

**Funktionelle und molekulare Untersuchungen zur
Expression von GABA_A- und P₂X-Rezeptoren in
Gliazellen des Hippocampus**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michael Grauer

aus

Karlsruhe

Bonn, 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinhäuser

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Promotion: 19.11.2009

Danksagung

Meine Dissertation habe ich am Institut für Zelluläre Neurowissenschaften angefertigt. Daher bedanke ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. Christian Steinhäuser, der mir diese Arbeit an seinem Institut ermöglichte, sie stets wohlwollend unterstützte und mir auch die Gelegenheit gab, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren.

Für die Übernahme des Zweit-Gutachtens danke ich Herrn Professor Dr. Bleckmann. Herrn Professor Dr. Witke und Herrn Professor Dr. Schilling danke ich für ihre Bereitschaft, das Dritt- bzw. Viert-Gutachten zu erstellen.

Bei Herrn Dr. Gerald Seifert bedanke ich mich für die Gelegenheit, in seinem DFG-Projekt zu arbeiten sowie für die Durchführung der Einzelzell RT-PCR. Herrn Dr. Ronald Jabs danke ich für die Möglichkeit, an seinem P2X-Projekt mitzuarbeiten sowie für viele hilfreiche Ratschläge und inspirierende Diskussionen. Frau Dr. Kerstin Hüttmann danke ich für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Anatomie und Funktion des Hippocampus | 2 |
| 1.2 | Die Gliazellen | 3 |
| 1.2.1 | Astrozyten | 4 |
| 1.2.2 | Oligodendrozyten | 6 |
| 1.2.3 | Mikroglia | 7 |
| 1.2.4 | NG2- und GluR-Zellen | 7 |
| 1.3 | Membranrezeptoren auf Gliazellen | 9 |
| 1.3.1 | GABA _A -Rezeptoren | 9 |
| 1.3.2 | P2X-Rezeptoren | 11 |
| 2. | Ziel der Arbeit | 13 |
| 3. | Material und Methoden | 14 |
| 3.1 | Das FVB [tg(hGFAP/EGFP)] Mausmodell | 14 |
| 3.1.1 | Präparation | 15 |
| 3.2 | Humane Gewebeproben | 16 |
| 3.2.1 | Präparation des humanen Gewebes | 16 |
| 3.3 | Lösungen | 17 |
| 3.3.1 | Präparations- und Lagerlösungen | 17 |
| 3.3.2 | Badlösungen zur elektrophysiologischen Untersuchung | 17 |
| 3.3.3 | Pipettenlösungen | 18 |
| 3.4 | Der Aufbau des Messplatzes | 20 |
| 3.4.1 | Das Mikroskop | 20 |
| 3.4.2 | Die Messkammer | 20 |
| 3.4.3 | Die elektronischen Komponenten | 21 |
| 3.4.4 | Schwingungsdämpfung und elektrische Abschirmung | 21 |
| 3.4.5 | Akquirierung der Daten | 21 |
| 3.4.6 | Applikationsmethoden | 22 |
| 3.5 | Verwendete Messverfahren | 22 |
| 3.5.1 | Das Prinzip der Spannungsklemme | 23 |
| 3.5.2 | Ganzzelleableitung | 24 |
| 3.5.3 | Die Perforated-Patch-Konfiguration | 25 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.5.4 | Beobachtung des Serienwiderstands beim Perforated-Patch | 26 |
| 3.6 | Einzelzell RT-PCR und semiquantitative PCR | 26 |
| 3.7 | Statistische Verfahren | 31 |
| 4. | Ergebnisse | 32 |
| 4.1 | Charakterisierung von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen | 32 |
| 4.1.1 | Pharmakologische Eigenschaften | 32 |
| 4.1.2 | Affinität von GABA _A -Rezeptoren in GluR-Zellen | 34 |
| 4.1.3 | Tonische GABA _A -Rezeptorströme | 37 |
| 4.1.4 | Vergleich der Stromdichten von induzierten GABA _A -Rezeptorströmen in CA1-Pyramidenneuronen und GluR-Zellen | 39 |
| 4.2 | Bestimmung des Cl⁻-Umkehrpotentials der GABA_A-Rezeptorantwort in GluR-Zellen | 40 |
| 4.2.1 | Die Perforated-Patch-Konfiguration als Methode zur Bestimmung des Cl ⁻ - Umkehrpotentials | 40 |
| 4.2.2 | Bestimmung der Zelldepolarisation nach der GABA _A -Rezeptorantwort | 41 |
| 4.3 | Untereinheitenkomposition von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen | 43 |
| 4.3.1 | Potenzierung von GABA _A -Rezeptorantworten durch Pentobarbital | 43 |
| 4.3.2 | Modulation der GABA _A -Rezeptorantworten durch Benzodiazepine und Agonisten der BZ-Bindungsstelle | 45 |
| 4.3.3 | Modulation der GABA _A -Rezeptorantworten durch den Modulator Loreclezol | 49 |
| 4.3.4 | Blockierung der GABA _A -Rezeptorantworten durch Zink | 49 |
| 4.3.5 | Charakterisierung der Expression der Untereinheiten von GABA _A -Rezeptoren mittels RT-PCR | 52 |
| 4.4 | GABA-Transporter in GluR-Zellen | 53 |
| 4.5 | Charakterisierung von transienten Strömen nach de- und hyper- polarisierenden Spannungssprüngen in Anwesenheit von GABA | 56 |
| 4.6 | Analyse von P₂X-Rezeptoren in Gliazellen | 62 |
| 4.6.1 | Schnelle Applikation und Freisetzung von ATP durch Photolyse erzeugt keine P2X-Rezeptor vermittelten Ströme in GluR-Zellen und Astrozyten der Maus | 63 |
| 4.6.2 | Applikation von ATP und P2X-Rezeptoragonisten an hippocampalen GluR- Zellen der Ratte und in humanen Resektaten erzeuge keine Rezeptorströme | 64 |
| 4.6.3 | ATP verursacht Einwärtsströme in Astrozyten unter Ca ²⁺ und Mg ²⁺ freien Bedingungen, die nicht durch P2X ₇ -Rezeptoren vermittelt werden | 66 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5. | Diskussion | 69 |
| 5.1 | Charakterisierung von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen | 69 |
| 5.1.1 | Rezeptordichte und kinetische Eigenschaften von akut isolierten GluR-Zellen | 69 |
| 5.1.2 | GABA-Affinität von GABA _A -Rezeptoren in GluR-Zellen <i>in situ</i> | 71 |
| 5.1.3 | Tonische GABA _A -Rezeptorströme in GluR-Zellen | 72 |
| 5.2 | Umkehrpotential von GABA_A-Rezeptorströmen in GluR-Zellen | 73 |
| 5.3 | Untereinheitenkomposition von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen | 75 |
| 5.3.1 | Pharmakologische Charakterisierung durch DZ, ZPD, DMCM und LOR | 75 |
| 5.3.2 | Blockierung der GABA _A -Rezeptorantworten durch Zn ²⁺ | 78 |
| 5.4 | GABA-Transporter in GluR-Zellen | 79 |
| 5.5 | Transiente Ströme nach de- und hyper-polarisierenden Spannungssprüngen in Anwesenheit von GABA | 80 |
| 5.6 | Analyse von P₂X-Rezeptoren in Gliazellen | 82 |
| 6. | Zusammenfassung | 85 |
| 6.1 | Summary | 87 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 88 |
| 8. | Abkürzungen | 103 |
| 9. | Appendix | 106 |
| 9.1 | Erklärung | 106 |
| 9.2 | Curriculum Vitae | 107 |

1. Einleitung

Lange Zeit konzentrierte sich die neurowissenschaftliche Forschung nahezu ausschließlich auf die Charakterisierung von Eigenschaften und Funktionen von Neuronen, da sie als einzige Zellen im Gehirn in der Lage sind, Aktionspotentiale zu generieren. Dabei wurde die zahlenmäßig größere Population der Gliazellen im Gehirn ignoriert. Diese Zellen wurden vom Neuropathologen Rudolph Virchow 1856 als Glia bezeichnet, abgeleitet von dem griechischen Wort für Leim oder Kitt. Gliazellen wurden als nicht erregbare Zellen angesehen, deren Aufgaben sich lediglich auf die Ionenhomöostase, die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt, Stützfunktionen sowie die Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen beschränken.

Mit der Entwicklung neuer elektrophysiologischer Messmethoden (Hamill et al., 1981) konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass Gliazellen spannungsgesteuerte Ionenkanäle besitzen (Kettenmann et al., 1982, Bevan et al., 1985). Außerdem wurde nachgewiesen, dass diese durch den Neurotransmitter Glutamat depolarisiert werden und funktionelle ionotrope Rezeptoren für Glutamat exprimieren (Bowman und Kimelberg, 1984; Usowicz et al., 1989). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Rezeptoren und Ionenkanälen in Gliazellen nachgewiesen, die auch Nervenzellen besitzen (Übersicht von Verkhratsky und Steinhäuser, 2000).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass synaptische Übertragung durch einen bestimmten Typ von Gliazellen, den Astrozyten, durch Freisetzung von Neurotransmittern moduliert wird. Erstmals wurde demonstriert, dass in Zellkulturen durch die Applikation von Bradykinin und elektrische Stimulation in Astrozyten die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht werden kann. Die Astrozyten schütteten daraufhin Glutamat aus, das in Zellkultur neuronale NMDA-Rezeptoren aktivierte und eine Ca^{2+} -Erhöhung in Neuronen zur Folge hatte (Parpura et al., 1994; Nedergaard, 1994). Diese Befunde konnten auch im Hirnschnitt des Hippocampus bestätigt werden, wo die Stimulation von Nervenfasern Ca^{2+} -Oszillationen in Astrozyten auslöste. Zeitlich korreliert zu diesen Ca^{2+} -Oszillationen in Astrozyten folgte eine Ca^{2+} -Oszillation in Neuronen, die wahrscheinlich durch Transmitterfreisetzung aus Astrozyten hervorgerufen wurde. Die gezielte Inhibition von Ca^{2+} -Oszillationen in Astrozyten verhinderte eine Freisetzung von Neurotransmittern und die Modulation synaptischer Aktivität im Hirnschnitt (Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998; Übersicht von Volterra und Steinhäuser, 2004).

Bei einem anderen Typ von Gliazellen im Gehirn, der das Proteoglykan NG2 exprimiert, wurde eine direkte, schnelle Reaktion auf die Stimulation von Axonen der CA3-Pyramidenneuronen nachgewiesen. Es konnte eine direkte Innervierung und Kommunikation über Synapsen zwischen Neuronen und NG2-Gliazellen funktionell und morphologisch gezeigt werden (Bergles et al., 2000; Jabs et al., 2005). Neben glutamatergen Synapsen wurden auch GABAerge Synapsen von Interneuronen des Hippocampus auf NG2-Gliazellen nachgewiesen (Lin und Bergles, 2004; Jabs et al., 2005). Inzwischen wurden mehrere Beispiele für Neuron-Glia-Wechselwirkungen gefunden, bei denen Gliazellen synaptische Transmission kontrollieren und modulieren (Übersicht von Volterra und Meldolesi, 2005). Die Beschreibung der Gliazellen als reine Versorger und Stützelemente im Gehirn wird daher dem aktuellen Erkenntnisstand nicht mehr gerecht.

1.1 Anatomie und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus [von griechisch hippos = Pferd, kampe = gekrümmt] ist einer der zentralen Bestandteile des limbischen Systems und gehört zum Archikortex oder Allokortex, der im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren Isokortex typischerweise nicht sechsschichtig aufgebaut ist. Der Hippocampus liegt bogenförmig ausgezogen entlang des Unterhorns des Seitenventrikels im mesialen Temporallappen. Er bildet die mediale Begrenzung des Seitenventrikels und ist in lateraler Richtung durch den Sulcus hippocampi vom Gyrus parahippocampalis getrennt. Die Hippocampusformation besteht im Wesentlichen aus dem Gyrus dentatus, dem Cornu Ammonis (Ammonshorn, CA) und dem Subiculum. Der Gyrus dentatus besteht aus drei Schichten, der Lamina molecularis, der Lamina granularis, in der die Somata der Körnerzellen liegen, und dem Hilus, der teilweise auch als CA4 Region bezeichnet wird. Das Ammonshorn wird weiter aufgeteilt in die Felder CA1 bis CA3, wobei jedes der Felder aus 4 Schichten besteht. Diese sind das Stratum oriens, das Stratum pyramidale, in dem die Somata der Pyramidenneurone liegen, das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare (siehe Abb. 1.1). Informationen erreichen den Hippocampus aus dem entorhinalen Kortex über den Tractus perforans, der hauptsächlich an den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus terminiert. Die Axone der Körnerzellen projizieren als sogenannte Moosfasern zu den großen Pyramidenzellen der CA3-Region. Diese wiederum senden die Schaffer'schen Kollateralen zu den apikalen Dendriten der Pyramidenneuronen in der CA1-Region.

Bei den Funktionen des Hippocampus stehen Gedächtnis und Lernen im Vordergrund. Eindrucksvoller Beleg hierfür ist die in den 1950er Jahren am Patienten H.M. durchgeführte

bilaterale Hippocampektomie, die zu einer vollständigen anterograden Amnesie und partieller retrograder Amnesie (für das Jahr vor der Operation) führte. Der Neurochirurg William B. Scoville hatte sich für diese Art der Operation entschieden, nachdem sich kein epileptischer Fokus eingrenzen ließ (Freed et al., 1987; Scoville und Milner, 2000). 1973 fanden Bliss und Lomo das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission, das als zelluläres Modell für Lern- und Gedächtnisvorgänge im Hippocampus gilt (Bliss und Lomo, 1973; Miyamoto, 2006).

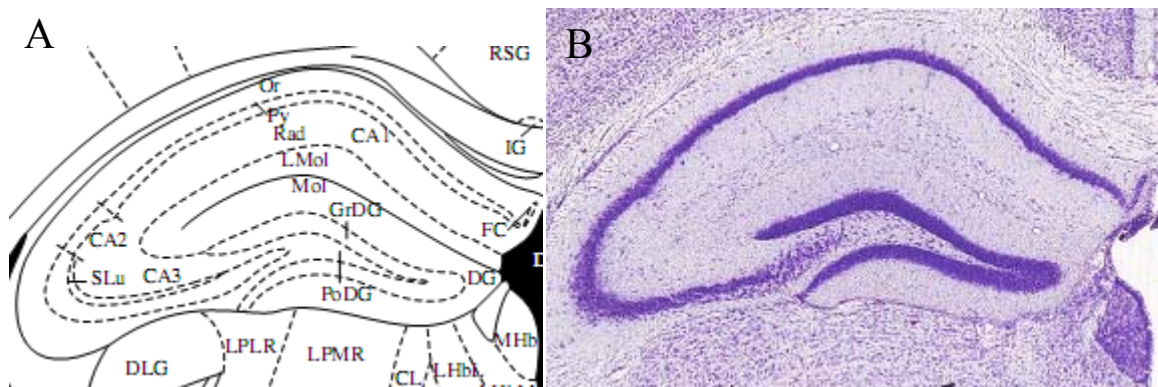


Abb. 1.1 Hippocampus der Maus, frontaler Schnitt. A) Abgebildet sind folgende Strukturen: Stratum oriens (Or), Pyramidenzellschicht (Py), Stratum radiatum (Rad), Stratum lacunosum moleculare (L. Mol), Stratum moleculare (Mol), Gyrus dentatus (DG), Granularzellschicht (GrDG), Polymorphe Schicht (PoDG), Stratum ludicum (SLu) und Cornu Ammonis Felder 1-3 (CA1, CA2, CA3) B) Nisselfärbung der gleichen stereotaktischen Ebene wie unter A) (Paxinos und Franklin, 2001).

1.2 Gliazellen

Im zentralen Nervensystem (ZNS) gibt es verschiedene Arten von Gliazellen. Sie werden in Makrogliazellen und Mikrogliazellen unterteilt. Bei den Makrogliazellen kann man Oligodendrozyten und Astrozyten unterscheiden. Im Cerebellum und in der Retina kommen radiale Gliazellen vor, die als Bergmann-Gliazellen und Müller-Gliazellen bezeichnet werden. Ein weiterer Typ der Makrogliazellen sind die NG2- oder GluR-Zellen. Der als eigener Gliazelltyp gilt (Übersicht von Peters, 2004). Die Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs, während die anderen glialen Zelltypen aus dem Ektoderm entstammen (Ramón y Cajal, 1913; Übersichten von Somjen, 1988; und Kimelberg, 2004).

1.2.1 Astrozyten

Astrozyten weisen je nach Funktion unterschiedliche morphologische Merkmale auf. Man unterscheidet protoplasmatische Astrozyten in der grauen Substanz und fibrilliäre Astrozyten in der weißen Substanz des Gehirns. Als gemeinsames morphologisches Merkmal wird die Bildung von Endfüßen angesehen, zum Beispiel auf Blutgefäßen und auf der Pia mater encephali. Eine weitere Eigenschaft von Astrozyten ist die Zellkopplung durch gap junctions. In den klassischen Färbungen von Cajal und del Rio-Hortega findet man in Astrozyten intermediäre Filamente, deren Hauptbestandteil später als gliales, fibrilliäres, saures Protein (GFAP, für die englische Schreibweise „glial fibrillary acid protein“) identifiziert wurde und deshalb oft als spezifischer astrozytärer Zell-Marker verwendet wird (Eng et al., 1971; Übersicht von Kimelberg, 2004). GFAP als Marker ist jedoch umstritten, da es in manchen Astrozyten erst nach Gewebeverletzungen repräsentiert wird und eine geringe Proteinexpression immunohistochemisch schwer nachweisbar ist. So sind z.B. kortikale Astrozyten häufig GFAP-negativ, exprimieren aber ein für Astrozyten spezifisches Glutamat-Transporter-Protein (EAAT1 oder GLAST) (Campbell und Gotz, 2002; Malatesta et al., 2000).

Es sind verschiedene Funktionen von Astrozyten bekannt. So induzieren Astrozyten die Bildung von tight junctions (Zonulae occludentes) an den Blutgefäßen, die die Blut-Hirn-Schranke (BBB, für englisch "blood brain barrier") bilden. Desweiteren besitzen die Plasmamembranen von Astrozyten hohe K^+ -Leitfähigkeiten, die es ihnen ermöglichen, durch neuronale Aktivität verursachte lokale Erhöhung der K^+ -Konzentrationen im Extrazellulärraum zu puffern. Diese Funktion wurde als räumliche Pufferung beschrieben (Orkand et al., 1966; Newman et al., 1984). Eine weitere wichtige Funktion ist die Energieversorgung von Neuronen mittels Laktatzufuhr. Laktat wird durch Glykolyse gewonnen und aktivitätsabhängig bereitgestellt (Übersicht von Magistretti und Pellerin, 1999). Astrozyten besitzen große Energiespeicher in Form von Glykogen, die unter anderem der Produktion von Laktat dienen.

Auch an der chemischen Signalübertragung sind Astrozyten beteiligt, sie besitzen Transporter für die wichtigsten Neurotransmitter Glutamat, GABA, Glycin, Adenosin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin (Swanson, 2005). Die Fortsätze von Astrozyten umschließen neuronale Synapsen und nehmen bei neuronaler Aktivität freiwerdende Transmitter wie z.B. Glutamat über ihre Glutamat-Transporter auf (Bergles et al., 1999; Oliet et al., 2004). Somit sind sie in der Lage, die Wirkung der Transmitter durch zelluläre Aufnahme zu beenden.

Die Interaktion von Astrozyten mit Neuronen beschränkt sich nicht nur auf die Aufnahme von Neurotransmittern. Es findet eine direkte wechselseitige Kommunikation über die Freisetzung von Transmittern aus Astrozyten und die Bindung an die jeweiligen neuronalen Rezeptoren statt (Übersicht von Volterra und Meldolesi, 2005; Haydon und Carmignoto, 2006). Astrozyten werden durch *spill over* von Transmittern aus Synapsen erregt. Bei Bergmann-Gliazellen im Cerebellum wurde auch eine andere Art der Kommunikation festgestellt. Diese erfolgte über ektopische neuronale Freisetzung von Transmittern nahe der Gliazellen, welche parallel zu der konventionellen Freisetzung an der Synapse stattfindet. Die Reaktion der Bergmann-Gliazellen äußert sich im Ca^{2+} -Einstrom über ionotrope Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ und durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Matsui und Jahr, 2004). In hippocampalen Astrozyten löst die synaptische Freisetzung von Glutamat die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCRs, "G protein-coupled receptors") aus, die eine Signalkaskade über Aktivierung von Phospholipasen und Erzeugung von Inositol-3-phosphat (IP3) zur Folge hat. IP3 löst Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern aus (Haydon und Carmignoto, 2006). Neuronen-abhängige Erregung von Astrozyten ist im ZNS weit verbreitet und wird durch verschiedenste Neurotransmitter und Faktoren wie Glutamat, GABA, Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, ATP, Stickstoffoxid und den Nervenwachstumsfaktor BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) vermittelt (Übersicht von Volterra und Meldolesi, 2005).

Eine physiologische Konsequenz der Erregung von Astrozyten durch Neurone ist unter anderem die Vasodilatation von kleinen Arteriolen und Kapillaren. Als möglicher Mechanismus wird eine fortlaufende Ca^{2+} -Welle über das astrozytäre Netzwerk vorgeschlagen und die anschließende Freisetzung vasoaktiver Substanzen aus astrozytären Endfüßen, die in Kontakt mit Arteriolen und Kapillaren stehen. Als vasoaktive Substanzen werden Prostaglandin E2 (PGE_2) und Arachidonsäure aus Astrozyten freigesetzt. Die Freisetzung von PGE_2 löst eine Gefäßerweiterung aus, während Arachidonsäure eine Konstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen verursacht (Übersicht von Haydon und Carmignoto, 2006).

Astrozyten modulieren synaptische Kommunikation über Freisetzung von Glutamat, ATP, und D-Serin. Die Freisetzung von Glutamat aus astrozytären Fortsätzen kann aus intrazellulären Vesikeln über einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus erfolgen (Bezzi et al., 2004). Freigesetztes Glutamat kann extrasynaptische NMDA Rezeptoren in der Zellmembran von Neuronen aktivieren. Es wird auch eine nichtvesikuläre Freisetzung von Glutamat durch

Connexin-Hemikanäle und ionotrope Purinrezeptoren vorgeschlagen (Ye et al., 2003; Duan et al., 2003).

Der Neurotransmitter D-Serin wird in Astrozyten aus L-Serin-Konvertierung durch das Enzym D-Serin-Racemase hergestellt. D-Serin ist ein Ko-Transmitter, der zusammen mit Glutamat neuronale NMDA-Rezeptoren aktiviert (Übersichten von Volterra und Meldolesi, 2005; und von Haydon und Carmignoto, 2006).

Ein Beispiel für die Wirkung des Gliotransmitters ATP ist die heterosynaptische Depression von Synapsen der Schaffer'schen Kollateralen an CA1-Pyramidenneuronen im Hippocampus. Bei Synapsen, die auf verschiedenen Spines desselben Dendriten terminieren, hemmt starke Aktivität einer Synapse die Aktivität einer benachbarten, weniger aktiven Synapse. Bei diesem Mechanismus sind sowohl Interneurone als auch Astrozyten beteiligt. In diesem Regelkreis setzen Astrozyten aktivitätsabhängig ATP frei, das durch extrazelluläre Ektonukleotidasen zu ADP, AMP und Adenosin abgebaut wird. Adenosin bindet an präsynaptischen A1-Rezeptoren einer benachbarten Synapse und führt zu einer reduzierten Neurotransmitterfreisetzung (Serrano et al., 2006; Übersicht von Volterra und Meldolesi, 2005).

Eine Untergruppe der Astrozyten sind die radialen Gliazellen. Radiale Gliazellen haben eine charakteristische bipolare Morphologie und stehen mit der Pia mater und den Ventrikeln in Kontakt. Genau wie die klassischen Astrozyten speichern sie Glykogen in Granula, bilden Endfüße auf Blutgefäßen, exprimieren GLAST und sind über gap junctions gekoppelt. Während der embryonalen Entwicklung generieren radiale Gliazellen in der ventrikulären Zone des Neokortex intermediäre Vorläuferzellen, die in die subventrikuläre Zone wandern. Dort generieren diese durch symmetrische Teilung Neurone, die in die kortikale Platte wandern (Übersicht von Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002; Mori et al., 2005 und von Kriegstein et al., 2006). In adulten Tieren generieren radiale Gliazellen in der Subgranularschicht (SGL, engl. sub granular layer) des Gyrus dentatus des Hippocampus Vorläuferzellen für die Neurogenese (Seri et al., 2001).

1.2.2 Oligodendrozyten

Oligodendrozyten produzieren die Myelinscheiden im zentralen Nervensystem, welche Axone der Neurone elektrisch isolieren (Butt, 2006). Diese Isolierung wird durch die Ranvierschen Schnürringe unterbrochen und ermöglicht so eine schnelle Übertragung von Nervenimpulsen (saltatorische Erregungsleitung). Oligodendrozyten können über den Durchmesser der Axone

und die Anzahl an Axonen, die sie myelinisieren, klassifiziert werden: Oligodendrozyten vom Typ I/II umwickeln 5 bis 30 dünne Axone ($\leq 2 \mu\text{m}$), Typ III/IV Oligodendrozyten 1 bis 6 dickere Axone. Myelin hat eine enge, kompakte vielschichtige Struktur mit einem hohen Lipidanteil (70-85% des Trockengewichts) mit Galaktosylceramid als Hauptkomponente. Die häufigsten Proteine sind das Proteo-Lipid Protein (PLP) und das Myelin-Basische Protein (MBP). Oligodendrozyten sind an der Anhäufung der Natrium- und Kaliumkanäle an Schnürringen und *Juxtaparanoden* involviert (Poliak und Peles, 2003).

1.2.3 Mikroglia

Mikrogliazellen sind immunkompetente Zellen im Gehirn (Streit et al., 2005), die im Unterschied zu den anderen Gliazellen aus dem Mesoderm entstanden sind. Mikrogliazellen ändern ihre Morphologie je nach ihrem Aktivitätszustand besonders drastisch. Im Ruhezustand sind sie stark verzweigt, im aktivierten Zustand werden sie hypertroph und entwickeln breite Fortsätze. Als vollentwickelte Mikroglia sind sie rund und haben keine sichtbaren Fortsätze. Auch im Ruhezustand sind Mikroglia extrem beweglich und scheinen die zelluläre Mikroumgebung zu überwachen (Nimmerjahn et al., 2005). Außerdem sind Mikrogliazellen Quelle und Ziel einer Vielzahl von Cytokinen und Chemokinen und mit einer Vielfalt von Rezeptoren für diese Signalproteine ausgestattet, die für die Interaktion mit Neuronen von Bedeutung sind (Übersicht von Biber et al., 2008).

1.2.4 NG2- und GluR-Zellen

NG2-Gliazellen sind nach ihrer Expression des Chondroitinsulfat-Proteoglykans NG2 in der Ratte benannt, das homologe Protein in der Maus ist AN2. Die Herkunft und Funktion von NG2-Glia wird zurzeit diskutiert. Die Expression von NG2 wurde anfangs als Merkmal für Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) angesehen, aber inzwischen werden NG2-Zellen auch als neuer, eigenständiger Typ von Makrogliazellen beschrieben, die in sich heterogen sind (Übersichten von Nishiyama et al., 2009 und von Polito und Reynolds, 2005). Im adulten Gehirn besitzen NG2-Zellen kleine, runde oder längliche Somata und mehrere primäre Fortsätze. Diese Morphologie ist untypisch für unreife Vorläuferzellen. Zudem verfügen nur wenige NG2-Zellen über die Fähigkeit, sich langsam zu teilen (Horner et al., 2000; Dawson et al., 2003). Die Heterogenität der NG2-Zellen wird unter anderem beim Vergleich von grauer und weißer Substanz deutlich. In adulten Nagern entwickeln sich in der weißen Substanz aus Olig2-positiven NG2-Vorläuferzellen fast ausschließlich Oligodendrozyten, ein kleiner Teil der Zellen persistiert im Vorläuferstadium und exprimiert weiterhin NG2. Im Gegensatz dazu

differenziert sich die Mehrzahl der Olig2-Zellen in der grauen Substanz nicht weiter aus; sie bleibt weiterhin NG2 positiv. 20 % der Zellen entwickeln sich zu Oligodendrozyten und 7 % zu Astrozyten (Dimou et al., 2008). Astrozyten und Oligodendrozyten exprimieren kein NG2. Außerdem zeigte eine andere Studie, dass sich aus NG2-Zellen in der grauen Substanz neben Oligodendrozyten auch Astrozyten entwickeln (Zhu et al., 2008). Zellen mit dem NG2 Antigen umfassen daher sowohl Oligodendrozyten- wie auch Astrozytenvorläuferzellen und NG2-Zellen, die im vollentwickeltem Gehirn persistieren (Aguilhon et al., 2008).

Im Hippocampus und in der weißen Substanz konnten glutamaterge und GABAerge Synapsen auf NG2-Gliazellen nachgewiesen werden (Bergles et al., 2000; Lin und Bergles, 2004; Lin et al., 2005; Jabs et al., 2005). Die neuronale Vesikelfreisetzung an dieser Neuro-Glia Synapse verläuft synchron mit den Aktionspotentialen der Neurone. Somit können NG2-Gliazellen die neuronale Aktivität detektieren (Übersicht von Gallo et al., 2008).

GluR-Zellen wurden in [tg(hGFAP-EGFP)] Mäusen als Zellen mit schwacher hGFAP-Promotoraktivität - ohne Expression von GFAP auf Proteinebene - beschrieben, die funktionelle Glutamat-Rezeptoren des AMPA Subtyps exprimieren (Matthias et al., 2003). Sie zeigen eine ähnliche Morphologie wie NG2-Glia, zusätzlich wurde NG2-Immunoreaktivität bei einem Teil der GluR-Zellen beobachtet. Ein weiteres gemeinsames Merkmal von GluR-Zellen und NG2-Zellen sind ihre elektrischen Membraneigenschaften - Zellen mit diesen Eigenschaften wurden als komplexe Zellen bezeichnet (Steinhäuser et al., 1994) - sowie deren entwicklungsabhängige Veränderung (Matthias et al., 2003; Karram et al., 2008). Wie bei NG2-Gliazellen wurden auch bei GluR-Zellen glutamaterge und GABAerge Synapsen gefunden. Diese innervierten GluR-Zellen waren NG2 positiv (Jabs et al., 2005). Zurzeit ist es noch unklar, in welchem Verhältnis komplexe Zellen, GluR-Zellen und NG2-Zellen genau zueinander stehen.

1.3. Membranrezeptoren auf Gliazellen

Gliazellen exprimieren eine Vielzahl von Membranrezeptoren (Verkhratsky und Steinhäuser, 2000). In den folgenden Abschnitten werden die Rezeptoren besprochen, die im Fokus dieser Arbeit stehen, GABA_A-Rezeptoren und die purinergen P2X-Rezeptoren.

1.3.1 GABA_A-Rezeptoren

Hochvernetzte GABAerge Interneurone sind eine wichtige Voraussetzung für die Kontrolle von Netzwerkoszillationen im Gehirn (Übersicht von Mody und Pearce, 2004). In der Entwicklung spielen GABAerge Signalwege eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Neurogenese und der Differenzierung von Zellen. GABAerge Erregung in der SGL fördert die Differenzierung von hippocampalen Vorläuferzellen zu Neuronen (Tozuka et al., 2005), in der subventrikulären Zone reguliert GABA die Proliferation von GFAP positiven Zellen (Liu et al., 2005). Im Laufe der Entwicklung ändert sich die Wirkung von GABA auf Neurone von exzitatorisch zu inhibitorisch. Diese anfängliche exzitatorische Wirkung von GABA, die durch eine hohe intrazelluläre Cl⁻-Konzentration vermittelt wird, kann bei der Entwicklung neuronaler Netzwerke von Bedeutung sein, da sich GABAerge Neurone vor glutamatergen Neuronen teilen und reife Synapsen entwickeln. Die Depolarisation der Neurone durch GABA kann spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle (VDCCs) öffnen sowie die spannungsabhängige Blockierung von NMDA-Rezeptoren durch Mg²⁺ bei negativen Potentialen aufheben (Übersicht von Ben-Ari, 2002, Ben-Ari, 2006).

In verschiedenen Hirnregionen existieren GABA_A Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung (Pirker et al., 2000). Es sind 19 Gene für Isoformen ionotroper GABA-Rezeptoruntereinheiten bekannt (Simon et al., 2004). Diese beinhalten 16 Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π), die GABA_A-Rezeptoren zugeordnet werden, und 3 Rho (ρ_{1-3}) Untereinheiten, die dem sogenannten GABA_C-Rezeptor zugeordnet werden. Der Terminus „GABA_C-Rezeptor“ ist jedoch umstritten (Barnard et al., 1998; Übersicht von Olsen und Sieghart, 2008a). Immunopräzipitations-Studien zeigten, dass α - und β -Untereinheiten beliebig kombinierbar sind und auch zwei verschiedene α - und β -Untereinheiten in einem Rezeptorkomplex vorkommen können. Im Gegensatz dazu konnten γ -Untereinheiten nicht mit weiteren γ -Untereinheiten ausgefällt werden. Aus diesen Studien wurde die Stöchiometrie für native Rezeptoren abgeleitet: 2α , 2β und 1γ oder 1δ (Abb. 1.2). Diese Schlussfolgerung konnte in mehreren Studien mit rekombinanten Rezeptoren bestätigt werden (Tretter et al., 1997; Baumann et al., 2002).

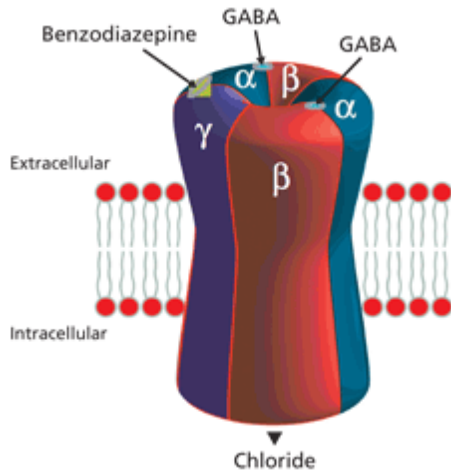


Abb. 1.2 Aufbau eines $GABA_A$ Rezeptors mit der Stöchiometrie $2\alpha 2\beta 1\gamma$. Der Rezeptor besitzt zwei Bindungsstellen für GABA und eine für Benzodiazepine. Letztere wird von α und γ Untereinheiten gebildet (aus Dawson et al., 2005).

Viele klinisch relevante Pharmazeutika wirken an $GABA_A$ -Rezeptoren. Am gründlichsten wurde die Interaktion der Rezeptoren mit Benzodiazepinen untersucht. Die Benzodiazepinbindungsstelle (BZ-Bindungsstelle) wird an der Kontaktstelle von α - und γ -Untereinheiten gebildet. Daher ist die Wirkung von Benzodiazepinen vor allem durch diese Untereinheiten bestimmt. So interagiert das klassische Benzodiazepin Diazepam (DZ) überwiegend mit Rezeptoren, die aus $\alpha_1\beta\gamma_2$, $\alpha_2\beta\gamma_2$, $\alpha_3\beta\gamma_2$ oder $\alpha_5\beta\gamma_2$ bestehen, jedoch nicht mit $\alpha_4\beta\gamma_2$ oder $\alpha_6\beta\gamma_2$. Rezeptoren, die die Untereinheiten γ_1 - oder γ_3 enthalten, zeigen eine reduzierte Affinität gegenüber Benzodiazepinen (Übersicht von Sieghart, 1995; und von Hevers und Lüddens, 1998).

Welche Kombinationen von $GABA_A$ -Rezeptoruntereinheiten im Gehirn vorkommen, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. So schlagen Olsen und Sieghart 11 verschiedene funktionelle Subtypen von $GABA_A$ Rezeptoren vor, deren Existenz bewiesen ist: $\alpha_{1-6}\beta\gamma_2$, $\alpha_4\beta_{2,3}\delta/\alpha_6\beta_{2,3}\delta$ und ρ (Olsen und Sieghart, 2008a). Weitere 6 Rezeptoren werden als sehr wahrscheinlich angenommen, z.B. binäre Rezeptoren aus $\alpha\beta$ -Untereinheiten. Nusser (1998) zeigte eine Kollokalisierung von α_1 - und α_6 -Untereinheiten in zerebralen Körnerzellen. Daher werden auch $\alpha_1\alpha_6\beta\gamma_2$ oder $\alpha_1\alpha_6\beta\delta$ als wahrscheinliche Rezeptoren angesehen. Für die weniger häufigen Subtypen γ_1 und γ_3 , ϵ , θ , π ist keine spezifische Pharmakologie oder Funktion bekannt, daher stufen die Autoren ihr natives Vorkommen als unsicher ein (Überblick von Olsen und Sieghart, 2008b).

Die funktionelle Bedeutung der vielfältigen Untereinheiten wird deutlich, wenn die entsprechenden Gene ausgeschaltet werden. So hat das Abschalten der γ_2 -Untereinheit tödliche Folgen für den Organismus. Knockout-Mäuse sterben innerhalb von 3 Wochen nach der Geburt. Mögliche Ursache könnte hier der Verlust des „*membrane clustering*“ sein, die

Rezeptoren werden nicht an den vorgesehenen Synapsen in der Membran verankert. Auch β_3 -Knockout-Mäuse sterben zu 90% innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt. Der Verlust einzelner α -Untereinheiten scheint jedoch kompensierbar zu sein. (Überblick von Korpi et al., 2002).

Die funktionelle Variabilität der Rezeptoren wird deutlich, wenn man deren Aktivierungs- und Inaktivierungs-Kinetik vergleicht. Rezeptoren mit $\alpha_2\beta\gamma_2$ Untereinheiten zeigen z.B. einen schnelleren Anstieg und einen langsameren Abfall ihrer Leitfähigkeiten als α_1 -Rezeptoren (McClellan und Twyman, 1999).

GABA_A-Rezeptoren wurden auch in vielen Gliazellen nachgewiesen. So wurden sie funktionell in Astrozyten beschrieben (MacVicar et al., 1989; Fraser et al., 1995; Rosewater und Sontheimer, 1994; Steinhäuser et al., 1994), ebenso in Oligodendrozyten (Hoppe und Kettenmann, 1989) und in Müllerzellen der Retina (Malchow et al., 1989; Biedermann et al., 2004). In Bergmann-Gliazellen wurden GABA_A-Rezeptoren der Kombination $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_1$ mittels in situ Hybridisierung und Immunohistochemie nachgewiesen (Meinecke et al., 1989; Wisden et al., 1989; Übersicht von Wisden, 1995; Khan et al., 1996; Riquelme et al., 2002). Auch in NG2-Gliazellen, die direkt durch GABAerge Synapsen innerviert sind, wurden synaptische Ströme nachgewiesen (Lin und Bergles, 2004; Jabs et al., 2005). Diese GABA_A-Rezeptoren wurden als insensitive gegenüber Zolpidem (ZPD) und sensitiv gegenüber DZ beschrieben. Daher wurde vermutet, dass diese Rezeptoren α_5 -Untereinheiten enthalten (Lin und Bergles, 2004). Bei Astrozyten findet man überwiegend Rezeptoren, die das pharmakologische Profil von $\alpha\beta\gamma_2$ -Rezeptoren haben. Eine Fraktion zeigt jedoch pharmakologische Eigenschaften, die für die Expression von γ_1 -Untereinheiten typisch sind (Fraser et al., 1994 und 1995; Rosewater und Sontheimer, 1994). Wie die GABA_A-Rezeptor-Komposition in GluR-Zellen beschaffen ist, ist noch nicht bekannt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.3.2. P2X-Rezeptoren

Das Nukleotid Adenosin-tri-Phosphat (ATP) wird in Mitochondrien produziert und dient als Energieträger der Zelle. Wird es in den extrazellulären Raum freigesetzt, kann ATP auch als Neurotransmitter fungieren und sowohl ionotrope Rezeptoren vom P2X-Typ als auch metabotrope Rezeptoren vom P2Y-Typ aktivieren. Die P2X-Rezeptoren sind permeabel für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} -Ionen. Ein Rezeptor formt sich aus drei Untereinheiten, es sind sieben verschiedene Untereinheiten für diese Rezeptoren bekannt (P2X₁₋₇). In Bezug auf die Kinetik der Desensibilisierung unterscheiden sich die schnell desensibilisierenden P2X₁- und P2X₃-

Rezeptoren (Zeitkonstante $\tau < 300$ ms) von den langsam desensitisierenden P2X_{2/3}- und P2X₄-Rezeptoren ($\tau > 2$ s). Die P2X₂- und P2X₇-Rezeptoren wurden als nicht desensitisierend ($\tau > 10$ s) beschrieben (Übersicht von Inoue, 1998; North, 2002; Egan et al., 2006; Khakh und North, 2006).

Im peripheren Nervensystem wurde die synaptische Modulation durch P2X-Rezeptoren bei der Schmerzwahrnehmung beschrieben. P2X₃-Rezeptoren werden in nozizeptiven (schmerzwahnehmenden) Neuronen der Hinterwurzel exprimiert und detektieren die Freisetzung von ATP bei Gewebeverletzungen. Diese Neurone bilden Synapsen mit Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks und setzen neben Glutamat auch ATP als Neurotransmitter frei. Diese Freisetzung führt zur Aktivierung postsynaptischer P2X-Rezeptoren und steigert die Frequenz postsynaptischer, Glutamat-vermittelter Ströme. Interneurone, die ebenfalls Synapsen mit Neuronen des Hinterhorns bilden, exprimieren präsynaptische P2X-Rezeptoren, deren Aktivierung die Freisetzung der inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glycin fördert. Die Relevanz dieser Rezeptoren für die Schmerzwahrnehmung wurde durch Verhaltensstudien an Knockout-Mäusen belegt (Übersicht von Khakh, 2001).

Im ZNS ist die Rolle der P2X-Rezeptoren noch nicht geklärt. Es gibt aber Hinweise, dass die Applikationen von ATP im Hippocampus Langzeit-Potenzierung (LTP) beeinflussen kann (Übersicht von Inoue, 1998). Desweiteren wurden in vielen Regionen des Gehirns nach Applikation von ATP Effekte an Neuronen beobachtet, z.B. Ca²⁺-Anstieg in kortikalen Neuronen, EPSC-Blockade im Hippocampus oder ATP-vermittelte Einwärtsströme in hippocampalen Zellkulturen. Jedoch wurde die Wirkung der ATP-Applikation auch durch indirekte Effekte erklärt (Übersicht von Norenberg und Illes, 2000).

Erste Hinweise auf ionotrope Purinrezeptoren in Gliazellen wurden in Astrozytenkulturen gefunden (Walz et al., 1994). Man vermutet, dass P2X-Rezeptoraktivierung in Astrozyten einen möglichen Mechanismus der astrozytären Freisetzung von Glutamat darstellt (Duan et al., 2003).

2. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen zwei verschiedene Arten von Membranrezeptoren an Gliazellen untersucht werden, deren mögliche Rolle bei der Kommunikation zwischen Gliazellen und Neuronen noch diskutiert wird:

- GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen

Hippocampale Neurone bilden GABAerge und glutamaterge Synapsen mit GluR-Zellen. Da die GABA_A-Rezeptoren dieser Zellen bislang kaum untersucht wurden, soll in dieser Arbeit geklärt werden, welche Konsequenzen die GABA_A-Rezeptoraktivierung hat.

- Zunächst sollen die funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren ermittelt werden: Rezeptordichte, Desensitisierung sowie die Affinität für den Liganden.
- Weiterhin soll geprüft werden, ob GluR-Zellen auch extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren exprimieren, die in Neuronen tonische Ströme vermitteln.
- Ferner soll die native [Cl⁻] in GluR-Zellen ermittelt werden, denn diese bestimmt die Folgen der Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren für die Zelle.
- Desweiteren soll die Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen mit molekularbiologischen und pharmakologischen Methoden untersucht werden. Je nach Untereinheitenzusammensetzung ändern sich die Affinität des Rezeptors zu GABA sowie seine Desensitisierung. Somit werden die Erkenntnisse aus den funktionellen Untersuchungen ergänzt.

- P2X-Rezeptoren in GluR- und GluT-Zellen

Die Rolle von P2X-Rezeptoren in Neuron-Glia-Wechselwirkungen wird diskutiert, ein eindeutiger Nachweis von funktionellen P2X-Rezeptoren in Makrogliazellen in akuten Präparaten wurde noch nicht erbracht. Daher ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die mögliche P2X-Rezeptorexpression in Gliazellen des Hippocampus funktionell in akuten Gewebeschnitten zu verifizieren.

3. Material und Methoden

3.1 Das [tg(hGFAP/EGFP)] Mausmodell

Als Versuchstiere wurden transgene Mäuse verwendet, die das grün-fluoreszierende Protein (EGFP, engl. für "enhanced green fluorescent protein") unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors exprimieren (Nolte et al., 2001). Die Aktivierung des Promotors in Gliazellen führt zur Expression von EGFP, dieses Protein ist eine in den roten Wellenlängenbereich verschobene Variante des *Aequorea victoria* fluoreszierenden Proteins mit verbesserten Fluoreszenzeigenschaften (Prendergast und Mann, 1978; Übersicht von Tsien, 1998). Die transgenen Mäuse wurden aus Mäusen des FVB/N Stamms hergestellt. Bei diesen Mäusen zeigte die Färbung mit Antikörpern gegen GFAP eine Überlappung mit EGFP in der Mehrheit der Zellen. Eine Überlappung mit Färbungen gegen den neuronalen Marker NeuN oder gegen den Oligodendrozytenmarker *Myelin-assoziiertes Glykoprotein* wurde nie beobachtet. Daher ist dieses Modell gut für eine schnelle direkte Detektion von Gliazellen in vitalen hippocampalen Gehirnschnitten geeignet (Nolte et al., 2001). In den Zellen ist das EGFP gleichmäßig verteilt und ermöglicht die Auflösung kleinerer morphologischer Details wie Fortsätze. Die Dichte von EGFP-exprimierenden Zellen variiert jedoch in verschiedenen Hirnregionen. Die transgenen Mäuse zeigten keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen desselben Stamms. Untersucht wurden Fruchtbarkeit, Brutpflege, Explorationsverhalten, Beweglichkeit und Lebensspanne (Nolte et al., 2001). Homozygote Tiere wurden im Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn gehalten.

In dieser Maus wurden 2 Typen von Zellen im Hippocampus mit unterschiedlich starker hGFAP-Promotor-Aktivität beschrieben und nach dem Vorhandensein von Glutamattransportern bzw. Rezeptoren GluT- und GluR-Zellen benannt (Matthias et al., 2003). GluT-Zellen sind protoplasmatische Astrozyten mit starker EGFP Expression, sie besitzen hohe Ruhe-K⁺-Leitfähigkeiten und kaum spannungsaktivierbare Kanäle. GluR-Zellen zeigen schwächere EGFP Expression und eine Vielzahl spannungsaktivierbarer Ionenkanäle. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist die Kopplung über gap junctions von GluT-Zellen, die in GluR-Zellen nie beobachtet wurde (Wallraff et al., 2004).

Die GluR-Zellen haben ein rundes Zellsoma mit wenigen dünnen Fortsätzen und ähneln damit den in der Einleitung beschriebenen NG2-Zellen (Abb. 3.1 A1). GluT-Zellen zeigen wie

protoplasmatische Astrozyten unregelmäßig geformte Zellkörper mit vielen prominenten, weit verzweigten Fortsätzen (Abb. 3.1 B1).

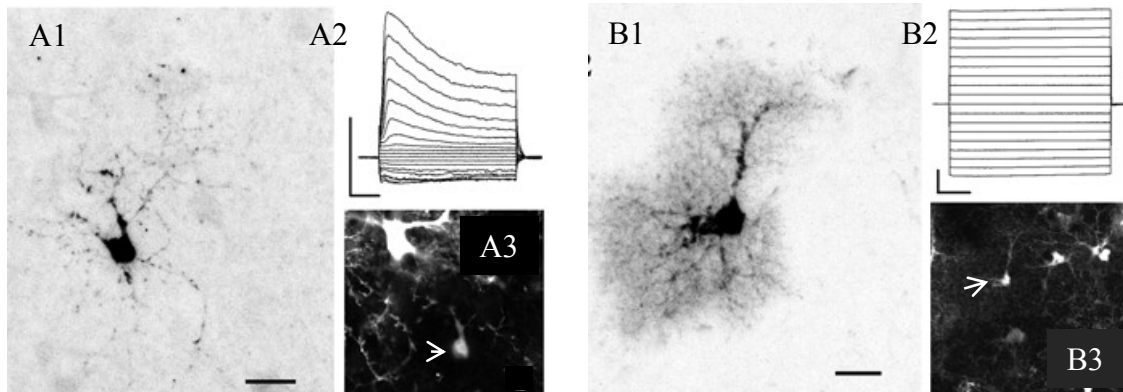


Abb. 3.1 (A1) Typisches Beispiel der Morphologie einer GluR Zelle mit wenigen Fortsätzen und (B1) einer GluT Zelle mit vielen weitverzweigten Fortsätzen aus der CA1 Region des Hippocampus einer tg(hGFAP/EGFP) Maus. Für die Visualisierung der Morphologie wurden die Zellen mit Dextran gekoppeltem Texasred gefüllt. (A2, B2) In der Ganzzelleableitung werden die Zellen von ihrem Haltepotential (-80 mV) ausgehend in 10 mV Schritten de- (bis +20mV) und hyperpolarisiert (bis -160 mV) (Jabs et al., 2005). GluR-Zellen zeigen bei Depolarisierung eine Aktivierung spannungsaktivierter K^+ -Kanäle. Zellen mit diesen Eigenschaften werden auch als "komplexe Zellen" bezeichnet (Steinhäuser et al., 1994). Auch NG2-Zellen zeigen diese Eigenschaften. GluT-Zellen zeigen eine lineare Korrelation zwischen angelegter Spannung und Stromamplitude, sie werden deshalb auch als "passive Zellen" bezeichnet. (A3) Man erkennt deutlich, dass die GluR-Zelle im Vergleich zu der benachbarten GluT-Zelle nur schwach EGFP exprimiert. Die Skalierung für die morphologischen Visualisierungen beträgt 10 μm . Die Skalierung für die Ganzzelleableitungen A2 und B2 beträgt 1 nA und 10 ms.

3.1.1 Präparation

Für die Präparation von akuten Gehirnschnitten wurden die Mäuse mit Isofluran oder einem Gasmisch aus gleichen Anteilen von CO_2 und O_2 betäubt und enthauptet. Das Gehirn wurde entfernt und auf eine Präparationsscheibe geklebt. Mit einem VT100S Vibratom (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 200 μm dicke Schnitte senkrecht zur hippocampalen Hauptachse geschnitten. Verwendet wurde dafür eisgekühlte Präparationslösung (siehe Punkt 3.1). Die Schnitte wurden anschließend in der gleichen Lösung 15-20 min bei 35°C gelagert und für 15 min bei 25°C temperiert. Im Anschluss wurden sie bis zur Verwendung in artifizierlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) bei Raumtemperatur gelagert. Sollten Zellen akut aus Schnitten isoliert werden, wurde die Schnittdicke auf 300 μm erhöht. Das Gewebe wurde in begaster ACSF-Lösung mit Papain (24 Einheiten/ml) und Cystein (0,24 mg/ml) für 20 min bei Raumtemperatur behandelt. Im Anschluss wurde die CA1-Region des Hippocampus ausgeschnitten und die Zellen mit Pasteurpipetten und Wolfram Nadeln isoliert.

3.2 Humane Gewebeproben

Humane hippocampale Gewebeproben wurden Patienten entnommen, die auf Grund einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie chirurgisch behandelt wurden ($n = 4$). Alle Patienten litten an einfachen und komplex-partiellen Anfällen, deren Häufigkeit von 4-5 pro Woche bis zu 2-3 pro Tag reichte. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 29 ± 5 Jahren zum Zeitpunkt der Operation. Bei 3 von 4 Patienten (2 männliche, 1 weiblicher) wurde mittels MRI und histopathologischer Gewebeuntersuchung eine Ammonshornsklerose (AHS) diagnostiziert. Charakteristisch hierfür ist unter anderem der starke neuronale Zellverlust, insbesondere in der CA1-Region des Hippocampus und eine Dispersion der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Blumcke et al., 2002). Alle Patienten hatten sekundäre, generalisierte grand mal Anfälle. Bei der vierten Patientin (24 Jahre) wurde eine grau-weiß-Differenzierungsstörung des anterioren Teils des rechten Temporallappens, ohne morphologische Veränderungen des Hippocampus diagnostiziert. Diese Patientin litt nicht unter generalisierten Anfällen.

Bei allen Patienten war der Hippocampus an der Generierung von Anfällen beteiligt. Dies wurde durch nichtinvasive und invasive Diagnostikverfahren nachgewiesen (Behrens et al., 1994; Elger und Schramm, 1993). Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit Wissen und Einwilligung der Patienten durchgeführt. Alle Vorgehensweisen wurden vom Ethikkomitee des Medizinischen Zentrums der Universität Bonn genehmigt und sind konform mit dem Standard der Deklaration von Helsinki (1989).

3.2.1 Präparation des humanen Gewebes

Dank einer speziell entwickelten Resektions-Technik wurden *en block*-Präparate des Hippocampus entnommen, deren Volumen sowohl eine anschließende histopathologische wie auch eine elektrophysiologische Untersuchung ermöglichten (Dietrich et al., 1999). Sofort nach der Resektion wurde das Gewebe in 4-6 °C kalter Präparationslösung mit einer Rasierklinge senkrecht zu der septotemporalen Achse in 3-4 mm dicke Blöcke geschnitten, von denen mit einem Vibratom (FTB, Plano, Marburg, Deutschland) 150 μ m Schnitte geschnitten wurden. Die Schnitte wurden in artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF), die mit Carbogen (5 % CO₂ / 95% O₂) begast wurde, bei Raumtemperatur aufbewahrt (Jabs et al., 2007).

3.3 Lösungen

3.3.1 Präparations- und Lagerlösungen

Präparationslösung

| | | |
|----------------------------------|------|----|
| NaCl | 87 | mM |
| KCl | 2.5 | mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 1.25 | mM |
| MgCl ₂ | 7 | mM |
| CaCl ₂ | 0.5 | mM |
| NaHCO ₃ | 25 | mM |
| Glukose | 25 | mM |
| Sucrose | 75 | mM |

pH 7,0 bei 5 °C und 7,6 bei 35 °C mit Carbogen

Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) für Raumtemperatur

| | | |
|----------------------------------|------|----|
| NaCl | 126 | mM |
| KCl | 3 | mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 1.25 | mM |
| MgSO ₄ | 2 | mM |
| CaCl ₂ | 2 | mM |
| NaHCO ₃ | 26 | mM |
| Glukose | 10 | mM |

pH 7,38 mit Carbogen

3.3.2 Badlösungen für elektrophysiologische Untersuchungen

Standard Badlösung

| | | |
|-------------------|-----|----|
| NaCl | 150 | mM |
| KCl | 5 | mM |
| MgCl ₂ | 2 | mM |
| CaCl ₂ | 2 | mM |
| Glukose | 10 | mM |
| HEPES | 10 | mM |

mit NaOH auf pH 7,38 eingestellt

Standard Blockierungslösung

| | | |
|-------------------|-----|----|
| NaCl | 135 | mM |
| KCl | 5 | mM |
| MgCl ₂ | 2 | mM |
| CaCl ₂ | 2 | mM |
| Glukose | 10 | mM |
| BaCl ₂ | 10 | mM |
| 4-Aminopyridin | 4 | mM |
| CdCl ₂ | 30 | μM |
| TTX | 1 | μM |
| HEPES | 10 | mM |

mit NaOH auf pH 7,38 eingestellt

Blockierungslösung für P₂X₇ Rezeptoren

| | | |
|-------------------|-----|----|
| NaCl | 153 | mM |
| KCl | 5 | mM |
| Glukose | 10 | mM |
| TEA | 5 | mM |
| Kynurensäure | 1 | mM |
| BaCl ₂ | 2 | mM |
| 4-Aminopyridin | 4 | mM |
| CdCl ₂ | 30 | μM |
| TTX | 1 | μM |
| DPCPX | 1 | μM |
| HEPES | 10 | mM |

mit NaOH auf pH 7,38 eingestellt

3.3.3 Pipettenlösungen

Pipettenlösung 1

| | | |
|-------------------|-----|----|
| KCl | 130 | mM |
| MgCl ₂ | 2 | mM |
| CaCl ₂ | 0,5 | mM |
| BAPTA | 5 | mM |

Material und Methoden

| | | |
|---------------------------------|----|----|
| HEPES | 10 | mM |
| Na ₂ -ATP | 3 | mM |
| mit KOH auf pH 7,28 eingestellt | | |

Pipettenlösung 2 (K-Glukonat)

| | | |
|---------------------------------|-----|----|
| K-Glukonat | 125 | mM |
| MgCl ₂ | 2 | mM |
| EGTA | 0,5 | mM |
| HEPES | 10 | mM |
| KCl | 20 | mM |
| NaCl | 3 | mM |
| Na ₂ -ATP | 2 | mM |
| mit KOH auf pH 7,28 eingestellt | | |

Pipettenlösung 3 (CsCl)

| | | |
|----------------------------------|-----|----|
| CsCl | 135 | mM |
| MgCl ₂ | 2 | mM |
| CaCl ₂ | 0,5 | mM |
| BABTA | 5 | mM |
| HEPES | 10 | mM |
| mit CsOH auf 7,28 pH eingestellt | | |

Pipettenlösung 4 (Cs-Glukonat)

| | | | |
|-----------------------|-----|----|---|
| Cs-Glukonat | 135 | mM | * |
| CsCl ₂ * | 20 | mM | |
| HEPES* | 10 | mM | |
| Na ₂ -ATP* | 2 | mM | |
| EGTA | 0,5 | mM | |
| MgCl ₂ | 2 | mM | |
| NaCl | 3 | mM | |

* CsOH, CsCl, Na₂-ATP und HEPES werden zusammen angesetzt und mit Glukonatlösung auf pH = 7,25 eingestellt. Der pH Wert muss nach 2, 4 und 6 Stunden überprüft und nachgestellt werden. Wegen des ATPs muss der Ansatz zwischen den Messungen bei 4°C gelagert werden. Die restlichen Reagenzien werden erst bei stabilen pH Werten hinzu gegeben.

Die verwendeten Chemikalien wurden - sofern nicht anders angegeben - von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Substanzen (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)-ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinsäure (CGP 55845), 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX), 1-(4,4-Diphenyl-3-butenyl)-3-Piperidincarboxyl-säure (SKF 89976A), 1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-(S)-3-Piperidincarboxylsäure (SNAP 5114), (2S)-2-Amino-2-[(1S,2S)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl)-Pro-pinsäure (LY 341495) wurden bei Biozol (Eching, Deutschland) erworben und die Substanzen 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), Tetrodotoxin (TTX) bei Ascent Scientific Ltd (Bristol, UK). DMNPE-ATP wurde bei Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bestellt.

3.4 Der Aufbau des Messplatzes

3.4.1 Das Mikroskop

Für die Auswahl der Zellen und die optische Kontrolle des Patchvorgangs wurde ein Nikon Eclipse E660FN Mikroskop benutzt. Dieses Mikroskop vereinigt zwei optische Verfahren, neben der normalen Hellfeldmikroskopie kann auch Fluoreszenzmikroskopie angewandt werden. Bei der Hellfeldmikroskopie wird die IR-DIC Methode verwendet. DIC ist das Akronym für *differential interference contrast* und ermöglicht eine bessere räumliche Darstellung von Zellen und Patchpipette. Der Infrarotanteil des Lichts wird von einer Infrarotkamera detektiert und das Bild auf einem Monitor dargestellt. In den Strahlengang wurde vor dem Kondensator zusätzlich ein Polarisator und ein Nomarskiprisma eingebaut und hinter dem Objektiv ein weiteres Nomarskiprisma. Am Ende des Strahlengangs, vor der Infrarotkamera, ist der Analysator angebracht. Das EGF- Protein in den Zellen wurde mit episkopischer (Auflicht-) Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Ein Exzitationsfilter selektiert den für die Anregung des EGFPs relevanten Anteil der Wellenlängen, der dichroitische Spiegel reflektiert diesen auf das Präparat. Das vom Präparat emittierte Licht passiert den Spiegel und den nachfolgenden Sperr-Filter und wird zur Kamera oder dem Tubus geleitet.

3.4.2 Die Messkammer

Die Schnitte wurden in einer Eintauchkammer unter einem U-förmigen mit Nylonfäden bespannten Platindraht fixiert. Es fand eine permanente Perfusion mit Sauerstoff begaster, HEPES gepufferter Lösung statt. Mit einem Infusionsschlauch wurde stetig begaste Lösung zugegeben, mit einem Absaugschlauch und angeschlossener Vakuumpumpe wurde der Flüssigkeitspegel in der Kammer konstant gehalten.

3.4.3 Die elektronischen Komponenten

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden mit EPC7- oder EPC8-Verstärkern durchgeführt (HEKA, Lambrecht, Deutschland). Diese bestehen aus einem Vorverstärker, an dem eine Elektrode montiert ist, die den elektrischen Kontakt zur Pipettenlösung herstellt (Messelektrode). Eine weitere Elektrode ist in der Messkammer befestigt und tritt bei Perfusion mit der Badlösung in elektrischen Kontakt (Referenzelektrode). Die gemessenen Ströme wurden dann im Hauptverstärker amplifiziert und über einen AD/DA-Wandler (ITC-16, HEKA Lambrecht, Deutschland) digitalisiert und an einen Rechner zur Speicherung übermittelt. Für Messungen in der Stromklemme wurde das Signal des EPC 7/8 Verstärkers mit einem DPA-2FS Verstärker (NPI-Electronics, Tamm, Deutschland) nachverstärkt und an das ITC-16 übermittelt.

3.4.4 Schwingungsdämpfung und elektrische Abschirmung

Schon kleinste Erschütterungen können sich negativ auf elektrophysiologische Messungen auswirken, daher befinden sich die sensitiven Teile des Setups auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt Deutschland). Das Mikroskop, die Messkammer sowie die Aufhängung für den Vorverstärker wurden auf eine massive Marmorplatte montiert, die auf Luftkissen gelagert wird. Zur Abschirmung vor elektrischen Feldern stand das Setup mit Mikroskop, Messkammer und Vorverstärker in einem Faradaykäfig.

3.4.5 Akquirierung der Daten

Für die Akquirierung der Daten wurde das Programm TIDA (HEKA Lambrecht, Deutschland) verwendet. Die Parameter für die Akquirierung werden in sogenannten Stimulationsdateien (*stimulation files*) gespeichert. Der wichtigste Parameter ist neben Dauer und Abtastrate der Aufnahme die Spannung an den ausgehenden Ports des ITCs / AD-Wandlers. Diese Spannung wird zu der angelegten Haltespannung des Verstärkers addiert. Über diesen Weg kann man die Zelle kontrolliert stimulieren, z.B. für die Aktivierung von spannungsaktivierbaren Kanälen (Abb. 3.1 A2). Die Signale werden vom EPC-Verstärker bei 10 kHz oder 3 kHz gefiltert und entsprechend mit 40 oder 6 kHz digitalisiert.

3.4.6 Applikationsmethoden

Bei akut isolierten Zellen wurden die Substanzen mittels Konzentrationsklemme appliziert. Die Zellen wurden in eine Glasröhre transferiert und in eine neue Kammer mit den entsprechenden Substanzen überführt. Mittels Unterdruck wurde die Lösung aus der Kammer im ms Bereich in die Glasröhre gezogen (Seifert und Steinhäuser, 1995). In akuten Schnitten wurden Agonisten und Inhibitoren den Perfusionslösungen zugegeben und somit langsam in den Schnitt eingewaschen. Für die Perfusion wurde die Flussgeschwindigkeit zwischen 3 und 5 ml/min eingestellt, für die Applikation der verschiedenen Lösungen wurde der Infusionsschlauch in die entsprechenden Gefäße umgesetzt. Fokale Applikationen wurden mit DAD12 oder OctaflowTM (ALA Scientific Westbury, New York, USA) durchgeführt. Beide Systeme arbeiten mit Gasdruck und unterscheiden sich nur in der Software. Die Systeme bestehen aus 12 Spritzen für die Druckapplikation mit jeweils einem Ventil und einem zusätzlichen Ventil, das die gravitationsgetriebene Perfusion steuert. Die Spritzen sind alle über denselben Druckschlauch an die Kontrolleinheit angeschlossen, die den angelegten Druck vorgibt. Als Gas wurde Sauerstoff verwendet. Aus den Ventilen führen dünne Applikationsschläuche, die sich in der Applikationspipette vereinen. Die Kontrolleinheit wird über einen PC mit der Octaflow-Software konfiguriert. Bei Inbetriebnahme des Octaflowsystems wurde die Geschwindigkeit der Applikation bestimmt. Hierfür wurde eine Patchpipette in die Applikationspipette eingeführt und Lösungen unterschiedlicher Osmolarität verglichen (HEPES-Lösung und hypoosmolare mit Wasser verdünnte HEPES-Lösung). Die verdünnte Lösung wurde für 2 s appliziert. Der schnelle Lösungswechsel erzeugte eine Änderung der Stromamplitude, es wurde das Zeitintervall zwischen 20 % und 80 % des Maximums der Amplitude als Maß für die Geschwindigkeit der Applikation betrachtet. Die Applikationsgeschwindigkeit ist abhängig vom angelegten Druck. Bei maximalem Druck (17 PSI laut Software) betrug der 20/80 Anstieg im Durchschnitt $5,44 \pm 1,63$ ms ($n = 7$). Bei den Applikationen an Zellen musste der Druck verringert werden, da sonst der Kontakt der Pipette zu der Zelle zerstört worden wäre. Bei reduziertem Druck (6 PSI) verlängerte sich das Zeitintervall auf ca. 50 ms ($46,58 \pm 3,09$ ms, $n = 7$).

3.5 Verwendete Messverfahren

Alle elektrophysiologischen Versuche wurden mit der *Patch-Clamp*-Technik durchgeführt. Diese wurde in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bernd Sakmann entwickelt (Neher und Sakmann, 1976).

3.5.1 Das Prinzip der Spannungsklemme

Die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran in der Ganzzelleableitung lassen sich am besten durch ein Ersatzschaltbild darstellen (Abb. 3.2). Die Zelle wird auf eine Haltespannung U_{soll} geklemmt. Der Serienwiderstand R_s ist der elektrische Widerstand, der an der geöffneten Membran unter der Pipettenmündung abfällt. Die Zellmembran selbst lässt sich als Widerstand R_m mit parallel geschaltetem Kondensator der Kapazität C_m darstellen. Bei einer sprungartigen Änderung der angelegten Spannung U_{soll} wird der Kondensator C_m umgeladen. Kurzzeitig fließt der Strom nur über R_s und C_m , R_m wird kurzgeschlossen. Ist der Kondensator aufgeladen, fließt der Strom über R_s und R_m .

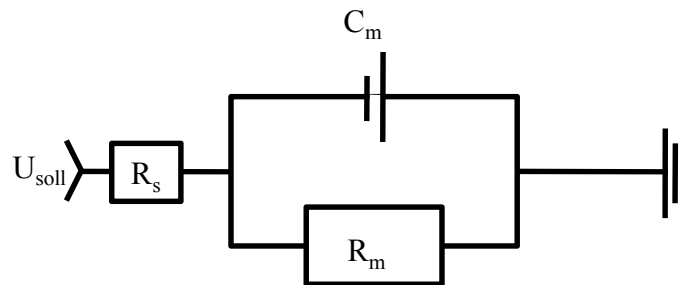


Abb. 3.2 Ersatzschaltbild einer Ganzzelleableitung. Der R_s fällt an der Membranöffnung unter der Pipettenmündung ab. Die Zellmembran wird mit ihren kapazitiven Eigenschaften als Kondensator C_m und ihrem Membranwiderstand R_m dargestellt, die parallel geschaltet sind.

Für die Bestimmung der Widerstände und der Kapazität der Zellmembran verwendeten wir depolarisierenden Spannungssprünge, U_{soll} wurde von -70 mV auf -60 mV geändert ($\Delta U = 10$ mV). Die Stromamplitude ΔI ($\Delta I = I_{-60 \text{ mV}} - I_{-70 \text{ mV}}$) hat initial ihr Maximum (Abb. 3.3, linker Pfeil), da R_s den gesamten Widerstand darstellt ($R = R_s$). Mit der Spannungsdifferenz $\Delta U = 10$ mV wurde R_s nach dem Ohmschen Gesetz (1) berechnet,

$$\Delta U = R_s * \Delta I \quad (1)$$

Mit zunehmender Aufladung des Kondensators C_m fällt ΔI ab, am Ende des Spannungssprungs nach 50 ms ist der Kondensator umgeladen, der Strom ΔI wird nun durch die Summe der Widerstände $R_s + R_m$ bestimmt (Abb. 3.2, rechter Pfeil). Da R_s bereits ermittelt wurde, kann R_m mit Gleichung (2) errechnet werden.

$$\Delta U = (R_s + R_m) * \Delta I \quad (2)$$

Für die Ermittlung von ΔI wurde eine Stromspur aus 10 konsekutiven Spannungssprüngen gemittelt. Die Kapazität der Zellmembran C_m wird durch das numerische Integral der Fläche unter der Stromspitze berechnet, ohne die Flächen unterhalb der Amplitude am Ende des Spannungssprungs (rechter Pfeil). Die Kapazität ist proportional zur Fläche der Zellmembran, man geht davon aus, dass 1 pF einem μm^2 entspricht (Numberger und Draguhn, 1996).

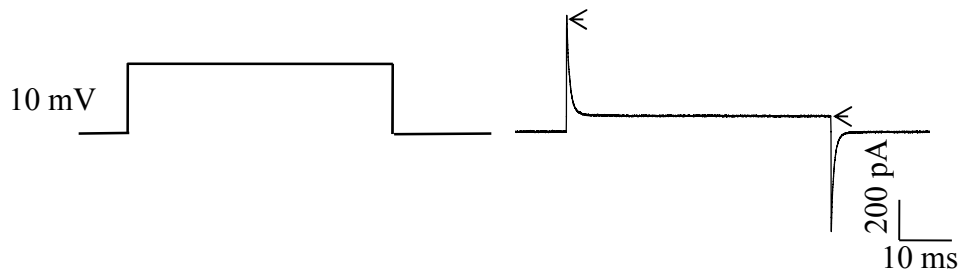


Abb. 3.3 Ermittlung der passiven elektrischen Eigenschaften einer abgeleiteten Zelle. Zur Ermittlung des R_s wurde die Zelle für 50 ms um 10 mV von -70 mV auf -60 mV depolarisiert. Durch die Depolarisation wird die Zellmembran umgeladen und stellt kurzzeitig keinen Widerstand dar. Die Stromspitze (linker Pfeil) stellt den Strom dar, der ausschließlich über R_s fließt. Nach spätestens 50 ms ist die Zellmembran umgeladen, und der Strom wird durch R_s und R_m bestimmt (Pfeil rechts). Die dargestellte Stromspur wurde aus 10 konsekutiven Sprüngen gemittelt.

3.5.2 Ganzzelleleitung

Die Pipetten wurden mit einem horizontal-Ziehgerät (Flaming/Brown Micropipette Puller P 87, Sutter Instruments, USA) gezogen, als Glas wurde Borosilikatglas verwendet (Science Products GmbH, Hofheim; Hilgenberg, Masfeld). Als Messelektrode diente ein mit Teflon beschichteter Silberdraht, der an der unbeschichteten Spitze chloriert wurde. Als Referenzelektrode wurde eine Pelletelektrode verwendet. Die Patchpipette wurde mit einem hydraulischen Mikromanipulator (Narishige Tokyo, Japan) an die Zellen herangeführt. Beim Eintauchen der Pipette schließt sich der Stromkreis aus Messelektrode, Pipettenlösung, Badlösung, Referenzelektrode und Verstärker. Potentiale zwischen den Lösungen bzw. den beiden Elektroden sollten nicht berücksichtigt werden, daher wurden diese an dem Verstärker auf den Wert 0 gesetzt. Der benötigte Überdruck wurde über ein mit Wasser gefülltes U-Rohr auf die Pipette übertragen. Dieser Überdruck sorgt für einen Ausstrom von Pipettenlösung aus der Pipette und verhindert das Eindringen von Badlösung sowie Verstopfungen durch Gewebefragmente. Die Pipette wurde so nahe herangeführt, bis eine halbkreisförmige helle Struktur auf der Zelloberfläche zu erkennen war. Diese Struktur zeigt die durch den Druck der Pipettenlösung eingedellte Zelloberfläche. Für die Etablierung des Gigaseals wurde der Überdruck weggenommen und Unterdruck durch Saugen erzeugt. Somit wurde die

Zellmembran dicht mit der Pipettenöffnung verbunden. Dies führt zu einem hohen Widerstand im unteren Gigaohmbereich, dem sogenannten Gigaseal. Nach Erreichen des Gigaseals wurde die Zelle durch vorsichtiges Saugen geöffnet. Nun besteht der Stromkreis aus Messelektrode, Pipettenlösung, Zelle, Badlösung, Referenzelektrode und Verstärker. Diese Konfiguration wird als Ganzzelleableitung bezeichnet.

Die EPC7- und EPC8-Verstärker besitzen zwei verschiedene Operationsmodi, die Spannungsklemme (engl. *voltage-clamp*) und die Stromklemme (engl. *current-clamp*). In der Spannungsklemme wird das Membranpotential der Zelle mit dem vorgegebenen Potential des Verstärkers verglichen. Bei einer Differenz wird über die Messelektrode Strom in die Zellen injiziert. Dieser Strom wird als Reaktion der Zelle dargestellt (Abb. 3.1, A2, B2). Wird die Stromklemme verwendet, so wird die Spannung angegeben, bei der kein Strom in die Zelle injiziert wird. Dieser Modus ist für die Analyse physiologischer Erregungsmuster geeignet, da die Zelle nicht durch die Strominjektionen des Verstärkers beeinflusst wird.

3.5.3 Die Perforated-Patch-Konfiguration

Bei der Ganzzelleableitung kommt es zu einem ungehinderten Ionenaustausch zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem. Dieser Umstand lässt keine Aussagen über die native intrazelluläre Ionenzusammensetzung zu. Mit der Perforated-Patch-Konfiguration wird dieses Problem umgangen, indem Ionen-selektive, porenbildende Substanzen in die Pipettenlösung gegeben werden. Die Pipette wird auf die Membran aufgesetzt, es wird durch Unterdruck ein Gigaseal erzeugt, die Zelle wird jedoch nicht durch weiteren Unterdruck geöffnet (Cell-attached-Konfiguration).

Antibiotika wie Gramicidin-A bilden Ionen-selektive Poren in der Zellmembran und ermöglichen somit einen elektrischen Zugriff auf die Zelle, ohne dass es zu einem kompletten Ionenaustausch zwischen Zytoplasma und Pipettenlösung kommt. Gramicidin-A bildet nur Kationen-permeable Ionenporen, deshalb wird die intrinsische, intrazelluläre Cl^- -Ionenkonzentration nicht verändert (Kyrozis und Reichling, 1995). Gramicidin-A ist daher ideal geeignet um die native Cl^- -Konzentration in Zellen zu bestimmen. In den Experimenten wurde Gramicidin in den Konzentrationen 20 - 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verwendet. Die Pipetten wurden in der Spitze mit der Pipettenlösung 2 ohne Gramicidin gefüllt und mit gramicidinhaltiger Pipettenlösung von hinten aufgefüllt. Alle Lösungen wurden ohne ATP angesetzt.

3.5.4 Beobachtung des Serienwiderstands beim Perforated Patch

Bei Messungen in der Perforated-Patch-Konfiguration wurde der R_S fortlaufend beobachtet, es wurden alle 3 Sekunden 10 mV Sprünge (wie zuvor bei der R_S Bestimmung) durchgeführt. Die Daten wurden in das Programm Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) mit einem Makro von Stefan Hinterkeuser importiert und die Rechenoperationen mit Makros von Dr. Ronald Jabs durchgeführt.

Der Einbau von Gramicidin-A Poren in die Zellmembran findet langsam statt und wird an steigender elektrischer Leitfähigkeit sichtbar. Für die Bestimmung des elektrochemischen Gleichgewichtspotentials ist ein konstanter R_S erforderlich. Die Abnahme des R_S wird nach dem Kontakt der Patchpipette mit der Zellmembran beobachtet (Abb. 3.4). Bei Werten unter 100 M Ω wurde mit der Applikation von Antagonisten und Agonisten begonnen.

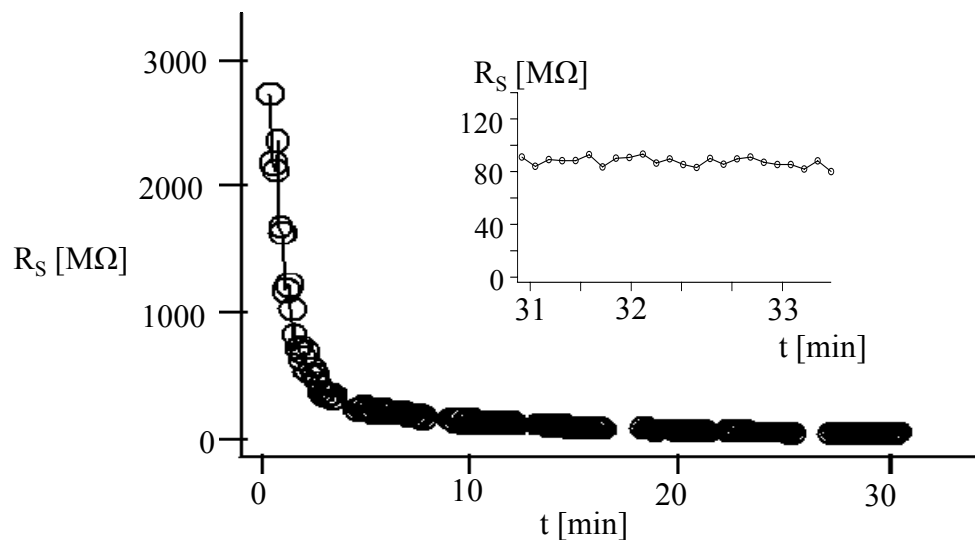


Abb. 3.4 Zeitliche Abnahme des Serienwiderstands in der Perforated-Patch Konfiguration. GluR-Zellen *in situ* wurden mit Patchpipetten, die mit Pipettenlösung 2 ohne ATP gefüllt wurden, in der cell-attached-Konfiguration gehalten. In die Pipettenlösung wurden 40 - 80 mg/ml Gramicidin A gegeben. Die Abnahme des Serienwiderstands durch Einbau von Gramicidin-A-Kationenselektiven Poren in die Zellmembran unter der Pipettenöffnung wurde aufgezeichnet. Bei konstantem R_S - nach ca. 30 min (siehe Inset) - wurde mit den Untersuchungen begonnen.

3.6 Einzelzell RT-PCR und semiquantitative PCR

Die Analyse der Transkripte für GABA_A-Rezeptoruntereinheiten in einzelnen GluR-Zellen sollte Hinweise liefern, welche GABA_A-Rezeptoruntereinheiten in den GluR-Zellen exprimiert werden. Es wurden GluR-Zellen nach ihrer elektrophysiologischen Charakterisierung mittels Einzelzell RT-PCR untersucht. Das Zytoplasma der jeweiligen Zelle wurde nach der elektrophysiologischen Ableitung vorsichtig in die Patchpipette

eingesaugt und der Inhalt der Pipette in ein Gefäß mit 3 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser überführt. Das Gefäß mit dem Zytoplasma der Zelle wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C im Gefrierschrank bis zur RT-Reaktion aufbewahrt. In das Gefäß mit dem Zellzytoplasma und dem DEPC-Wasser wurden 3,5 µl eines Reaktionsgemisches aus RT Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), Desoxyribonukleotid-Triphosphat (dNTP) (finale Konzentration 4 x 250 µM; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), Hexanukleotid Primer (50 µM; Roche, Mannheim, Deutschland), 20 U RNase Inhibitor (RNasin) (Promega, Madison, WI, USA) und 0,5 µl Sensiscript Reverse Transkriptase (Qiagen) hinzugegeben, so dass man ein Gesamtvolumen von 10 µl erhielt. Die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) der RNA wurde bei 37 °C 1 h durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde amplifiziert und diente als Vorlage für die nachfolgende PCR mit eingerückten Primern (2-Runden PCR).

Für die erste PCR wurden dem gesamten RT Produkt PCR Puffer, MgCl₂ (2.5 mM) und die entsprechenden Primer (jeweils 200 nM) beigelegt, so dass man ein Endvolumen von 50 µl erhielt. Nach der Denaturierung (94 °C, 4 min) wurden 3.5 U Taq Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei 85 °C zugegeben.

Die Primerpaare, die für die erste PCR Runde verwendet wurden, amplifizierten alle GABA_A-Rezeptoruntereinheiten jeweils einer Familie (α, β oder γ). Die Sequenzen, Positionen innerhalb der RNA-Sequenz und die Längen der jeweiligen PCR-Produkte sind in Tabelle 1 angegeben. Im PCR-Cycler (PTC-200, Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) wurden 45 Zyklen durchlaufen. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C für 25 s. Bei den ersten 5 Zyklen erfolgte die Primeranbindung bei 51 °C für 2 min, für die folgenden Zyklen wurde die Zeit auf 45 s reduziert. Die Primerverlängerung wurde bei 72 °C für 25 s durchgeführt. Am Ende aller Zyklen wurde die Temperatur für 7 min bei 72 °C gehalten, um alle angefangenen Kettenverlängerungen abzuschließen.

Anschließend wurde mit jeweils 2 µl Produkt der ersten PCR eine zweite PCR-Runde mit genspezifischen, eingerückten 'nested'-Primern (Tabelle 1) durchgeführt, bei der jeweils nur das Produkt eines Gens pro Reaktionsgefäß amplifiziert wurde. Hierfür wurden jeweils 48 µl eines Reaktionsgemisches verwendet, das PCR-Puffer, 2,5 mM MgCl₂, 4x50 µM dNTP's, das sense und antisense Primerpaar (jeweils 200 nM), und 0,5 µl Platinum® Taq-Polymerase (Invitrogen) enthielt. Die Platinum® Taq-Polymerase ist eine Hotstart-Polymerase, die im Thermocycler im initialen Denaturierungsschritt aktiviert wird. In der zweiten PCR-Runde wurden 35 Zyklen durchlaufen. Die Primeranbindung erfolgte bei 54 °C. Die übrigen

Bedingungen entsprachen denen der ersten PCR.

Jeweils 10 µl der entstandenen PCR-Produkte wurden, mit 2 µl Ladebuffer versetzt, auf ein mit Ethidiumbromid (0,013%) versetztes 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen, bei der die Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Als Längenstandard wurde der Marker Φ X-174/Hinc II digest auf das Gel aufgetragen.

Das PCR-Produkt für die $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten wurde nochmals amplifiziert, das erhaltene PCR-Produkt aufgereinigt (MinElute PCR Purification Kit, Qiagen) und eine Restriktionsanalyse zur Unterscheidung der Expression von β_2 und/oder β_3 in individuellen Zellen durchgeführt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in 25 µl Wasser gelöst. Mit den Untereinheiten-spezifischen Endonucleasen *Pst*I (schneidet β_2 (307 bp) in ein 202 bp und ein 105 bp Fragment) und *Ban*I (schneidet β_3 (307 bp) in ein 169 bp und ein 138 bp Fragment) wurde die Expression der entsprechenden Untereinheiten in einer Zelle identifiziert. Die Endonucleasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Sieben µl des jeweiligen gereinigten PCR-Produkts wurden mit 10 U des Restriktionsenzym inkubiert (Endvolumen 15 µl; 6 h bei 37 °C). Die cDNA Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese mit einer Auflösung bis zu 10 bp aufgetrennt (2 % Agarose 1000, 50 bp Längenmarker, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Fragmente wurden mit Ethidiumbromid markiert und mit einem System zur digitalen Darstellung (*AlphaImager*, San Leandro, CA, USA) ausgewertet.

Als Positiv-Kontrolle für die RT-PCR wurde mittels Trizol (Invitrogen) Gesamt-RNA aus dem Maushirn isoliert und mit 2 ng der gesamt-RNA und den für die Einzelzell-PCR verwendeten Primern eine zwei Runden RT-PCR durchgeführt. Es wurden keine unspezifischen Produkte erhalten. PCR Produkte aus der gesamt-RNA wurden mit den beschriebenen Restriktionsenzymen verdaut. Die erhaltenen Fragmente entsprachen den erwarteten Längen. Die verwendeten Primerpaare waren stets auf verschiedenen Exonen lokalisiert, um eine Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Das Weglassen der reversen Transkriptase bzw. die Verwendung von Badlösung dienten als Negativkontrolle. Die Transkripanalyse wurde gemeinsam mit PD Dr. Gerald Seifert durchgeführt.

Primersequenzen für Einzelzell RT-PCR

| Gen | Primersequenz | Produktlänge | Position | Genbank-Nummer |
|------------------------|--|--------------|---|----------------|
| Alpha | se 5'-TGGACTCCTGATACNTTYTT as 5'-GCHATRAACCARTCCATGGC | 590 bp, | 361, 364, 439, 382, 385 931, 934, 1009, 952, 955 | |
| α_1 (nested) | se 5'- CCAGCCCGTTCAGTGGTTGTA as 5'-GCACGGCAGATATGTTTGAAT | 180 bp | 601, 760 | NM_010250 |
| α_2 (nested) | se 5'- TTACAATGCTTCTGACTCCGTTCA as 5'- CGRGC ACTGATRCRWARGGT | 306 bp | 597 883 | NM_008066 |
| α_3 (nested) | se 5'-CTTGGGAAGAACAAATCTGTGGA as 5'- CGRGC ACTGATRCRWARGGT | 305 bp | 673 958 | NM_008067 |
| α_4 (nested) | se 5'- ACCAAAGGCCCTGAGAAGTCA as 5'- CGRGC ACTGATRCRWARGGT | 308 bp | 613 901 | NM_010251 |
| α_5 (nested) | se 5'-GCTGGAGGATGATGGCACACTTCT as 5'- GTTGAGCCTGGAGCCATCTTCTG | 208 bp | 462 647 | NM_176942 |
| Beta | se 5'- CTGGATGARCAAAACTGYAC | 443 bp | 508, 505, 508 | |

| | | | | |
|---------------------------|--|--------|--------------------------------|-------------------------|
| | as 5'-ACAAAGACAAARCAWCCCAT | | 931, 928, 931 | |
| β_1 (nested) | se 5'-ATGGAGGAGAGGGAGCAGTAACT as 5'-CAGCCCATGAGATAGATGTCAATC | 358 bp | 581 915 | NM_008069 |
| $\beta_{2/3}$ (nested) | se 5'-GGCGYGGCGRTGACAAKGC as 5'-TCCCGRAGGTGRGTGTTGAT | 307 bp | 575, 578 862, 865 | NM_008070, NM_008071 |
| Gamma | se 5'-TAGACAGCAAAYATGGTGGG as 5'-TTGATCCAAAADGACACCCAGG | 481 bp | 404, 407, 353 863, 866, 812 | |
| γ_1 (nested) | se 5'-CGCCTGCTGCGGATTTG as 5'-CACAGAGGGCTTTTTCCACTTGT | 180 bp | 496 653 | NM_010252 |
| γ_2 (nested) | se 5'-AAAAMRGCTGAGGCTCACTGGAT as 5'-AACTGCGCTTCCATTGATAAACA | 211 bp | 463 651 | NM_177408 |
| γ_3 (nested) | se 5'-AAAAMRGCTGAGGCTCACTGGAT as 5'-CTGAGGCCCATGAAGTCAAACCTGA | 272 bp | 409 657 | NM_008074 |

Tabelle 1: Oligonukleotidprimer für die Einzelzell-RT-PCR. Das erste Nukleotid des Translationsstartcodons jedes Gens wurde als Position 1 festgelegt. Die Länge der amplifizierten PCR-Produkte unter Einsatz der Primer wurden als Basenpaare (bp) angegeben. 'Se' und 'as' bezeichnen jeweils die sense- und antisense-Primer. Die Primerpaare für Alpha, Beta und Gamma amplifizieren jeweils alle GABA_A-Rezeptoruntereinheiten der jeweiligen Genfamilie. Für die Untereinheiten α_2 , α_3 , und α_4 wurde ein gemeinsamer antisense-Primer benutzt, ebenso war der sense-Primer für γ_2 und γ_3 gleich.

3.7 Statistische Verfahren

Der Student T-Test

Zur Feststellung von signifikanten Unterschieden wurde der Student-Test (T-Test) angewandt. Bei unseren Auswertungen wurden immer gepaarte Werte verglichen, d.h. eine Zelle bei verschiedenen Kombinationen von Substanzen. Der T-Wert wurde dann aus Gleichung (3) berechnet.

$$\text{T-Wert} = \sqrt{n} * \frac{\bar{d}}{s_d} \quad (3)$$

Die Anzahl der Versuche wird mit n angegeben, \bar{d} ist der Mittelwert aus den Differenzen der Wertepaare, z.B. Stromamplitude ohne und Stromamplitude mit Testsubstanz. Die Variable s_d ist die Standardabweichung des Mittelwerts, ausgehend von der Stichprobe. Die Signifikanzschränken wurden aus "Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler" entnommen (Lozan und Kausch, 2004).

Test auf Normalverteilung

Zur Klärung der Frage ob eine Gruppe gleichverteilt ist, wurde der Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest verwendet und die Werte gegen eine angenommene Normalverteilung getestet. Im Einzelnen wurden die Werte in aufsteigender Reihenfolge geordnet, jeweils die Z-Transformation durchgeführt und aus dem Ergebnis die Fläche der Standardnormalverteilung berechnet. Diese wird mit einer angenommenen Gleichverteilung verglichen. Die maximale Differenz wird mit den entsprechenden Grenzwerten in der Tabelle (aus Lozan und Kausch, 2004) verglichen. Liegt die Differenz unter diesem Grenzwert so kann man von einer Gleichverteilung der Werte ausgehen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von GABA_A Rezeptoren in GluR-Zellen

4.1.1 Pharmakologische Eigenschaften

Um schnelle GABA_A-Rezeptorantworten in GluR-Zellen auszulösen, wurden diese aus akuten Gehirnschnitten des Hippocampus (CA1-Region) nach enzymatischer Behandlung mechanisch isoliert. Durch Konzentrationsklemmtechnik war es möglich, einen Lösungsaustausch im ms Bereich zu erreichen (Seifert und Steinhäuser, 1995). Diese Technik erlaubt an akut isolierten Zellen eine schnelle und simultane Aktivierung von Rezeptoren auf der gesamten Zelloberfläche kleiner Zellen, wie sie GluR-Zellen darstellen. Die Applikation von GABA an akut isolierten GluR Zellen verursachte auswärts gerichtete Chlorid-Ströme bei einem Haltepotential von -70 mV und einer intrazellulären Cl⁻-Konzentration von 134 mM (Abb. 4.1 A1). Unter diesen Bedingungen löste GABA (100 μM) einen Rezeptorstrom mit einer Amplitude von -413 ± 259 pA aus (n = 70). Das Verhältnis der Stromamplituden zur jeweiligen Zelloberfläche ergab eine durchschnittliche Stromdichte von 132 ± 112 pA/pF. Die schnelle Applikation von GABA (100 μM) führte zu langsam desensitisierenden Rezeptorantworten. In 41 Zellen lag ein monoexponentieller Abfall vor, mit der Zeitkonstante $\tau = 1,25 \pm 0,65$ s. Bei 22 Zellen wurde ein biexponentieller Abfall der Rezeptorströme beobachtet, die schnelle Zeitkonstante τ_{fast} betrug 218 ± 207 ms (Amplitudenfaktor $22 \% \pm 16$), mit der zugehörigen langsamen Zeitkonstante $\tau_{\text{slow}} = 2,48 \pm 1,95$ s. Die Applikation von 1 mM GABA erzeugte Rezeptorantworten mit ähnlich langsamer Desensitisierung, die Amplitude betrug -631 ± 489 pA, die entsprechende Stromdichte 297 ± 276 pA/pF (n = 10). Die Zeitkonstante der monoexponentiellen Desensitisierung der Rezeptorströme betrug $\tau = 0,58 \pm 0,27$ s (n = 3). In fünf Zellen wurde ein biexponentieller Abfall beobachtet ($\tau_{\text{fast}} = 92,5 \pm 65,3$ ms, Amplitudenfaktor 20%, $t_{\text{slow}} = 1,93 \pm 1,45$ s).

Nach Präinkubation der GluR-Zellen in dem kompetitiven GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (20 μM) wurden die von GABA (100 μM) verursachten Rezeptorströme auf $3,5 \pm 2,4$ % (n = 12) blockiert (Abb. 4.1 A1). Der GABA_A-Rezeptoragonist Muscimol (100 μM) löste ähnliche Rezeptorantworten wie GABA aus (Abb. 4.1 A2). Die mittlere Amplitude der Ströme betrug -523 ± 213 pA (n = 5) und die entsprechende Stromdichte 163 ± 122 pA/pF. Die Desensitisierung der Rezeptoren konnte durch eine monoexponentielle Funktion mit der Zeitkonstante $\tau = 1,55 \pm 1,24$ s beschrieben werden. Durch Muscimol induzierte Ströme waren ebenfalls sensitiv gegenüber Bicucullin (20 μM), ihre Amplituden wurden auf $10,0 \pm$

0,8 % der Muscimol-Kontrollantworten reduziert ($n = 3$) (Abb. 4.1 A2).

Diese pharmakologischen Eigenschaften, die Auslösung desensitisierte Ströme durch GABA und Muscimol und die vollständige Blockierung der Ströme durch Bicucullin, belegen die Expression von funktionellen GABA_A-Rezeptoren in GluR Zellen.

In Gliazellen des Rückenmarks (Medula spinalis) wurden auch Rezeptoren für Glycin – den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Rückenmark und im peripheren Nervensystem - nachgewiesen (Kirchhoff et al., 1996). Einige dieser Zellen wiesen ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften wie GluR-Zellen auf, das heißt einwärts-gerichtete K⁺-Ströme, transiente und verzögert gerichtete spannungsaktivierte K⁺-Ströme. Wir testeten deshalb GluR-Zellen, die aus der CA1 Region des Hippocampus isoliert wurden auf die Expression funktioneller Glycinrezeptoren. Schnelle Applikation von Glycin in Konzentrationen von 100 μ M ($n = 3$) und 500 μ M ($n = 6$) verursachte in keiner Zelle ein Stromantwort (Abb. 4.1 B2).

Ein anderer Agonist an GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ist Taurin (del Olmo et al., 2000). Die Aminosäure Taurin aktiviert GABA_A-Rezeptoren mit der Untereinheit α_4 , letztere ist bei Neuronen extrasynaptisch lokalisiert (Jia et al., 2008). Zusätzlich ist Taurin ein Agonist für Glycin-Rezeptoren (Albrecht und Schousboe, 2005). In Bergmanngliazellen wird Taurin auch über Transporter aufgenommen und freigesetzt (Barakat et al., 2002). Taurin wurde in hohen Konzentrationen (10 mM) appliziert und löste in isolierten GluR-Zellen keine Ströme aus ($n = 3$) (Abb. 4.1 B2). Fokale Druckapplikation von Taurin löste bei GluR-Zellen in situ kleine Ströme mit einer durchschnittlichen Amplitude von $6,5 \pm 1,9$ pA ($n = 3$; 5 mM) und $14,6 \pm 6,7$ pA ($n = 4$; 10 mM) aus (Abb. 4.1 B3). Drei Zellen antworteten nicht auf Taurinapplikation.

Diese Experimente an GluR-Zellen aus der CA1-Region zeigen, dass

- (1) funktionelle GABA_A-Rezeptoren in diesen Zellen exprimiert werden,
- (2) es keine Hinweise auf die Expression funktioneller Glycinrezeptoren gibt,
- (3) einige GluR-Zellen in situ entweder GABA_A-Rezeptoren, die die Untereinheit α_4 enthalten, oder funktionelle Taurin-Transporter exprimieren.

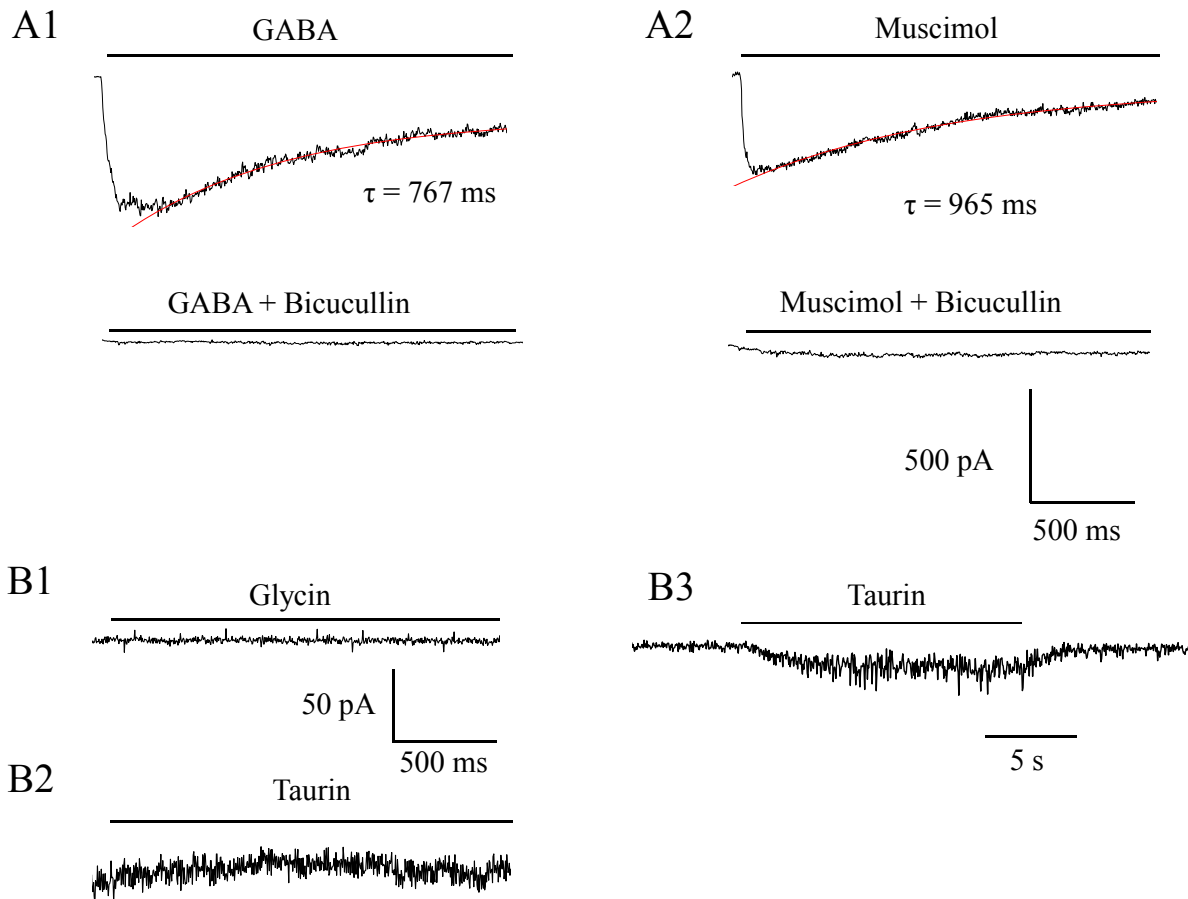


Abb. 4.1 Pharmakologische Charakterisierung von $GABA_A$ -Rezeptorantworten in hippocampalen GluR-Zellen. (A1 und A2) Nach akuter Isolation von GluR-Zellen aus dem Hippocampus wurden GABA und Muscimol ($100 \mu M$) mittels Konzentrationsklemmtechnik schnell appliziert. Das Haltepotential betrug $-70 mV$. Die intrazelluläre Cl^- -Konzentration betrug $134 mM$. Der Stromabfall konnte mittels einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Nach Vorapplikation von $20 \mu M$ Bicucullin wurden GABA ($100 \mu M$) und Muscimol ($100 \mu M$) zusammen mit Bicucullin koappliziert. Die Aktivierung von Rezeptorströmen wurde unterdrückt (untere Stromspuren). (B1) Applikation von Glycin ($500 \mu M$) löste keine Rezeptorströme in isolierten GluR-Zellen aus. (B2) Der Glycin- und $GABA_A$ -Rezeptor Agonist Taurin ($5 mM$) konnte in isolierten GluR-Zellen keine Rezeptorantworten erzeugen. (B3) Taurin konnte unter fokaler Druckapplikation in hohen Konzentrationen ($10 mM$) kleine Rezeptorantworten in GluR-Zellen in situ hervorrufen.

4.1.2 Affinität von $GABA_A$ -Rezeptoren in GluR-Zellen.

Die GABA-Affinität wird von der Untereinheitenzusammensetzung der Rezeptoren beeinflusst. An GluR-Zellen in Schnitten von juvenilen [tg(hGFAP/EGFP)] Mäusen (p8 - 13) wurde GABA in aufsteigenden Konzentrationen von $10 \mu M$ bis $10 mM$ appliziert, die Antworten wurden auf die Werte bei einer Konzentration von $10 mM$ normiert. Die Applikation von GABA im Hirnschnitt aktiviert jedoch mehrere Zellen, daher mussten indirekte Effekte durch Ausschüttung von Neurotransmittern verhindert werden. Deshalb

wurde die Ca^{2+} -abhängige vesikuläre Freisetzung von Neurotransmittern durch Zugabe von CdCl_2 (30 μM) in die Badlösung verhindert und die Weiterleitung von Aktionspotentialen durch Zugabe von Tetrodotoxin (TTX, 1 μM) blockiert. Spannungsaktivierte und einwärts gerichtete K^+ -Kanäle wurden durch Zugabe von 4-Aminopyridin (4-AP, 4 mM) und hohen Konzentrationen von BaCl_2 (10 mM) blockiert (Blockierungslösung, siehe Material und Methoden). Aktivierung von ionotropen Glutamat-Rezeptoren vom AMPA/Kainat-Typ wurde mit dem Blocker CNQX (25 μM) verhindert. Eine Aktivierung von GABA-Transportern in Gliazellen und Nervenzellen die Ergebnisse der Messungen möglicherweise beeinflussen. Daher wurden diese durch Zugabe des GABA-Transporterblockers SKF 89976A (100 μM) blockiert.

Die GABA-Konzentration, bei der die halbmaximale Stromamplitude erreicht wurde (EC_{50}), gilt als Standard für die Wirksamkeit von Substanzen. Für die Ermittlung des EC_{50} wurden die normierten Amplituden gegen die entsprechenden Konzentrationen in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 4.2). Die Dosis-Wirkungskurve wurde mittels Ausgleichsrechnung aus Gleichung (4) ermittelt. Die Stromamplitude bei einer Konzentration C ist abhängig von dem EC_{50} und dem Hill-Koeffizient n_H .

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \left(\frac{\text{EC}_{50}}{C}\right)^{n_H}} \quad (4)$$

I_{\max} entspricht der maximalen Stromamplitude, I ist die gemessene Stromamplitude bei der jeweiligen Konzentration C. Der Mittelwert des EC_{50} lag bei $292 \pm 105 \mu\text{M}$ GABA mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1,4 \pm 0,58$ ($n = 11$). Betrachtet man die EC_{50} Werte der individuellen Zellen, so liegen diese zwischen 148,41 und 451,95 μM GABA mit einem Hill-Koeffizienten zwischen $n_H = 0,79$ und $n_H = 2,2$. Hill-Koeffizienten $n_H > 1$ deuten auf Kooperativität der GABA-Bindung an den Rezeptoren hin. Man nimmt an, dass zwei Moleküle GABA an einen Rezeptor binden müssen, damit er sich öffnet. Die absolute Stromamplitude bei 10 mM GABA betrug $3085 \pm 995,1 \text{ pA}$ (1182 - 4061 pA, $n = 11$).

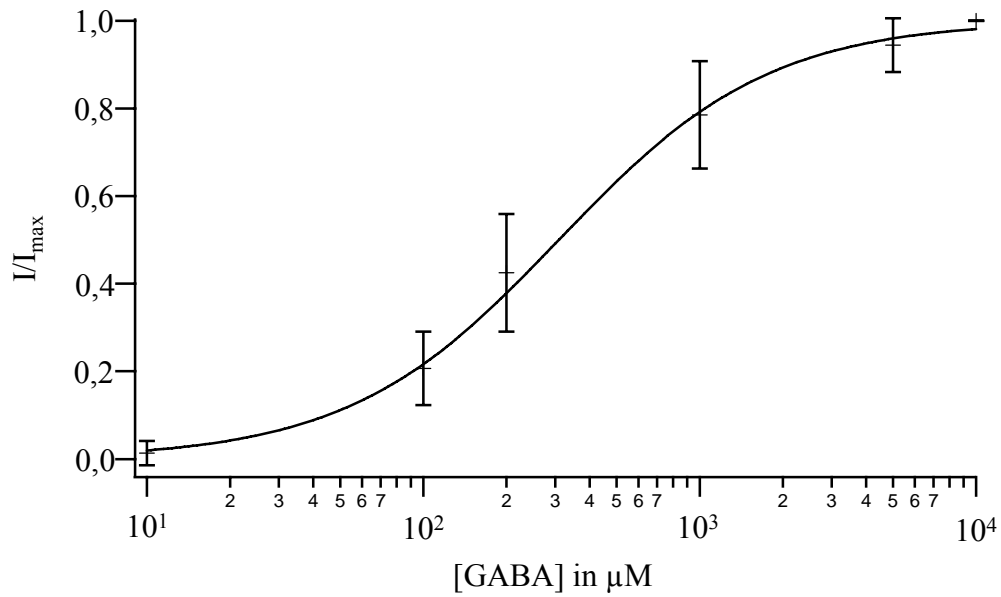


Abb. 4.2 *GluR*-Zellen *in situ* exprimieren $GABA_A$ -Rezeptoren mit einem EC_{50} von 292 μM . In der Dosis-Wirkungs-Kurve sind die gemittelten, normierten Stromamplituden gegenüber der jeweiligen GABA-Konzentration aufgetragen ($n = 11$), es wurde auf die jeweiligen maximalen Amplituden der Zellen bei 10 mM GABA normiert. Zum Unterbinden von indirekten Effekten wurden K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} -Kanäle mit $BaCl_2$ (10 mM), 4-AP (4 mM), TTX (1 μM), $CdCl_2$ (30 μM) blockiert.

4.1.3 Tonische GABA_A-Rezeptorströme

Im extrazellulären Raum des ZNS kommt GABA in Konzentrationen von 0,2 bis 2,5 μM vor (Tossman et al., 1986; Lerma et al., 1986; Ding et al., 1998). Dieses ambiente GABA kann nach synaptischer Aktivität aus dem synaptischen Spalt diffundiert sein (*spill over*) (Übersicht von Semyanov et al., 2004). Diese Annahme wird durch eine neuere Publikation unterstützt, in der gezeigt wurde, dass tonische GABA_A-Rezeptorströme nach Blockierung von vesikulärer GABA-Freisetzung nicht länger auftreten (Glykys und Mody, 2007b). Als Alternative wird nicht-synaptische Freisetzung diskutiert. Die Freisetzung von GABA durch GABA-Transporter ist weniger wahrscheinlich, weil die Blockierung des GABA-Transporters GAT1 keinen Effekt auf die tonischen Ströme hat. Bei einer Blockierung der GAT3 (mGAT4) GABA-Transporter werden die tonischen GABA_A-Rezeptorströme sogar verstärkt (Übersicht von Semyanov et al., 2004). Das ambiente GABA kann tonische Ströme in Neuronen auslösen, die extra- und perisynaptische GABA_A Rezeptoren besitzen, welche wegen ihrer hohen Affinität für GABA für die Aktivierung durch geringe GABA Konzentrationen prädestiniert sind (Saxena und Macdonald, 1994; Brown et al., 2002; Wei et al., 2003; Mody, 2001; Übersichten von Semyanov et al., 2004; Mody und Pearce, 2004; Farrant und Nusser, 2005). Das Auftreten von tonischen GABA_A-Rezeptorströmen wurde zuerst in Körnerzellen des Cerebellums beschrieben. Diese Neurone wurden auf eine bestimmte Spannung (Haltespannung) geklemmt. Bei Applikation des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin verringerte sich der Haltestrom der für die Aufrechterhaltung der Haltespannung benötigt wurde. Gleichzeitig verringerte sich das Hintergrundrauschen durch Blockade stochastischer Kanalöffnungen (Übersicht von Semyanov et al., 2004).

Ob und in welchem Ausmaß tonische, GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme in GluR-Zellen vorkommen, ist nicht bekannt. Zur Klärung dieser Frage wurde der Effekt des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (100 μM) auf den Haltestrom bei einem Haltepotential von -70 mV untersucht. K⁺-Leitfähigkeiten wurden blockiert, indem das KCl in der Innenlösung durch CsCl substituiert wurde (Pipettenlösung 3, Material und Methoden). K⁺-Kanäle sind impermeabel für Cs⁺. Glutamat-Rezeptoren wurden mit Kynurensäure (1 mM) blockiert, um eine Übererregung des Schnittes nach GABA_A-Rezeptorblockade mit Bicucullin-Applikation zu verhindern.

Die Blockierung von GABA-Transportern mit 3-Piperidincarboxylsäure (Nipecotinsäure) führte bei den gegebenen Cl⁻-Konzentrationen (140 mM CsCl in der Innenlösung und 161 mM Cl⁻ in der Badlösung) und der hyperpolarisierenden Haltespannung ($V_H = -70$ mV) zu

einem Cl^- -Efflux und zu einer Verstärkung des Hintergrundrauschens. Die fokale Applikation von Bicucullin ($100 \mu\text{M}$) blockierte diesen tonischen Strom ($14,71 \pm 5,92 \text{ pA}$, $0,73 \pm 0,36 \text{ pA/pF}$, $n = 7$). Zusätzlich verringerte sich das Hintergrundrauschen (Abb. 4.3). Daher nahmen wir an, dass die Blockierung der Transporter eine Erhöhung der ambienten GABA-Konzentration verursacht. Dies führte zur vermehrten Aktivierung von GABA_A -Rezeptoren, die tonische Ströme und verstärktes Hintergrundrauschen verursachten.

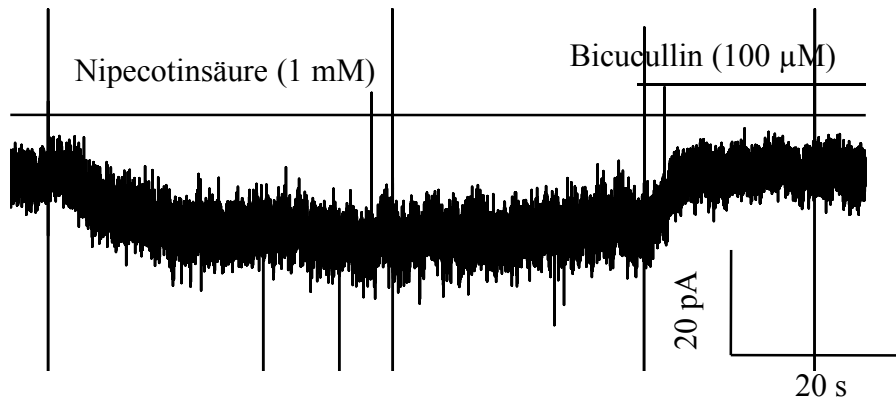


Abb. 4.3 Induktion tonischer GABA_A -Rezeptorströme in GluR-Zellen in situ. GABA_A -Rezeptorströme konnten durch fokale Applikation des GABA-Transporter Inhibitors Nipicotinsäure (1 mM), der neuronale und gliale GABA-Transporter inhibiert, ausgelöst werden. Der GABA_A -Rezeptor-Antagonist Bicucullin blockiert die hervorgerufenen Ströme. Glutamat-Rezeptorströme wurden durch Koapplikation des Glutamat-Rezeptor-Antagonisten Kynurensäure (1 mM) inhibiert. K^+ -Kanalströme wurden unterbunden, indem KCl in der Pipettenlösung durch CsCl äquimolar substituiert wurde. Die Zellen wurden bei der fokalen Druckapplikation bei $V_H = -70 \text{ mV}$ untersucht.

Um zu belegen, dass diese tonischen, Bicucullin-sensitiven Ströme ursächlich durch GABA_A -Rezeptoraktivierung ausgelöst werden, wurde GABA in geringen Konzentrationen ($5 \mu\text{M}$) zusätzlich mit der Badlösung appliziert (Abb. 4.4). Im Vergleich zur alleinigen Applikation des GABA-Transporterblockers Nipicotinsäure wurden ein größerer tonischer Strom und ein verstärktes Hintergrundrauschen beobachtet. Nach Zugabe von Bicucullin wurde die Stromamplitude der tonischen GABA_A -Rezeptorströme um $29,8 \pm 17,44 \text{ pA}$ ($n = 5$) reduziert, dies entspricht einer Stromdichte von $1,99 \pm 1,59 \text{ pA/pF}$. Das verstärkte Auftreten tonischer Ströme bei erhöhter ambienter GABA-Konzentration und die Blockierung durch Bicucullin unterstützt unsere Folgerungen aus dem vorangegangenen Versuch, dass ambientes GABA nach Transporterblockade durch Rezeptoraktivierung tonische Ströme auslöst.

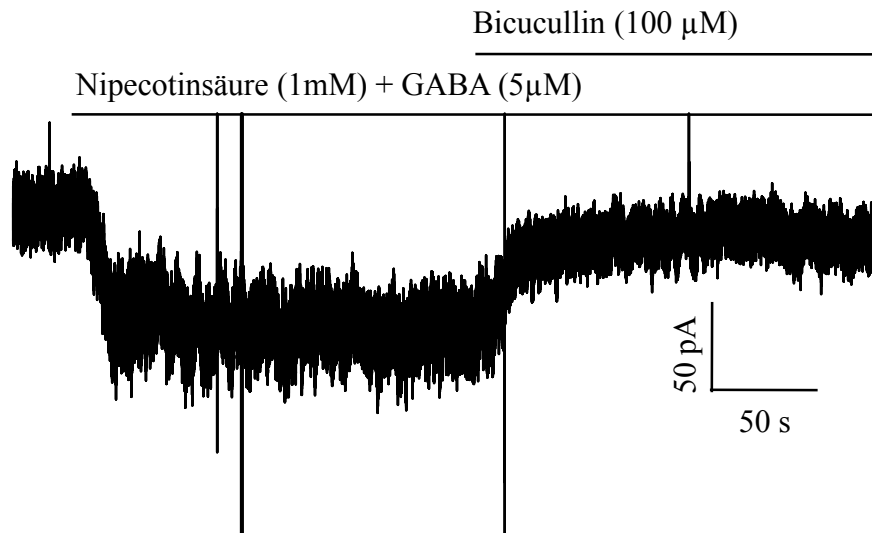


Abb. 4.4 Applikation von geringen GABA-Konzentrationen verstärkt tonische GABA_A-Rezeptorströme von GluR-Zellen in situ. Durch Badapplikation von Nipicotinsäure (1 mM) und GABA (5 µM) wurden tonische GABA_A-Rezeptorantworten erzeugt. In Anwesenheit von GABA und Nipicotinsäure wurden GABA_A-Rezeptorströme mit größeren Amplituden registriert, als bei Nipicotinsäure alleine. Das Hintergrundrauschen des Haltestroms war ebenfalls stärker. Bicucullin blockiert diese Auswärtsströme und reduziert das Hintergrundrauschen. K⁺-Kanalströme und Glutamat-Rezeptorströme wurden - wie in Abb. 4.3 beschrieben - inhibiert.

4.1.4 Vergleich der Stromdichten von induzierten GABA_A-Rezeptorströmen in CA1-Pyramidenneuronen und GluR-Zellen

Desweiteren wollten wir Unterschiede zwischen den GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen und Neuronen unter unseren Applikationsbedingungen ermitteln. Mittels fokaler Applikation von GABA (50 µM) lösten wir GABA_A-Rezeptor-Ströme in CA1-Pyramidenneuronen und Gliazellen aus (Abb. 4.5). Indirekte Effekte wurden durch die Applikation von K⁺-Kanalblockern und TTX sowie CdCl₂ unterbunden (Blockierungslösung). Bei der Untersuchung von Neuronen wurden zusätzlich noch GABA_B-Rezeptoren mit CGP 55845 (5 µM) und metabotrope Glutamat-Rezeptoren mit LY 341495 (10 µM) blockiert. Bei jungen Mäusen (p8 - 15) wurden in Pyramidenneuronen durch fokale Applikation von GABA Amplituden von durchschnittlich $1432,81 \pm 1189,76$ pA ausgelöst (symmetrische Cl⁻-Konzentrationen, $V_H = -70$ mV), was einer Stromdichte von $29,35 \pm 37,29$ pA/pF entspricht ($n = 37$). Die GluR-Zellen besitzen relativ zu Pyramidenneuronen eine geringere Stromdichte. Die maximalen Amplituden lagen im Durchschnitt bei $248,36 \pm 218,91$ pA, mit einer Stromdichte von $10,66 \pm 9,87$ pA/pF ($n = 57$). Die Ursache für die unterschiedliche Stromdichte in Neuronen und GluR-Zellen kann sowohl in der Rezeptordichte als auch in der speziellen Komposition des GABA_A-Rezeptors liegen, da GABA_A-Rezeptoren in Nervenzellen eine höhere GABA-Affinität aufweisen (Fraser et al., 1995; Tietz et al., 1999;

Mangan et al., 2005: $EC_{50} < 20 \mu\text{M}$ für Pyramidenzellen; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998).

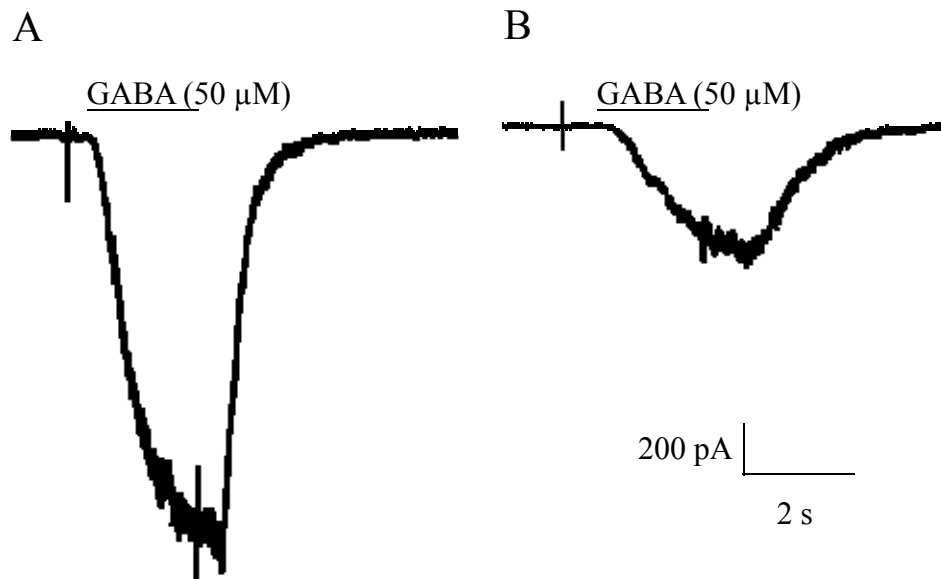


Abb. 4.5 *GluR*-Zellen zeigten geringere $GABA_A$ -Rezeptorantworten als CA1-Pyramidenneurone im Hippocampus. $GABA_A$ -Rezeptorströme wurden durch fokale Applikation von $50 \mu\text{M}$ GABA für 2 s auf (A) Pyramidenneurone und (B) *GluR*-Zellen *in situ* ausgelöst. Die Pyramidenneurone wurden nahe ihres Ruhemembranpotentials gehalten ($V_H = -60 \text{ mV}$), *GluR*-Zellen entsprechend auf $V_H = -70 \text{ mV}$. K^+ , Na^+ und Ca^{2+} -Leitfähigkeiten wurden mit Blockierungslösung unterbunden. Glutamat-Rezeptoren vom AMPA/Kainat Typ wurden mit CNQX ($25 \mu\text{M}$) blockiert, in Neuronen wurden zusätzlich metabotrope $GABA_B$ -Rezeptoren mit CGP 55845 und metabotrope Glutamat-Rezeptoren mit LY 341495 blockiert.

4.2 Bestimmung des Cl^- -Umkehrpotentials der $GABA_A$ -Rezeptorantwort in *GluR*-Zellen

4.2.1 Die Perforated-Patch-Konfiguration als Methode zur Bestimmung des Cl^- -Umkehrpotentials

Für die Bestimmung des nativen Cl^- -Umkehrpotentials wurden die Zellen in der Perforated Patch-Konfiguration gehalten (siehe Material und Methoden). Der Einbau von Gramicidin-A Poren in die Zellmembran findet langsam statt und wird an steigender elektrischer Leitfähigkeit sichtbar. Die Zunahme der Leitfähigkeit wird durch Abnahme des R_S verursacht, dieser wurde kontinuierlich beobachtet (siehe Material und Methoden). Bei konstanten Werten um die $100 \text{ M}\Omega$ wurde mit den Untersuchungen begonnen.

Die abgeleiteten Zellen wurden anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften als *GluR*-Zellen identifiziert (Abb. 4.6).

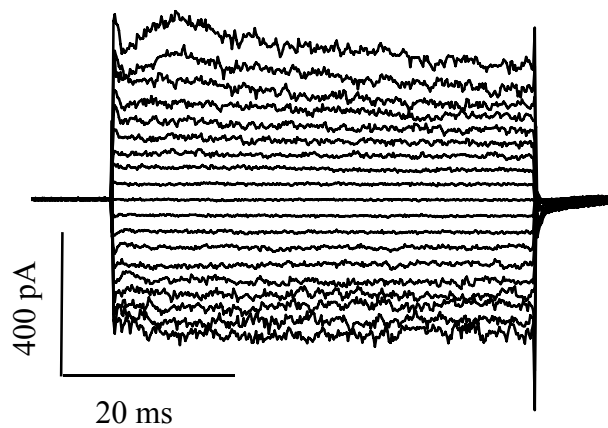


Abb. 4.6 GluR-Zellen zeigen auch in der Perforated-Patch-Konfiguration ihr typisches Strommuster: Spannungsaktivierte und gleichrichtende Kaliumkanäle werden bei Depolarisation und Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert. Die Zelle wurde für jeweils 50 ms auf Potentiale zwischen +20 und -160 mV geklemmt, in Intervallen von 10 mV. Das Haltepotential betrug -70 mV.

4.2.2 Bestimmung der Zelldepolarisation nach der GABA_A-Rezeptorantwort

In der Stromklemme wird das Membranpotential der Zelle (V_M) gemessen. Dieses wird von den unterschiedlichen Ionenkonzentrationen ($[K^+]$, $[Na^+]$, $[Cl^-]$) an der Innen- und Außenseite der Membran und der spezifischen Permeabilität der Membran für die jeweiligen Ionen (P_K , P_{Na} , P_{Cl}) bestimmt. Quantitativ wird dies in der Goldman-Gleichung ausgedrückt.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_a + P_{Na} [Na^+]_a + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_a} \quad (4)$$

Mit T , der Umgebungstemperatur (in Kelvin). R , der allgemeinen Gaskonstante ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) und F , der Faradaykonstante ($96485,3399 \text{ C mol}^{-1}$)

Bei Gliazellen ist die Permeabilität der Zellmembran für K^+ (P_K) sehr viel höher als für andere Ionen ($P_K \gg P_{Na} > P_{Cl}$). Daher entspricht das Ruhemembranpotential nahezu dem K^+ -Gleichgewichtspotential. Für die Ermittlung des Cl^- -Umkehrpotentials ist es jedoch erforderlich, dass das Membranpotential V_m dem Cl^- -Gleichgewichtspotential E_{Cl^-} entspricht. Daher müssen P_K und P_{Na} gesenkt und P_{Cl} erhöht werden. Dann kann die Membranspannung näherungsweise durch die Nernst-Gleichung (5) für E_{Cl} ausgedrückt werden. Hierfür wurde die Blockierungslösung verwendet, die Antagonisten für K^+ - und Na^+ -Kanäle enthält. Bei Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren wird selektiv P_{Cl} erhöht. Das gemessene Membranpotential in Anwesenheit von GABA_A-Rezeptoragonisten sollte dann dem Cl^- -Gleichgewichtspotential entsprechen (siehe Gleichung 5).

$$E_{Cl} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_a} \quad (5)$$

Als Kontrolle wurde zunächst das Membranpotential in Anwesenheit von GABA in der Ganzzelle gemessen, wobei E_{Cl} über die Cl^- -Konzentrationen der Innen- und Außenlösung vorgegeben wurde. Bei Cl^- -Konzentrationen $[Cl^-]_a = 168 \text{ mM}$ und $[Cl^-]_i = 27 \text{ mM}$ ergab sich $E_{Cl} = -46 \text{ mV}$. Das experimentell ermittelte Membranpotential wurde mit $-39,0 \pm 3,2 \text{ mV}$ bestimmt ($n = 7$).

In der Perforated-Patch-Konfiguration, bei der die native intrazelluläre Cl^- -Ionenkonzentration nicht verändert ist, stellte sich nach Aktivierung von $GABA_A$ -Rezeptoren durch Applikation von $400 \mu\text{M}$ Muscimol und Blockierungslösung ein Membranpotential von durchschnittlich $-20,3 \pm 6,3 \text{ mV}$ ein ($n = 6$) (Abb. 4.7 B). Korrigiert man dieses Potential mit der Abweichung des experimentell ermittelten Cl^- -Gleichgewichtspotential aus den Ganzzelleitungen (s. oben), so erhält man ein Gleichgewichtspotential für Cl^- -Ionen von -26 mV . Nach Gleichung (5) entspricht dies einer $[Cl^-]_i$ von 60 mM ($59,8 \pm 13,5 \text{ mM}$) bei $[Cl^-]_a = 168 \text{ mM}$.

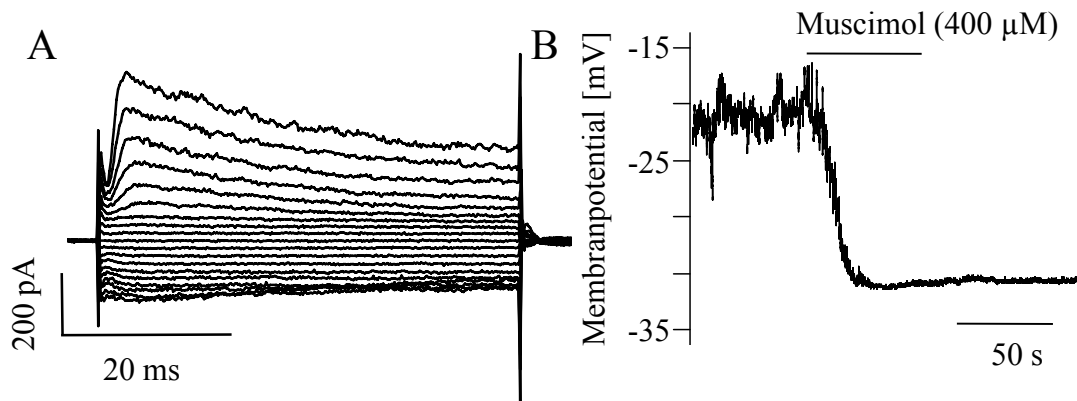


Abb. 4.7 Bestimmung des Cl^- -Gleichgewichtspotentials durch Aktivierung von $GABA_A$ -Rezeptoren. $GABA_A$ -Rezeptoren in GluR-Zellen wurden durch die Applikation des spezifischen Agonisten Muscimol aktiviert. In der Stromklemme stellte sich die Membranspannung daraufhin auf das Cl^- -Umkehrpotential ein. **A)** De- und Hyperpolarisierung einer GluR-Zelle in der Perforated-Patch-Konfiguration. V_H wurde in 10 mV Intervallen geändert, bis $+20 \text{ mV}$ und -160 mV ausgehend von $V_H = -70 \text{ mV}$. **B)** In der Stromklemme wurde Muscimol ($400 \mu\text{M}$) für 1 min mittels Perfusion in die Badkammer eingewaschen. Zuvor wurden K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle mit $BaCl_2$ (10 mM), 4-AP (4 mM), TTX ($1 \mu\text{M}$) und $CdCl_2$ ($30 \mu\text{M}$) blockiert. Bei der Applikation von Muscimol stellt die Membranspannung sich auf das Cl^- -Gleichgewichtspotential ein, in diesem Beispiel auf -30 mV .

4.3 Untereinheitenkomposition von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen

Durch die Bestimmung der GABA-Affinität der GABA_A-Rezeptoren und ihre pharmakologischen Eigenschaften können Rückschlüsse auf die Komposition der Rezeptoren gezogen werden. Die Wirkung von positiven Modulatoren basiert auf der Erhöhung der Affinität des Rezeptors zu seinem Substrat. Daraus resultiert eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit des Cl⁻-Kanals. Dies äußert sich in der Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve zu niedrigeren Agonisten-Konzentrationen in Anwesenheit des Modulators. Die maximalen Leitfähigkeiten werden mit geringeren Dosen des Neurotransmitters erreicht. Bei gleicher, submaximaler Agonisten-Konzentration wird so eine Erhöhung der Rezeptorströme beobachtet. Unterstützend wurde mittels Einzelzell RT-PCR die Häufigkeit der Transkripte einzelner Untereinheiten in individuellen GluR-Zellen ermittelt. Die Ergebnisse dieser komplementären Methoden liefern Indizien auf die möglichen Untereinheitenzusammensetzungen der GABA_A-Rezeptoren in GluR Zellen *in situ*. In diesen Experimenten wurden alle Substanzen (Modulatoren, Agonisten, Antagonisten) fokal mittels eines DAD12- oder Octaflow™ Systems an Zellen in akuten Gehirnschnitten appliziert. Eine Messung umfasste 3 GABA Applikationen, bei der zweiten Applikation wurde der jeweilige Modulator koappliziert.

4.3.1 Potenzierung von GABA_A-Rezeptorantworten durch Pentobarbital

Das Barbiturat Pentobarbital (PBT) wird auch als Pentobarbiton bezeichnet und wurde früher als Schlafmittel eingesetzt. Es bindet an der β -Untereinheit von GABA_A-Rezeptoren (Übersicht von Mehta und Ticku, 1999) bewirkt eine stärkere Bindung von GABA an den Rezeptor und verlängerte Öffnungszeiten der Rezeptorpore (Olsen und Snowman, 1982; Macdonald und Barker, 1978; Macdonald et al., 1989; Twyman et al., 1989; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998). Diese Eigenschaften bewirken größere Rezeptorströme in Anwesenheit von PBT unter der Voraussetzung, dass die Bindungsstellen nicht wegen hoher GABA-Konzentrationen bereits gesättigt sind.

Die Rezeptormodulation durch PBT ist ubiquitär, alle funktionellen Rezeptoren werden durch PBT moduliert. Die Stärke der Modulation durch PBT ist bei Rezeptoren mit verschiedenen β -Untereinheiten nicht verschieden (Hadingham et al., 1993; Übersicht von Mehta und Ticku, 1999). Die α -Untereinheiten können die Stärke der Modulation beeinflussen. Bei Konzentrationen um 50 μ M tritt bei allen $\alpha\beta_2\gamma_2$ Rezeptor-Kombinationen eine Potenzierung auf (Thompson et al., 1996; Übersicht von Mehta und Ticku, 1999). Mit PBT als Modulator

wurde getestet, ob wir mit unserem fokalen Applikationssystem Rezeptorantworten potenzieren können. Bei 40 s Vorapplikation löste PBT alleine keine Ströme aus. Fokale Applikation von GABA (50 μ M) löste in allen getesteten Zellen Rezeptorantworten aus, welche in Gegenwart von PBT (50 μ M) gesteigert wurden ($n = 11$) (Abb. 4.8). Im Durchschnitt betrug die Amplitudenerhöhung 301 ± 78 %. Dieser Effekt ist hoch signifikant.

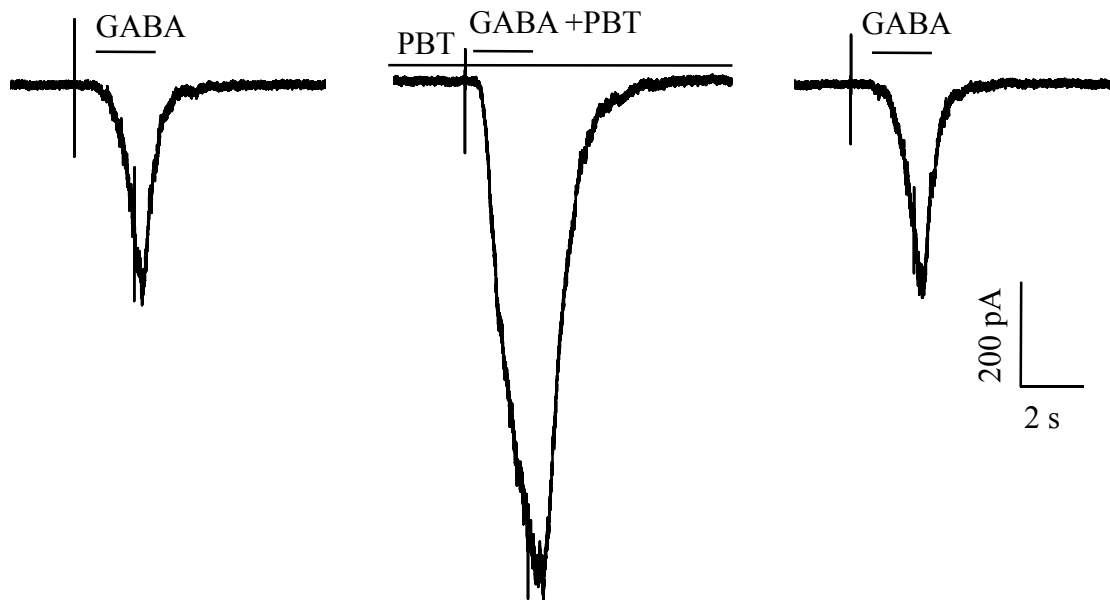


Abb. 4.8 GABA_A-Rezeptorströme in GluR-Zellen im Hippocampus werden durch den GABA_A-Rezeptor-Modulator PBT potenziert. PBT (50 μ M) wurde mittels fokaler Druckapplikation 40 s vorappliziert und dann zusammen mit GABA (50 μ M) für 2 s appliziert. Als Kontrolle wurde zuvor eine Applikation von GABA (50 μ M) ohne PBT in derselben Zelle (links) für 2 s durchgeführt. Die Reversibilität des PBT Effekts wurde durch die Applikation von GABA nach PBT überprüft (rechts). K⁺-, Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle wurden mit der Blockierungslösung blockiert. Die Potenzierung durch PBT (mitte) betrug 265 %.

Die Stärke der Potenzierung ist abhängig von der GABA-Konzentration. Bei einer Konzentration von 80 μ M betrug die Potenzierung noch 229 ± 39 % ($n = 3$); wurde GABA in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt, so war der Effekt von PBT (186 ± 35 %, $n = 5$) signifikant schwächer als bei niedrigerer GABA Konzentration (50 μ M).

Die Potenzierung der Rezeptorantworten durch PBT zeigte, dass das verwendete Applikationssystem zur Durchführung entsprechender Experimente geeignet ist. Wir konnten reproduzierbare Rezeptorströme auslösen und die Reversibilität des Modulators PBT nachweisen.

4.3.2 Modulation der GABA_A-Rezeptorantworten durch Benzodiazepine und Agonisten der BZ-Bindungsstelle

Für den Nachweis der α - und γ -Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren liefert die Modulation durch Benzodiazepine und Agonisten der Benzodiazepinbindungsstelle (BZ-Bindungsstelle) wichtige Hinweise. In heterologen Expressionssystemen wurden Unterschiede in der modulatorischen Wirkung dieser Substanzen bei unterschiedlichen Rezeptorkombinationen quantifiziert (Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993b; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998).

Das Benzodiazepin Diazepam (DZ) wird als Medikament eingesetzt und ist unter dem Handelsnamen Valium bekannt. Es wirkt anxiolytisch, antikonvulsiv, muskelrelaxierend und sedierend. Es ist ein positiver allosterischer Modulator des GABA_A-Rezeptors, es bewirkt eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Rezeptoren. Die BZ-Bindungsstelle wird an der Kontaktstelle der α - und γ -Untereinheit des Rezeptors vermutet (siehe Abb. 1.2). Mutationen an einer oder beiden Untereinheiten können daher die Wirksamkeit von Benzodiazepinen beeinflussen (Cope et al., 2004; Übersicht von Mehta und Ticku, 1999). Am stärksten ist die modulatorische Wirkung von DZ bei Rezeptoren mit den Kombinationen $\alpha_{1-3,5}\gamma_2\beta_x$, aber es werden auch Rezeptoren potenziert, die anstatt der γ_2 - die γ_1 -Untereinheit besitzen. Rezeptoren mit α_4 - und α_6 -Untereinheiten sind insensitive gegenüber Diazepam (Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993a; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998).

In GluR-Zellen potenzierte DZ (20 μ M) bei Koapplikation mit GABA (50 μ M) die Rezeptorantworten auf 171 ± 57 % ($n = 4$) im Vergleich zur Kontrolle mit 50 μ M GABA (Abb. 4.9). Dieser Befund spricht für eine bevorzugte Expression der Untereinheiten α_1 , α_2 , α_3 oder α_5 .

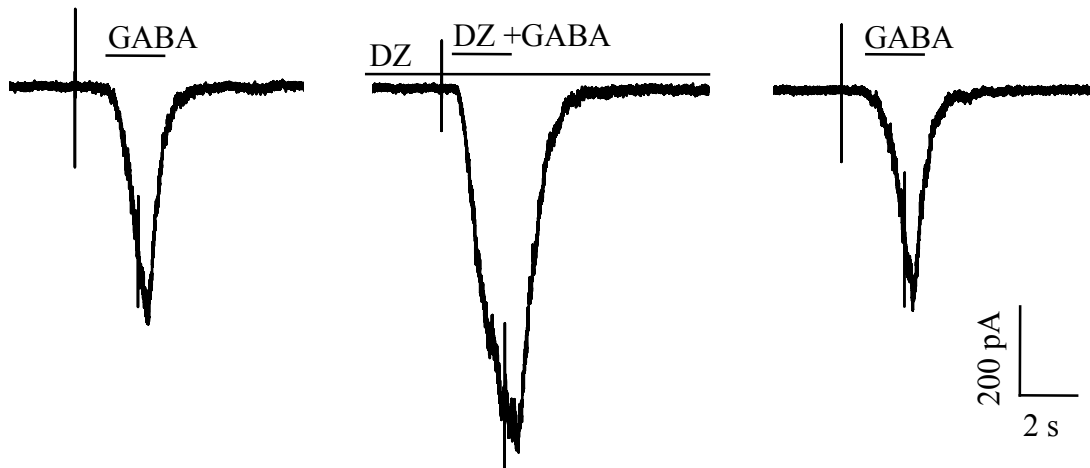


Abb. 4.9 Hippocampale GluR-Zellen besitzen $GABA_A$ -Rezeptoren mit einer funktionellen Bindungsstelle für Benzodiazepine. Das Benzodiazepin Diazepam (DZ) potenzierte $GABA_A$ -Rezeptorströme ($n = 4$). Die Stromamplitude, ausgelöst durch GABA ($50 \mu M$, 2 s) bei $V_H = -70 mV$ (links), wurde in der nachfolgenden Applikation (mitte) von GABA ($50 \mu M$) und DZ ($20 \mu M$, 40 s vorappliziert) um 166 % potenziert. Der Modulator wurde ausgewaschen und GABA wurde nochmals appliziert (rechts). Kationenkanäle wurden mit den gleichen Substanzen wie bei der Applikation von PBT blockiert.

Der $GABA_A$ -Rezeptor-Modulator Zolpidem (ZPD) hat eine schwach sedierende, muskelrelaxierende und antikonvulsive Wirkung. Er bindet ebenfalls an der BZ-Bindungsstelle und bewirkt eine Erhöhung der Affinität für GABA. Er bindet mit hoher Affinität an Rezeptoren mit $\alpha_1\gamma_2$ -Untereinheiten. Bei mikromolaren Konzentrationen werden jedoch auch $GABA_A$ -Rezeptoren, die α_2 - oder α_3 -Untereinheiten besitzen, positiv moduliert (Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993b; Hevers und Lüddens, 1998; Sanna et al., 2002). Bei 18 von 19 getesteten Zellen wurde die GABA Antwort durch ZPD ($10 \mu M$) potenziert (273 ± 113 % der Kontrollamplitude, $n = 18$) (Abb. 4.10, 4.11). Eine Zelle zeigte nur eine schwache Steigerung der Antwort bei ZPD Koapplikation (105 %), die nicht als signifikant gewertet wurde (der Schwellenwert für eine Potenzierung wurde auf 115 % der Kontrolle gesetzt). Wir testeten, ob man die untersuchten Zellen bezüglich der Stärke ihrer Potenzierung (bei $10 \mu M$ ZPD) diskriminieren kann, fanden jedoch keine Abweichung von der Normalverteilung (KS-Test). Bei einer GABA-Konzentration auf $80 \mu M$ betrug die Potenzierung der $GABA_A$ -Rezeptorströme durch Zolpidem ($10 \mu M$) 206 ± 57 % ($n = 3$), bei einer weiteren Erhöhung auf $100 \mu M$ konnte nur noch eine von 3 getesteten Zellen erfolgreich durch PBT potenziert werden. Auch bei geringen ZPD-Konzentrationen ($1 \mu M$, $500 nM$) wurden die Rezeptorantworten, die durch $50 \mu M$ GABA ausgelöst wurden, potenziert. Bei einer

Konzentration von 1 μM ZPD betrug die Potenzierung $226 \pm 84 \%$ ($n = 6$). Eine weitere Reduktion auf 500 nM bewirkte den gleichen Effekt (Potenzierung auf $248 \pm 68 \%$, $n = 4$). Diese profunde Potenzierung der GABA-induzierten Rezeptorantworten durch ZPD und DZ deutet auf die Expression von glialen GABA_A-Rezeptoren hin, die die Untereinheiten α_1 , α_2 , α_3 und γ_2 enthalten.

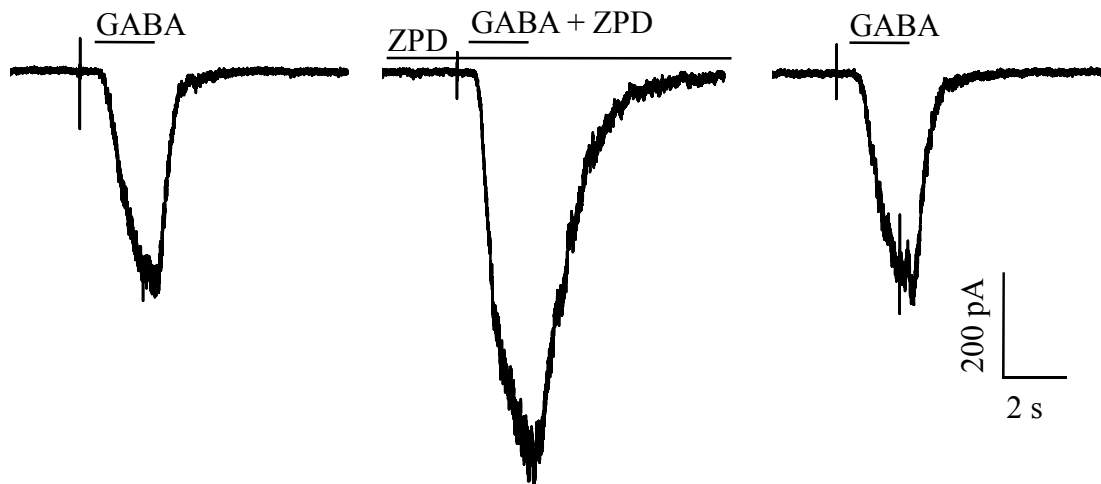


Abb. 4.10 GABA_A-Rezeptorströme in GluR-Zellen lassen sich durch den BZ-Agonist ZPD modulieren. Der Agonist (10 μM , 40 s vorappliziert) wurde mit GABA (50 μM , 2 s) koappliziert. Es wurde eine Erhöhung der Stromamplitude auf 185 % der Kontrollamplitude beobachtet. Die Applikation von GABA löste reproduzierbare Antworten aus, und der Effekt des Modulators war vollständig reversibel. Kationenleitfähigkeiten wurden wie in den Messungen mit Blockierungslösung inhibiert, die Applikationsbedingungen entsprachen denen von PBT und DZ.

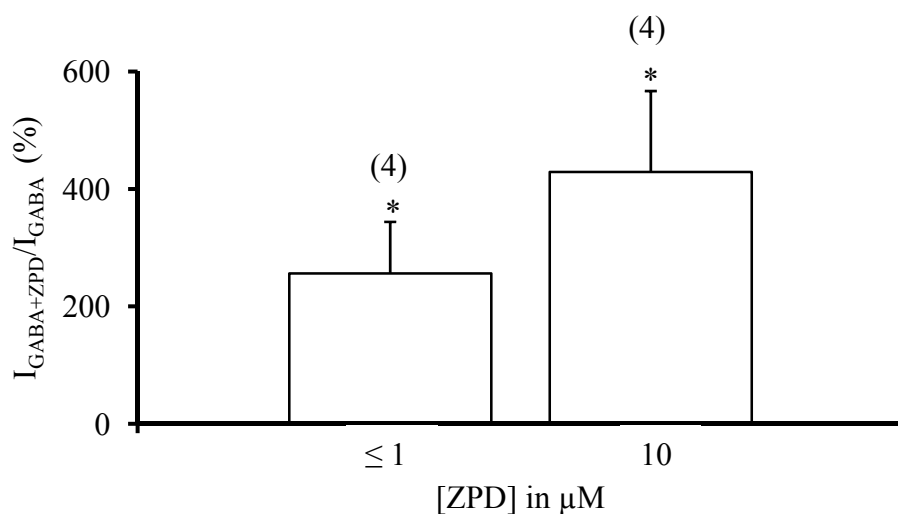


Abb. 4.11 ZPD potenziert GABA-Rezeptorantworten auch in geringeren Konzentrationen. ZPD (10 μM) löste im Durchschnitt eine Amplitudenerhöhung auf $359 \pm 137 \%$ der Kontrollamplitude aus ($n = 4$). Eine Reduktion der ZPD-Konzentration auf 1 oder 0,5 μM zeigte eine signifikante Abnahme der Potenzierung bei denselben Zellen ($256 \pm 88 \%$, $n = 4$).

Die Applikation von GABA mit verschiedenen ZPD-Konzentrationen an denselben Zellen (Abb. 4.11) zeigte eine signifikant stärkere Potenzierung durch 10 μM ZPD im Vergleich zu Konzentrationen von 1 oder 0,5 μM ($n = 4$). Möglicherweise werden die α_2 - und die α_3 -Untereinheiten im Verhältnis zur α_1 -Untereinheit stärker exprimiert.

Als weiteren GABA_A-Rezeptor-Modulator der BZ-Bindungsstelle haben wir das β -Carbolin Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carbolin-carboxylat (DMCM) getestet. DMCM kann GABA_A-Rezeptorantworten sowohl positiv wie auch negativ modulieren und wird auch als inverser Agonist der BZ-Bindungsstelle bezeichnet. DMCM potenziert Antworten von Rezeptoren, die γ_1 -Untereinheiten enthalten, während Rezeptoren der Kombinationen $\alpha_1\beta_{1-3}\gamma_2$, $\alpha_1\beta_1\gamma_3$, $\alpha_2\beta_1\gamma_2$, $\alpha_3\beta_{1-2}\gamma_2$ inhibiert werden (von Blankenfeld et al., 1990; Puia et al., 1991; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998). DMCM wirkte bei allen getesteten GluR-Zellen inhibitorisch auf die GABA-induzierte Rezeptor-Antworten. Die Kontrollamplitude (50 μM GABA) wurde durch Applikation von 10 μM DMCM signifikant auf $73 \pm 15\%$ reduziert ($n = 6$) (Abb. 4.12). Im Gegensatz zu den anderen benutzten Modulatoren war der Effekt von DMCM (10 μM) irreversibel. Diese negative Modulation durch DMCM legt - wie schon zuvor ZPD - eine bevorzugte Expression der γ_2 -Untereinheit mit α_1 -, α_2 - oder α_3 -Untereinheiten nahe (Puia et al., 1991; Burgard et al., 1996; Übersicht Hevers und Lüddens, 1998).

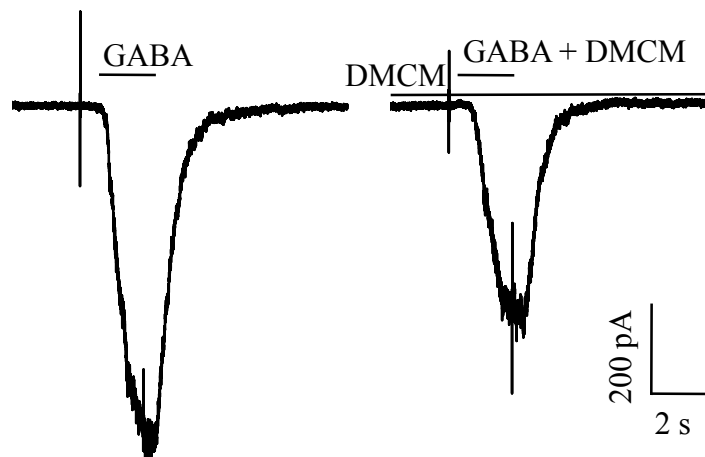


Abb. 4.12 Der inverse Agonist der BZ-Bindungsstelle DMCM reduziert GABA_A-Rezeptorströme in GluR-Zellen. Die Stromamplitude, die durch GABA (50 μM , 2 s) ausgelöst wurde, sank bei der nachfolgenden Applikation von GABA und DMCM auf 70 % der Kontrollamplitude. Der Effekt von DMCM war nicht reversibel. Kationenleitfähigkeiten wurden wie in den vorangegangenen Messungen blockiert. DMCM wurde 40 s vorappliziert, und die Zellen wurden bei -70 mV gehalten.

4.3.3 Modulation der GABA_A-Rezeptorantworten durch den Modulator Loreclezol

Um die Expression von β -Untereinheiten in GluR-Zellen pharmakologisch zu verifizieren, wurde der Modulator Loreclezol (LOR) verwendet. LOR potenziert spezifisch GABA_A-Rezeptoren, die $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten enthalten (Wafford et al., 1994). Essentiell für diese Modulation ist das Asparagin an Position 289 und 290 der TM2 Region der $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten. Wird es durch Serin ersetzt, verliert der Rezeptor seine Sensitivität gegenüber Loreclezol (Wingrove et al., 1994). Bei Koapplikation von Loreclezol (10 μ M) wurde die Kontrollamplitude bei allen Zellen (GABA, 50 μ M) auf 177 ± 52 % signifikant potenziert ($n = 12$) (Abb. 4.13). Daraus lässt sich schließen, dass in GluR-Zellen die Untereinheiten β_2 oder β_3 exprimiert werden.

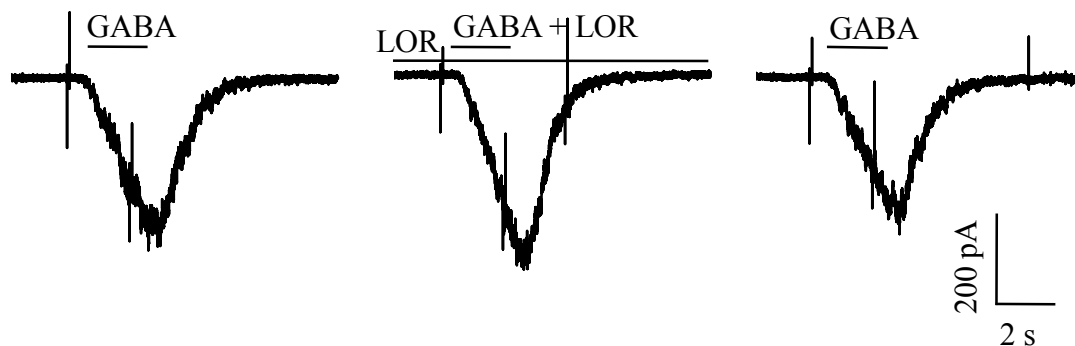


Abb. 4.13 Der β -Untereinheiten-spezifische Modulator LOR potenzierte GABA_A-Rezeptorantworten in GluR-Zellen. Die GABA-Kontrollamplitude (50 μ M, 2 s) wurde durch Koapplikation von LOR (10 μ M, 40 s vorappliziert, mitte) um 128 % gesteigert. Der Effekt von LOR war reversibel (rechte Aufnahme). Kationenleitfähigkeiten wurden wie in den vorangegangenen Messungen blockiert ($V_H = -70$ mV).

4.3.4 Blockierung der GABA_A-Rezeptorantworten durch Zink

Zur weiteren Charakterisierung der Zusammensetzung der Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren in Gliazellen wurde die Sensitivität der Rezeptoren gegenüber dem GABA_A-Rezeptorblocker Zink (Zn^{2+}) charakterisiert. In heterologen Expressionssystemen zeigte sich eine Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber Zn^{2+} von den α - und γ -Untereinheiten. Als besonders sensitiv erwiesen sich Rezeptoren ohne γ -Untereinheiten sowie Rezeptoren mit α_4 - und α_6 -Untereinheiten in Kombination mit γ_2 -Untereinheiten. Im Gegensatz dazu waren Rezeptoren mit Kombinationen aus $\alpha_1\gamma_2$ -Untereinheiten relativ insensitive gegenüber dem inhibitorischen Effekt von Zn^{2+} (Draguhn et al., 1990; Smart et al., 1991; Saxena und Macdonald, 1996; Fisher et al., 1997; Brown et al., 2002).

Die untersuchten Zellen zeigten heterogene Rezeptorantworten in Anwesenheit von Zn^{2+} . An 8 Zellen wurden jeweils 50 μM und 100 μM Zink mit GABA (50 μM) nacheinander koappliziert. Wir teilten diese Zellen bezüglich der Zn^{2+} -Sensitivität der Rezeptorantworten in zwei Gruppen auf (Abb. 4.14, 4.15). Die Gruppe sensibler Zellen (Abb. 4.14, 4.15 A1-3) zeigte eine Reduktion der Rezeptorströme durch Koapplikation von 50 μM Zn^{2+} auf $16,4 \pm 4,8$ % der Kontrolle ($n = 5$). Die Inhibition wurde durch Erhöhung der Zn^{2+} -Konzentration verstärkt (100 μM Zn^{2+} , Block auf $7,2 \pm 7,2$ % der Kontrollamplitude, $n = 5$). Bei zwei dieser Zellen wurden zusätzlich 10 μM Zn^{2+} appliziert (Abb. 4.15), es ergab sich eine Reduktion der Blockade auf $58,5 \pm 19,5$ % der Kontrolle ($n = 2$). Die andere Gruppe von Zellen ($n = 3$) war gegenüber Zn^{2+} -Applikation relativ insensitive (Abb. 4.14, Abb. 4.15 B1-3). 100 μM Zn^{2+} reduzierte die GABA-Amplituden nur auf $46,1 \pm 16,0$ %. Bei 50 μM Zn^{2+} wurden die GABA-induzierten Stromamplituden auf $88,0 \pm 13,0$ % reduziert. Bei beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen $[Zn^{2+}]$ und der Reduktion der GABA-Antwort. Da Zn^{2+} möglicherweise AMPA-Rezeptorströme moduliert (Übersicht von Paoletti et al., 2009), wurden AMPA/Kainat-Rezeptoren CNQX (25 μM) blockiert.

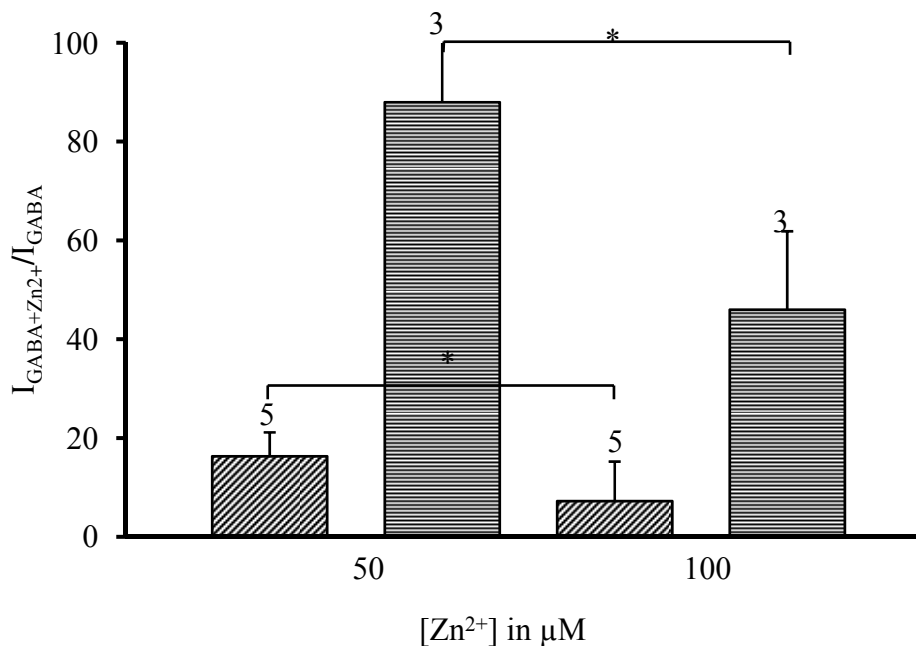


Abb. 4.14 GluR-Zellen exprimieren $GABA_A$ -Rezeptoren mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Zn^{2+} . Daher wurden Zellen, an denen 50 und 100 μM Zn^{2+} appliziert wurde ($n = 8$), in Gruppen eingeteilt. Sensitive Zellen (diagonal gestreifte Säulen, $n = 5$) zeigten schon bei 50 μM eine Reduktion der GABA-Antwort auf $16,4 \pm 4,8$ %, bei 100 μM Zn^{2+} wurden GABA-Antworten fast vollständig blockiert ($7,2 \pm 7,2$ %). GABA-Rezeptorantworten von insensitive Zellen wurden bei gleichen Konzentrationen auf $88,0 \pm 13$ % und $46,1 \pm 16,0$ % reduziert (horizontal gestreifte Säulen, $n = 3$). Beide Gruppen unterscheiden sich signifikant in ihren Antworten bei 50 und 100 μM Zn^{2+} . Na^+ , Ca^{2+} und K^+ -Ionenkanäle wurden mit der Blockierungslösung inhibiert, AMPA/Kainat-Rezeptoren mit CNQX (25 μM).

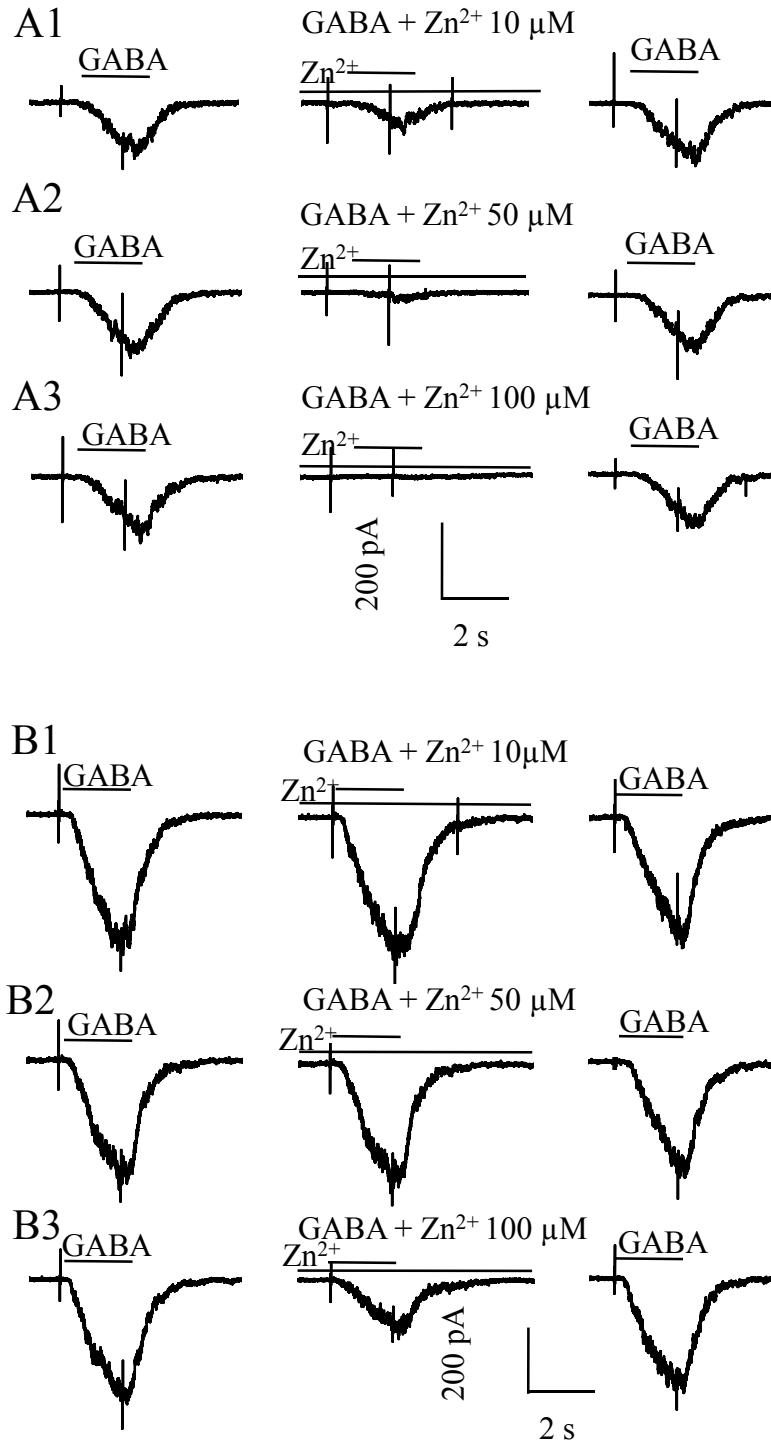


Abb. 4.15 Hippocampale GluR-Zellen exprimieren GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Zn²⁺. In dieser Abbildung ist je ein Beispiel für eine Zelle mit Zn²⁺-sensitiven GABA_A-Rezeptoren (A1-3) und eine Zelle mit Zn²⁺-insensitiven GABA_A-Rezeptoren dargestellt (B1-3). Die Zelle mit sensitiven GABA_A-Rezeptoren zeigte schon in Anwesenheit von 10 μM Zn²⁺ eine Reduktion auf 39 % der Kontrollamplitude (A1, Mitte), bei 50 μM Zn²⁺ betrug die Amplitude noch 11 % der Kontrolle (A2, Mitte), während durch die Applikation von 100 μM Zn²⁺ alle GABA_A-Rezeptorströme blockiert wurden (A3, Mitte). (B1-3) Bei der Zelle mit Zn²⁺-insensitiven GABA_A-Rezeptoren wurden GABA_A-Rezeptorströme erst durch 100 μM Zn²⁺ (B3, Mitte) auf 40 % der Kontrollamplitude reduziert, während die Applikation von 10 μM und 50 μM Zn²⁺ (B1, B2 Mitte) keine Inhibition der GABA-Antworten bewirkte.

Da die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen für die Expression von GABA_A-Rezeptoren mit $\alpha\gamma$ -Untereinheiten sprechen, liefert die heterogene Sensitivität der Rezeptorantworten gegenüber Zn²⁺ möglicherweise ein Indiz für eine unterschiedlich starke Expression der Zn²⁺-insensitiven α_1 -Untereinheit im Verhältnis zu den sensitiven α_2 -/ α_3 -Untereinheiten.

4.3.5 Charakterisierung der Expression der Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren mittels RT-PCR

Für die Analyse der Transkripte auf Einzelzellebene wurden GluR-Zellen aus akuten Schnitten gesammelt, für die spätere Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Mittels *Einzelzell RT PCR* wurden in einzelnen Zellen die Transkripte für die Untereinheiten des Rezeptors nachgewiesen (siehe Material und Methoden) (Abb. 4.16).

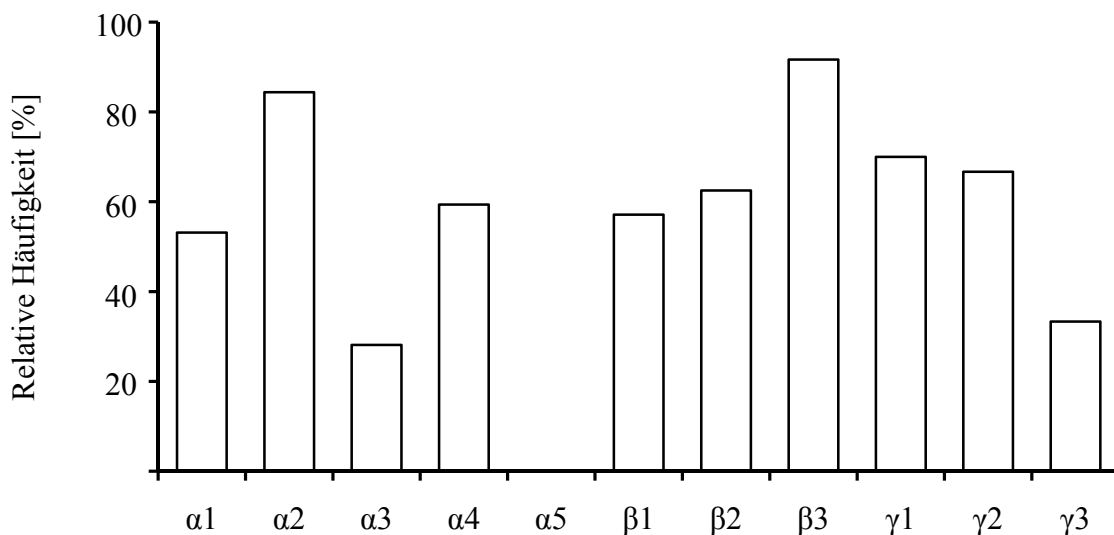


Abb. 4.16 Relative Häufigkeit der Transkripte von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in GluR Zellen. Individuelle GluR-Zellen wurden isoliert und mittels RT-PCR auf Transkripte der Untereinheiten untersucht (n = 29).

Die Untereinheit α_2 wurde in 84 %, die Untereinheiten α_4 (59 %) und α_1 (53 %) in etwa der Hälfte der analysierten GluR-Zellen gefunden. Die α_3 -Untereinheit kam in 29 % der Zellen vor, während die α_5 -Untereinheit nicht gefunden wurde. Die häufigste β -Untereinheit war β_3 , die in fast allen Zellen vorkam (92 %); β_1 wurde in 57 %, β_2 -Transkripte in 63 % der Zellen detektiert. Die häufigsten γ -Untereinheiten waren γ_1 und γ_2 mit jeweils 67 % und 64 %, γ_3 kam in 36 % der Zellen vor.

Die pharmakologischen Eigenschaften stimmen mit den Resultaten der Expressionsanalyse gut überein; Transkripte für $\alpha_{1,2}$ -, γ_2 - und $\beta_{2,3}$ -Untereinheiten waren aus den Versuchen zur Modulation der GABA_A-Rezeptoren mit Agonisten der BZ-Bindungsstelle, LOR und der Blockierung mit Zn²⁺ zu erwarten. Mittels RT-PCR wurde die Untereinheit α_4 häufig in GluR-Zellen gefunden. Diese Untereinheit könnte, wie in Nervenzellen, extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren bilden und durch Taurin aktiviert werden. Durch die molekulare Analyse wurde auch die Rezeptoruntereinheit γ_1 sehr häufig in GluR-Zellen gefunden, die heteromer mit anderen Rezeptoruntereinheiten exprimiert wird. Wie aus der blockierenden Wirkung von DMCM auf die GABA_A-Rezeptorantworten zu schlussfolgern ist, wird die γ_1 -Untereinheit, wahrscheinlich nur in geringer Menge auf zellulärer Ebene exprimiert.

4.4. GABA-Transporter in GluR-Zellen

Bisher wurden vier GABA-Transporter für die Maus kloniert (mGAT1-4), für einige sind spezifische Inhibitoren verfügbar. Die Nomenklatur der Transporter ist zwischen Ratte und Maus uneinheitlich. Der Maus GAT2-Transporter entspricht dem Betain-Transporter in der Ratte; dieser erkennt auch GABA als Substrat. Entsprechend unterscheiden sich die Bezeichnungen der Transporter-Isoformen (mGAT3 = GAT2, mGAT4 = GAT3) (siehe Übersicht von Schousboe et al., 2004). Der Maus-GAT1-Transporter (mGAT1) wird sehr stark auf GABAergen Axonendigungen im Hippocampus exprimiert, aber auch auf glialen Fortsätzen (Minelli et al., 1995; Ribak et al., 1996).

Akut isolierte GluR-Zellen wurden auf das Vorhandensein funktioneller GABA-Transporter getestet. Es wurde geprüft, ob GABA-Transporter-Antagonisten die Rezeptorantwort, die vorher durch Applikation von GABA (100 μ M) ausgelöst wurde, beeinflusst (Abb. 4.17). Koapplikation des GAT1-spezifischen, nicht-transportablen GABA-Transporter-Inhibitors SKF 89976A (100 μ M) reduzierte die Amplitude der GABA-induzierten Ströme nicht signifikant (93 ± 18 %, $n = 5$). Der Glia-spezifische GABA-Transporter mGAT4 befindet sich auf astrozytären Fortsätzen, die GABAerge Synapsen umhüllen (Ribak et al., 1996; Minelli et al., 1996). Der nichttransportable Inhibitor für mGAT3 und mGAT4-Transporter 1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]-ethyl]-(S)-3-Piperidincarboxylsäure (SNAP 5114, 100 μ M) reduzierte die Ströme in der Hälfte der getesteten Zellen auf 84 ± 8 % ($n = 5$). Nipecotinsäure ist ein unspezifischer transportabler Inhibitor für die GABA-Transporter mGAT1 und mGAT4, aber er inhibiert auch mGAT3 und mGAT4 (Krogsgaard-Larsen, 1980; Borden et al., 1994a; Übersicht von Schousboe et al., 2004). Die GABA-induzierten Ströme wurden

durch Nipecotinsäure nicht signifikant reduziert ($91 \pm 17 \%$, $n = 6$; Abb. 4.17 C). Der Transport von Nipecotinsäure kann Ströme auslösen, wenn diese in hohen Konzentrationen eingesetzt wird (Krogsgaard-Larsen, 1980). Es wurden jedoch keine Ströme bei GluR-Zellen induziert ($500 \mu\text{M}$, $n = 7$; Abb. 4.17 D). Schnelle Applikation des transportablen GABA-Transporterinhibitors β -Alanin (1 mM) (Borden et al., 1994b) induzierte Ströme mit kleiner Amplitude in 5 von 12 Zellen ($24 \pm 7 \text{ pA}$; Abb. 4.17 E1). Die entsprechenden Ströme - auf die Zelloberfläche bezogen - waren mindestens eine Größenordnung kleiner als die GABA-induzierten Ströme ($6,2 \pm 1,6 \text{ pA/pF}$ vs. $297 \pm 276 \text{ pA/pF}$). Schnelle Applikation des mGAT2-Agonisten Betain (1 mM) (Borden et al., 1995) verursachte keine Ströme in GluR Zellen ($n = 6$; Abb. 4.17 D).

Wegen der geringfügigen Inhibierung der GABA-induzierten Ströme durch SNAP-5114 und Nipecotinsäure sowie der Auslösung von Membranströmen bei Applikation von 1 mM β -Alanin kann die Expression von funktionellen GABA-Transportern vom mGAT3- oder mGAT-4-Typ in einem Teil der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Diese geringfügigen Effekte weisen bestenfalls auf einen geringen Anteil von Transportern auf GABA-vermittelte Ströme hin. Die Expression der Isoformen mGAT1 und mGAT2 ist wegen der geringen Effekte von SKF89976A und Nipecotinsäure, bzw. dem Ausbleiben eines Effekts von Betain, unwahrscheinlich.

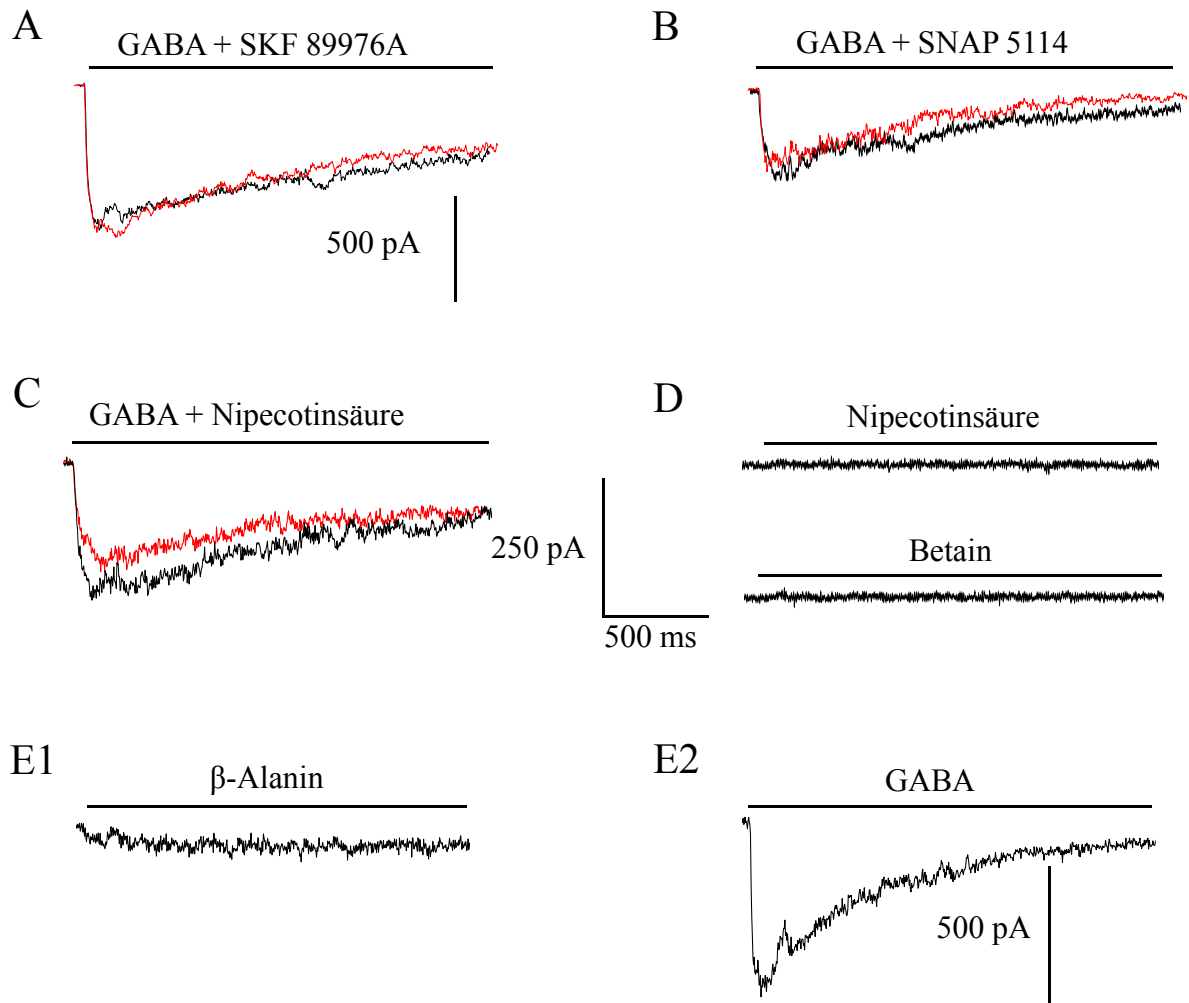


Abb. 4.17 *GluR*-Zellen exprimieren keine *mGAT1*- und *mGAT2*-Transporter. (A-C) Ströme wurden in akut isolierten Zellen durch schnelle Applikation von GABA ($100\ \mu\text{M}$) ausgelöst. Nipecotinsäure und SNAP 5114 (je $100\ \mu\text{M}$; Haltespannung $-70\ \text{mV}$; $[\text{Cl}^-]_i = 135\ \text{mM}$) reduzierten die Antworten, während SKF 89976A ($100\ \mu\text{M}$), ein *mGAT1* Inhibitor, keinen Effekt zeigte. (D) Weder Betain ($1\ \text{mM}$), ein Substrat von Betain/GABA Transportern, noch Nipecotinsäure ($500\ \mu\text{M}$), ein transportabler Antagonist von GABA Transportern, erzeugten Ströme in *GluR*-Zellen. (E) Nur β -Alanin ($1\ \text{mM}$; E1) zeigte eine schwache Antwort im Vergleich zu GABA in derselben Zelle (E2).

4.5 Charakterisierung von transienten Strömen nach de- und hyper-polarisierenden Spannungssprüngen in Anwesenheit von GABA

In den vorherigen Versuchen wurde die Modulation der GABA_A-Rezeptorantworten durch verschiedene allosterisch wirkende Substanzen beschrieben. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit dem Einfluss des Membranpotentials auf GABA induzierte Rezeptorströme.

Die GluR-Zellen wurden bei den Ableitungen in der Spannungsklemme gehalten und die Ionenflüsse beim Sprung von V_H von positiven zu negativen Potentialen untersucht.

In der Perforated-Patch-Konfiguration, bei nativem intrazellulärem Cl⁻-Milieu, wurden GluR-Zellen auf verschiedene V_H geklemmt. Während der Messungen wurden spannungsaktivierbare K⁺-Kanäle, Na⁺-Kanäle und Ca²⁺-Kanäle mit Blockierungslösung (siehe Material und Methoden, Punkt 2 Lösungen) blockiert, um Cl⁻-Ionenströme zu separieren. Durch die Applikation von GABA (500 μM) wurden Rezeptorströme ausgelöst, die bei $V_H = -70$ mV zu einem Cl⁻-Ausstrom führten (Abb. 4.18). Bei De- und Hyperpolarisation traten transiente Ströme auf, die in ihrem langsamen Abfall nicht den kapazitiven Umladeströmen entsprachen. Besonders deutlich traten diese Ströme bei der Repolarisation nach Sprüngen auf +20 bis +100 mV auf (Abb. 4.18 B). Diese Ströme wurden als *tail currents* bezeichnet.

In Anwesenheit von GABA wurde eine zeitabhängige Verschiebung des E_{Cl^-} in der Spannungsklemme festgestellt ($\Delta E_{Cl^-} = -27,25 \pm 10,37$ mV nach 8 s; $\Delta E_{Cl^-} = -40,75 \pm 4,11$ mV nach 24 s; n = 3). Daher könnten die *tail currents* auch mit wechselnden Ionenkonzentrationen erklärt werden. Bei depolarisierenden V_H in Anwesenheit von GABA fließen demnach Cl⁻-Ionen in die Zelle, bei Repolarisation auf depolarisierende V_H fließen diese akkumulierten Cl⁻-Ionen wieder hinaus. Dieser Vorgang könnte in transienten *tail currents* resultieren, die zusätzlich zu dem GABA_A-Rezeptorstrom auftreten. Vorausgesetzt wird dabei, dass mit der Änderung von E_{Cl^-} auch ein massiver Cl⁻-Ausstrom aus der Zelle stattfindet.

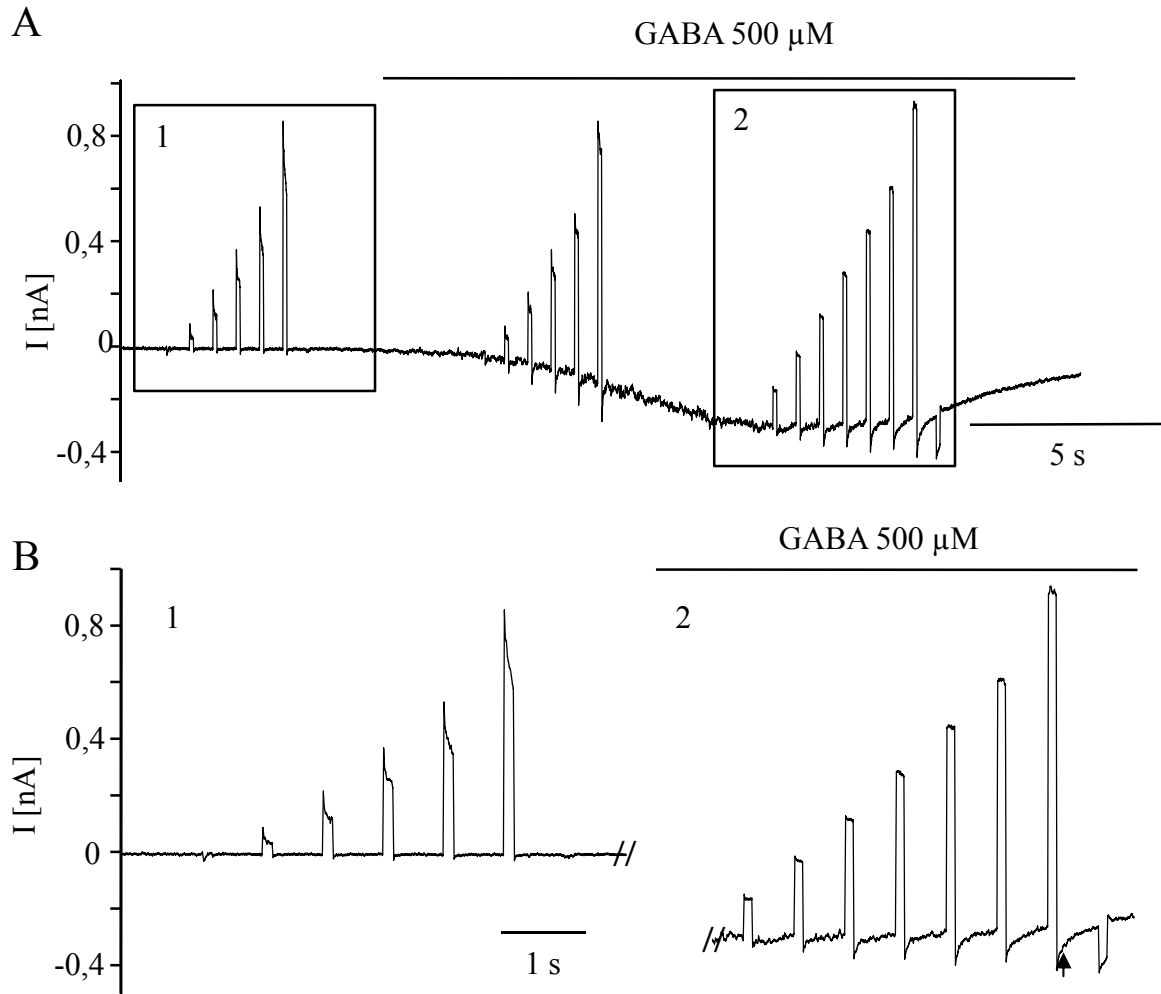


Abb. 4.18 Repolarisation von positiven V_H auf -70 mV während der Applikation von GABA an GluR-Zellen in der Perforated-Patch-Konfiguration löste zusätzliche, transiente Ströme aus. (A) Es wurden fortlaufend je 8 Sprünge auf verschiedene Potentiale (-40 mV, -20 mV, 0 mV, 20 mV, 40 mV, 60 mV, 100 mV, -100 mV) durchgeführt, ausgehend von $V_H = -70$ mV. (A, B rechts) Bei Repolarisation traten transiente tail currents auf (Pfeil). Diese tail currents werden vermutlich durch den Ausstrom von Cl^- -Ionen verursacht, die während der vorangegangenen Depolarisation an der Innenseite der Zellmembran akkumulierten. (B) Die Amplitude der tail currents hängt von der Stärke der vorangegangenen Depolarisation ab. Während der Messungen wurden spannungsaktivierte K^+ -Kanäle, Na^+ -Kanäle und Ca^{2+} -Kanäle sowie einwärts-gerichtete K^+ -Kanäle mit Blockierungslösung inhibiert.

Bei Nervenzellen im Neokortex wurde ein ähnliches Phänomen bei GABA_A -Rezeptoraktivierung beschrieben (DeFazio und Hablitz, 2001). GABA wurde bei einem $V_H > E_{\text{Cl}^-}$ appliziert und löste einen Auswärtsstrom aus. Wurde $V_H = E_{\text{Cl}^-}$ gesetzt trat wider Erwarten ein transienter einwärts-gerichteter Strom auf. Die Autoren schlossen daraus, dass sich E_{Cl^-} geändert hatte und sich nun wieder auf den ursprünglichen Wert einstellt. Sollte sich die Ionenkonzentration der Zelle tatsächlich ändern, so müssten die auftretenden tail currents abhängig von der Depolarisationsdauer sein. Diese Vorhersage wurde in Ganzellableitungen

bestätigt. Daher wurde von einer Akkumulation von Cl^- während depolarisierendem V_H ausgegangen.

Es wurde jedoch nicht diskutiert, dass Ionen stets aus der Pipette nachfließen können und einer Änderung von $[\text{Cl}^-]$ entgegenwirken. Ein alternatives Modell wäre die Akkumulation bzw. Depletion der Cl^- über der Zellmembran. Die Ionen akkumulieren nahe der Öffnungen des Rezeptorkanals an der Innen- und Außenseite der Membran und werden deshalb schneller aus der Zelle befördert. Nach diesem Modell sollte die Größe der *tail currents* ebenfalls von der Dauer der Depolarisation abhängen.

In den folgenden Experimenten wollten wir unsere Hypothese mittels Ganzzelleableitung bestätigen. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die Größe der Amplituden der *tail currents* (i) von der Dauer der vorangegangenen Depolarisation ($n = 7$) und (ii) von der Stärke der Depolarisation abhängt ($n = 4$) (Abb. 4.19).

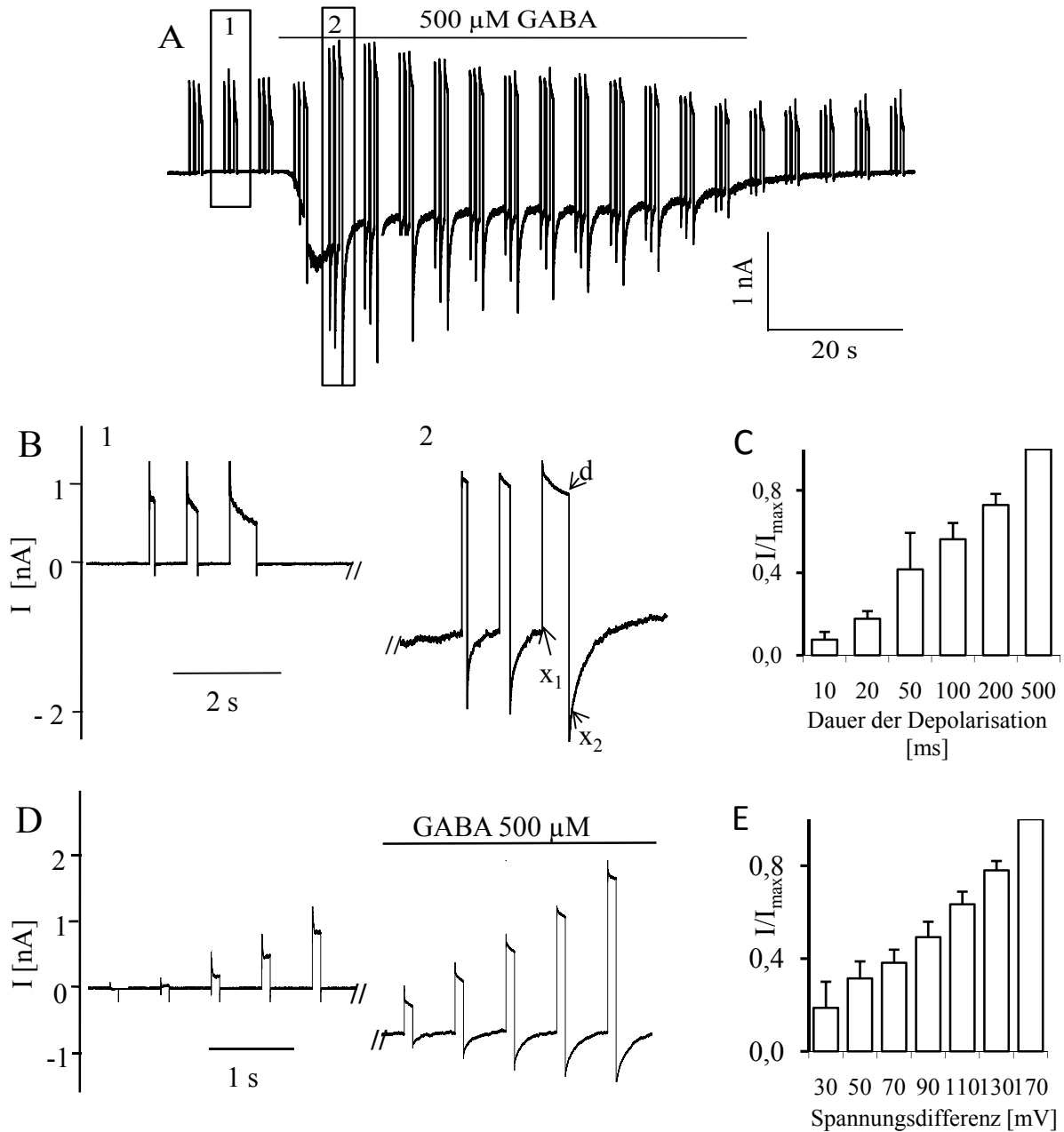


Abb. 4.19 In der Ganzzelleableitung traten in Anwesenheit von GABA ($500 \mu\text{M}$) tail currents in GluR-Zellen auf. (A, B) Bei Repolarisation traten in Anwesenheit von GABA transiente tail currents auf. (A) GABA wurde 1 min lang appliziert (ca. 4 ml). (A, B) Es wurden fortlaufend depolarisierende Spannungssprünge auf $+20 \text{ mV}$ durchgeführt, ausgehend von $V_H = -70 \text{ mV}$. (B, C) Bei länger andauernder Depolarisation wurden tail currents mit größerer Amplitude beobachtet ($n = 7$). Die Amplituden der tail currents wurden als die Differenz aus $x_2 - x_1$ festgelegt. Der Punkt x_1 ist der letzte Messpunkt bei $V_H = -70 \text{ mV}$ vor dem Spannungssprung, x_2 ist der Messpunkt 8 ms nach der Depolarisation. Zu diesem Zeitpunkt sind die kapazitiven Umladeströme bereits abgefallen. Diese Werte wurden gegen die Depolarisationsdauer aufgetragen. (D, E) Es wurde auch eine Korrelation der tail current-Amplitude und der Höhe der Spannungssprünge bei konstanter Depolarisationsdauer von 100 ms festgestellt ($n = 4$). Die Stromamplituden wurden gegen die entsprechende Spannungsdifferenz (30, 50, 70, 90, 110, 130, 170 mV; ausgehend von $V_H = -70 \text{ mV}$) aufgetragen. Mit der Blockierungslösung wurden indirekte Effekte reduziert und Kationen-Leitfähigkeiten blockiert.

Eine mögliche Akkumulation von Cl^- würde sich in der Verschiebung des Umkehrpotentials äußern. Daher wurde das Umkehrpotential der *tail currents* bei verschiedenen langer Depolarisation bestimmt.

Mit länger andauernder Depolarisation konnte eine Verschiebung des Umkehrpotentials beobachtet werden (Abb. 4.20). Für diese Messungen wurde eine Cs-Glukonat Innenlösung mit erniedrigter $[\text{Cl}^-]$ verwendet. Bei kurzer Depolarisation ($V_H = +20 \text{ mV}$; 10 ms) wurde eine Umkehrpotential von $-36.84 \pm 0,76 \text{ mV}$ nach Applikation von GABA ($500 \mu\text{M}$) gemessen. Eine längere Depolarisation ($V_H = +20 \text{ mV}$; 200ms) bewirkte eine signifikante Änderung des Umkehrpotentials auf $-33,16 \pm 1,86 \text{ mV}$ ($n = 4$). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Hypothese, dass nach GABA_A -Rezeptoraktivierung und Depolarisation Cl^- in GluR-Zellen akkumuliert. Dies entspricht einer Änderung der $[\text{Cl}^-]_i$ von 39 mM auf 45 mM.

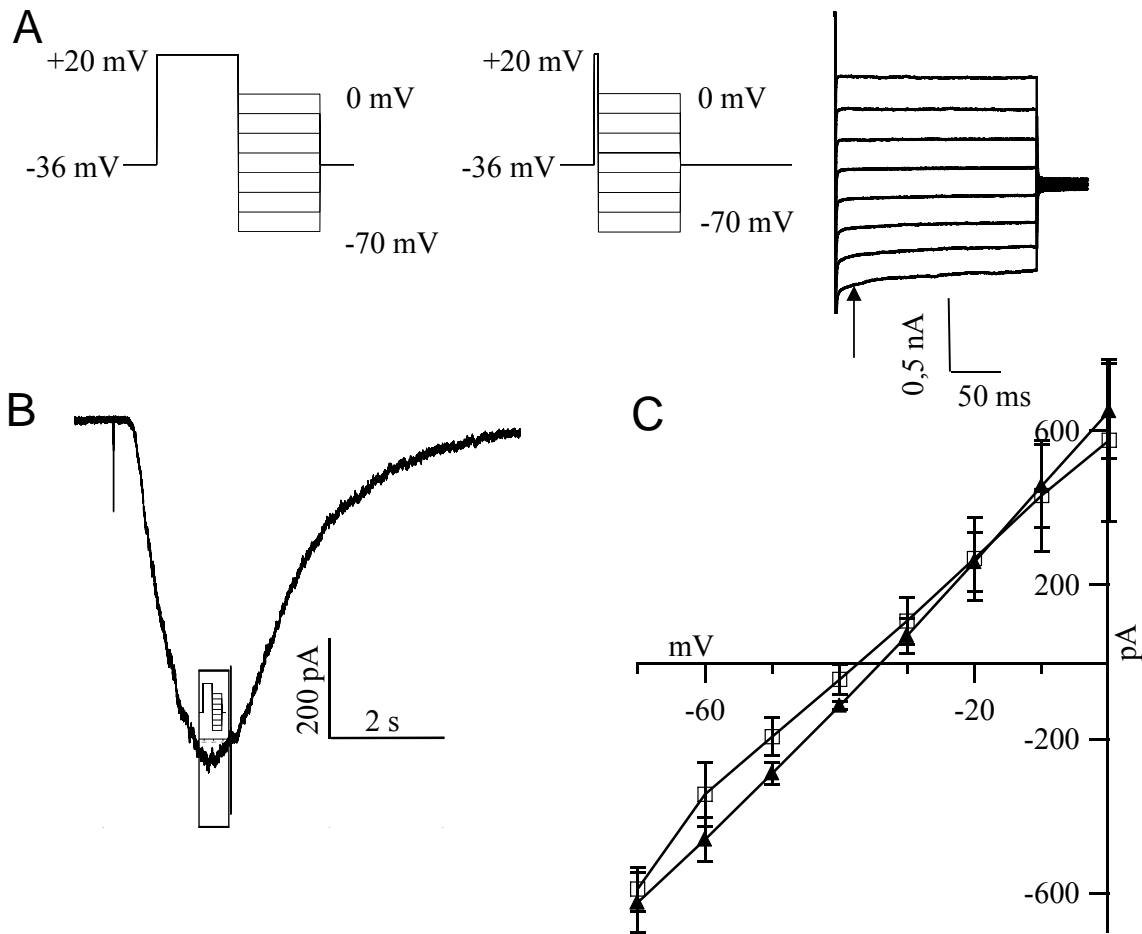


Abb. 4.20 Längere Depolarisation in Anwesenheit von GABA ($500 \mu\text{M}$) führt zu einer Verschiebung von E_{Cl} . **A)** GluR-Zellen wurden ausgehend von -36 mV jeweils 10 und 200 ms auf $+20 \text{ mV}$ gehalten und im Anschluss auf verschiedene Potentiale von -70 bis 0 mV geklemmt. Bei negativen Potentialen traten tail currents auf. **B)** Die Messungen wurden bei jeweils maximaler Rezeptorantwort durchgeführt. Der Zeitpunkt der Depolarisation wurde durch Applikation von GABA bei $V_{\text{H}} = -70 \text{ mV}$ bestimmt. **C)** Die Amplituden 8 ms nach dem Rücksprung (A, Pfeil) wurden gegen die entsprechenden Spannungen aufgetragen. Dargestellt sind die gemittelten Amplituden von $n = 4$ Zellen mit den zugehörigen Standardabweichungen. Bei einer 200 ms langen Depolarisation (Dreiecke) wurde eine signifikante Verschiebung des E_{Cl} im Vergleich zu 10 ms (Quadrate) beobachtet (von $-36,84 \pm 0,76 \text{ mV}$ auf $-33,16 \pm 1,85$; $n = 4$). Dies entspricht einer Änderung des $[\text{Cl}]_{\text{i}}$ von 39 auf 45 mM . Zur Isolierung von Cl^- -Strömen wurde das K^+ in der Pipettenlösung durch Cs^+ ersetzt und Blockierungslösung verwendet. Die Membranströme, die ohne GABA-Applikation aufgenommen wurden, wurden von den gemessenen Strömen in Anwesenheit von GABA subtrahiert.

Die tail currents in GluR-Zellen werden durch spezifische GABA_{A} -Rezeptoraktivierung ausgelöst. Applikation des AMPA-Rezeptor-Agonisten Kainat erzeugte einen Einwärtsstrom, es wurden jedoch keine tail currents ausgelöst ($n = 11$, Abb. 4.21). AMPA-Rezeptoren sind für Na^+ und K^+ -Ionen permeabel. Möglicherweise können an der Zellmembran nahe des Kanals keine K^+ und Na^+ -Ionen akkumuliert werden.

AMPA-Rezeptoren zeigten jedoch einen anderen interessanten Effekt. Ihre Aktivierung blockiert K_{ir} -Kanäle. Der Mechanismus ist unabhängig von Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden

und kann durch intrazelluläre Perfusion mit hohen Na^+ -Konzentrationen nachgeahmt werden (Schroder et al., 2002). Dieser Effekt könnte durch lokal erhöhte Na^+ -Konzentrationen ausgelöst werden.

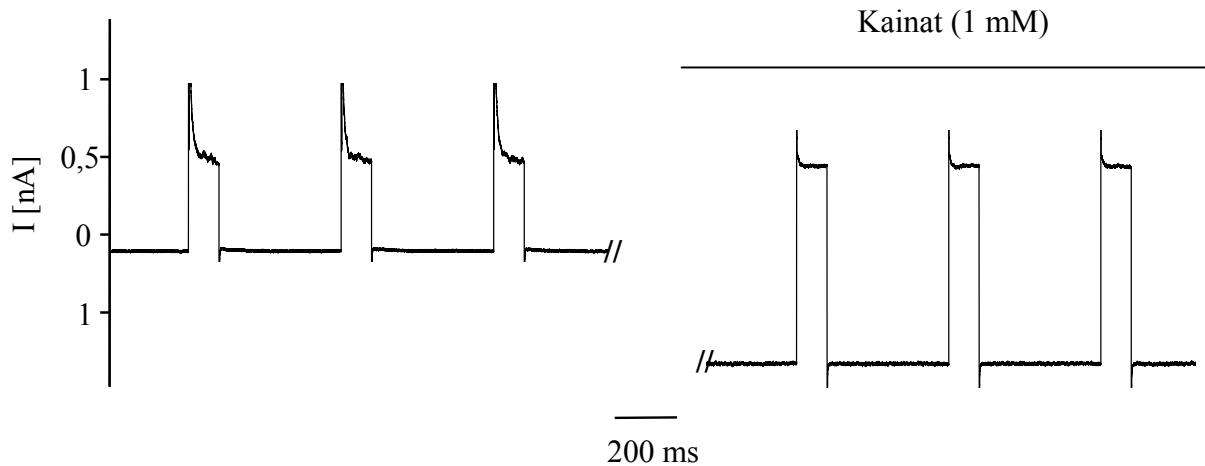


Abb. 4.21 Applikation des AMPA Rezeptor Agonisten Kainat löste Rezeptorströme aus, jedoch keine tail currents. Applikation von Kainat (1 mM) in der Ganzzelleableitung führte zu größeren Auswärtsströmen (rechts) bei Depolarisation (+20 mV für 100 ms alle 0.5 s) und zu stärkeren Einwärtsströmen bei $V_H = -70$ mV im Vergleich zu den Amplituden vor der Applikation (links). Beim Rücksprung auf -70 mV traten keine tail currents auf, die kleinen schnellen Ströme sind kapazitive Umladeartefakte. Die Messungen wurden in Gegenwart der Blockierungslösung durchgeführt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in GluR-Zellen bei GABA_A -Rezeptoraktivierung transiente Ströme auftreten, sogenannte *tail currents*, die durch die kurzzeitige Änderung von V_H ausgelöst werden. Die Amplitude dieser Ströme ist abhängig von der Dauer und Größe der Änderung von V_H . Eine längere Änderung von V_H bewirkte außerdem eine Verschiebung des E_{Cl^-} . Dieser Befund legt eine intrazelluläre Akkumulation von Cl^- bei Depolarisation nahe.

4.6 Analyse von P_2X -Rezeptoren in Gliazellen.

P_2X -Rezeptoren in Gliazellen wurden in aktuellen Modellen zur Neuron-Glia-Kommunikation diskutiert (Haydon und Carmignoto, 2006), jedoch wurden funktionelle gliale P_2X -Rezeptoren bisher nie in akuten Präparaten nachgewiesen. Auf ihr Vorhandensein deuten nur indirekte Effekte hin. In dieser Arbeit soll mittels schneller Applikation untersucht werden, ob funktionelle P_2X in hippocampalen Astrozyten und GluR-Zellen vorkommen, um eine mögliche Rolle dieser Rezeptoren in der Neuron-Glia-Kommunikation zu validieren.

4.6.1 Schnelle Applikation von ATP durch Photolyse erzeugt keine P2X-Rezeptor-vermittelten Ströme in GluR-Zellen und Astrozyten der Maus

Das erste Ziel war, P2X-Rezeptoren in Gliazellen des Hippocampus der Maus in situ nachzuweisen. Einige P2X-Rezeptoren, die aus P2X₁ oder P2X₃ Untereinheiten bestehen und bei der Modulation der Neurotransmission im Hinterhorn des Rückenmarks eine wichtige Rolle spielen, desensibilisieren im Bereich von Millisekunden (Übersicht von North, 2002). Daher ist für einen funktionellen Nachweis dieser Rezeptoren eine schnelle Applikation von ATP erforderlich. Eine Methode zur schnellen Freisetzung von Transmittern in akuten Schnitten ist die fokale photolytische Spaltung von inaktiven, gekapselten Agonisten. Als Substrat diente uns ATP-P3-(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl) Ester (DMNPE-ATP, auch als DMNPE caged-ATP bezeichnet) das durch UV-Blitzlichtphotolyse ATP freisetzt (Rapp und Guth, 1988; Grote et al, 2005). Das ATP-spaltende Enzym Apyrase (0,3 Einheiten/ml) wurde mit dem Substrat koappliziert, um endogenes ATP abzubauen, das in Spuren in DMNPE-ATP enthalten ist. So wurde eine vorherige Desensibilisierung von Rezeptoren durch geringe ambiente ATP-Konzentrationen ausgeschlossen. Die Aktivierung von metabotropen A₁-Rezeptoren, die durch Adenosin aktiviert werden, wurde durch den Blocker DPCPX (1 µM) verhindert. Mit TTX (1 µM) wurden Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen und die damit verbundene neuronale Transmitterfreisetzung unterbunden. Die Freisetzung von ATP durch Blitzlichtphotolyse von DMNPE-ATP (100 µM) erzeugte keine Rezeptorströme in GluR Zellen (n = 7) (Abb. 4.22 A) oder Astrozyten (n = 6) (Abb. 4.22 B). Eine Kontrollapplikation an einer Mikrogliazelle löste jedoch eine Antwort aus (Abb. 4.22 C2). An diesen Zellen wurden bereits funktionelle P2X-Rezeptoren in situ nachgewiesen (Farber und Kettenmann, 2006). Bei allen Applikationen wurden die Zellen in der Ganzzelleableitung bei V_H = -70 mV gehalten. Die Ergebnisse ließen nicht darauf schließen, dass in akuten Gehirnschnitten von tg(hGFAP/EGFP) Mäusen Astrozyten oder GluR-Zellen funktionelle P2X-Rezeptoren exprimieren. (Jabs et al., 2007).

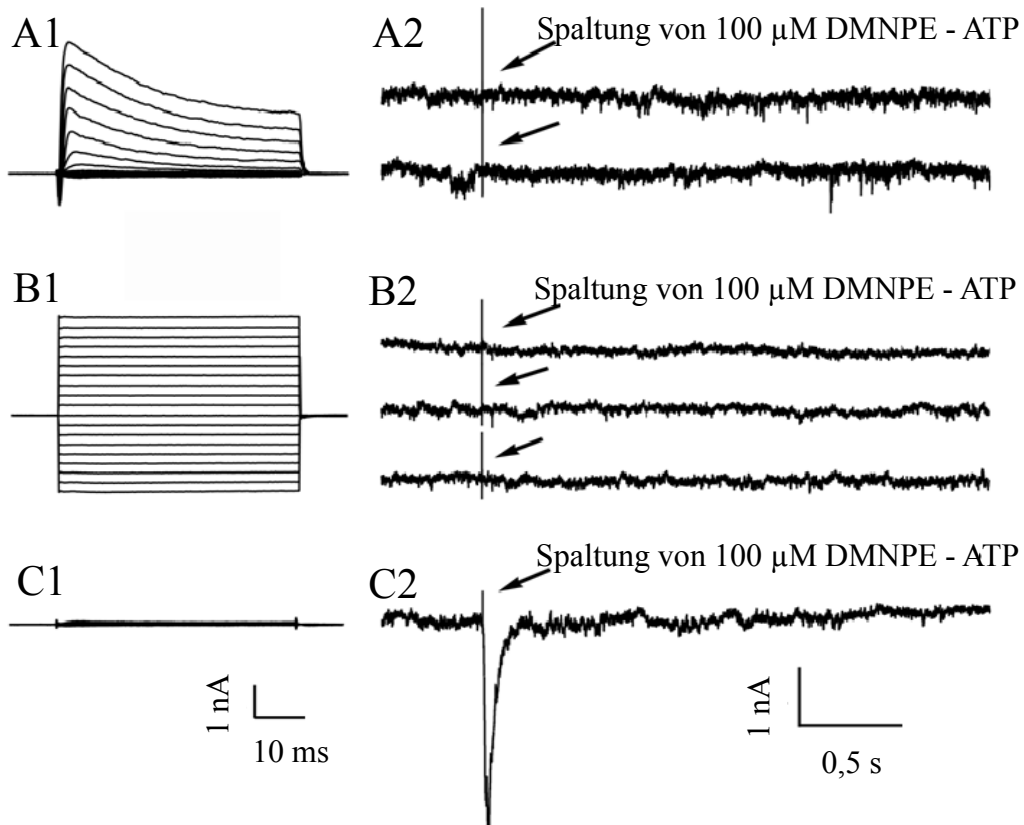


Abb. 4.22 ATP-Freisetzung durch Photolyse im Hippocampus erzeugte keine P2X-Rezeptorströme in Astrozyten und GluR-Zellen. Dargestellt sind die exemplarischen Antworten auf Photolyse von DMNPE-ATP ($100 \mu\text{M}$) in GluR Zellen (A2), Astrozyten (B2) und Mikrogliazellen (C2). Die Messungen wurden in Anwesenheit des A_1 -Rezeptor Blockers DPCPX ($1 \mu\text{M}$), von TTX ($1 \mu\text{M}$) und dem ATP spaltenden Enzym Apyrase ($0,2$ Einheiten/ml) durchgeführt. Photolyse von DMNPE-ATP löste nur in Mikrogliazellen P2X-Rezeptorströme aus (72 pA ; $20\text{-}80 \%$ Anstiegszeit, 6 ms ; monoexponentielle Abnahme der Ströme, Zeitkonstante $\tau = 36 \text{ ms}$). Die Zellen wurden bei $V_H = -70 \text{ mV}$ analysiert (aus Jabs et al., 2007). Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Blitzlichtphotolyse von DMNPE-ATP an.

4.6.2 Applikation von ATP und P2X-Rezeptoragonisten an hippocampalen GluR-Zellen der Ratte und in humanen Resektaten erzeugte keine Rezeptorströme

Als nächstes wurde überprüft, ob funktionelle P2X-Rezeptoren in anderen Spezies vorhanden sind. P2X-Rezeptor-vermittelte Ströme konnten weder in hippocampalen GluR-Zellen in Gehirnschnitten der Ratte noch im humanen hippocampalen Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 4.23 A, B). Das humane Gewebe stammt von Epilepsie-Patienten, die an pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie litten und sich daher einem chirurgischen Eingriff unterziehen mussten (siehe Material und Methoden).

Es wurden neben ATP verschiedene P2X-Rezeptoragonisten appliziert, die spezifischer an bestimmte Rezeptoruntereinheiten binden. Der Agonist $\alpha\beta$ -Methylen-ATP aktiviert homomere P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren sowie Rezeptoren, die P2X_{6/1}- oder P2X_{6/3}-

Untereinheiten enthalten. P2X₄- und P2X₂-Rezeptoren reagieren nicht auf diesen Agonisten, jedoch auf ATP und können dadurch von den vorher genannten Rezeptoruntereinheiten unterschieden werden. Die Wirkung von Bz-ATP ist an P2X₇-Rezeptoren stärker als die von ATP (Übersicht von North, 2002), der Agonist wirkt jedoch auch als Agonist anderer P2X-Rezeptoren.

Bei der Ratte konnten durch fokale Applikation mit dem DAD12-Applikationssystem *in situ* keine Ströme in Gliazellen ausgelöst werden (Abb. 4.23 B: ATP, n = 16; $\alpha\beta$ -Methylen-ATP, n = 15; BzATP, n = 14). Die schnelle Applikation der Agonisten an akut isolierten GluR-Zellen zeigte ebenfalls keinen Effekt (Abb. 4.23 C: ATP, 100 μ M, n = 9; $\alpha\beta$ -Methylen-ATP, 100 μ M, n = 8; BzATP, 30 μ M, n = 4). Im humanen Hippocampus induzierte fokale Applikation von P2X-Rezeptoragonisten an GluR-Zellen in akuten Schnitten ebenso keine Antworten (Abb. 4.23 A; ATP, 100 μ M, n = 4; $\alpha\beta$ -Methylen-ATP, 100 μ M, n = 3; BzATP, 30 μ M, n = 3). Als Positivkontrolle wurden die Substanzen an ektopisch exprimierten Rezeptoren auf ihre Wirksamkeit getestet (Abb. 4.23 D). Fokale Applikation an P2X₃-transfizierten HEK293-Zellen von ATP und Rezeptoragonisten konnte reproduzierbar Ströme in diesen Zellen auslösen (ATP 30 μ M, 1137 ± 710 pA, n = 16; $\alpha\beta$ -Methylen-ATP 30 μ M 1088 ± 217 pA, n = 31; BzATP 30 μ M, 944 ± 470 pA, n = 26) (Jabs et al., 2007).

Zusammenfassend lieferten diese Ergebnisse keinen Hinweis auf die Expression funktioneller P2X₇-Rezeptoren in Astrozyten und GluR-Zellen im Hippocampus von Mensch und Ratte.

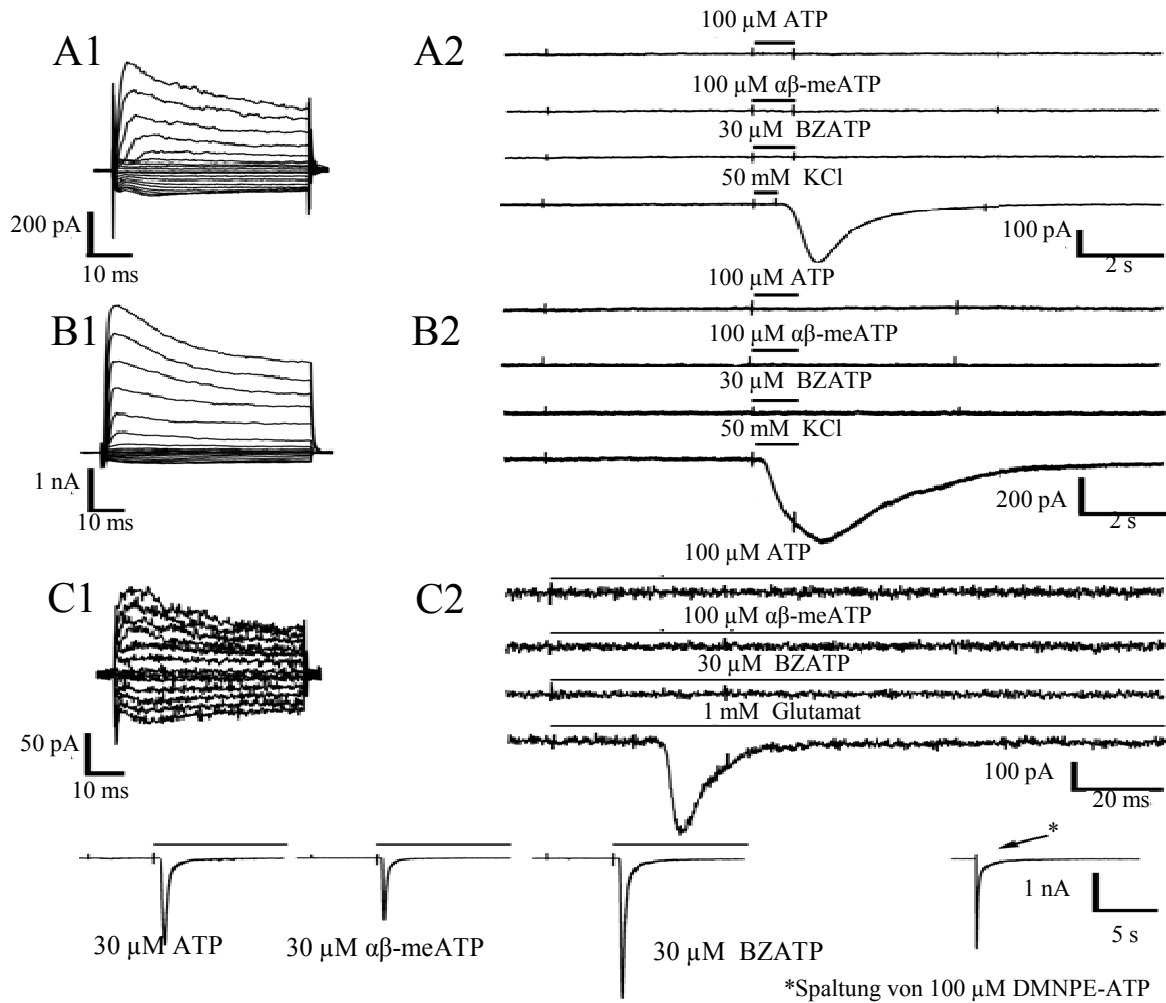


Abb. 4.23 Hippocampale GluR-Zellen in humanem Gewebe (A) und der Ratte (B) weisen keine P2X-Rezeptorströme auf. Abgebildet sind Ableitungen von GluR-Zellen aus der CA1-Region im humanen Gewebe (A1, in situ) und der CA1-Region der Ratte (B1 in situ, C1 akut isolierte Zelle). Nach Applikation von ATP (100 μ M), $\alpha\beta$ -Methylen-ATP (100 μ M) und Bz-ATP (30 μ M) wurden keine Einwärtsströme beobachtet (A2, B2). Kontrollapplikation von KCl (50 mM), die vitale Zellen depolarisiert, löste Ströme zwischen 168 und 463 pA aus (A2, B2) ($V_H = -70$ mV). (C) Untersuchungen isolierter Zellen ergab ebenfalls keinen Hinweis auf die Existenz funktioneller P2X-Rezeptoren. Die Kontroll-Applikation von Glutamat erzeugte eine Rezeptorantwort von 334 pA (C2), während ATP und ATP-Rezeptoragonisten keine Rezeptorantworten auslösten. (D) P2X₃-Rezeptor transfizierte HEK293 Zellen dienten als Positivkontrolle für die ATP-Rezeptoragonisten und die jeweilige Applikationsmethode. Fokale Applikation von ATP, $\alpha\beta$ -Methylen-ATP und Bz-ATP induzierte Ströme von 2,4 nA, 1,7 nA und 3,8 nA (D1). Blitzlicht-Photolyse von DMNPE-ATP in Anwesenheit von Apyrase (0,2 Einheiten/ml) erzeugte einen Einwärtsstrom von 2,5 nA (D2) (aus Jabs et al., 2007).

4.6.3 ATP verursacht Einwärtsströme in Astrozyten unter Ca²⁺ und Mg²⁺ freien Bedingungen, die nicht durch P2X₇-Rezeptoren vermittelt werden

Die vorangegangenen Experimente zeigten keine Hinweise auf die Expression funktioneller P2X-Rezeptoren in GluR-Zellen und Astrozyten im Hippocampus. Da sich P2X₇-Rezeptoren in ihren pharmakologischen Eigenschaften von den übrigen P2X-Rezeptoren durch ihre relativ niedrige Affinität zu ATP und $\alpha\beta$ -Methylen-ATP unterscheiden und sie zusätzlich

durch divalente Ionen inhibiert werden, bestand die Möglichkeit, dass die Rezeptorantworten sehr klein waren und bisher übersehen wurden (Übersicht von North, 2002; Sperlagh et al., 2006). Daher wurden Messungen in Außenlösungen durchgeführt, die keine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen enthielten. Außerdem wurde ATP in höheren Konzentrationen appliziert. In Gehirnschnitten erzeugt die Substitution zweiwertiger Kationen Hyperaktivität und wird als Epilepsie-Modell genutzt (Mody et al., 1987; Yaari et al., 1983). Diese Hyperaktivität wurde durch Blockierung von Glutamatrezeptoren (Kynurensäure, 1 mM) sowie Inhibition der Weiterleitung von Aktionspotentialen und Transmitterfreisetzung (Cd^{2+} , 30 μM ; TTX, 1 μM) unterdrückt. Spannungsaktivierte und einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle wurden durch Tetra-Ethyl-Ammonium-Chlorid (TEA, 5 mM) und BaCl_2 (2 mM) reduziert, metabotrope Adenosin A_1 Rezeptoren wurden durch DPCPX (1 μM) blockiert. Diese Lösungen wurden für Messungen an akut isolierten Astrozyten (Abb. 4.24 A) und Astrozyten in akuten Gehirnschnitten (Abb. 4.24 B) verwendet.

Der P2X_7 -Rezeptoragonist BzATP (20 μM) wurde an akut isolierte Astrozyten appliziert. Drei von vier getesteten Zellen zeigten keine Rezeptorströme (Abb. 4.24 A1), eine Zelle jedoch einen kleinen Einwärtsstrom von 40 pA ($V_{\text{H}} = -60$ mV). Daher wurde überprüft, ob ATP-induzierte Ströme durch den P2X_7 -Antagonisten Brilliant Blue G (BBG) blockiert werden. In allen getesteten Astrozyten rief 1 mM ATP in Ca^{2+} und Mg^{2+} freier Lösung Einwärtsströme hervor (106 ± 67 pA, $n = 10$). Diese Antworten zeigten eine lineare Strom-Spannungs-Kennlinie mit einem Umkehrpunkt nahe 0 mV. Koapplikation von BBG (10 μM) zusammen mit ATP (1 mM) konnte diese Ströme nie reduzieren oder den Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie verändern (Abb. 4.24 A2). Höhere ATP Konzentrationen (bis zu 3 mM) erzeugten größere Ströme (499 ± 238 pA, $n = 4$), ohne die Form der Strom-Spannungs-Kennlinie zu ändern. Besonders hervorzuheben ist der Befund, dass Applikation von ADP (3 mM), welches kein P2X_7 -Rezeptoragonist ist, Membranströme mit ähnlicher Amplitude verursachte (178 ± 161 pA, $n = 3$) (Abb. 4.24 A3). Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass ATP induzierte Antworten in Ca^{2+} und Mg^{2+} -freien Lösungen durch P2X_7 -Rezeptoren vermittelt werden.

Für eine eindeutige Klärung dieser Frage benutzten wir Gehirnschnitte von jungen P2X_7 -Knockout-Mäusen. Alle Astrozyten (156 ± 119 pA, $n = 6$) und alle GluR-Zellen (44 ± 19 pA, $n = 5$), die in den $\text{P2X}_7^{-/-}$ Mäusen getestet wurden, zeigten Stromantworten auf die Applikation von ATP (3 mM) in Abwesenheit von extrazellulärem Mg^{2+} und Ca^{2+} (Abb. 4.24). Diese Ergebnisse zeigten, dass die hier beobachteten ATP-induzierten Ströme nicht von

funktionellen P2X₇-Rezeptoren verursacht wurden.

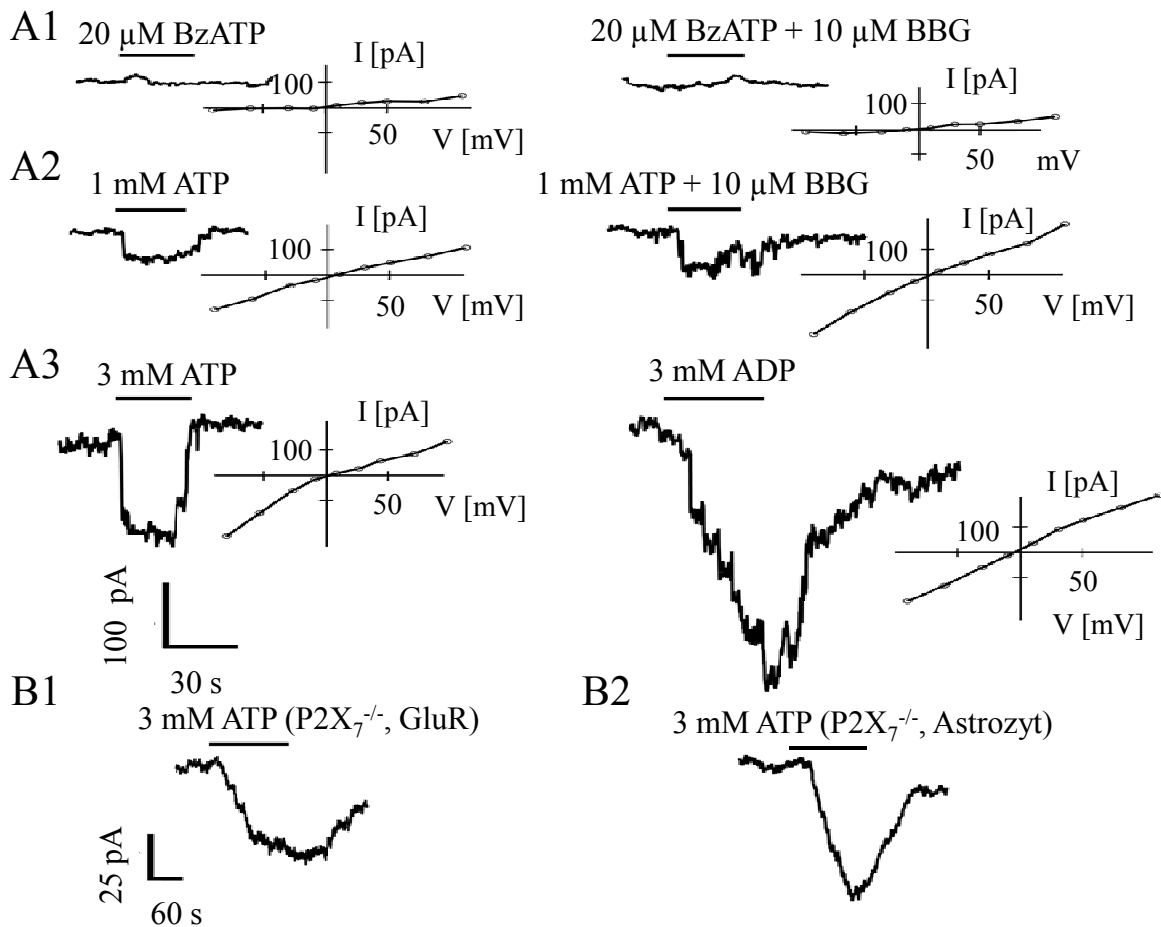


Abb. 4.24 Astrozyten und GluR-Zellen zeigen keine P2X₇-Rezeptor-vermittelten Ströme. Alle Aufnahmen wurden in nominal Ca²⁺ und Mg²⁺ freier Lösungen durchgeführt, zugesetzt wurden Kynurensäure (1 mM), Cd²⁺ (30 μM), TTX (1 μM), TEA (5 mM), BaCl₂ (2 mM) und DPCPX (1 μM). (A) An akut isolierten Astrozyten aus Gehirnen von [tg(hGFAP/EGFP)] Mäusen wurden P2X₇-Rezeptoragonisten getestet. Abgebildet sind die entsprechenden Strom-Spannungs-Kennlinien und die Ströme bei einem Haltepotential bei -60 mV. (A1) Applikation von BzATP (20 μM) erzeugte keine Einwärtsströme. Die kleinen Auswärtsströme bei positiven Spannungen waren nicht sensitiv gegenüber dem P2X₇-Rezeptor-Antagonisten BBG (10 μM) (vor und in BBG: 23 pA und 37 pA bei +80 mV). (A2) Hohe ATP Konzentrationen (1 mM) verursachten BBG (10 μM)-insensitive Membranströme mit einer linearen Strom-Spannungs-Kennlinie (vor und in BBG: -41 und -52 pA bei -60 mV; Umkehrpotential bei 4 und -3 mV). (A3) Neben ATP (3 mM) löste auch ADP (3 mM) Antworten aus (-158 und -359 pA von -60 mV; Umkehrpotential bei 4 und -3 mV). (B) In akuten Hirnschnitten von P2X₇-Knockout-Mäusen (p10) induzierte ATP (3 mM) reversibel Einwärtsströme (-60 mV), hier sind exemplarische Antworten einer GluR Zelle (B1; 52 pA) und eines Astrozyten (B2; 76 pA) dargestellt (aus Jabs et al., 2007).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen analysiert sowie die Konsequenzen der Rezeptoraktivierung untersucht. In einem weiteren Teil der Arbeit wurde überprüft, ob GluR- und GluT-Zellen der CA1-Region des Hippocampus funktionelle P2X-Rezeptoren exprimieren.

5.1 Charakterisierung von GABA_A Rezeptoren in GluR-Zellen

Wir untersuchten GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen in juvenilen [tg(hGFAP/EGFP)] Mäusen (p8 - 13). Diese Zellen hatten eine schwache Grünfluoreszenz und kleine Somata mit dünnen Fortsätzen, die eine geringe Verzweigung aufwiesen (Fig. 2.1 A). Sie besaßen ein komplexes Strommuster (Abb. 2.1 A) wie es bereits in Gliazellen des Hippocampus beschrieben wurde (Steinhäuser et al., 1994). GluR-Zellen, die innerviert wurden, exprimierten das Proteoglykan NG2 (Jabs et al., 2005). Im Hippocampus der Ratte wurden auf den Somata von Gliazellen, die ebenfalls ein komplexes Strommuster und NG2-Expression aufwiesen, neuronale Synapsen nachgewiesen (Lin und Bergles, 2004).

Bei GluR-Zellen ist über die Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoren und deren funktionellen Eigenschaften wenig bekannt. Daher untersuchten wir GABA_A-Rezeptoren an akut isolierten Zellen und in Gehirnschnitten. Isolierte Zellen bieten den Vorteil, dass indirekte Effekte durch umliegende Zellen vermieden werden und eine schnellere Applikation von Agonisten möglich ist. In Gehirnschnitten ist eine Untersuchung unter physiologischeren Bedingungen möglich. Die Zellen sind in ihrer zellulären Umgebung und die synaptische Innervierung bleibt erhalten. Die Transkription von Untereinheiten in einzelnen GluR-Zellen wurde mittels RT-PCR analysiert.

5.1.1 Rezeptordichte und kinetische Eigenschaften von akut isolierten GluR-Zellen

Wir konnten funktionelle GABA_A-Rezeptoren in akut isolierten GluR-Zellen aus jungen Mäusen (p8 - 12) nachweisen. Sowohl GABA als auch der GABA_A-Rezeptoragonist Muscimol lösten in allen untersuchten Zellen Ströme aus. Diese konnten mit dem spezifischen GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin fast vollständig blockiert werden. Glycin-induzierte Ströme, die in Gliazellen des Rückenmarks vorkommen (Kirchhoff et al., 1996), wurden in GluR-Zellen des Hippocampus nicht nachgewiesen.

Erste Nachweise von GABA_A-Rezeptoren in Gliazellen wurden in Zellkulturen erbracht. Astrozyten und O2A-Vorläuferzellen reagierten auf Applikation von GABA mit

Depolarisation (Backus et al., 1988; Kettenmann und Schachner, 1985; Kettenmann et al., 1984; MacVicar et al., 1989; Magoski et al., 1992; Walz und Magoski, 1991; Übersicht von Fraser et al., 1994; Übersicht von Verkhratsky und Steinhäuser, 2000).

Ein Vergleich der GABA-induzierten Ströme in akut isolierten GluR-Zellen und anderen Gliazellen lässt Unterschiede bei annähernd gleichen Messbedingungen - wie Ionenkonzentration, Haltespannung und GABA-Konzentration (100 μM) - erkennen. GluR-Zellen besitzen eine höhere Rezeptordichte als akut isolierte hippocampale Astrozyten (Fraser et al., 1995), Müllerzellen der humanen Retina (Biedermann et al., 2004) und O2A-Vorläuferzellen in Kulturen aus neonatalen Ratten (Williamson et al., 1998), die Stromdichten unterscheiden sich etwa um eine Größenordnung. Der Vergleich mit Neuronen in situ zeigte, dass GluR-Zellen bei Applikation von 50 μM GABA ca. ein Drittel der Stromdichte der Pyramidenneurone und somit eine geringere Rezeptordichte aufweisen.

Die Rezeptoren in GluR-Zellen desensibilisieren auch bei schneller Applikation von GABA und Muscimol langsamer als die Rezeptoren von Neuronen. Die Mehrzahl der GluR-Zellen zeigte einen langsamen, monoexponentiellen Abfall der Stromamplitude. In einem Drittel der GluR-Zellen trat ein biexponentieller Abfall der Stromamplitude auf, wie er in hippocampalen Neuronen beobachtet wird (Berger et al., 1998; Edwards et al., 1990; Galarreta und Hestrin, 1997). Die schnelle Zeitkonstante war jedoch um den Faktor 20 langsamer. Eine langsame Zeitkonstante in ähnlicher Größenordnung wurde in akut isolierten hippocampalen Neuronen vorgefunden. Bei lang andauernder schneller Applikation von GABA an Patches zeigte sich ein langsamer Abfall (Jones und Westbrook, 1995; Celentano und Wong, 1994), wie es in unseren akuten Präparationen beobachtet wurde. Die Autoren erklärten diese langsame Desensibilisierung damit, dass die Rezeptoren in Gegenwart des Agonisten den geschlossenen Zustand schnell wieder verlassen können und damit ständig Kanalöffnungen auftreten.

Die langsame Desensibilisierung der Rezeptoren akut isolierter GluR-Zellen deckt sich auch mit publizierten Ergebnissen. Der Abfall der Amplitude von mIPSC-ähnlichen Strömen in NG2-Zellen war ebenfalls langsamer (τ ca. 24 ms) im Vergleich zu Pyramidenneuronen (τ ca. 13 ms) (Lin und Bergles, 2004); auch induzierte IPSC-ähnliche Ströme in GluR-Zellen in situ desensibilisieren langsam (τ ca. 25 ms) (Jabs et al., 2005).

5.1.2 GABA-Affinität von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen in situ

Die Untereinhenzusammensetzung der Rezeptoren beeinflusst auch ihre Affinität zu GABA. Für einen sinnvollen Vergleich zwischen Rezeptoren verschiedener Zellen bietet sich daher der EC₅₀ an, die Konzentration, bei der die halbmaximale Stromamplitude erreicht wird. Der EC₅₀ ist unabhängig von Ionenkonzentrationen und der Anzahl oder Dichte von Rezeptoren, da die Antworten auf die maximale Amplitude normiert werden. Hippocampale GluR-Zellen in akuten Gewebeschnitten exprimieren GABA_A-Rezeptoren mit einem EC₅₀ von 292 µM. Der Hill-Koeffizient > 1 (n_H = 1,4) lässt auf eine kooperative Rezeptorbindung von 2 GABA Molekülen schließen. Maximale Rezeptorströme (ca. 3 nA, bei V_H = -70 mV und E_{Cl} = -6 mV) wurden bei einer GABA-Konzentration von 10 mM erreicht.

Mit diesen Rezeptoreigenschaften unterscheiden sich die GABA_A-Rezeptoren der GluR-Zellen von denen anderer Gliazellen. Akut isolierte Astrozyten aus dem Hippocampus exprimieren sensitivere GABA_A-Rezeptoren (EC₅₀ ~ 50 µM) (Fraser et al., 1995), ebenso Müllerzellen der Retina deren EC₅₀ sich in der gleichen Größenordnung wie Astrozyten befinden (Clark und Mobbs, 1992; Biedermann et al., 2004). Rezeptoren in O2A-Vorläuferzellen aus neonatalen Ratten besitzen mit einem EC₅₀ von 113 µM eine ähnlich geringe Affinität wie GluR-Zellen (Williamson et al., 1998).

Die maximalen Stromamplituden wurden in GluR-Zellen erst bei 10 mM GABA erreicht. Dies trifft auch auf GABA-Rezeptoren von O2A-Vorläuferzellen in Zellkultur zu (Williamson et al., 1998). Hippocampale Astrozyten erreichten ihre maximalen GABA-induzierten Ströme bei einer Konzentration von 1 mM. Müllerzellen der humanen Retina zeigten ähnliches Verhalten (Fraser et al., 1995; Biedermann et al., 2004).

Neurone in Zellkultur aus dem Hippocampus exprimieren GABA_A-Rezeptoren mit einer deutlich höheren GABA-Affinität im Vergleich zu Astrozyten (Fraser et al., 1995). In akut isolierten hippocampalen Neuronen zeigte sich eine erhebliche Heterogenität bezüglich der GABA-Affinität. So konnten in hippocampalen Pyramidenneuronen der CA1-Region der Ratte 2 Gruppen mit unterschiedlicher GABA_A-Rezeptoraffinität beschrieben werden (Tietz et al., 1999). Die Rezeptorantworten auf verschiedene GABA-Konzentrationen konnten in der ersten Gruppe durch eine monophasische Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem EC₅₀ von 8,2 µM beschrieben werden. Bei outside out Patches wurde ein EC₅₀ in einer ähnlichen Größenordnung gefunden (Jones et al., 1998). Die zweite Gruppe zeigte Rezeptorantworten mit biphasischer Kinetik mit einem EC₅₀₋₁ von 11 µM und einem EC₅₀₋₂ von 334 µM (Tietz et

al., 1999).

Die GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen besitzen somit eine geringe Affinität als die Rezeptoren in Neuronen, Astrozyten und Müllerzellen. In heterologen Expressionssystemen zeigten Rezeptoren mit α_3 -Untereinheiten ähnlich geringe Affinitäten (Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998).

5.1.3 Tonische GABA_A-Rezeptorströme in GluR-Zellen

GABA_A-Rezeptoraktivierung löst nicht nur phasische Ströme aus, die durch synaptische Übertragung vermittelt werden. Es werden auch hochaffine Rezeptoren in Neuronen exprimiert, die extrasynaptisch lokalisiert sind und durch geringe Konzentrationen von ambientem GABA aktiviert werden. Die Rezeptoraktivierung löst persistierende (tonische) Ströme aus. Tonische GABA_A-Rezeptorströme wurden unter anderem in Körnerzellen des Cerebellums und des Gyrus dentatus des Hippocampus sowie in hippocampalen Interneuronen nachgewiesen. Pyramidenzellen im Hippocampus zeigen nur in frühen Entwicklungsstadien tonische Ströme (Übersicht von Semyanov et al., 2004). Ein Beispiel für die Funktion tonischer Ströme ist die Kontrolle der Migration von Zellen in der SVZ und dem rostralen migratorischen Strom in juvenilen und adulten Mäusen (Bolteus und Bordey, 2004). GFAP- positive Zellen, welche die Vorläuferzellen umschließen, steuern die Wanderung über die Aufnahme von GABA durch mGAT4 Transporter. Bei niedrigen GABA Konzentrationen wurde die Wanderung von neuronalen Vorläuferzellen verlangsamt. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch die Blockade der astrozytären GABA-Transporter ausgelöst werden. Die Applikation des Antagonisten Bicucullin hat die Wanderung der Zellen beschleunigt bzw. den Effekt der Transporterblockade aufgehoben. So wurde bewiesen, dass tonische GABA_A-Rezeptorströme die Zellmigration inhibieren.

Die Regulation der Neurogenese in der SVZ und SGL ist eine weitere Funktion von tonischen GABA-Rezeptorströmen. Während der Embryonalentwicklung inhibiert ambientes GABA die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen durch die tonische Aktivierung ihrer GABA-Rezeptoren. In der adulten SGL generieren Neuroblasten ebenfalls neuronale Vorläuferzellen. Diese Proliferation wird durch phasische oder tonische Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren gesteuert (Tozuka et al., 2005; Ge et al., 2006;Übersicht von Ge et al., 2007).

Tonische Ströme können durch GABA_A-Rezeptoren mit verschiedensten Untereinheitenkombinationen induziert werden. Wegen ihrer hohen Affinität zu GABA und ihrer geringen Desensibilisierung wurden GABA_A-Rezeptoren mit δ -Untereinheiten als beste Kandidaten für

die Erzeugung von tonischen Strömen bei geringen ambienten GABA-Konzentrationen angesehen. Aber auch $\alpha_5\beta\gamma$ -Rezeptoren sind an der Generierung von tonischen Strömen beteiligt, so vermitteln sie in CA1- und CA3-Pyramidenneuronen einen Großteil der tonischen Ströme (Caraiscos et al., 2004, Prenosil et al., 2006; Glykys et al., 2008; Übersichten von Farrant und Nusser, 2005; Glykys und Mody, 2007a). Außerdem werden binäre GABA_A-Rezeptoren aus $\alpha\beta$ -Untereinheiten als Vermittler von tonischen Strömen in hippocampalen Pyramidenneuronen postuliert (Brickley et al., 1999; Mortensen und Smart, 2006). In Neuronen des Thalamus werden tonische Ströme von Rezeptoren vermittelt, die α_4 -Untereinheiten enthalten (Chandra et al., 2006).

In hippocampalen GluR-Zellen ließen sich durch Inhibition von GABA-Transportern persistierende Ströme auslösen, die sensitiv auf den GABA_A-Rezeptorblocker Bicucullin reagierten. Wurde GABA in mikromolaren Konzentrationen koappliziert, stieg die Bicucullin sensitive Amplitude weiter an. Daraus schlossen wir, dass es sich bei diesen Strömen um tonische GABA_A-Rezeptorströme handelt, wie sie bereits in Neuronen nachgewiesen wurden. Die Analyse der Transkripte für die einzelnen Untereinheiten ergab, dass ca. 60% der GluR-Zellen die α_4 -Untereinheit transkribieren. Die α_5 -Untereinheit wurde nicht nachgewiesen. Rezeptoren mit α_4 -Untereinheiten besitzen eine erhöhte Affinität zu GABA (Brown et al., 2002). Proteine dieser Untereinheiten sind unter anderem in hippocampalen CA1-Pyramidenneuronen als extrasynaptisch lokalisiert (Mangan et al., 2005). Außerdem existieren starke funktionelle Evidenzen für die Expression von extrasynaptischen $\alpha_4\delta$ -Rezeptoren in den Körnerzellen des Gyrus dentatus, welche die tonischen Ströme vermitteln (Nusser und Mody, 2002). Daher ist die Vermittlung tonischer Ströme in GluR-Zellen durch Aktivierung von Rezeptoren mit α_4 -Untereinheiten als wahrscheinlichster Mechanismus anzusehen.

5.2 Umkehrpotential von GABA_A-Rezeptorströmen in GluR-Zellen

Die Wirkungsweise von GABA wird von der Konzentration der Cl⁻-Ionen in der Zelle bestimmt. Liegt E_{Cl^-} über dem Ruhemembranpotential, so verursacht die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren eine Depolarisation der Zelle. Entspricht E_{Cl^-} dem Ruhemembranpotential, wird das Ruhemembranpotential stabilisiert und einer Erregung entgegengewirkt. Daher ermittelten wir mit Hilfe der Perforated-Patch-Methode das Umkehrpotential der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Cl⁻-Ströme. Unter Anwendung der Nernst-Gleichung wurde die native $[Cl^-]_i$ in hippocampalen GluR-Zellen errechnet. Die Messungen wurden in der Stromklemme durchgeführt, da in der Spannungsklemme eine

Verschiebung von E_{Cl^-} beobachtet wurde und somit keine zuverlässigen Aussagen über das native E_{Cl^-} möglich waren. Ein Einfluss von V_H auf E_{Cl^-} wurde auch bei akut isolierten hippocampalen Neuronen festgestellt (Huguenard und Alger, 1986). Kontrollexperimente in der Ganzzelleableitung zeigten eine Abweichung des gemessenen Membranpotentials von dem berechneten E_{Cl^-} . Diese Abweichung wurde bei der Berechnung der nativen $[Cl^-]_i$ berücksichtigt.

Wir ermittelten ein natives E_{Cl^-} für GluR-Zellen von -26 mV, was einer $[Cl^-]_i$ von 60 mM entsprach. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren GluR-Zellen somit depolarisieren. NG2-positive Zellen im Hippocampus besitzen ebenfalls eine hohe $[Cl^-]_i$. Im Gegensatz dazu besaßen parallel untersuchte Pyramidenneurone eine niedrige $[Cl^-]_i$ von 4 mM (Lin und Bergles, 2004). Auch andere Gliazelltypen, wie die Müllerzellen der humanen Retina, behalten noch in adulten Organismen eine hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration (Biedermann et al., 2004).

In neonatalen Neuronen wirkt GABA ebenfalls exzitatorisch. Mit fortschreitender Entwicklung sinkt die $[Cl^-]_i$ der Neurone, die Wirkung von GABA wird inhibitorisch. Dieser Umstand ist für die Formierung neuronaler Netzwerke von Bedeutung. So werden während der Entwicklung des Gehirns GABAerge Synapsen vor glutamatergen Synapsen gebildet. Depolarisation durch GABA kann sowohl spannungsaktivierbare Ca^{2+} -Kanäle öffnen als auch die Blockierung der NMDA-Rezeptoren durch Mg^{2+} aufheben. Dies führt zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, der Signalkaskaden aktiviert, die zur Bildung von Synapsen führen (Übersicht von Ben-Ari, 2002). Diese Theorie konnte auch in aktuellen Publikationen bekräftigt werden. Im sich entwickelnden Kortex wurde nachgewiesen, dass eine hohe Cl^- -Konzentration in Neuronen eine Voraussetzung für die Formierung von glutamatergen Synapsen ist. Die hohe $[Cl^-]_i$ in unreifen Neuronen wird durch den Cl^- -Transporter NKCC1 aufrecht erhalten. Während der embryonalen Entwicklung wird NKCC1 zunächst stark exprimiert, während in ausgereiften Zellen die Expression herunter reguliert wird. Bei Mäusen wurde in E15 Embryonen mittels knockdown die Expression von NKCC1 unterdrückt. In den heranwachsenden Tieren wurde daraufhin eine signifikante Reduktion von AMPA-Rezeptor-vermittelten, postsynaptischen Strömen festgestellt. Diese Reduktion konnte durch eine Mutation des NMDA-Rezeptors aufgehoben werden, welche die übliche spannungsabhängige Blockierung des Rezeptors durch extrazelluläres Mg^{2+} umgeht. (Wang und Kriegstein, 2008). Die Expression von KCC2 während der Entwicklung verläuft gegensätzlich zu NKCC1. Dieser Cl^- -Transporter agiert nur in Auswärtsrichtung und sorgt für

eine niedrige $[Cl^-]_i$ in reifen Neuronen. Eine frühzeitig induzierte Überexpression von KCC2 zeigte einen starken Einfluss auf die morphologische Entwicklung von Neuronen, die sich in reduzierter Neuritenlänge und Verzweigung äußerte (Cancedda et al., 2007). Somit ist die Aufrechterhaltung einer hohen $[Cl^-]_i$ in sich entwickelnden Neuronen sowohl für die Bildung von glutamatergen Synapsen notwendig als auch für die morphologische Differenzierung der Neurone.

Bei kultivierten und akut isolierten Astrozyten löst GABA einen Ca^{2+} Anstieg aus, welcher zum Teil durch $GABA_A$ -Rezeptoraktivierung vermittelt wird (Nilsson et al., 1993; Fraser et al., 1995). Auch bei OPCs wurde ein Ca^{2+} -Einstrom bei $GABA_A$ -Rezeptoraktivierung festgestellt. Dieser erfolgt möglicherweise über spannungsaktivierbare Ca^{2+} -Kanäle (Kirchhoff und Kettenmann, 1992). Ca^{2+} -Einstrom könnte - wie bei Neuronen - zur Bildung von Synapsen mit Neuronen führen. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob eine Depolarisation der GluR-Zellen durch GABA zur Öffnung von spannungsaktivierbaren Ca^{2+} -Kanälen führt.

Die Existenz von funktionellen NMDA-Rezeptoren in hippocampalen Gliazellen ist nicht eindeutig belegt (Übersicht von Verkhratsky und Steinhäuser, 2000). In kortikalen Astrozyten gibt es jedoch Hinweise auf funktionelle NMDA Rezeptoren. Diese werden jedoch nicht wie bei Neuronen durch extrazelluläres Mg^{2+} spannungsabhängig blockiert (Lalo et al., 2006; Übersicht von Verkhratsky und Kirchhoff, 2007).

5.3 Untereinheitenkomposition von $GABA_A$ -Rezeptoren in GluR-Zellen

Anhand des pharmakologischen Profils sowie der Analyse der Transkripte der Untereinheiten wurden die möglichen Untereinheitenkompositionen von $GABA_A$ -Rezeptoren in GluR-Zellen bestimmt.

5.3.1 Pharmakologische Charakterisierung durch DZ, ZPD, DMCM und LOR

$GABA_A$ -Rezeptorströme in GluR-Zellen wurden von allen getesteten Modulatoren signifikant positiv oder negativ moduliert. Die getesteten Modulatoren (bis auf PBT und LOR) sind Agonisten der BZ-Bindungsstelle, die an der Kontaktstelle der α - und γ -Untereinheiten des Rezeptors lokalisiert ist (Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998). Wegen der positiven Modulation der $GABA_A$ -Rezeptorströme durch DZ und ZPD ist in GluR-Zellen eine dominante Expression von γ_1 - oder γ_3 -Untereinheiten weniger wahrscheinlich, da Benzodiazepine vor allem $GABA_A$ -Rezeptoren mit γ_2 -Untereinheiten stärker modulieren. Bei ZPD ist der Unterschied in der Potenzierung zwischen den γ -Untereinheiten deutlicher als bei

DZ (Wafford et al., 1993a; Puia et al., 1991; Sanna et al., 2002; Khom et al., 2006).

Die Potenzierung durch DZ lässt den Schluss zu, dass α_1 -, α_2 -, oder α_3 -Untereinheiten stärker als α_4 exprimiert werden, da Rezeptoren mit α_4 - und α_6 -Untereinheiten insensitive gegenüber BZ-Modulation sind (Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998). Letztere Untereinheit wird nicht im Hippocampus exprimiert (Pirker et al., 2000).

Rezeptoren in NG2-positiven OPCs und in einigen CA1-Pyramidenneuronen bestehen möglicherweise hauptsächlich aus α_5 -Untereinheiten. Sie sind gegenüber ZPD insensitive, während Diazepam GABA-Antworten potenziert (Tietz et al., 1999; Lin und Bergles, 2004). Diese Eigenschaft zeigen Rezeptoren mit α_5 -Untereinheiten in heterologen Expressionssystemen (Burgard et al., 1996; Übersicht von Mohler, 2006).

GluR-Zellen transkribierten keine α_5 -Untereinheiten, GABA-Rezeptorströme wurden entsprechend durch ZPD potenziert. Kompetitive Bindungsstudien zeigten eine um den Faktor 20 höhere Affinität gegenüber ZPD von α_1 - im Vergleich zu α_2 - und α_3 -Rezeptoren (Langer et al., 1992; Pritchett und Seeburg, 1990). Auf die Potenzierung von Rezeptorantworten in heterologen Expressionssystemen hat dies bei mikromolaren ZPD-Konzentrationen wenig Einfluss (Wafford et al., 1993b).

Bei Applikation von ZPD in verschiedenen Konzentrationen an denselben Zellen konnte eine signifikant stärkere Potenzierung bei 10 μM ZPD gegenüber 1 und 0,5 μM ZPD beobachtet werden. Dies könnte ein Indiz für die Expression von Untereinheitenkombinationen $\alpha_{2,3}\beta\gamma_2$ sein, wobei auch die Expression der α_1 -Untereinheit möglich ist, da auch nanomolare ZPD-Konzentrationen noch modulierend wirken. Eine Koexpression von GABA_A-Rezeptoren mit verschiedenen α -Untereinheiten in einer Zelle ist wahrscheinlich.

Ein weiteres Indiz für die Expression von γ_2 -Untereinheiten lieferte das β -Carbolin DMCM, welches GABA_A-Rezeptoren mit γ_1 -Untereinheit positiv und Rezeptoren mit γ_2 negativ moduliert (Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993a; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998; Khom et al., 2006). Da die Rezeptorantworten in allen getesteten GluR-Zellen verringert wurden, ist eine γ_2 -Expression sehr wahrscheinlich. Die Rezeptorantworten in GluR-Zellen wurden durch LOR potenziert, dieser Modulator ist spezifisch für Rezeptoren mit β_2 - oder β_3 -Untereinheiten (Wafford et al., 1994).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Modulation von GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen durch verschiedene Modulatoren auf die Expression der Untereinheiten α_1 , α_2 oder α_3 , β_2 oder β_3 und γ_2 hin.

Es bleibt darauf hinzuweisen, dass GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen nur eine geringe GABA-Affinität ($EC_{50} = 292 \mu\text{M}$) aufweisen, die in heterologen Expressionssystemen GABA_A-Rezeptoren entspricht, welche α_3 -Untereinheiten enthalten (Sigel et al., 1990; Wafford et al., 1993b; Ebert et al., 1994; Knoflach et al., 1993; Verdoorn, 1994). Dagegen zeigen Rezeptoren in Nervenzellen und rekombinanten Systemen, welche die Untereinheiten α_1 oder α_2 enthalten, eine höhere GABA-Affinität ($EC_{50} < 100 \mu\text{M}$) (Knoflach et al., 1993; Saxena und Macdonald, 1996; Übersicht von Hevers und Lüddens, 1998).

Astrozyten im Hippocampus haben im Vergleich zu Nervenzellen ebenfalls Rezeptoren mit geringerer GABA-Affinität (Fraser et al., 1995). Da die α_3 -Untereinheit im Hippocampus mittels Immunohistochemie kaum gefunden wird (Sperk et al., 1997; Prenosil et al., 2006; Übersicht von Mohler, 2006), könnten andere Mechanismen die GABA-Affinität der Rezeptoren ändern. So kann z.B. die Gegenwart von Proteinkinase A (PKA) GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme in CA1-Pyramidenneuronen und Körnerzellen des Bulbus olfactoris beeinflussen (Nusser et al., 1999; Poisbeau et al., 1999; Übersicht von Brandon et al., 2002).

GABA_A-Rezeptoren in Gliazellen wurden in anderen Hirnregionen charakterisiert, z.B. im Hippocampus, im optischen Nerv, im Corpus callosum und im Rückenmark. (Übersicht von Verkhratsky und Steinhäuser, 2000). Die GABA_A-Rezeptoren der GluR-Zellen zeigten eine ähnliche BZ-Pharmakologie wie akut isolierte hippocampale Astrozyten (Fraser et al., 1995) und kultivierte fibriöse Astrozyten des Rückenmarks (Rosewater und Sontheimer, 1994). Isolierte Gliazellen der humanen Retina zeigten ebenfalls eine vergleichbare Antwort auf Diazepam (Biedermann et al., 2004). Bergmann-Gliazellen im Cerebellum exprimieren GABA_A-Rezeptoren, die sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften und in ihrer Zusammensetzung von GluR-Zellen unterscheiden. Diese exprimieren DZ-insensitive Rezeptoren mit γ_1 - und α_2 -Untereinheiten. Hinweise auf γ_1 -Untereinheiten fanden sich auch bei einem Teil der hippocampalen Astrozyten, deren Rezeptorströme durch DMCM potenziert wurden (Muller et al., 1994; Fraser et al., 1995; Übersicht von Wisden, 1995; Riquelme et al., 2002).

In CA1-Pyramidenneuronen wird $\alpha_{1,2}\beta_3\gamma_2$ als der häufigste Rezeptortyp angesehen (Nusser et al., 1996). Unter physiologischen Bedingungen wurden zwei verschiedenen schnelle Antworten der Zellen auf GABA festgestellt, wobei die schnellen GABA-Antworten durch α_2 -Rezeptoren vermittelt werden (Pearce, 1993). Die $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ Rezeptoren wurden an den Fortsätzen der Neurone nachgewiesen (Sperk et al., 1997; Nusser et al., 1996) und könnten für langsame Antworten verantwortlich sein. Akut isolierte hippocampale Neuronen adulter Ratten waren heterogen in ihrer Potenzierung der Rezeptorantworten durch DZ und ZDP. Ein Teil der Zellen zeigte sich insensitiv gegenüber ZPD, was auf Expression von α_5 -Untereinheiten schließen lässt (Tietz et al., 1999).

5.3.2 Blockierung der GABA_A-Rezeptorantworten durch Zn²⁺

Im Gegensatz zu den vorherigen Modulatoren ist Zn²⁺ ein endogener Modulator. Er wird vesikulär von Moosfasern zusammen mit GABA ausgeschüttet und inhibiert NMDA- und GABA_A-Rezeptoren in hippocampalen Signalwegen. Endogene Zn²⁺-Konzentrationen sind ausreichend, um monosynaptische GABAerge IPSCs zu modulieren (Ruiz et al., 2004).

Wir applizierten Zn²⁺ in verschiedenen Konzentrationen an GluR-Zellen. Die Effizienz der Zn²⁺ Blockade der Rezeptorantworten in den verschiedenen Zellen war heterogen, erst bei einer [Zn²⁺] von 100 μ M wurden die GABA_A-Rezeptorströme in allen GluR-Zellen reduziert. Eine Unterteilung der GluR-Zellen bezüglich ihrer Sensitivität zeigte, dass bei der Gruppe sensibler Zellen bereits 10 μ M Zn²⁺ die GABA-Antworten auf etwa 50% der ursprünglichen Antwort reduzierte. Rezeptorantworten der weniger sensiblen Zellen wurden erst mit 100 μ M Zink im gleichen Umfang blockiert.

Die Sensitivität der GABA_A-Rezeptoren gegenüber Zn²⁺ ist abhängig von den Untereinheiten, aus denen der Rezeptor zusammengesetzt ist. So führte in heterologen Expressionssystemen die Expression von γ -Untereinheiten zu einer drastischen Reduktion der Sensitivität der GABA_A-Rezeptoren gegenüber mikromolaren Konzentrationen von Zn²⁺ (Draguhn et al., 1990; Smart et al., 1991). Die molekulare Analyse des Rezeptors offenbarte 3 Bindungsstellen für Zn²⁺: eine Bindungsstelle an der Oberfläche der β -Untereinheit, die sich im Ionenkanal befindet, und zwei Bindungsstellen an der Oberfläche zwischen α - und β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors. Der Einbau einer γ -Untereinheit führt zum Wegfall einer Bindungsstelle (Hosie et al., 2003). Rezeptoren mit γ -Untereinheit besitzen je nach α -Untereinheit unterschiedliche Zinksensitivität. In Kombination mit γ_2 -Untereinheiten erwiesen sich Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten gegenüber Zn²⁺ insensitiv ($IC_{50} = 245 \mu$ M), während

Rezeptoren mit α_2 -, α_3 -, α_4 - und α_6 -Untereinheiten stärkere Sensitivität ($IC_{50} = 47 \mu\text{M}$ für $\alpha_{4,6}$) zeigten (White und Gurley, 1995; Saxena und Macdonald, 1996; Fisher et al., 1997; Brown et al., 2002). In Müllerzellen der Retina potenzierte Zn^{2+} die GABA_A -Rezeptorströme (Qian et al., 1997; Biedermann et al., 2004). Eine Potenzierung von GABA -Rezeptoren durch Zn^{2+} wird als indirekter Effekt angesehen. In situ werden potenzierende Effekte von Zn^{2+} auf GABA -Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission durch eine erhöhte präsynaptische Vesikelfreisetzung erklärt. Die direkte Wirkung von Zn^{2+} ist die Blockade der GABA_A -Rezeptoren (Übersicht von Smart et al., 2004; Korpi et al., 2002).

Die unterschiedliche Sensitivität der GluR-Zellen gegenüber Zn^{2+} lässt zusammen mit den Erkenntnissen aus der Modulation der Rezeptorantworten auf eine unterschiedlich starke Expression von α -Rezeptoruntereinheiten in den Zellen schließen. Zellen mit geringerer Zn^{2+} -Sensitivität exprimieren demnach vermehrt Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten. Da bei $100 \mu\text{M}$ Zn^{2+} eine starke Inhibition auftritt, ist eine Koexpression von $\alpha_{2,3}$ -Untereinheiten wahrscheinlich. Die sensitiveren Zellen exprimieren demnach bevorzugt α_2 - oder α_3 -Untereinheiten, welche in heterologen Expressionssystemen eine höhere Zn^{2+} -Sensitivität im Vergleich zu α_1 -Untereinheiten aufweisen (White und Gurley, 1995). Die Befunde aus der Transkriptanalyse stützen diese Befunde, von den α -Untereinheiten wurden α_2 - und α_1 -Untereinheiten am häufigsten nachgewiesen.

5.4 GABA Transporter in GluR-Zellen

GABA kann nicht nur durch die Aktivierung von Rezeptoren Ströme in Zellen auslösen, sondern auch als Substrat von GABA -Transportern. Daher sollte geprüft werden, ob ein Teil der GABA -vermittelten Ströme in GluR-Zellen durch Transport von GABA entsteht. Der GABA_A -Rezeptorantagonist Bicucullin ($20 \mu\text{M}$) reduzierte die durch GABA ($100 \mu\text{M}$) induzierten Ströme auf 3,5% der ursprünglichen Amplitude - die residualen Ströme betragen ca. 14 pA. Daher war es möglich, dass diese Ströme durch den Transport von GABA verursacht wurden. Eine Koapplikation von GABA und GABA -Transporterblockern zeigte wenig Einfluss auf die Stromamplituden, was nach den Ergebnissen der Blockierung mit Bicucullin zu erwarten war. Diese geringfügige Blockade der GABA -induzierten Ströme durch den $\text{GAT}2/3$ -Transporterblocker (m $\text{GAT}3/4$) SNAP 5114 schließt ein Vorhandensein von Transportern nicht aus, jedoch ist ihr möglicher Beitrag zu den Stromamplituden gering.

Einige GABA -Transporterantagonisten sind gleichzeitig Substrat für Transporter. So löste β -Alanin, das auch durch m $\text{GAT}3$ - und m $\text{GAT}4$ -Transporter transportiert wird, in einem Teil

der GluR-Zellen Ströme aus. Ein ähnlicher Effekt wurde bei Bergmanngliazellen in situ beobachtet. Dort löste β -Alanin GABA-Transporter-vermittelte Ströme aus, während GABA_A-Rezeptoren durch Picrotoxin blockiert waren (Barakat und Bordey, 2002). β -Alanin kann auch als Substrat für Taurin-Transporter dienen (Liu et al., 1992; Smith et al., 1992; Barakat et al., 2002). Die Applikation von Taurin löste jedoch keine Ströme in akut isolierten GluR-Zellen aus. In Müllerzellen der Retina löste β -Alanin Bicucullin-sensitive Ströme aus und wirkt somit als Rezeptoragonist (Biedermann et al., 2004). In hippocampalen Astrozyten wurden durch Immunohistochemie GAT1- und GAT3- (mGAT4) Proteine nachgewiesen (Ribak et al., 1996). Neokortikale Astrozyten zeigten β -Alanin-sensitive GAT-Ströme, die eine geringe Amplitude aufwiesen (Kinney und Spain, 2002).

Die geringen Effekte der Antagonisten von GABA-Transporter auf GABA-vermittelte Ströme in GluR-Zellen zeigten, dass diese Ströme überwiegend durch GABA_A-Rezeptoraktivierung ausgelöst wurden und nur geringe Evidenzen für funktionelle GABA-Transporter in GluR-Zellen vorliegen.

5.5 Transiente Ströme nach de- und hyper-polarisierenden Spannungssprüngen in Anwesenheit von GABA

Wir beobachteten in GluR-Zellen in situ bei GABA_A-Rezeptoraktivierung das Auftreten von transienten Strömen, sogenannten *tail currents*. Diese traten zusätzlich zu den Rezeptorströmen auf, wenn die Zelle wieder auf ein hyperpolarisierendes Potential geklemmt wird, nachdem sie zuvor auf Potentiale geklemmt wurde, die positiver waren als E_{Cl^-} . Sowohl intakte Zellen als auch Zellen in Ganzzelleableitungen wiesen *tail currents* bei Rezeptoraktivierung auf. In Ganzzelleableitungen stellte der Kontakt zur Pipettenlösung konstante Ionenkonzentrationen innerhalb der Zelle sicher. Die *tail currents* zeigten einen Anstieg ihrer Amplitude, die mit der Dauer der vorangegangenen Depolarisation korrelierte. Eine stärkere Depolarisation führte ebenfalls zu *tail currents* mit größerer Amplitude.

Tail currents könnten durch Akkumulation von Cl^- während der Depolarisation verursacht werden. Bei der anschließenden Relaxation wird Cl^- wieder aus der Zelle befördert (DeFazio und Hablitz, 2001). Dies würde die Abhängigkeit der *tail currents* von Dauer und Stärke der Depolarisation erklären. *Tail-currents* werden auch in der Ganzzelleableitung beobachtet, bei der die Pipettenlösung einen Ausgleich der $[Cl^-]_i$ bewirkt. Die Bestimmung des E_{Cl^-} der *tail currents* in der Ganzzelleableitung zeigte eine Verschiebung zu positiveren Werten bei längerer Depolarisation. Damit wurde nachgewiesen, dass sich E_{Cl^-} auch bei vorgegebener

$[Cl^-]_i$ ändern kann.

Möglicherweise findet die Cl^- -Akkumulation nur an der Innenseite der Membran statt. Nimmt man an, dass bei Depolarisation nur eine lokale Akkumulation von Ionen nahe der Rezeptoröffnung auftritt. Die lokale Akkumulation von Ionen bei Depolarisation und der Rücksprung auf hyperpolarisierende Haltespannung führten demnach zu einem kurzzeitig erhöhten Ionenfluß, bis die akkumulierten Ionen die Zelle verlassen haben. Mit diesem Modell lassen sich die Abhängigkeiten der *tail currents* von der Depolarisationsdauer und der Stärke der Depolarisation erklären, ohne dass sich die Ionenkonzentration der Zelle massiv ändern muss. Beim Auftreten von *tail currents* werden demnach keine zusätzlichen Rezeptoren aktiviert. Lokal erhöhte Ionenkonzentrationen könnten auch den Mechanismus der Interaktion anderer Rezeptoren in GluR-Zellen erklären. So werden Kir-Kanäle durch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren in GluR-Zellen inhibiert. Dies wird durch Na^+ verursacht, welches durch AMPA-Rezeptorkanäle in die Zelle gelangt (Schroder et al., 2002). Die hohe intrazelluläre Na^+ -Konzentration, die für die Blockade der Kir-Kanäle benötigt wird, kann kaum durch alleinigen AMPA-Rezeptor-vermittelten Na^+ -Einstrom erreicht werden. Daher wäre eine lokale Akkumulation direkt an der Membran die einfachste Erklärung.

In Neuronen des auditorischen Hirnstamms wurden ebenfalls *tail currents* vorgefunden, die bei der Aktivierung eines Rezeptorkanals auftreten. Sie benötigen einen offenen Glycin-Rezeptor (Backus et al., 1998). Bei diesen Neuronen wurde bei Aktivierung des Rezeptors eine zeitabhängige Verschiebung des Cl^- -Umkehrpotentials in der Perforated-Patch-Konfiguration beobachtet. In der Ganzzelleableitung liegt das Umkehrpotential - wie bei unseren Messungen - nahe 0 mV. Die *tail currents* der Neurone zeigten wie in den GluR-Zellen einen Anstieg in ihrer Amplitude, wenn die Dauer oder die Stärke des depolarisierenden Präpulses erhöht wurde.

Tail currents in GluR-Zellen treten nur bei aktivierten $GABA_A$ -Rezeptoren auf. Spannungsaktivierbare K^+ - und Na^+ -Kanäle sind nicht an der Entstehung dieser Ströme beteiligt. Sie ähneln den *tail currents*, die in Neuronen des auditorischen Hirnstamms bei aktivierten Glycin-Rezeptoren vorgefunden wurden (Backus et al., 1998) und denen in den kortikalen Neuronen der Lamina II/III, welche bei Applikation von GABA auftraten (DeFazio und Hablitz, 2001).

5.6 Analyse von P2X-Rezeptoren in Gliazellen

P2X-Rezeptoren sind ionotrope Rezeptoren, die selektiv für die Kationen Na^+ , K^+ und Ca^{2+} permeabel sind. Der P2X- und P2Y-Rezeptorligand ATP wird neben Neuronen auch von Gliazellen ausgeschüttet und löst in Astrozytenkulturen Ca^{2+} -Oszillationen aus, die sich interzellulär als Ca^{2+} -Wellen fortsetzen (Guthrie et al., 1999; Sul et al., 2004). Die Tatsache, dass Transmitter in Astrozyten Ca^{2+} -Transienten auslösen, ist wichtiger Bestandteil in allen Modellen zur Neuron-Glia-Neuron-Signalübertragung (Parpura et al., 1994, Pasti et al., 1997). Ca^{2+} -Wellen werden durch Transport von IP_3 von Zelle zu Zelle über gap junctions und durch Aktivierung von metabotropen P2Y Rezeptoren durch extrazelluläres ATP ausgelöst (Fam et al., 2000; Übersicht bei Haydon, 2001; James und Butt, 2001). Ferner wurde ein Zusammenhang zwischen P2Y-Rezeptoraktivierung und vesikulärer Glutamatfreisetzung in Kultur festgestellt (Domercq et al., 2006). Von den P2X Rezeptoren ist in Gliazellen der P2X₇-Rezeptor von besonderem Interesse, denn in astrozytären Zellkulturen wurde ein P2X₇-vermittelter Mechanismus der nichtvesikulären Glutamatfreisetzung postuliert (Duan et al., 2003). Erste Hinweise für das Auftreten dieser Rezeptoren im Hippocampus wurden durch Detektion von Proteinen der Untereinheiten mittels Immunohistochemie geliefert (Kukley et al., 2001; siehe auch 5.6, letzter Abschnitt). Auch wurde bei Applikation von P2X₇-Rezeptoragonisten eine NMDA-Rezeptor abhängige Antwort bei CA1 Pyramidenneuronen vermutet (Fellin et al., 2006). Daher haben diese Rezeptoren möglicherweise eine Funktion in der Glia-Neuron-Kommunikation. Jedoch fehlte noch ein direkter Nachweis von funktionellen P2X-Rezeptoren auf hippocampalen Gliazellen.

In Astrozyten und GluR-Zellen des Hippocampus konnten keine funktionellen P2X-Rezeptoren nachgewiesen werden (Jabs et al., 2007). Die Bedingungen, unter denen die Applikation durchgeführt wurde, sind jedoch nicht der Grund für den negativen Befund. In P2X₃ transfizierten HEK-Zellen lösten wir unter denselben Applikationsmethoden schnelle Rezeptorantworten durch ATP-Applikation aus. Auch eine Inaktivierung von P2X-Rezeptoren durch den Präparationsvorgang ist unwahrscheinlich, denn in Mikrogliazellen konnten in situ mittels ATP-Applikation erfolgreich Rezeptorströme ausgelöst werden. Dieser Zelltyp exprimiert funktionelle P2X-Rezeptoren in situ (Übersicht von Farber und Kettenmann, 2006). Für den Nachweis potentieller P2X₇-Rezeptoren wurden divalente Kationen aus den Lösungen entfernt. Bei Applikationen unter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Bedingungen konnten zwar Ströme durch hohe ATP-Konzentrationen ausgelöst werden, diese traten jedoch zeitverzögert zur Applikation auf und wurden nur langsam aktiviert. Diese

Eigenschaften sind untypisch für P2X₇-Rezeptoren, die sofort und schnell aktiviert werden (Riedel et al., 2007). Zusätzlich sprechen die Insensitivität der Zellen gegenüber dem P2X₇-Rezeptoragonisten BzATP und dem spezifischen Antagonisten BBG sowie die Auslösung von ähnlichen Strömen durch ADP gegen die Präsenz funktioneller P2X₇-Rezeptoren. Diese Annahme wird durch die Verwendung von P2X₇-Knockout-Mäusen bestätigt. Auch in diesen Tieren konnten ATP und ADP unter denselben Bedingungen Ströme auslösen. Es ist jedoch noch unklar, durch welchen Mechanismus diese Ströme vermittelt werden.

Über einen möglichen Einfluss von Rezeptorphosphorylierung auf P2X₇-Rezeptoren ist wenig bekannt. Studien in ektopischen Expressionssystemen fanden mehrere putative Phosphorylierungsstellen in P2X₇-Rezeptoren. Diese sind gegenüber Kinasen sensitiv, welche Rezeptorströme inhibieren oder potenzieren sollen (Übersicht von Roberts et al., 2006). Eine Rezeptorphosphorylierung konnte jedoch nie eine vollständige Blockade der Rezeptorströme bewirken. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Abwesenheit von Strömen durch Phosphorylierung von Rezeptoren verursacht wurde.

In kultivierten Astrozyten werden P2X-Rezeptoren exprimiert (Duan et al., 2003; Walz et al., 1994). Jedoch konnten vorherige Publikationen keine glialen Rezeptorströme im Hippocampus der Ratte nachweisen. Es wurden sowohl reaktive als auch Kontrollgewebeproben untersucht (Jabs et al., 1997). Auch in unseren Versuchen mit akut isolierten Gliazellen, in verschiedenen Organismen, in Tieren verschiedener Altersstufen und unter Verwendung von schnellen Applikationssystemen kamen wir zu demselben Ergebnis (Jabs et al., 2007).

Im Unterschied zu hippocampalen Astrozyten und GluR-Zellen exprimieren Mikrogliazellen funktionelle P2X-Rezeptoren in vitro und in situ (Boucsein et al., 2003; Farber und Kettenmann, 2006). Im Hippocampus zeigen Interneurone im Stratum oriens (Khakh et al., 2003), und Nestin-positive neuronale Vorläuferzellen (Shukla et al., 2005) Einwärtsströme in Gegenwart von extrazellulärem ATP. Widersprüchliche Daten wurden für CA1-Pyramidenneurone veröffentlicht (Khakh et al., 1999; Khakh et al., 2003). In kortikalen Astrozyten konnten ATP-vermittelte Rezeptorströme nachgewiesen werden, die möglicherweise durch Aktivierung von heteromeren P2X_{1/5} Rezeptoren ausgelöst werden (Lalo et al., 2008). In einer neueren Studie an kultivierten Astrozyten wurde nachgewiesen, dass Blockade von Pannexin1-Kanälen auch Ströme inhibiert, die durch den P2X₇-Rezeptoragonisten BzATP ausgelöst wurden. Es bleibt jedoch noch zu klären, ob BzATP Pannexin1-Kanäle direkt oder über P2X₇-Rezeptoren aktiviert (Iglesias et al., 2009).

Antikörperfärbungen zeigten zwar die Expression von P2X-Proteinen (Kukley et al., 2001), unter anderem auch von P2X₇, in S100β positiven Zellen, jedoch ließen Untersuchungen an P2X₇-Knockout-Mäusen erhebliche Zweifel an der Existenz dieser Rezeptoren aufkommen (Kukley et al., 2004; Sim et al., 2004). Für P2X_{1-4,6} sind sowohl unspezifische Antikörperreaktion als auch das Ausbleiben der Integration der Rezeptorproteine in die Zellmembran nicht auszuschließen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Membranrezeptoren von Gliazellen des Hippocampus funktionell und molekular untersucht.

Der Fokus der Untersuchungen lag auf der Charakterisierung der GABA_A-Rezeptoren in GluR-Zellen. Grundlage der Untersuchung war ein transgenes Tiermodell, in dem hGFAP-Promotoraktivität die Expression von EGFP steuert und sowohl GluR- als auch GluT-Zellen markiert. Ein weiteres Ziel war der Nachweis von funktionellen P2X-Rezeptoren in Gliazellen des Hippocampus. Hierfür wurden zusätzlich Ratten und humane Resektate untersucht.

Die Untersuchungen an GluR-Zellen aus dem Hippocampus ergaben, dass diese GABA_A-Rezeptoren exprimieren, die sich von denen der Neurone unterscheiden. So zeigten akut isolierte Zellen Rezeptorantworten auf GABA mit einer langsameren Desensitisierung als sie in Neuronen beobachtet wurden. Auch zeigten sich in akuten Schnitten eine niedrigere Rezeptordichte sowie eine geringere Affinität für GABA. Im Vergleich zu Astrozyten und Müllerzellen besitzen GluR-Zellen jedoch eine höhere Rezeptordichte.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass GluR-Zellen eine hohe native intrazelluläre [Cl⁻] aufweisen. Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren führt somit zur Depolarisation der Zelle. Dadurch könnte - wie in jungen Neuronen - eine Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen sowie von NMDA-Rezeptoren ausgelöst werden.

Durch die pharmakologische Charakterisierung der GABA_A-Rezeptorantworten sowie die Analyse der Transkripte einzelner Untereinheiten konnte die mögliche Rezeptorzusammensetzung ermittelt werden. GABA_A-Rezeptoren aus $\alpha_{1,2,3}\beta_{2,3}\gamma_2$ Untereinheiten-Kombinationen vermitteln den Großteil der GABA-induzierten phasischen Ströme in GluR-Zellen. Diese Kombinationen werden auch in Neuronen vorgefunden, daher sind posttranslationale Modifikationen die wahrscheinliche Ursache für die geringere Affinität der Rezeptoren in GluR-Zellen.

Bei GluR-Zellen traten neben phasischen Strömen auch persistierende tonische Ströme auf, die in Neuronen durch perisynaptische Rezeptoren vermittelt werden. Die Analyse der RNA Transkripte ergab Unterschiede zur Zusammensetzung der Rezeptoren, die in Neuronen tonische Ströme vermitteln.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit hippocampales Gewebe von Mäusen, Ratten und humanen Resektaten auf P2X Rezeptoren untersucht. Es konnten keine funktionellen P2X-Rezeptoren in hippocampalen GluR- und GluT-Zellen nachgewiesen werden. Weder schnelle Applikation von ATP durch Photolyse noch spezifische Rezeptoragonisten konnten Ströme auslösen. Zusätzliche Untersuchungen an P2X₇-Knockout-Mäusen zeigten, dass langsame ATP vermittelte Antworten auf indirekte Effekte zurückzuführen sind. Die in Publikationen propagierte Hypothese, dass Gliazellen nach Aktivierung ionotroper P2X-Rezeptoren Glutamat ausschütten, konnte demnach für hippocampalen GluR- und GluT-Zellen nicht bestätigt werden.

6.1 Summary

This thesis covered the functional and molecular analysis of membrane receptors on glial cells.

The focus of the study was on the characterization of GABA_A receptors in GluR cells. Tests were done in a transgenic mouse line with hGFAP promoter-controlled EGFP expression. Both GluR and GluT cells were labeled in the hippocampus. Another goal was to provide proof of functional P2X receptors in the hippocampus of mice rats and human tissue.

This study revealed that GluR cells express GABA_A receptors, which differ from the ones in neurons. Acutely isolated cells displayed receptor currents with slower desensitization time constant than it was shown for neurons. Additionally a lower receptor density as well as a reduced affinity for GABA compared to neurons was observed in acute slices. But GluR cells possess a higher receptor density than astrocytes or Muller cells.

Furthermore we could detect a high native [Cl⁻] in GluR cells. Therefore activation of GABA_A receptors leads to depolarization of these cells. This could trigger activation on voltage gated Ca²⁺ channels and NMDA receptors as described for immature neurons in the developing brain.

GABA_A receptor formation was analyzed via pharmacological characterization of receptor currents and analysis of subunit transcripts. It appeared that GABA_A receptors consisting of $\alpha_{1,2,3}\beta_{2,3}\gamma_2$ subunit variants mediate most of the GABA induced phasic currents in GluR cells. These subunits form receptors in neurons as well. Hence the lower affinity for GABA of receptors in GluR cells is due to posttranslational modifications.

GluR cells display both phasic and tonic currents. The latter ones were mediated through perisynaptic receptors in Neurons. Transcript analysis revealed that composition of these receptors is different in GluR cells and neurons.

Hippocampal tissue of mouse, rat and human was tested for P2X receptors. There was no evidence for functional P2X receptors in hippocampal GluR and GluT cells. Neither rapid application of ATP via photolysis nor specific receptor agonists could induce currents in these cells. Further experiments with P2X₇ knockout mice showed, that slow ATP mediated currents are attributed to indirect effects. The hypothesis proclaimed by other publications that activation of P2X receptors leads to glutamate release in GluR and GluT cells could therefore not be confirmed.

7. Literaturverzeichnis

- Agulhon C *et al.* (2008) What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* **59**, 932-946.
- Albrecht J & Schousboe A (2005) Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem. Res* **30**, 1615-1621.
- Alvarez-Buylla A & Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *Journal of Neuroscience* **22**, 629-634.
- Backus KH, Deitmer JW, & Friauf E (1998) Glycine-activated currents are changed by coincident membrane depolarization in developing rat auditory brainstem neurones. *J Physiol* **507** (Pt 3), 783-794.
- Backus KH, Kettenmann H, & Schachner M (1988) Effect of benzodiazepines and pentobarbital on the GABA-induced depolarization in cultured astrocytes. *Glia* **1**, 132-140.
- Barakat L & Bordey A (2002) GAT-1 and Reversible GABA Transport in Bergmann Glia in Slices. *J Neurophysiol* **88**, 1407-1419.
- Barakat L, Wang D, & Bordey A (2002) Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *J Physiol* **541**, 753-767.
- Barnard EA *et al.* (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* **50**, 291-313.
- Baumann SW, Baur R, & Sigel E (2002) Forced Subunit Assembly in alpha 1beta 2gamma 2 GABAA Receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 46020-46025.
- Behrens E *et al.* (1994) Subdural and depth electrodes in the presurgical evaluation of epilepsy. *Acta Neurochir. (Wien.)* **128**, 84-87.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 728-739.
- Ben-Ari Y (2006) Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic. Disord.* **8**, 91-102.
- Berger T, Schwarz C, Kraushaar U, & Monyer H (1998) Dentate gyrus basket cell GABAA receptors are blocked by Zn²⁺ via changes of their desensitization kinetics: an in situ patch-clamp and single-cell PCR study. *J. Neurosci.* **18**, 2437-2448.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, & Jahr CE (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* **405**, 187-191.
- Bergles DE, Diamond JS, & Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 293-298.

- Bevan S, Chiu SY, Gray PT, & Ritchie JM (1985) The presence of voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured astrocytes. *Proc R. Soc. Lond B Biol Sci* **225**, 299-313.
- Bezzi P *et al.* (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* **7**, 613-620.
- Biber K, Vinet J, & Boddeke HWGM (2008) Neuron-microglia signaling: Chemokines as versatile messengers. *Journal of Neuroimmunology* **198**, 69-74.
- Biedermann B *et al.* (2004) GABA(A) receptors in Muller glial cells of the human retina. *Glia* **46**, 302-310.
- Bliss TVP & Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 331-356.
- Blumcke I, Thom M, & Wiestler OD (2002) Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* **12**, 199-211.
- Bolteus AJ & Bordey A (2004) GABA Release and Uptake Regulate Neuronal Precursor Migration in the Postnatal Subventricular Zone. *Journal of Neuroscience* **24**, 7623-7631.
- Borden LA *et al.* (1994a) Cloning of the human homologue of the GABA transporter GAT-3 and identification of a novel inhibitor with selectivity for this site. *Receptors. Channels* **2**, 207-213.
- Borden LA *et al.* (1994b) Tiagabine, SK&F 89976-A, CI-966, and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *Eur J Pharmacol* **269**, 219-224.
- Borden LA, Smith KE, Gustafson EL, Branchek TA, & Weinshank RL (1995) Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J Neurochem.* **64**, 977-984.
- Boucein C *et al.* (2003) Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2267-2276.
- Bowman CL & Kimelberg HK (1984) Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature* **311**, 656-659.
- Brandon NJ, Jovanovic JN, & Moss SJ (2002) Multiple roles of protein kinases in the modulation of [gamma]-aminobutyric acidA receptor function and cell surface expression. *Pharmacology & Therapeutics* **94**, 113-122.
- Brickley SG, Cull-Candy SG, & Farrant M (1999) Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J. Neurosci.* **19**, 2960-2973.
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, & Wafford KA (2002) Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br. J Pharmacol* **136**, 965-974.

- Burgard EC, Tietz EI, Neelands TR, & Macdonald RL (1996) Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol Pharmacol* **50**, 119-127.
- Butt AM (2006) Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* **54**, 666-675.
- Campbell K & Gotz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences* **25**, 235-238.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, & Poo Mm (2007) Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons In Vivo. *Journal of Neuroscience* **27**, 5224-5235.
- Caraiscos VB *et al.* (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3662-3667.
- Celentano JJ & Wong RK (1994) Multiphasic desensitization of the GABAA receptor in outside-out patches. *Biophys. J.* **66**, 1039-1050.
- Chandra D *et al.* (2006) GABAA receptor $\alpha 4$ subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15230-15235.
- Clark B & Mobbs P (1992) Transmitter-operated channels in rabbit retinal astrocytes studied in situ by whole-cell patch clamping. *Journal of Neuroscience* **12**, 664-673.
- Cope DW *et al.* (2004) Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Neuropharmacology* **47**, 17-34.
- Dawson GR, Collinson N, & Atack JR (2005) Development of subtype selective GABAA modulators. *CNS. Spectr.* **10**, 21-27.
- Dawson MRL, Polito A, Levine JM, & Reynolds R (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience* **24**, 476-488.
- DeFazio RA & Hablitz JJ (2001) Chloride accumulation and depletion during GABA(A) receptor activation in neocortex. *Neuroreport* **12**, 2537-2541.
- del Olmo N, Bustamante J, del Rio RM, & Solis JM (2000) Taurine activates GABAA but not GABAB receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Research* **864**, 298-307.
- Dietrich D, Kral T, Clusmann H, Friedl M, & Schramm J (1999) Reduced function of L-AP4-sensitive metabotropic glutamate receptors in human epileptic sclerotic hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1109-1113.
- Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, & Gotz M (2008) Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* **28**, 10434-10442.

- Ding R, Asada H, & Obata K (1998) Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. *Brain Res* **800**, 105-113.
- Domercq M *et al.* (2006) P2Y1 Receptor-evoked Glutamate Exocytosis from Astrocytes: CONTROL BY TUMOR NECROSIS FACTOR- α AND PROSTAGLANDINS. *J. Biol. Chem.* **281**, 30684-30696.
- Draguhn A, Verdorn TA, Ewert M, Seeburg PH, & Sakmann B (1990) Functional and molecular distinction between recombinant rat GABAA receptor subtypes by Zn²⁺. *Neuron* **5**, 781-788.
- Duan S *et al.* (2003) P2X7 Receptor-Mediated Release of Excitatory Amino Acids from Astrocytes. *Journal of Neuroscience* **23**, 1320-1328.
- Ebert B, Wafford KA, Whiting PJ, Krogsgaard-Larsen P, & Kemp JA (1994) Molecular pharmacology of gamma-aminobutyric acid type A receptor agonists and partial agonists in oocytes injected with different alpha, beta, and gamma receptor subunit combinations. *Mol Pharmacol* **46**, 957-963.
- Edwards FA, Konnerth A, & Sakmann B (1990) Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol* **430**, 213-249.
- Egan TM, Samways DS, & Li Z (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**, 501-512.
- Elger CE & Schramm J (1993) [The surgical treatment of epilepsy]. *Radiologe* **33**, 165-171.
- Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, & Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* **28**, 351-354.
- Fam SR, Gallagher CJ, & Salter MW (2000) P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J Neurosci* **20**, 2800-2808.
- Farber K & Kettenmann H (2006) Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch.* **452**, 615-621.
- Farrant M & Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 215-229.
- Fellin T, Pozzan T, & Carmignoto G (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol. Chem.* **281**, 4274-4284.
- Fisher JL, Zhang J, & Macdonald RL (1997) The Role of alpha 1 and alpha 6 Subtype Amino-Terminal Domains in Allosteric Regulation of gamma -Aminobutyric Acids Receptors. *Mol Pharmacol* **52**, 714-724.
- Fraser DD *et al.* (1995) GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* **15**, 2720-2732.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, & MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* **11**, 83-93.

- Freed DM, Corkin S, & Cohen NJ (1987) Forgetting in H.M.: A second look. *Neuropsychologia* **25**, 461-471.
- Galarreta M & Hestrin S (1997) Properties of GABAA Receptors Underlying Inhibitory Synaptic Currents in Neocortical Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience* **17**, 7220-7227.
- Gallo V, Mangin JM, Kukley M, & Dietrich D (2008) Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions? *J. Physiol* **586**, 3767-3781.
- Ge S *et al.* (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439**, 589-593.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GI, & Song H (2007) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends in Neurosciences* **30**, 1-8.
- Glykys J, Mann EO, & Mody I (2008) Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci* **28**, 1421-1426.
- Glykys J & Mody I (2007a) Activation of GABAA Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft. *Neuron* **56**, 763-770.
- Glykys J & Mody I (2007b) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* **582**, 1163-1178.
- Guthrie PB *et al.* (1999) ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves. *Journal of Neuroscience* **19**, 520-528.
- Hadingham KL *et al.* (1993) Role of the beta subunit in determining the pharmacology of human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol. Pharmacol.* **44**, 1211-1218.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
- Haydon PG (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**, 185-193.
- Haydon PG & Carmignoto G (2006) Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiol. Rev.* **86**, 1009-1031.
- Hevers W & Lüddens H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* **18**, 35-86.
- Hoppe D & Kettenmann H (1989) GABA triggers a Cl⁻ efflux from cultured mouse oligodendrocytes. *Neurosci Lett.* **97**, 334-339.
- Horner PJ *et al.* (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* **20**, 2218-2228.
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, & Smart TG (2003) Zinc-mediated inhibition of GABAA receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci* **6**, 362-369.
- Huguenard JR & Alger BE (1986) Whole-cell voltage-clamp study of the fading of GABA-activated currents in acutely dissociated hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **56**, 1-18.

- Iglesias R, Dahl G, Qiu F, Spray DC, & Scemes E (2009) Pannexin 1: The Molecular Substrate of Astrocyte "Hemichannels". *Journal of Neuroscience* **29**, 7092-7097.
- Inoue K (1998) The functions of ATP receptors in the hippocampus. *Pharmacol Res.* **38**, 323-331.
- Jabs R *et al.* (2007) Lack of P2X receptor mediated currents in astrocytes and GluR type glial cells of the hippocampal CA1 region. *Glia* **55**, 1648-1655.
- Jabs R, Paterson IA, & Walz W (1997) Qualitative analysis of membrane currents in glial cells from normal and gliotic tissue in situ: down-regulation of Na⁺ current and lack of P2 purinergic responses. *Neuroscience* **81**, 847-860.
- Jabs R *et al.* (2005) Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J Cell Sci* **118**, 3791-3803.
- James G & Butt AM (2001) P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ. *Cell Calcium* **30**, 251-259.
- Jia F *et al.* (2008) Taurine Is a Potent Activator of Extrasynaptic GABAA Receptors in the Thalamus. *Journal of Neuroscience* **28**, 106-115.
- Jones MV & Westbrook GL (1995) Desensitized states prolong GABAA channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* **15**, 181-191.
- Jones MV, Sahara Y, Dzubay JA, & Westbrook GL (1998) Defining Affinity with the GABAA Receptor. *Journal of Neuroscience* **18**, 8590-8604.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, & Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* **1**, 683-692.
- Karram K *et al.* (2008) NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis.* **46**, 743-757.
- Kettenmann H, Backus KH, & Schachner M (1984) Aspartate, glutamate and [gamma]-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neuroscience Letters* **52**, 25-29.
- Kettenmann H, Okland RK, Lux HD, & Schachner M (1982) Single potassium channel currents in cultured mouse oligodendrocytes. *Neuroscience Letters* **32**, 41-46.
- Kettenmann H & Schachner M (1985) Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience* **5**, 3295-3301.
- Khakh BS (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**, 165-174.
- Khakh BS & North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**, 527-532.
- Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, & Jones A (2003) ATP Modulation of Excitatory Synapses onto Interneurons. *Journal of Neuroscience* **23**, 7426-7437.

- Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, & Lester HA (1999) Allosteric Control of Gating and Kinetics at P2X₄ Receptor Channels. *Journal of Neuroscience* **19**, 7289-7299.
- Khan ZU, Gutierrez A, Miralles CP, & De Blas AL (1996) The gamma subunits of the native GABA_A/benzodiazepine receptors. *Neurochem. Res* **21**, 147-159.
- Khom S *et al.* (2006) Pharmacological Properties of GABA_A Receptors Containing {gamma}1 Subunits. *Mol Pharmacol* **69**, 640-649.
- Kimelberg HK (2004) The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International* **45**, 191-202.
- Kinney GA & Spain WJ (2002) Synaptically Evoked GABA Transporter Currents in Neocortical Glia. *J Neurophysiol* **88**, 2899-2908.
- Kirchhoff F & Kettenmann H (1992) GABA Triggers a [Ca²⁺]_i Increase in Murine Precursor Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *Eur J Neurosci* **4**, 1049-1058.
- Kirchhoff F, Mulhardt C, Pastor A, Becker CM, & Kettenmann H (1996) Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord. *J Neurochem.* **66**, 1383-1390.
- Knoflach F, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, & Mohler H (1993) Full and partial agonism displayed by benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acid_A receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **266**, 385-391.
- Korpi ER, Gründer G, & Lüddens H (2002) Drug interactions at GABA_A receptors. *Progress in Neurobiology* **67**, 113-159.
- Kriegstein A, Noctor S, & Martinez-Cerdeno V (2006) Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci* **7**, 883-890.
- Krogsgaard-Larsen P (1980) Inhibitors of the GABA uptake systems. *Mol Cell Biochem* **31**, 105-121.
- Kukley M, Barden JA, Steinhäuser C, & Jabs R (2001) Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* **36**, 11-21.
- Kukley M, Stausberg P, Adelman G, Chessell IP, & Dietrich D (2004) Ecto-Nucleotidases and Nucleoside Transporters Mediate Activation of Adenosine Receptors on Hippocampal Mossy Fibers by P2X₇ Receptor Agonist 2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)-ATP. *Journal of Neuroscience* **24**, 7128-7139.
- Kyrozis A & Reichling DB (1995) Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J. Neurosci. Methods* **57**, 27-35.
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, & Verkhratsky A (2006) NMDA Receptors Mediate Neuron-to-Glia Signaling in Mouse Cortical Astrocytes. *Journal of Neuroscience* **26**, 2673-2683.
- Lalo U *et al.* (2008) P2X₁ and P2X₅ Subunits Form the Functional P2X Receptor in Mouse Cortical Astrocytes. *Journal of Neuroscience* **28**, 5473-5480.

- Langer SZ, Faure-Halley C, Seeburg P, Graham D, & Arbilla S (1992) The selectivity of zolpidem and alpidem for the [alpha]1-subunit of the GABAA receptor. *European Neuropsychopharmacology* **2**, 232-234.
- Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, & Martin del RR (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res* **384**, 145-155.
- Lin SC & Bergles DE (2004) Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **7**, 24-32.
- Lin Sc *et al.* (2005) Climbing Fiber Innervation of NG2-Expressing Glia in the Mammalian Cerebellum. *Neuron* **46**, 773-785.
- Liu QR, Lopez-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, & Nelson N (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 12145-12149.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, & Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* **8**, 1179-1187.
- Lozan JL & Kausch H *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*(Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg, 2004).
- Macdonald RL & Barker JL (1978) Different actions of anticonvulsant and anesthetic barbiturates revealed by use of cultured mammalian neurons. *Science* **200**, 775-777.
- Macdonald RL, Rogers CJ, & Twyman RE (1989) Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABAA receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* **417**, 483-500.
- MacVicar BA, Tse FW, Crichton SA, & Kettenmann H (1989) GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* **9**, 3577-3583.
- Magistretti PJ & Pellerin L (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci* **354**, 1155-1163.
- Magoski NS, Walz W, & Juurlink BH (1992) Identification of mouse type-2-like astrocytes: demonstration of glutamate and GABA transmitter activated responses. *J Neurosci Res.* **33**, 91-102.
- Malatesta P, Hartfuss E, & Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-5263.
- Malchow RP, Qian HH, & Ripps H (1989) gamma-Aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Muller (glial) cells are mediated by neuronal-like GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 4326-4330.
- Mangan PS *et al.* (2005) Cultured Hippocampal Pyramidal Neurons Express Two Kinds of GABAA Receptors. *Mol Pharmacol* **67**, 775-788.

- Matsui K & Jahr CE (2004) Differential Control of Synaptic and Ectopic Vesicular Release of Glutamate. *Journal of Neuroscience* **24**, 8932-8939.
- Matthias K *et al.* (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **23**, 1750-1758.
- McClellan AM & Twyman RE (1999) Receptor system response kinetics reveal functional subtypes of native murine and recombinant human GABAA receptors. *J. Physiol* **515** (Pt 3), 711-727.
- Mehta AK & Ticku MK (1999) An update on GABAA receptors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **29**, 196-217.
- Meinecke DL, Tallman J, & Rakic P (1989) GABAA/benzodiazepine receptor-like immunoreactivity in rat and monkey cerebellum. *Brain Res* **493**, 303-319.
- Minelli A, Brecha NC, Karschin C, DeBiasi S, & Conti F (1995) GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* **15**, 7734-7746.
- Minelli A, DeBiasi S, Brecha NC, Vitellaro Zuccarello L, & Conti F (1996) GAT-3, a High-Affinity GABA Plasma Membrane Transporter, Is Localized to Astrocytic Processes, and It Is Not Confined to the Vicinity of GABAergic Synapses in the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* **16**, 6255-6264.
- Miyamoto E (2006) Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences* **100**, 433-442.
- Mody I (2001) Distinguishing between GABA(A) receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem. Res* **26**, 907-913.
- Mody I, Lambert JD, & Heinemann U (1987) Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* **57**, 869-888.
- Mody I & Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci.* **27**, 569-575.
- Mohler H (2006) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* **326**, 505-516.
- Mori T, Buffo A, & Gotz M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **69**, 67-99.
- Mortensen M & Smart TG (2006) Extrasynaptic {alpha} {beta} subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* **577**, 841-856.
- Muller T *et al.* (1994) Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* **14**, 2503-2514.

- Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* **263**, 1768-1771.
- Neher E & Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Newman EA, Frambach DA, & Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* **225**, 1174-1175.
- Nilsson M, Eriksson PS, Rönnbäck L, & Hansson E (1993) GABA induces Ca²⁺ transients in astrocytes. *Neuroscience* **54**, 605-614.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, & Helmchen F (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* **308**, 1314-1318.
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, & Zhu X (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* **10**, 9-22.
- Nolte C *et al.* (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* **33**, 72-86.
- Norenberg W & Illes P (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* **362**, 324-339.
- North RA (2002) Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013-1067.
- Nusser Z, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, & Somogyi P (1996) Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11939-11944.
- Nusser Z, Sieghart W, & Mody I (1999) Differential regulation of synaptic GABA_A receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *J Physiol* **521 Pt 2**, 421-435.
- Nusser Z & Mody I (2002) Selective Modulation of Tonic and Phasic Inhibitions in Dentate Gyrus Granule Cells. *J Neurophysiol* **87**, 2624-2628.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA, & Theodosis DT (2004) Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia* **47**, 258-267.
- Olsen RW & Sieghart W (2008a) GABA(A) receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*
- Olsen RW & Snowman AM (1982) Chloride-dependent enhancement by barbiturates of gamma-aminobutyric acid receptor binding. *J Neurosci* **2**, 1812-1823.
- Olsen RW & Sieghart W (2008b) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of {gamma}-Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacol Rev* **60**, 243-260.
- Orkand RK, Nicholls JG, & Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* **29**, 788-806.

Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, & Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* **158**, 126-136.

Parpura V *et al.* (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**, 744-747.

Pasti L, Volterra A, Pozzan T, & Carmignoto G (1997) Intracellular Calcium Oscillations in Astrocytes: A Highly Plastic, Bidirectional Form of Communication between Neurons and Astrocytes In Situ. *Journal of Neuroscience* **17**, 7817-7830.

Paxinos G & Franklin KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2. 2001. Academic Press.

Pearce RA (1993) Physiological evidence for two distinct GABA_A responses in rat hippocampus. *Neuron* **10**, 189-200.

Peters A (2004) A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J Neurocytol.* **33**, 345-357.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, & Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**, 815-850.

Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, & Mody I (1999) Modulation of Synaptic GABA_A Receptor Function by PKA and PKC in Adult Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience* **19**, 674-683.

Poliak S & Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* **4**, 968-980.

Polito A & Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* **207**, 707-716.

Prendergast FG & Mann KG (1978) Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* **17**, 3448-3453.

Prenosil GA *et al.* (2006) Specific Subtypes of GABA_A Receptors Mediate Phasic and Tonic Forms of Inhibition in Hippocampal Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* **96**, 846-857.

Pritchett DB & Seeburg PH (1990) Gamma-aminobutyric acid_A receptor alpha 5-subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. *J Neurochem.* **54**, 1802-1804.

Puia G, Vicini S, Seeburg PH, & Costa E (1991) Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents. *Mol. Pharmacol.* **39**, 691-696.

Qian H, Li L, Chappell RL, & Ripps H (1997) GABA Receptors of Bipolar Cells From the Skate Retina: Actions of Zinc on GABA-Mediated Membrane Currents. *J Neurophysiol* **78**, 2402-2412.

Ramón y Cajal S. Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. Trab.Lab.Invest.Biol.Univ.Madrid **11**, 255-315. 1913.

- Rapp G & Guth K (1988) A low cost high intensity flash device for photolysis experiments. *Pflugers Arch.* **411**, 200-203.
- Ribak CE, Tong WM, & Brecha NC (1996) Astrocytic processes compensate for the apparent lack of GABA transporters in the axon terminals of cerebellar Purkinje cells. *Anat Embryol. (Berl)* **194**, 379-390.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, & Markwardt F (2007) Kinetics of P2X7 Receptor-Operated Single Channels Currents. *Biophysical Journal* **92**, 2377-2391.
- Riquelme R, Miralles CP, & De Blas AL (2002) Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J. Neurosci.* **22**, 10720-10730.
- Roberts JA *et al.* (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* **452**, 486-500.
- Rosewater K & Sontheimer H (1994) Fibrous and protoplasmic astrocytes express GABAA receptors that differ in benzodiazepine pharmacology. *Brain Res.* **636**, 73-80.
- Ruiz A, Walker MC, Fabian-Fine R, & Kullmann DM (2004) Endogenous Zinc Inhibits GABAA Receptors in a Hippocampal Pathway. *J Neurophysiol* **91**, 1091-1096.
- Sanna E *et al.* (2002) Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABAA receptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* **451**, 103-110.
- Saxena NC & Macdonald RL (1994) Assembly of GABAA receptor subunits: role of the delta subunit. *Journal of Neuroscience* **14**, 7077-7086.
- Saxena NC & Macdonald RL (1996) Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol Pharmacol* **49**, 567-579.
- Schousboe A, Sarup A, Larsson OM, & White HS (2004) GABA transporters as drug targets for modulation of GABAergic activity. *Biochemical Pharmacology* **68**, 1557-1563.
- Schroder W, Seifert G, Huttmann K, Hinterkeuser S, & Steinhäuser C (2002) AMPA receptor-mediated modulation of inward rectifier K⁺ channels in astrocytes of mouse hippocampus. *Mol. Cell Neurosci.* **19**, 447-458.
- Scoville WB & Milner B (2000) Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **12**, 103-10a.
- Seifert G & Steinhäuser C (1995) Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur J Neurosci* **7**, 1872-1881.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, & Silver RA (2004) Tonicly active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.* **27**, 262-269.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, & varez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* **21**, 7153-7160.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, & Robitaille R (2006) GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. *Journal of Neuroscience* **26**, 5370-5382.

- Shukla V *et al.* (2005) Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **80**, 600-610.
- Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234.
- Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H, & Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron* **5**, 703-711.
- Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, & Surprenant A (2004) Reanalysis of P2X7 Receptor Expression in Rodent Brain. *Journal of Neuroscience* **24**, 6307-6314.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, & Barnard EA (2004) Analysis of the Set of GABAA Receptor Genes in the Human Genome. *J. Biol. Chem.* **279**, 41422-41435.
- Smart TG, Moss SJ, Xie X, & Huganir RL (1991) GABAA receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br. J Pharmacol* **103**, 1837-1839.
- Smart TG, Hosie AM, & Miller PS (2004) Zn²⁺ Ions: Modulators of Excitatory and Inhibitory Synaptic Activity. *Neuroscientist* **10**, 432-442.
- Smith KE *et al.* (1992) Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* **42**, 563-569.
- Somjen GG (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* **1**, 2-9.
- Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, & Sieghart W (1997) GABAA receptor subunits in the rat hippocampus I: Immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* **80**, 987-1000.
- Sperligh B, Vizi ES, Wirkner K, & Illes P (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **78**, 327-346.
- Steinhäuser C, Kressin K, Kuprijanova E, Weber M, & Seifert G (1994) Properties of voltage-activated sodium and potassium currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflugers Arch.* **428**, 610-620.
- Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, & Mariani CL (2005) Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurological Research* **27**, 685-691.
- Sul JY, Orosz G, Givens RS, & Haydon PG (2004) Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. *Neuron Glia Biol* **1**, 3-11.
- Swanson RA Astrocyte neurotransmitter uptake in *Neuroglia* (eds. Kettenmann, H. & Ransom, B.) 346-354 (Oxford University Press, Inc., New York, 2005).
- Thompson SA, Whiting PJ, & Wafford KA (1996) Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br. J Pharmacol* **117**, 521-527.
- Tietz EI, Kapur J, & Macdonald RL (1999) Functional GABAA Receptor Heterogeneity of Acutely Dissociated Hippocampal CA1 Pyramidal Cells. *J Neurophysiol* **81**, 1575-1586.

- Tossman U, Jonsson G, & Ungerstedt U (1986) Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system. *Acta Physiol Scand.* **127**, 533-545.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, & Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* **47**, 803-815.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, & Sieghart W (1997) Stoichiometry and Assembly of a Recombinant GABAA Receptor Subtype. *Journal of Neuroscience* **17**, 2728-2737.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev Biochem* **67**, 509-544.
- Twyman RE, Rogers CJ, & Macdonald RL (1989) Pentobarbital and picrotoxin have reciprocal actions on single GABAA receptor channels. *Neurosci Lett.* **96**, 89-95.
- Usovich MM, Gallo V, & Cull-Candy SG (1989) Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *Nature* **339**, 380-383.
- Verdoorn TA (1994) Formation of heteromeric gamma-aminobutyric acid type A receptors containing two different alpha subunits. *Mol Pharmacol* **45**, 475-480.
- Verkhratsky A & Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in Glia. *Neuroscientist* **13**, 28-37.
- Verkhratsky A & Steinhäuser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews* **32**, 380-412.
- Volterra A & Steinhäuser C (2004) Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia* **47**, 249-257.
- Volterra A & Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**, 626-640.
- von Blankenfeld G *et al.* (1990) Differential benzodiazepine pharmacology of mammalian recombinant GABAA receptors. *Neurosci. Lett.* **115**, 269-273.
- Wafford KA *et al.* (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABAA receptor beta subunit. *Neuron* **12**, 775-782.
- Wafford KA, Bain CJ, Whiting PJ, & Kemp JA (1993a) Functional comparison of the role of gamma subunits in recombinant human gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. *Mol. Pharmacol.* **44**, 437-442.
- Wafford KA, Whiting PJ, & Kemp JA (1993b) Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **43**, 240-244.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, & Steinhäuser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* **48**, 36-43.
- Walz W, Gimpl G, Ohlemeyer C, & Kettenmann H (1994) Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J Neurosci Res* **38**, 12-18.
- Walz W & Magoski NS (1991) Short-circuiting effects of K⁺ currents on electrical responses of type-1-like astrocytes from mouse cerebral cortex. *Brain Research* **567**, 120-126.

- Wang DD & Kriegstein AR (2008) GABA Regulates Excitatory Synapse Formation in the Neocortex via NMDA Receptor Activation. *Journal of Neuroscience* **28**, 5547-5558.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, & Mody I (2003) Perisynaptic Localization of δ Subunit-Containing GABAA Receptors and Their Activation by GABA Spillover in the Mouse Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience* **23**, 10650-10661.
- White G & Gurley DA (1995) Alpha subunits influence Zn block of gamma 2 containing GABAA receptor currents. *Neuroreport* **6**, 461-464.
- Williamson AV, Mellor JR, Grant AL, & Randall AD (1998) Properties of GABA(A) receptors in cultured rat oligodendrocyte progenitor cells. *Neuropharmacology* **37**, 859-873.
- Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, & Whiting PJ (1994) The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4569-4573.
- Wisden W (1995) Structure and distribution of multiple GABAA receptor subunits with special reference to the cerebellum. *Ann. N. Y. Acad Sci* **757**, 506-515.
- Wisden W, McNaughton LA, Darlison MG, Hunt SP, & Barnard EA (1989) Differential distribution of GABAA receptor mRNAs in bovine cerebellum--localization of alpha 2 mRNA in Bergmann glia layer. *Neurosci. Lett.* **106**, 7-12.
- Yaari Y, Konnerth A, & Heinemann U (1983) Spontaneous epileptiform activity of CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions. *Exp. Brain Res.* **51**, 153-156.
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, & Ransom BR (2003) Functional Hemichannels in Astrocytes: A Novel Mechanism of Glutamate Release. *Journal of Neuroscience* **23**, 3588-3596.
- Zhu X, Bergles DE, & Nishiyama A (2008) NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* **135**, 145-157.

8. Abkürzungen

| | |
|---------------------------------|--|
| [Cl ⁻] _i | intrazelluläre Chlorid-Konzentration |
| 4-AP | 4-Amminopyridin |
| ACSF | artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit |
| ADP | Adenosin-di-Phosphat |
| AHS | Ammonshornsklerose |
| AMPA | α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat |
| ATP | Adenosin-tri-Phosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BBB | Blut-Hirn-Schranke |
| BZ | Benzodiazepin |
| CA | Cornu Ammonis |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| Cm | Membrankapazität |
| CNQX | 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione |
| CGP 55845 | (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinsäure |
| DIC | Differential-Interferenz-Kontrast |
| DMCM | Methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-β-carbolin-carboxylat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPCPX | 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin |
| DZ | Diazepam |
| dNTP | Desoxyribonukleotid-Triphosphat |
| EC ₅₀ | mittlere effektive Konzentration |
| E _{Cl⁻} | Chlorid-Umkehrpotential |
| EGFP | verbessertes grün fluoreszierendes Protein |
| EPSC | exzitatorischer, postsynaptischer Strom |
| GABA | γ-Aminobuttersäure |
| mGAT-1 | muriner GABA Transporter 1 |
| mGAT-2 | muriner GABA Transporter 2 |
| mGAT-3 | muriner GABA Transporter 3 |
| mGAT-4 | muriner GABA Transporter 4 |
| GFAP | saures Gliafaserprotein |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|---|
| GLAST | Glutamat/Aspartat-Transporter |
| GLT-1 | Glutamat-Transporter-1 |
| GluR | Glutamat-Rezeptor |
| GluT | Glutamat-Transporter |
| hGFAP | Humanes-Saures-Gliafaserprotein |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-1ethansulfonsäure |
| IP ₃ | Inositoltriphosphat |
| IPSC | inhibitorischer, postsynaptischer Strom |
| KCC2 | K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter |
| kHz | Kilohertz |
| LOR | Loreclezol |
| LTP | Langzeitpotenzierung |
| LY 341495 | (2S)-2-Amino-2-[(1S,2S)-2-carboxycycloprop-1-yl]-3-(xanth-9-yl) Propionsäure |
| mGluR | metabotroper Glutamat-Rezeptor |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| n | Anzahl |
| NG2 | Chondroitinsulfat Proteoglykan Nerv/Glia 2 |
| n _H | Hill-Koeffizient |
| NBQX | 2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoyl-Benzo(f)quinoxalin-2,3-Dion |
| NKCC1 | Na ⁺ -K ⁺ -2 Cl ⁻ -Kotransporter |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| O2A | Oligodendrozyt Typ 2 Astrozyt |
| Olig2 | Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2 |
| P2X | purinerge Rezeptor, Liganden-gesteuerter Ionenkanal |
| P2Y | purinerge G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| PBT | Pentobarbital |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| RNasin | RNase Inhibitor |
| R _s | Serienwiderstand |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| SGL | Subgranularzellschicht |
| SKF 89976A | 1-(4,4-Diphenyl-3-butenyl)-3-Piperidincarboxylsäure |

Abkürzungen

| | |
|-----------|--|
| SNAP 5114 | 1-[2-[tris(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl]-(S)-3-Piperidincarboxylsäure |
| SVZ | Subventrikuläre Zone |
| tg | transgen |
| TEA | Tetra-Ethyl-Ammonium-Chlorid |
| TLE | Temporallappenepilepsie |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| TTX | Tetrodotoxin |
| V_H | Klemmspannung oder auch Haltespannung |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| ZPD | Zolpidem |

9. Appendix

9.1 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, den

(Michael Grauer)

