN S. (2002) *Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 12438–12443.
- GALINDO J. und RUDOMÍN P. (1978) *Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine*. Neurosci Lett **10**: 299–304.
- GALVAN M., GRAFE P. und TEN BRUGGENCATE G. (1982) *Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice*. Brain Res **241**: 75–86.
- GIBSON J.R., BEIERLEIN M. und CONNORS B.W. (1999) *Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex*. Nature **402**: 75–79.
- GIBSON J.R., BEIERLEIN M. und CONNORS B.W. (2005) *Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4*. J Neurophysiol **93**: 467–480.
- GIGOUT S., LOUVEL J., KAWASAKI H., D'ANTUONO M., ARMAND V., KURCEWICZ I., OLIVIER A., LASCHET J., TURAK B., DEVAUX B., PUMAIN R. und AVOLI M. (2006) *Effects of gap junction blockers on human neocortical synchronization*. Neurobiol Dis **22**: 496–508.
- GLOVER W.E. (1982) *The aminopyridines*. Gen Pharmacol **13**: 259–285.

- GONZALEZ-SULSER A., WANG J., MOTAMEDI G.K., AVOLI M., VICINI S. und DZAKPASU R. (2011) *The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array*. *Neuropharmacology* **60**: 1142–1153.
- GÖTZ M., STOYKOVA A. und GRUSS P. (1998) *Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex*. *Neuron* **21**: 1031–1044.
- GUAN X., CRAVATT B.F., EHRING G.R., HALL J.E., BOGER D.L., LERNER R.A. und GILULA N.B. (1997) *The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells*. *J Cell Biol* **139**: 1785–1792.
- GUPTA A. (2000) *Organizing Principles for a Diversity of GABAergic Interneurons and Synapses in the Neocortex*. *Science* **287**: 273–278.
- GUSTAFSSON B., GALVAN M., GRAFE P. und WIGSTRÖM H. (1982) *A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine*. *Nature* **299**: 252–254.
- HAAS J.S., ZAVALA B. und LANDISMAN C.E. (2011) *Activity-dependent long-term depression of electrical synapses*. *Science* **334**: 389–393.
- HAIDER B. und MCCORMICK D.A. (2009) *Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms*. *Neuron* **62**: 171–189.
- HALABISKY B., SHEN F., HUGUENARD J.R. und PRINCE D.A. (2006) *Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex*. *J Neurophysiol* **96**: 834–845.
- HAMILL O.P., MARTY A., NEHER E., SAKMANN B. und SIGWORTH F.J. (1981) *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. *Pflugers Arch* **391**: 85–100.
- HAMZEI-SICHANI F., DAVIDSON K.G.V., YASUMURA T., JANSSEN W.G.M., WEARNE S.L., HOF P.R., TRAUB R.D., GUTIÉRREZ R., OTTERSEN O.P. und RASH J.E. (2012) *Mixed Electrical-Chemical Synapses in Adult Rat Hippocampus are Primarily Glutamatergic and Coupled by Connexin-36*. *Front Neuroanat* **6**: 13.

- HARTFIELD E.M., RINALDI F., GLOVER C.P., WONG L.F., CALDWELL M.A. und UNEY J.B. (2011) *Connexin 36 expression regulates neuronal differentiation from neural progenitor cells*. PloS One **6**: e14746.
- HARVEY A.L. und MARSHALL I.G. (1977) *The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **299**: 53–60.
- HAYDON P.G. und CARMIGNOTO G. (2006) *Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling*. Physiol Rev **86**: 1009–1031.
- HE W., INGRAHAM C., RISING L., GODERIE S. und TEMPLE S. (2001) *Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis*. J Neurosci **21**: 8854–8862.
- HERMANN A. und GORMAN A.L. (1981) *Effects of tetraethylammonium on potassium currents in a molluscan neurons*. J Gen Physiol **78**: 87–110.
- HERSH C. und RAE-GRANT A. (2012) *Extended-release dalfampridine in the management of multiple-sclerosis-related walking impairment*. Ther Adv Neurol Disord **5**: 199–204.
- HESTRIN S. und GALARRETA M. (2005) *Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons*. Trends Neurosci **28**: 304–309.
- HOLMGREN C., HARKANY T., SVENNENFORS B. und ZILBERTER Y. (2003) *Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex*. J Physiol **551**: 139–153.
- HOMBACH S., JANSSEN-BIENHOLD U., SÖHL G., SCHUBERT T., BÜSSOW H., OTT T., WEILER R. und WILLECKE K. (2004) *Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina*. Eur J Neurosci **19**: 2633–2640.
- HORMUZDI S.G., FILIPPOV M.A., MITROPOULOU G., MONYER H. und BRUZZONE R. (2004) *Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks*. Biochim Biophys Acta **1662**: 113–137.

- HORMUZDI S.G., PAIS I., LEBEAU F.E., TOWERS S.K., ROZOV A., BUHL E.H., WHITTINGTON M.A. und MONYER H. (2001) *Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice*. *Neuron* **31**: 487–495.
- HOWE J.R., SUTOR B. und ZIEGLGÄNSBERGER W. (1987) *Characteristics of long-duration inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical neurons in vitro*. *Cell Mol Neurobiol* **7**: 1–18.
- JEFFERYS J.G. und HAAS H.L. (1982) *Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission*. *Nature* **300**: 448–450.
- JOHNSTON M.F., SIMON S.A. und RAMÓN F. (1980) *Interaction of anaesthetics with electrical synapses*. *Nature* **286**: 498–500.
- JONES E.G. (2000) *Microcolumns in the cerebral cortex*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5019–5021.
- JUSZCZAK G.R. und SWIERGIEL A.H. (2009) *Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**: 181–198.
- KAMASAWA N., SIK A., MORITA M., YASUMURA T., DAVIDSON K.G.V., NAGY J.I. und RASH J.E. (2005) *Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning*. *Neuroscience* **136**: 65–86.
- KANDLER K. (1997) *Coordination of neuronal activity by gap junctions in the developing neocortex*. *Semin Cell Dev Biol* **8**: 43–51.
- KANDLER K. und KATZ L.C. (1998) *Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication*. *J Neurosci* **18**: 1419–1427.
- KANG J., JIANG L., GOLDMAN S.A. und NEDERGAARD M. (1998) *Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission*. *Nat Neurosci* **1**: 683–692.

- KANG N., XU J., XU Q., NEDERGAARD M. und KANG J. (2005) *Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. *J Neurophysiol* **94**: 4121–4130.
- KANNAN M.S. und DANIEL E.E. (1978) *Formation of gap junctions by treatment in vitro with potassium conductance blockers*. *J Cell Biol* **78**: 338–348.
- KANTROWITZ J.T., FRANCIS N.N., SALAH A. und PERKINS K.L. (2005) *Synaptic depolarizing GABA Response in adults is excitatory and proconvulsive when GABAB receptors are blocked*. *J Neurophysiol* **93**: 2656–2667.
- KAWAGUCHI Y. (1993a) *Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex*. *J Neurophysiol* **69**: 416–431.
- KAWAGUCHI Y. (1993b) *Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum*. *J Neurosci* **13**: 4908–4923.
- KAWAGUCHI Y. und KUBOTA Y. (1997) *GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex*. *Cereb Cortex* **7**: 476–486.
- KEHL S.J. (1990) *4-Aminopyridine causes a voltage-dependent block of the transient outward K⁺ current in rat melanotrophs*. *J Physiol* **431**: 515–528.
- KEROS S. und HABLITZ J.J. (2005) *Ectopic action potential generation in cortical interneurons during synchronized GABA responses*. *Neuroscience* **131**: 833–842.
- KIM Y.I., GOLDNER M.M. und SANDERS D.B. (1980) *Facilitatory effects of 4-aminopyridine on normal neuromuscular transmission*. *Muscle Nerve* **3**: 105–111.
- KITA T., KITA H. und KITAI S.T. (1985) *Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation*. *Brain Res* **361**: 10–18.
- KOBAYASHI K., NISHIZAWA Y., SAWADA K., OGURA H. und MIYABE M. (2008) *K⁺-Channel Openers Suppress Epileptiform Activities Induced by 4-Aminopyridine in Cultured Rat Hippocampal Neurons*. *J Pharmacol Sci* **108**: 517–528.

- KOHLER I., MEIER R., BUSATO A., NEIGER-AESCHBACHER G. und SCHATZMANN U. (1999) *Is carbon dioxide (CO₂) a useful short acting anaesthetic for small laboratory animals?*. *Lab Anim* **33**: 155–161.
- KREUZBERG M.M., DEUCHARS J., WEISS E., SCHOBER A., SONNTAG S., WELLERSHAUS K., DRAGUHN A. und WILLECKE K. (2008) *Expression of connexin30.2 in interneurons of the central nervous system in the mouse*. *Mol Cell Neurosci* **37**: 119–134.
- KRISHNAMURTHY P., SILBERBERG G. und LANSNER A. (2012) *A cortical attractor network with Martinotti cells driven by facilitating synapses*. *PLoS One* **7**: e30752.
- KRÜGER O., PLUM A., KIM J.S., WINTERHAGER E., MAXEINER S., HALLAS G., KIRCHHOFF S., TRAUB O., LAMERS W.H. und WILLECKE K. (2000) *Defective vascular development in connexin 45-deficient mice*. *Development* **127**: 4179–4193.
- KUMAR N.M. und GILULA N.B. (1996) *The gap junction communication channel*. *Cell* **84**: 381–388.
- LAMSA K. und TAIRA T. (2003) *Use-dependent shift from inhibitory to excitatory GABA_A receptor action in SP-O interneurons in the rat hippocampal CA3 area*. *J Neurophysiol* **90**: 1983–1995.
- LANDISMAN C.E. und CONNORS B.W. (2005) *Long-term modulation of electrical synapses in the mammalian thalamus*. *Science* **310**: 1809–1813.
- LAU T., GAGE G.J., BERKE J.D. und ZOCHOWSKI M. (2010) *Local dynamics of gap-junction-coupled interneuron networks*. *Phys Biol* **7**: 16015.
- LEE H.S. und GO M.L. (1996) *Effects of mefloquine on Ca²⁺ uptake and release by dog brain microsomes*. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **331**: 221–231.
- LEMEIGNAN M. (1972) *Analysis of the action of 4-amino pyridine on the cat lumbar spinal cord. I. Modification of the afferent volley, the monosynaptic discharge amplitude and the polysynaptic evoked responses*. *Neuropharmacology* **11**: 551–558.

- LEMEIGNAN M. (1973) *Analysis of the effects of 4-amino pyridine on the lumbar cord of the cat. II. Modifications of certain spinal inhibitory phenomena, post-tetanic potentiation and dorsal root potentials.* Neuropharmacology **12**: 641–651.
- LEMEIGNAN M., MILLART H., LAMIABLE D., MOLGO J. und LECHAT P. (1984) *Evaluation of 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine penetrability into cerebrospinal fluid in anesthetized rats.* Brain Res **304**: 166–169.
- LEUNG Y.M. (2012) *Involvement of C-type inactivation gating in the actions of voltage-gated K⁺ channel inhibitors.* Pharmacol Ther **133**: 151–158.
- LI X., LYNN B.D. und NAGY J.I. (2012) *The effector and scaffolding proteins AF6 and MUPP1 interact with connexin36 and localize at gap junctions that form electrical synapses in rodent brain.* Eur J Neurosci **35**: 166–181.
- LIM L.Y. und GO M.L. (1986) *The anticholinesterase activity of mefloquine.* Clin Exp Pharmacol Physiol **12**: 527–531.
- DE LIMA A.D., GIESELER A. und VOIGT T. (2008) *Relationship between GABAergic interneurons migration and early neocortical network activity.* Dev Neurobiol **69**: 105–123.
- LIPTON P. und WHITTINGHAM T. (1984) Energy metabolism and brain slice function. Brain Slices. Dingleline R, editor. New York, Plenum.
- LIU X., SUN L., TORII M. und RAKIC P. (2012) *Connexin 43 controls the multipolar phase of neuronal migration to the cerebral cortex.* Proc Natl Acad Sci U S A **109**: 8280–8285.
- LLINÁS R., WALTON K. und BOHR V. (1976) *Synaptic transmission in squid giant synapse after potassium conductance blockage with external 3- and 4-aminopyridine.* Biophys J **16**: 83–86.
- LOUVEL J., PAPTAEODOROPOULOS C., SINISCALCHI A., KURCEWICZ I., PUMAIN R., DEVAUX B., TURAK B., ESPOSITO V., VILLEMEURE J.G. und AVOLI M. (2001)

- GABA-mediated synchronization in the human neocortex: elevations in extracellular potassium and presynaptic mechanisms.* Neuroscience **105**: 803–813.
- LU B.X., LIU L.Y., LIAO L., ZHANG Z.H. und MEI Y.A. (2005) *Inhibition of Na⁺ channel currents in rat myoblasts by 4-aminopyridine.* Toxicol Appl Pharmacol **207**: 275–282.
- LUNDH H., NILSSON O. und ROSÉN I. (1977) *4-aminopyridine—a new drug tested in the treatment of Eaton-Lambert syndrome.* J Neurol Neurosurg Psychiatry **40**: 1109–1112.
- LUNDH H., NILSSON O. und ROSÉN I. (1979) *Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis.* Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry **42**(2): 171–5.
- LUNDH H., NILSSON O. und ROSÉN I. (1983) *Novel drug of choice in Eaton-Lambert syndrome.* J Neurol Neurosurg Psychiatry **46**: 684–685.
- LUNDH H., NILSSON O. und ROSÉN I. (1985) *Improvement in neuromuscular transmission in myasthenia gravis by 3,4-diaminopyridine.* Eur Arch Psychiatry Neurol Sci **234**: 374–377.
- MA Y., HIOKI H., KONNO M., PAN S., NAKAMURA H., NAKAMURA K.C., FURUTA T., LI J.L. und KANEKO T. (2011) *Expression of gap junction protein connexin36 in multiple subtypes of GABAergic neurons in adult rat somatosensory cortex.* Cereb Cortex **21**: 2639–2649.
- MA Y., HU H., BERREBI A.S., MATHERS P.H. und AGMON A. (2006) *Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice.* J Neurosci **26**: 5069–5082.
- MACVICAR B.A. und THOMPSON R.J. (2010) *Non-junction functions of pannexin-1 channels.* Trends Neurosci **33**: 93–102.
- MAGNOTTI L.M., GOODENOUGH D.A. und PAUL D.L. (2011) *Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality.* Glia **59**: 1064–1074.

- MAIER N., GÜLDENAGEL M., SÖHL G., SIEGMUND H., WILLECKE K. und DRAGUHN A. (2002) *Reduction of high-frequency network oscillations (ripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice*. J Physiol **541**: 521–528.
- MALATESTA P., HARTFUSS E. und GÖTZ M. (2000) *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage*. Development **127**: 5253–5263.
- MANCILLA J.G., LEWIS T.J., PINTO D.J., RINZEL J. und CONNORS B.W. (2007) *Synchronization of electrically coupled pairs of inhibitory interneurons in neocortex*. J Neurosci **27**: 2058–2073.
- MANN E.O., RADCLIFFE C.A. und PAULSEN O. (2005) *Hippocampal gamma-frequency oscillations: from interneurons to pyramidal cells, and back*. J Physiol **562**: 55–63.
- MARKRAM H., TOLEDO-RODRIGUEZ M., WANG Y., GUPTA A., SILBERBERG G. und WU C. (2004) *Interneurons of the neocortical inhibitory system*. Nat Rev Neurosci **5**: 793–807.
- MATCHKOV V.V., RAHMAN A., PENG H., NILSSON H. und AALKJAER C. (2004) *Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetinic acid derivatives in rat mesenteric small arteries*. Br J Pharmacol **142**: 961–972.
- MAXEINER S. (2005) Untersuchung zur Funktion von Connexin45 in Neuronen und im Herzen mit Hilfe von konditionalen Connexin45-Defektmäusen. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- MAXEINER S., KRÜGER O., SCHILLING K., TRAUB O., URSCHER S. und WILLECKE K. (2003) *Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice*. Neuroscience **119**: 689–700.
- MAYER-PROSCHEL M., KALYANI A.J., MUJTABA T. und RAO M.S. (1997) *Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells*. Neuron **19**: 773–785.

- MCCORMICK D.A., CONNORS B.W., LIGHTHALL J.W. und PRINCE D.A. (1985) *Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex*. J Neurophysiol **54**: 782–806.
- McFARLANE S. (2001) *Dendritic morphogenesis: building an arbor*. Mol Neurobiol **22**: 1–9.
- MEDINA-CEJA L., CORDERO-ROMERO A. und MORALES-VILLAGRÁN A. (2008) *Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex*. Brain research **1187**: 74–81.
- MEFFERT N. (2002) Untersuchungen zur genetischen Disposition für die Helicobacter pylori-Infektion im Mausmodell. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover.
- MEIER C., PETRASCH-PARWEZ E., HABBES H.W., TEUBNER B., GÜLDENAGEL M., DEGEN J., SÖHL G., WILLECKE K. und DERMETZEL R. (2002) *Immunohistochemical detection of the neuronal connexin36 in the mouse central nervous system in comparison to connexin36-deficient tissues*. Histochem Cell Biol **117**: 461–471.
- MERCER A. (2012) *Electrically coupled excitatory neurones in cortical regions*. Brain Res **1487**: 192–197.
- MERCER A., BANNISTER A.P. und THOMSON A.M. (2006) *Electrical coupling between pyramidal cells in adult cortical regions*. Brain Cell Biol **35**: 13–27.
- MEVES H. und PICHON Y. (1975) *Proceedings: Effects of 4-aminopyridine on the potassium current in internally perfused giant axons of the squid*. J Physiol **251**: 60–62.
- MEYER A.H., KATONA I., BLATOW M., ROZOV A. und MONYER H. (2002) *In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons*. J Neurosci **22**: 7055–7064.
- MEYER H.S., SCHWARZ D., WIMMER V.C., SCHMITT A.C., KERR J.N.D., SAKMANN B. und HELMSTAEDTER M. (2011) *Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A*. Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 16807–16812.

- MITTMANN W., CHADDERTON P. und HÄUSSER M. (2004) *Neuronal microcircuits: frequency-dependent flow of inhibition*. *Curr Biol* **14**: 837–839.
- MOLNÁR Z. und CHEUNG A.F.P. (2006) *Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons*. *Neurosci Res* **55**: 105–115.
- MONTORO R.J. und YUSTE R. (2004) *Gap junctions in developing neocortex: a review*. *Brain Res Brain Res Rev* **47**: 216–226.
- MOORE C.I., CARLEN M., KNOBLICH U. und CARDIN J.A. (2010) *Neocortical interneurons: from diversity, strength*. *Cell* **142**: 189–193.
- MORA G. und TAPIA R. (2005) *Effects of retigabine on the neurodegeneration and extracellular glutamate changes induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo*. *Neurochem Res* **30**: 1557–1565.
- MOUNTCASTLE V.B. (1997) *The columnar organization of the neocortex*. *Brain* **120**: 701–722.
- MÜLLER A., LAUVEN M., BERKELS R., DHEIN S., POLDER H.R. und KLAUS W. (1999) *Switched single-electrode voltage-clamp amplifiers allow precise measurement of gap junction conductance*. *Am J Physiol* **276**: 980–987.
- MULLIS K.B. (1990) *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*. *Ann Biol Clin* **48**: 579–582.
- MULLIS K.B. und FALOONA F.A. (1987) *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol* **155**: 335–350.
- MURRAY N.M. und NEWSOM-DAVIS J. (1981) *Treatment with oral 4-aminopyridine in disorders of neuromuscular transmission*. *Neurology* **31**(3): 265–271.
- NAGY J.I., LI X., REMPEL J., STELMACK G., PATEL D., STAINES W.A., YASUMURA T. und RASH J.E. (2001) *Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43*. *J Comp Neurol* **441**: 302–323.

- NAGY J.I., LYNN B.D., TRESS O., WILLECKE K. und RASH J.E. (2011) *Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice*. Eur J Neurosci **34**: 263–271.
- NEDERGAARD M., RANSOM B. und GOLDMAN S.A. (2003) *New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain*. Trends Neurosci **26**: 523–30.
- NUMBERGER M. und DRAGUHN A. (1996) Patch-Clamp-Technik. Heidelberg-Berlin-Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- ORTHMANN-MURPHY J.L., ABRAMS C.K. und SCHERER S.S. (2008) *Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes*. J Mol Neurosci **35**: 101–116.
- PACKER A.M. und YUSTE R. (2011) *Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition?*. J Neurosci **31**(37): 13260–13271.
- PAIS I., HORMUZDI S.G., MONYER H., TRAUB R.D., WOOD I.C., BUHL E.H., WHITTINGTON M.A. und LEBEAU F.E.N. (2003) *Sharp wave-like activity in the hippocampus in vitro in mice lacking the gap junction protein connexin 36*. J Neurophysiol **89**: 2046–2054.
- PANCHIN Y.V. (2005) *Evolution of gap junction proteins—the pannexin alternative*. J Exp Biol **208**: 1415–1419.
- PANNASCH U., VARGOVÁ L., REINGRUBER J., EZAN P., HOLCMAN D., GIAUME C., SYKOVÁ E. und ROUACH N. (2011) *Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 8467–8472.
- PANUCCIO G., SANCHEZ G., LÉVESQUE M., SALAMI P., DE CURTIS M. und AVOLI M. (2012) *On the ictogenic properties of the piriform cortex in vitro*. Epilepsia **53**: 459–468.
- PARK W.M., WANG Y., PARK S., DENISOVA J.V., FONTES J.D. und BELOUSOV A.B. (2011) *Interplay of chemical neurotransmitters regulates developmental increase in electrical synapses*. J Neurosci **31**: 5909–5920.

- PEINADO A. (2001) *Immature neocortical neurons exist as extensive syncytial networks linked by dendrodendritic electrical connections*. J Neurophysiol **85**: 620–629.
- PELHATE M. und PICHON Y. (1974) *Proceedings: Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach*. J Physiol **242**: 90–91.
- PELVIG D.P., PAKKENBERG H., STARK A.K. und PAKKENBERG B. (2008) *Neocortical glial cell numbers in human brains*. Neurobiol Aging **29**: 1754–1762.
- PEREA G. und ARAQUE A. (2005) *Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes*. J Neurosci **25**: 2192–2203.
- PEREDA A.E., CURTI S., HOGE G., CACHOPE R., FLORES C.E. und RASH J.E. (2013) *Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity*. Biochim Biophys Acta **1828**: 134–146.
- PERREAULT P. und AVOLI M. (1992) *4-aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long-lasting depolarization in the rat hippocampus*. J Neurosci **12**(1): 104–115.
- PETERS A. (2003) *Examining neocortical circuits: some background and facts*. J Neurocytol **31**: 183–193.
- PFEIFFER M., DRAGUHN A., MEIERKORD H. und HEINEMANN U. (1996) *Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity in vitro*. Br J Pharmacol **119**: 569–577.
- PFEUTY B., MATO G., GOLOMB D. und HANSEL D. (2003) *Electrical synapses and synchrony: the role of intrinsic currents*. J Neurosci **23**: 6280–6294.
- PHAM Y.T., RÉGINA A., FARINOTTI R., COURAUD P., WAINER I.W., ROUX F. und GIMENEZ F. (2000) *Interactions of racemic mefloquine and its enantiomers with P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line, GPNT*. Biochim Biophys Acta **1524**: 212–219.

- RACKAUSKAS M., NEVERAUSKAS V. und SKEBERDIS V.A. (2010) *Diversity and properties of connexin gap junction channels*. *Medicina* **46**: 1–12.
- RASH J.E., STAINES W.A., YASUMURA T., PATEL D., FURMAN C.S., STELMACK G.L. und NAGY J.I. (2000) *Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7573–7578.
- RAY A., ZOIDL G., WEICKERT S., WAHLE P. und DERMIETZEL R. (2005) *Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system*. *Eur J Neurosci* **21**: 3277–3290.
- RELA L. und SZCZUPAK L. (2004) *Gap junctions: their importance for the dynamics of neural circuits*. *Mol Neurobiol* **30**: 341–357.
- REMY S., BECK H. und YAARI Y. (2010) *Plasticity of voltage-gated ion channels in pyramidal cell dendrites*. *Curr Opin Neurobiol* **20**: 503–509.
- RHEIMS S., REPRESA A., BEN-ARI Y. und ZILBERTER Y. (2008) *Layer-specific generation and propagation of seizures in slices of developing neocortex: role of excitatory GABAergic synapses*. *J Neurophysiol* **100**: 620–628.
- ROERIG B. und FELLER M.B. (2000) *Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits*. *Brain Res Brain Res Rev* **32**: 86–114.
- RÖRIG B., KLAUSA G. und SUTOR B. (1995) *Dye coupling between pyramidal neurons in developing rat prefrontal and frontal cortex is reduced by protein kinase A activation and dopamine*. *J Neurosci* **15**: 7386–7400.
- RÖRIG B., KLAUSA G. und SUTOR B. (1996) *Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones*. *The Journal of physiology* **490** (Pt 1(1996): 31–49.
- ROSS F.M., GWYN P., SPANSWICK D. und DAVIES S.N. (2000) *Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices*. *Neuroscience* **100**(4): 789–96.

- RUDY B., FISHELL G., LEE S. und HJERLING-LEFFLER J. (2011) *Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons*. Dev Neurobiol **71**: 45–61.
- RUTECKI P.A., LEBEDA F.J. und JOHNSTON D. (1987) *4-Aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition*. J Neurophysiol **57**: 1911–1924.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. und ERLICH H.A. (1988) *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science **239**: 487–491.
- SAITO M., MURAI Y., SATO H., BAE Y.C., AKAIKE T., TAKADA M. und KANG Y. (2006) *Two opposing roles of 4-AP-sensitive K⁺ current in initiation and invasion of spikes in rat mesencephalic trigeminal neurons*. J Neurophysiol **96**: 1887–1901.
- SCEMES E. und SPRAY D.C. (2012) *Extracellular K⁺ and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels*. Neurochem Res **37**: 2310–2316.
- SCHULDINER S., SHIRVAN A. und LINIAL M. (1995) *Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans*. Physiol Rev **75**: 369–392.
- SCHÜZ A. und PALM G. (1989) *Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse*. J Comp Neurol **286**: 442–455.
- SEDEHIZADEH S., KEOGH M. und MADDISON P. (2012) *The use of aminopyridines in neurological disorders*. Clin Neuropharmacol **35**: 191–200.
- SHELLEY J., DEDEK K., SCHUBERT T., FEIGENSPAN A., SCHULTZ K., HOMBACH S., WILLECKE K. und WEILER R. (2006) *Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice*. Eur J Neurosci **23**: 3176–3186.
- SIEGLE J.H. und MOORE C.I. (2011) *Cortical circuits: finding balance in the brain*. Curr Biol **21**: 956–957.

- SILBERBERG G. (2008) *Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity*. *Curr Opin Neurobiol* **18**: 332–337.
- SILBERBERG G., GUPTA A. und MARKRAM H. (2002) *Stereotypy in neocortical microcircuits*. *Trends Neurosci* **25**: 227–230.
- SILBERBERG G. und MARKRAM H. (2007) *Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells*. *Neuron* **53**: 735–746.
- SINISCALCHI A., CALABRESI P., MERCURI N.B. und BERNARDI G. (1997) *Epileptiform discharge induced by 4-aminopyridine in magnesium-free medium in neocortical neurons: physiological and pharmacological characterization*. *Neuroscience* **81**: 189–197.
- SLOMIANKA L., AMREIN I., KNUESEL I., SØ RENSEN J.C. und WOLFER D.P. (2011) *Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination*. *Brain Struct Funct* **216**: 301–317.
- SLOPER J.J. (1972) *Gap junctions between dendrites in the primate neocortex*. *Brain Res* **44**(2): 641–646.
- SMITH M. und PEREDA A.E. (2003) *Chemical synaptic activity modulates nearby electrical synapses*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4849–4854.
- SÖHL G., MAXEINER S. und WILLECKE K. (2005) *Expression and functions of neuronal gap junctions*. *Nature reviews Neuroscience* **6**(3): 191–200.
- SÖHL G., ODERMATT B., MAXEINER S., DEGEN J. und WILLECKE K. (2004) *New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants*. *Brain Res Brain Res Rev* **47**: 245–259.
- SONG J.H., WANG Y., FONTES J.D. und BELOUSOV A.B. (2012) *Regulation of connexin 36 expression during development*. *Neurosci Lett* **513**: 17–19.
- SOSINSKY G.E., BOASSA D., DERMETZEL R., DUFFY H.S., LAIRD D.W., MACVICAR B., NAUS C.C., PENUELA S., SCMES E., SPRAY D.C., THOMPSON R.J., ZHAO H.B.

- und DAHL G. (2011) *Pannexin channels are not gap junction hemichannels*. Channels **5**: 193–197.
- SPAIN W.J., SCHWINDT P.C. und CRILL W.E. (1991a) *Post-inhibitory excitation and inhibition in layer V pyramidal neurones from cat sensorimotor cortex*. J Physiol **434**: 609–626.
- SPAIN W.J., SCHWINDT P.C. und CRILL W.E. (1991b) *Two transient potassium currents in layer V pyramidal neurones from cat sensorimotor cortex*. J Physiol **434**: 591–607.
- SPRAY D.C., ROZENTAL R. und SRINIVAS M. (2002) *Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers*. Curr Drug Targets **3**: 455–464.
- SPRUSTON N. (2008) *Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration*. Nat Rev Neurosci **9**: 206–221.
- SRINIVAS M., ROZENTAL R., KOJIMA T., DERMIETZEL R., MEHLER M., CONDORELLI D.F., KESSLER J.A. und SPRAY D.C. (1999) *Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36*. J Neurosci **19**: 9848–9855.
- STAFSTROM C.E., SCHWINDT P.C., FLATMAN J.A. und CRILL W.E. (1984) *Properties of subthreshold response and action potential recorded in layer V neurons from cat sensorimotor cortex in vitro*. J Neurophysiol **52**: 244–263.
- SUADICANI S.O., BROSNAN C.F. und SCEMES E. (2006) *P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling*. J Neurosci **26**: 1378–1385.
- SUN W., SMITH D., FU Y., CHENG J.X., BRYN S., BORGENS R. und SHI R. (2010) *Novel potassium channel blocker, 4-AP-3-MeOH, inhibits fast potassium channels and restores axonal conduction in injured guinea pig spinal cord white matter*. J Neurophysiol **103**: 469–478.
- SUTOR B., GRIMM C. und POLDER H.R. (2003) *Voltage-clamp-controlled current-clamp recordings from neurons: an electrophysiological technique enabling the detection of fast potential changes at preset holding potentials*. Pflügers Arch **446**: 133–141.

- SUTOR B. und HAGERTY T. (2005) *Involvement of gap junctions in the development of the neocortex*. *Biochim Biophys Acta* **1719**: 59–68.
- SUTOR B., SCHMOLKE C., TEUBNER B., SCHIRMER C. und WILLECKE K. (2000) *Myelination defects and neuronal hyperexcitability in the neocortex of connexin 32-deficient mice*. *Cereb Cortex* **10**: 684–697.
- SZABADICS J., LORINCZ A. und TAMÁS G. (2001) *Beta and gamma frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons*. *J Neurosci* **21**: 5824–5831.
- SZENTE M., GAJDA Z., SAID ALI K. und HERMESZ E. (2002) *Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex*. *Neuroscience* **115**: 1067–1078.
- TAMAMAKI N., YANAGAWA Y., TOMIOKA R., MIYAZAKI J.I., OBATA K. und KANEKO T. (2003) *Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse*. *J Comp Neurol* **467**: 60–79.
- TANAKA Y., TANAKA Y., FURUTA T., YANAGAWA Y. und KANEKO T. (2008) *The effects of cutting solutions on the viability of GABAergic interneurons in cerebral cortical slices of adult mice*. *J Neurosci Methods* **171**: 118–125.
- TASKER J.G., OLIET S.H.R., BAINS J.S., BROWN C.H. und STERN J.E. (2012) *Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology*. *J Neuroendocrinol* **24**: 566–576.
- TEUBNER B., DEGEN J., SÖHL G., GÜLDENAGEL M., BUKAUSKAS F.F., TREXLER E.B., VERSELIS V.K., DE ZEEUW C.I., LEE C.G., KOZAK C.A., PETRASCH-PARWEZ E., DERMETZEL R. und WILLECKE K. (2000) *Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein*. *J Membr Biol* **176**: 249–262.
- THEIS M., SOHL G., SPEIDEL D., KUHN R. und WILLECKE K. (2003) *Connexin43 is not expressed in principal cells of mouse cortex and hippocampus*. *Eur J Neurosci* **18**:

267–274.

THESLEFF S. (1980) *Aminopyridines and synaptic transmission*. *Neuroscience* **5**(8): 1413–1419.

THOMPSON R.J. und MACVICAR B.A. (2008) *Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes*. *Channels* **2**: 81–86.

THOMSON A.M. und DEUCHARS J. (1997) *Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro*. *Cereb Cortex* **7**: 510–522.

THOMSON A.M. und MORRIS O.T. (2003) *Selectivity in the inter-laminar connections made by neocortical neurones*. *J Neurocytol* **31**: 239–246.

THOMSON A.M., WEST D.C., HAHN J. und DEUCHARS J. (1996) *Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex*. *J Physiol* **496**: 81–102.

TIAN G.F., AZMI H., TAKANO T., XU Q., PENG W., LIN J., OBERHEIM N., LOU N., WANG X., ZIELKE H.R., KANG J. und NEDERGAARD M. (2005) *An astrocytic basis of epilepsy*. *Nat Med* **11**: 973–981.

TIBBS G.R., BARRIE A.P., VAN MIEGHEM F.J., MCMAHON H.T. und NICHOLLS D.G. (1989) *Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release*. *J Neurochem* **53**: 1693–1699.

TODD K.L., KRISTAN W.B. und FRENCH K.A. (2010) *Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation*. *J Neurosci* **30**: 15277–15285.

TODOROVIC S.M. und LINGLE C.J. (1998) *Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents*. *J Neurophysiol* **79**: 240–252.

TOMIOKA R., OKAMOTO K., FURUTA T., FUJIYAMA F., IWASATO T., YANAGAWA Y., OBATA K., KANEKO T. und TAMAMAKI N. (2005) *Demonstration of long-range*

- GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex*. Eur J Neurosci **21**: 1587–1600.
- TRAUB R.D., BIBBIG R., PIECHOTTA A., DRAGUHN R. und SCHMITZ D. (2001) *Synaptic and nonsynaptic contributions to giant ipsps and ectopic spikes induced by 4-aminopyridine in the hippocampus in vitro*. J Neurophysiol **85**: 1246–1256.
- TRAUB R.D., DUNCAN R., RUSSELL A.J.C., BALDEWEG T., TU Y., CUNNINGHAM M.O. und WHITTINGTON M.A. (2010) *Spatiotemporal patterns of electrocorticographic very fast oscillations (> 80 Hz) consistent with a network model based on electrical coupling between principal neurons*. Epilepsia **51**: 1587–1597.
- TSENG G.N. (1999) *Different state dependencies of 4-aminopyridine binding to rKv1.4 and rKv4.2: role of the cytoplasmic halves of the fifth and sixth transmembrane segments*. J Pharmacol Exp Ther **290**: 569–577.
- TSENG G.N., JIANG M. und YAO J.A. (1996) *Reverse use dependence of Kv4.2 blockade by 4-aminopyridine*. J Pharmacol Exp Ther **279**: 865–876.
- VAN DER GIESSEN R.S., MAXEINER S., FRENCH P.J., WILLECKE K. und DE ZEEUW C.I. (2006) *Spatiotemporal distribution of Connexin45 in the olivocerebellar system*. J Comp Neurol **495**: 173–184.
- VANDECASTEELE M., GLOWINSKI J. und VENANCE L. (2006) *Connexin mRNA expression in single dopaminergic neurons of substantia nigra pars compacta*. Neurosci Res **56**: 419–426.
- VENANCE L., GLOWINSKI J. und GIAUME C. (2004) *Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices*. J Physiol **559**: 215–230.
- VERKHRATSKY A., KRISHTAL O.A. und PETERSEN O.H. (2006) *From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology*. Pflugers Arch **453**: 233–247.
- VESSEY J.P., LALONDE M.R., MIZAN H.A., WELCH N.C., KELLY M.E.M. und BARNES S. (2004) *Carbenoxolone inhibition of voltage-gated Ca channels and synaptic transmission in the retina*. J Neurophysiol **92**: 1252–1256.

- VOLMAN V., PERC M. und BAZHENOV M. (2011) *Gap junctions and epileptic seizures—two sides of the same coin?*. PloS One **6**: e20572.
- WAGNER E.M. (2012) Prä- und postsynaptische Wirkungen hervorgerufen durch Aktivierung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) in infra- und supragranulären neocorticalen Pyramidenzellen der Maus. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- WAGONER P.K. und OXFORD G.S. (1990) *Aminopyridines block an inactivating potassium current having slow recovery kinetics*. Biophys J **58**: 1481–1489.
- WANG Y., BARAKAT A. und ZHOU H. (2010) *Electrotonic coupling between pyramidal neurons in the neocortex*. PloS One **5**: e10253.
- WANG Y., GUPTA A., TOLEDO-RODRIGUEZ M., WU C.Z. und MARKRAM H. (2002) *Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex*. Cereb Cortex **12**: 395–410.
- WANG Y., SONG J.H., DENISOVA J.V., PARK W.M., FONTES J.D. und BELOUSOV A.B. (2012) *Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury*. J Neurosci **32**: 713–725.
- WANG Z., FERMINI B. und NATTEL S. (1995) *Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes*. J Pharmacol Exp Ther **272**: 184–196.
- WASSEFF S.K. und SCHERER S.S. (2011) *Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling*. Neurobiol Dis **42**: 506–513.
- WATTS J. und THOMSON A.M. (2005) *Excitatory and inhibitory connections show selectivity in the neocortex*. J Physiol **562**: 89–97.
- WEINGART R. und BUKAUSKAS F.F. (1998) *Long-chain n-alkanols and arachidonic acid interfere with the Vm-sensitive gating mechanism of gap junction channels*. Pflugers Arch **435**: 310–319.

- WEISS S.M., BENWELL K., CLIFFE I.A., GILLESPIE R.J., KNIGHT A.R., LERPINIÈRE J., MISRA A., PRATT R.M., REVELL D., UPTON R. und DOURISH C.T. (2003) *Discovery of nonxanthine adenosine A2A receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease*. *Neurology* **61**: 101–106.
- WELLERSHAUS K. (2006) Charakterisierung einer konditional Connexin36-defizienten Mausmutante sowie Vorversuche zur funktionellen Analyse von Horizontalzellen in der Retina. Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- WELLERSHAUS K., DEGEN J., DEUCHARS J., THEIS M., CHAROLLAIS A., CAILLE D., GAUTHIER B., JANSSEN-BIENHOLD U., SONNTAG S., HERRERA P., MEDA P. und WILLECKE K. (2008) *A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells*. *Exp Cell Res* **314**: 997–1012.
- WERTHAT F. (2012) Postnatale Entwicklung einer Subpopulation GABAerger Interneurone im sensomotorischen Cortex der transgenen Mauslinie FVB-Tg(GadGFP)45704Swn/J. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- WETZEL W. (2003) Charakterisierung der Immunantwort auf Tumore nach regionaler Hyperthermie im Mausmodell des malignen Melanoms. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- WILLECKE K., EIBERGER J., DEGEN J., ECKARDT D., ROMUALDI A., GÜLDENAGEL M., DEUTSCH U. und SÖHL G. (2002) *Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome*. *Biol Chem* **383**: 725–737.
- WONG M. und YAMADA K.A. (2001) *Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: a comparison of four in vitro seizure models*. *Brain Res Dev Brain Res* **128**: 113–120.
- WOZNY C. und WILLIAMS S.R. (2011) *Specificity of synaptic connectivity between layer 1 inhibitory interneurons and layer 2/3 pyramidal neurons in the rat neocortex*. *Cereb Cortex* **21**: 1818–1826.

- WU Z.Z., LI D.P., CHEN S.R. und PAN H.L. (2009) *Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit*. J Biol Chem **284**: 36453–36461.
- YAMAMOTO T., VUKELIC J., HERTZBERG E.L. und NAGY J.I. (1992) *Differential anatomical and cellular patterns of connexin43 expression during postnatal development of rat brain*. Brain Res Dev Brain Res **66**: 165–180.
- YANG L. und BENARDO L.S. (2002) *Laminar properties of 4-aminopyridine-induced synchronous network activities in rat neocortex*. Neuroscience **111**: 303–313.
- YANG Q. und MICHELSON H.B. (2001) *Gap junctions synchronize the firing of inhibitory interneurons in guinea pig hippocampus*. Brain Res **907**: 139–143.
- YU Y.C., HE S., CHEN S., FU Y., BROWN K.N., YAO X.H., MA J., GAO K.P., SOSINSKY G.E., HUANG K. und SHI S.H. (2012) *Preferential electrical coupling regulates neocortical lineage-dependent microcircuit assembly*. Nature **486**: 113–117.
- YUSTE R. (2011) *Dendritic spines and distributed circuits*. Neuron **71**(5): 772–781.
- ZAHN R.K., TOLNER E.A., DERST C., GRUBER C., VEH R.W. und HEINEMANN U. (2008) *Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats*. Neurobiol Dis **29**: 186–200.
- ZAPPALÀ A., CICERO D., SERAPIDE M.F., PAZ C., CATANIA M.V., FALCHI M., PARENTI R., PANTÒ M.R., LA DELIA F. und CICIRATA F. (2006) *Expression of pannexin1 in the CNS of adult mouse: cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced seizures*. Neuroscience **141**: 167–178.
- ZHENG-FISCHHÖFER Q., SCHNICHELS M., DERE E., STROTMANN J., LOSCHER N., MCCULLOCH F., KRETZ M., DEGEN J., REUCHER H., NAGY J.I., PETI-PETERDI J., HUSTON J.P., BREER H. und WILLECKE K. (2007) *Characterization of connexin30.3-deficient mice suggests a possible role of connexin30.3 in olfaction*. Eur J Cell Biol **86**: 683–700.

- ZIBURKUS J., CRESSMAN J.R., BARRETO E. und SCHIFF S.J. (2006) *Interneuron and pyramidal cell interplay during in vitro seizure-like events*. J Neurophysiol **95**: 3948–3954.
- ZLOMUZICA A., REICHINNEK S., MAXEINER S., BOTH M., MAY E., WÖRSDÖRFER P., DRAGUHN A., WILLECKE K. und DERE E. (2010) *Deletion of connexin45 in mouse neurons disrupts one-trial object recognition and alters kainate-induced gamma-oscillations in the hippocampus*. Physiol Behav **101**: 245–253.
- ZOLLES G., WAGNER E., LAMPERT A. und SUTOR B. (2009) *Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors in rat neocortical layer 5 pyramidal cells*. Cereb Cortex **19**: 1079–1091.
- ZSIROS V., ARADI I. und MACCAFERRI G. (2007) *Propagation of postsynaptic currents and potentials via gap junctions in GABAergic networks of the rat hippocampus*. J Physiol **578**: 527–544.

Danksagung

All den Menschen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, bin ich zu tiefem Dank verpflichtet. Besonders hervorgehoben seien an dieser Stelle:

Herr Prof. Dr. Bernd Sutor für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut der LMU München sowie die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes – ich hätte mir kein besseres Umfeld für die Anfertigung dieser Arbeit wünschen können. Als Doktorvater und Betreuer stand er mir bei Fragen stets mit konstruktiver Kritik in menschlich angenehmer Atmosphäre zur Seite.

Frau Prof. Dr. Magdalena Götz für die Aufnahme in das Department of Physiological Genomics sowie die weiteren Mitarbeiter des Physiologischen Instituts der LMU München, insbesondere Frau Gabi Horn und Frau Roswita Maul, ohne die ein strukturiertes Arbeiten im Labor nicht möglich gewesen wäre. Außerdem Herr Dr. Florian Werthat, bei dem ich für Diskussionen über die Details der Patch-Clamp-Technik immer ein offenes Ohr gefunden habe.

Meine Familie und meine Freunde, ohne deren Unterstützung ohnehin nichts gegangen wäre.

Ihnen allen: schönen Dank!

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

»Elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle von Gap Junctions bei der Entstehung von synchronisierter, GABA_A-Rezeptor vermittelter Aktivität in der Großhirnrinde der Maus *in vitro*«

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand