

**Generierung und Charakterisierung transgener Mausmodelle  
zur Untersuchung und Beeinflussung neuronaler Netzwerke**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

(Dr. rer. nat.)

doctor rerum naturalium (Dr. rer. Nat)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl.-Ing. (FH) Ralf Dittmann**

**geboren am 05. August 1981 in Gera**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. med. Christian Hübner  
Universitätsklinikum Jena, Institut für Humangenetik**
- 2. Prof. Dr. rer. nat. Aria Baniahmad  
Universitätsklinikum Jena, Institut für Humangenetik und Biologische Fakultät**
- 3. Prof. Dr. med. Dirk Isbrandt  
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen Köln, Experimentelle Neurophysiologie**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. Mai 2019**

Für meine Familie

**Inhaltsverzeichnis****Abkürzungsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	Neuronale Netzwerke .....	2
2.2	Interneurone .....	5
2.3	GABA und GABAerge Synapse .....	7
2.4	Manipulation neuronaler Netzwerke .....	10
2.5	Der K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Kotransporter 2 (KCC2).....	11
2.6	Photostimulation .....	14
2.7	Optogenetik .....	14
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
4.1	Material.....	18
4.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	18
4.1.2	Puffer, Lösungen und Medien .....	18
4.1.4	Primer .....	21
4.1.5	Plasmide .....	22
4.1.6	Antikörper .....	22
4.1.7	Software.....	23
4.1.8	Zelllinien.....	23
4.1.9	Mauslinien.....	23
4.2	Kultur prokaryotischer Zellen.....	23
4.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	23
4.2.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	24
4.2.3	Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien.....	24
4.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	24

4.3.1	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen .....	25
4.3.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen .....	26
4.3.3	Hippokampale und kortikale primäre Neuronenkulturen der Maus .....	26
4.3.4	Kultivierung embryonaler Maus-Fibroblasten.....	27
4.3.5	Kultivierung von ES-Zellen.....	28
4.3.6	Auftauen von ES-Zellen .....	28
4.3.7	Transfektion und Selektion von ES-Zellen .....	28
4.4	RNA-Methoden.....	29
4.4.1	RNA-Isolation.....	29
4.4.2	<i>Northern Blot</i> .....	30
4.4.3	Synthese komplementärer DNA.....	31
4.4.4	<i>In situ</i> Hybridisierung .....	31
4.5	DNA-Methoden.....	32
4.5.1	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	32
4.5.2	<i>Hot-Shot</i> DNA Extraktion aus Schwanzbiopsien.....	32
4.5.3	Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren .....	32
4.5.4	Agarosegelelektrophorese .....	33
4.5.5	Isolation von DNA aus Agarosegelen .....	33
4.5.6	Polymerase-Ketten-Reaktion .....	33
4.5.7	Restriktionsverdau .....	34
4.5.8	Ligation .....	34
4.5.9	<i>Southern Blot</i> .....	35
4.5.10	Screening von ES-Zellen .....	35
4.5.11	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Hybridisierung .....	35
4.6	Protein-Methoden .....	36
4.6.1	Isolation von Proteinen .....	36
4.6.2	Bestimmung der Konzentration von Proteinen.....	37
4.6.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37

4.6.4	<i>Western Blot</i> Analyse.....	37
4.6.5	Nachweis von Beta-Galaktosidase ( $\beta$ -Galaktosidase-Assay) .....	38
4.7	Eingriffe an Mäusen.....	38
4.7.1	Injektion von ES-Zellklonen in Blastozysten .....	38
4.7.2	Rotarod .....	39
4.7.3	Transkardiale Perfusion von Mäusen.....	39
4.7.4	Anfertigung von Gewebeschnitten .....	39
4.8	Antikörperfärbung von Gewebeschnitten.....	40
4.9	Antikörperfärbung von Zellkulturen.....	40
4.10	Elektrophysiologie .....	41
4.10.1	Präparation akuter Hirnschnitte .....	41
4.10.2	Messung von lokalen Feldpotentialen.....	41
4.10.3	<i>Patch-Clamp</i> Messungen .....	43
4.10.4	Aufnahme lokaler Feldpotentiale (LFPs) im Hippokampus .....	44
4.11	Statistische Methoden .....	47
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
5.1	Funktionelle Charakterisierung von PV-spezifischen KCC2 KO Mäusen .....	48
5.1.1	Immunhistochemischer Nachweis der PV <sup>cre</sup> Spezifität.....	48
5.1.2	Generierung PV-spezifischer KCC2 KO Mäuse.....	49
5.1.3	Allgemeine Beobachtungen bei PV <sup>cre+</sup> KCC2 <sup>flox/flox</sup> und KCC2 <sup>flox/+</sup> Mäusen	50
5.1.4	Verifizierung des zelltypspezifischen KO von KCC2 .....	52
5.1.5	Analyse der Überlebensrate bis Tag 250 .....	53
5.1.6	Gewichtsanalyse und ROTAROD-Motoriktest .....	53
5.1.7	Messung lokaler Feldpotentiale nach dem <i>Paired-Pulse</i> Paradigma .....	55
5.1.8	<i>Patch-Clamp</i> Aufnahmen kortikaler Pyramidenzellen .....	57
5.1.9	Analyse der hippocampalen LFP-Tiefenprofile .....	59
5.2	Herstellung des konditionalen ChR2 Mausmodells .....	62
5.2.1	Generierung einer „geflochten“ ChR2-Mauslinie.....	62

5.2.2	Generierung und Charakterisierung einer ChR2-Mauslinie .....	64
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
6.1	<b>Deletion des K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Kotransporters KCC2 in PV-positiven Interneuronen</b> .....	<b>67</b>
6.2	Die murine Expression von Channelrhodopsin-2 .....	80
6.3	Fazit und Ausblick .....	82
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
8.1	Plasmidkarten.....	108
8.2	Elektrophysiologie – Tabellen.....	111
8.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung - FISH .....	113
8.4	Danksagung .....	114
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung .....	115

**Abkürzungsverzeichnis**

$^{32}\text{P}$	radioaktiv markiertes Phosphor
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent, 1/100
Å	Ångström, $10^{-10}$ m
AAV	adenoassoziierter Virus
aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AK	Antikörper
AMPA(R)	<i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (receptor)</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
Bq	Becquerel, 1/s
$[\text{Cl}^-]_i$	intrazelluläre Chloridkonzentration
C	elektrische Kapazität
CA 1/3	<i>cornu Ammonis 1/3</i>
(c)DNA	<i>(copy/complementary)</i> Desoxyribonukleinsäure
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propansulfonat
ChR2	Channelrhodopsin-2
cm	Zentimeter
$\text{cm}^2$	Quadratcentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
(d)dH <sub>2</sub> O	(doppelt-) destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E3.5	embryonaler Tag 3,5
$E_{\text{Cl}^-}$	Gleichgewichtspotentialen von $\text{Cl}^-$
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
$E_{\text{GABA}}$	Umkehrpotential $\text{GABA}_A\text{R}$ -vermittelter Ströme
$E_{\text{HCO}_3^-}$	Gleichgewichtspotentialen von $\text{HCO}_3^-$

ES	embryonale Stammzelle
(E)PSP	<i>(excitatory)</i> postsynaptisches Potential
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein, YFP</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m/s}^2$
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GABA <sub>A</sub> R	GABA-A-Rezeptor
GABA <sub>B</sub> R	GABA-B-Rezeptor
GABA <sub>erg</sub>	GABA-vermittelt, GABA-ausschüttend
GABA <sub>ρ</sub> R	GABA <sub>A</sub> -rho-Rezeptoren
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
H134R Chr2	Chr2 mit Einzelpunktmutation an Position H134
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HET	heterozygoter Knockout
Hz	Hertz, 1/s
IgG	Immunglobulin G
ISI	Inter-Stimulus-Intervalle
KCC2	Kalium-Chlorid-Kotransporter 2
kHz	Kilohertz
KI	Knock-In
KO	Homozygoter Knockout
h	Stunde
l	Liter
ISI	Inter-Stimulus-Intervall
kb	Kilobasen
kD	(Kilo)-Dalton; entspricht $1/12$ der Masse eines isolierten Atoms des Kohlenstoff-Isotops $^{12}\text{C}$ im Grundzustand
LFP	lokales Feldpotential
LB	<i>lysogeny broth</i>
LFP(s)	Lokales Feldpotential
M	Mol, molar
MΩ	Megaohm, $10^6 \text{ kg}\cdot\text{m}^2/(\text{A}^2\cdot\text{s}^3)$
mA	Milliampere

MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mIPSC	<i>miniature</i> inhibitorischer postsynaptischer Strom
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
mW	Milliwatt, $10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^3$
MW	Molekulargewicht
m/w	Masseanteil
n	Stückzahl, Menge
ng	Nanogramm
NKCC1	Na-K-Cl-Kontransporter 1
NMDAR	<i>N-Methyl-D-aspartate receptor</i>
nm	Nanometer
NMT	Natrium-Magnesium-Trispuffer
NP-40	Nonidet P-40, Octoxinol 9
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
P0 / P3	postnataler Tag 0 bzw. 3
pA	Picoampere
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptavidin
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PPR	<i>Paired-Pulse Rate/Ratio</i>
PV	Parvalbumin
PVI	Parvalbumin exprimierende Interneuronen
REM	<i>rapid eye movement</i>

RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
sIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-Diol
TTX	Tetrotoxin
U	Spannung
V	Volt; $\text{kg}\cdot\text{m}^2/(\text{A}\cdot\text{s}^3)$
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
(E)YFP	(Enhanced) <i>Yellow Flourescent Protein</i>
$\beta$ Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$\mu\text{F}$	Mikrofarad, $\text{A}^2\cdot\text{s}^4/(\text{kg}\cdot\text{m}^2)$
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

## 1 Zusammenfassung

Die komplexe Struktur des neuronalen Netzwerks des Gehirns bildet die Grundlage höherer Fähigkeiten wie Kognition und Verhalten. In der vorliegenden Arbeit sollte das neuronale Netzwerk über verschiedene Wege manipuliert werden und die eventuellen Auswirkungen *in vivo* untersucht werden. Zum einen wurde der Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC2 in Parvalbumin(PV)-positiven Interneuronen deletiert, zum anderen wurde ein Mausmodell generiert, um den photoaktivierbaren Kationen-Kanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) konditional in Neuronen exprimieren zu können.

Die Inaktivierung von KCC2 in PV-positiven Interneuronen konnte über verschiedene molekularbiologische Methoden bestätigt werden. Knockout-Mäuse zeigten eine erhöhte Sterblichkeit, Motordefizite sowie epileptische Anfälle. Elektrophysiologisch konnte an akuten Hirnschnitten eine veränderte Plastizität sowie veränderte Netzwerkeigenschaften nachgewiesen werden.

Es ist vorstellbar, dass der Knockout von KCC2 in PV-positiven Interneuronen zu einer Disinhibition dieser Zellen führt, die dadurch vermehrt GABA ausschütten. Dies könnte sich unmittelbar auf das neuronale Netzwerk auswirken. Weitere elektrophysiologische Untersuchungen an akuten Hirnschnitten der generierten Mäuse können die Funktion PV-positiver Interneurone genauer spezifizieren.

Optogenetische Werkzeuge stellen eine alternative Möglichkeit dar, die Erregbarkeit von Zellen zur Untersuchung neuronaler Netzwerke selektiv zu modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine konditionale ChR2-Mauslinie generiert, um mithilfe lichtsensitiver Ionenkanäle selektiv Einfluss auf das Membranpotential nehmen zu können. Nach Verpaarung mit einer Cre-Deleter-Mauslinie konnte die Expression von ChR2-DNA, -RNA und -Protein verifiziert werden. Allerdings konnten Neurone nicht durch Licht moduliert werden, da offenbar die Expressionsstärke zu gering war.

## 2 Einleitung

### 2.1 Neuronale Netzwerke

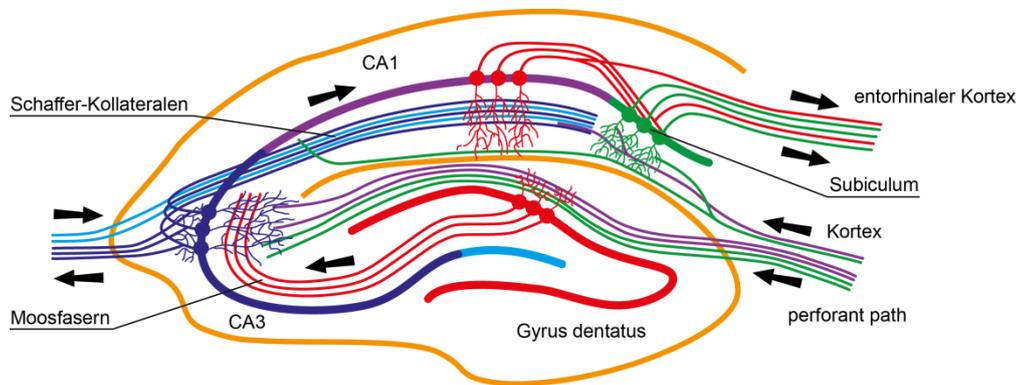
Die Nervenzelle ist die Grundeinheit unseres Nervensystems. Obwohl es viele verschiedene Arten gibt, ist die Komplexität menschlichen Verhaltens eher auf deren Organisation in anatomisch definierten Netzwerken zurückzuführen als auf deren Vielfalt (Kandel 2013). Demzufolge können Nervenzellen je nach Art ihrer Verschaltung unterschiedliche Aktionen hervorrufen. Emotionen und Kognition sind unabdingbar miteinander verbunden (Singer 2012, Wranke 2012).

Ein Modell neuronaler Netzwerke soll die Strukturen und Informationsketten der Nervensysteme von Tieren oder Menschen in vereinfachter Weise darstellen. Das neuronale Netzwerk stellt dabei ein informationsverarbeitendes System dar, wobei sich die einzelnen Einheiten Informationen in Form von Aktivierung und Hemmung über gerichtete Verbindungen zusenden. Die Informationen werden dabei in Form von Aktivitätsmustern über Verbindungen zwischen den Neuronen weitergegeben. Kein Netzwerk ist dauerhaft gleichbleibend. Jederzeit werden neue Verbindungen zwischen Neuronen geschaffen oder bestehende gelöst (Kennedy 2013, Overk und Masliah 2014, Vyazovskiy und Harris 2013).

Jedes Verhalten wird von einer speziellen Aktivierung verschalteter Neurone vermittelt, wobei die Verhaltensweise jedes Neurons wiederum durch seine Verbindungen zu anderen Neuronen determiniert ist. Modelle für die Interaktion zwischen vernetzten Zellverbänden und deren Untersuchungen ermöglichen, die Leistungen des Gehirns auf anatomische Verbindungsmuster zurückzuführen und diese in Form von neuronalen Netzwerken dazustellen.

Der humane Kortex besteht aus sechs Schichten, wobei sich jede Schicht durch eine andere Komposition an säulenförmig gekoppelten Zelltypen- und Verbindungen auszeichnet. Die Neurone innerhalb einer Säule erregen sich meist gegenseitig stark, diejenigen in Nachbarsäulen schwächer und Neurone in weiter entfernten Säulen können sogar gehemmt werden (Ramón y Cajal 1899, Kandel et al. 1991). Der Hippokampus besteht aus *Gyrus dentatus*, *cornu Ammonis* 1 bis 3 (CA1 bis CA3) und Subiculum, sowie - funktionell betrachtet – dem entorhinalen Kortex. Der Hippokampus in Säugtieren spielt eine kritische Rolle beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung. Er transformiert Information aus assoziativen Kortexregionen und sendet die verarbeiteten Daten hauptsächlich über Projektionsneuronen in der CA1-Region. Efferenzen führen von dort

zu verschiedenen Hirnregionen wie den medialen prefrontalen Kortex, den medialen entorhinalen Kortex oder die Amygdala (Cenquizca und Swanson 2007). Es wäre denkbar, dass sie die Wechselwirkungen zwischen den Hirnarealen während Gedächtnisprozessen koordinieren (Fanselow et al. 2008, Maren und Quirk 2004). Das hippocampale Netzwerk passieren die Signale auf verschiedenen Signalwegen (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des unidirektionalen hippocampalen Netzwerks. Der entorhinalen Kortex ist eine Schnittstelle zu verschiedenen Hirnregionen und erhält von dort Eingangssignale (Burwell 2000). Letztendlich führen alle Kreisläufe zurück zum entorhinalen Kortex, wobei Projektionen aus der *cornu Ammonis* (CA) 1-Region (CA1) und dem Subiculum zum Neokortex und in subkortikale Regionen wie der Amygdala oder dem Hypothalamus sowie zu zahlreichen anderen Teilen des Gehirns verlaufen (van Strien et al. 2009). **(A) temporo-ammonic pathway:** CA1-Neurone erhalten direkten Eingang vom entorhinalen Kortex (Maccaferri und McBain 1995, Ramón y Cajal 1911). **(B) perforant path:** das Subiculum wird von Zellausläufern des entorhinalen Kortex durchdrungen und Neurone in CA3 und Gyrus dentatus bzw. CA1 und Subiculum werden affiziert (Amaral et al. 1990, Breindl et al. 1994, Witter 2007). **(C) Drei-Synapsen-Signalweg:** der entorhinalen Kortex projiziert auf die Körnerzellen im Gyrus dentatus. Die Axone der Körnerzellen projizieren über die Moosfasern auf Pyramidenzellen der CA3-Region, welche wiederum über die Schaffer-Kollaterale in das *Stratum radiatum* zu den Pyramidenzellen im CA1 sowie zu Pyramidenzellen des kontralateralen Hippokampus projizieren. Die CA1-Neurone entsenden ihre Ausläufer zurück zum entorhinalen Kortex. (Shepherd 2004) (modifiziert nach: <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/>, 21.06.2013).

Sowohl am Beispiel des Hippokampus als auch am Kortex lässt sich das Prinzip der funktionellen Segregation belegen. Dieses besagt, dass sich unterschiedliche Hirnfunktionen verschiedenen Bereichen und Strukturen des Hirns anatomisch zuordnen lassen. Verschiedene Regionen des Gehirns repräsentieren dabei Netzwerke verschiedener Funktionen und definierte kognitive Leistungen lassen sich bestimmten kortikalen Regionen zuordnen. Der Kortex wird zum Beispiel in 52 Zentren, die sogenannten Brodmann Areale, eingeteilt (Brodmann 1909). Diese Zentren können weiter in kleinere partielle Netzwerke untergliedert werden. Beispielsweise werden sämtliche Regionen der Körperoberfläche im sensorischen Kortex in einzelnen Zonen repräsentiert, wodurch die Informationsverarbeitung als modular angesehen werden kann (Longo et al. 2010, Rasmussen und Penfield 1947).

Die Komplexität der Hirnfunktionen beruht nicht allein auf dem Prinzip der Segregation, sondern wird durch die Vernetzung funktioneller Prozesse unterstützt (Tononi et al. 1994). Dieses Prinzip der funktionellen Integration besagt, dass die Nervenzellen und die Nervenzellverbände in vielschichtiger Art und Weise durch Nervenfasern miteinander verschaltet sind und dass so die neuronalen Funktionen in hohem Grad voneinander abhängig sind (Edelman, 1987, 1989; Edelman, 1993). Beispielsweise werden Erinnerungen im Gehirn als spezifische Aktivitätsmuster zwischen Netzwerken von Neuronen repräsentiert (Deuker et al. 2013).

In einem neuronalen Netzwerk können Synapsen als Verknüpfung aufgefasst werden. Ein Neuron kann hierbei Signale mehrerer Neurone über Dendriten erhalten (Konvergenz), als auch Signale über Axone an mehrere Neuronen senden (Divergenz). Es wird zwischen chemischen Synapsen und elektrischen Synapsen unterschieden. Elektrische Synapsen sind mechanische, elektrisch leitfähige Verbindungen zweier benachbarter Zellen. Aufgrund der Eigenschaft eine schmale Lücke zu formen werden sie *gap junctions* genannt und kommen neben dem Gehirn unter anderem im Herz, in glatter Muskulatur und im Drüsengewebe vor (Collingridge und Lester 1989). Im Gehirn befinden sich jedoch überwiegend chemische Synapsen, wodurch die neuronale Kommunikation über elektrochemische Signale vermittelt wird. Ist ein Neuron ausreichend elektrisch erregt, das heißt ein entsprechender Schwellenwert des Membranpotentials von etwa -55 bis -45 mV wird überschritten, bildet sich am Axonhügel ein Aktionspotential, welches über das Axon orthodrom zur Synapse weitergeleitet wird. In regelmäßigen Abständen wird dieses an den Ranvier-Schnürringen der Myelinscheide regeneriert, was als saltatorische Erregungsleitung bekannt ist (Brophy 2003). Die Informationsübertragung findet schließlich an der Synapse statt. Hier werden Vesikel mit Neurotransmittern entsprechend der Frequenz und Dauer des Aktionspotentials in den synaptischen Spalt freigesetzt (Hille 1992). Diese Vesikel liegen bereits direkt an der präsynaptischen Membran als sofort freisetzbare Reserve vor oder werden aus dem Zytoplasma zur Membran transportiert (Zucker und Regehr 2002). An der postsynaptischen Membran binden die Neurotransmitter an spezifische Rezeptoren, wodurch wiederum ein elektrisches Signal erzeugt wird.

Die Art des Neurons determiniert hierbei, welcher Neurotransmitter ausgeschüttet wird. Dieser kann, je nach Art und Zustand des Zielneurons, die Auslösung eines postsynaptischen Aktionspotentials begünstigen (exzitatorisch) oder verhindern (inhibitorisch). Die unterschiedlichen Auswirkungen der Signalübertragung an chemischen Synapsen

kommen somit aufgrund der Vielfältigkeit von Nervenzellen und deren charakteristischen Eigenschaften zustande. Eine grobe funktionelle Einteilung von Nervenzellen erfolgt in sensorische Neurone, motorische Neurone und Interneurone. Sensorische Neurone übermitteln dem Nervensystem Informationen, die der Wahrnehmung und indirekt der motorischen Koordination dienen, Motoneurone kontrollieren hingegen die Muskelzellen. Interneurone sind beiden zwischengeschaltet und werden daher auch Schaltneurone genannt (Kandel 2013).

## 2.2 Interneurone

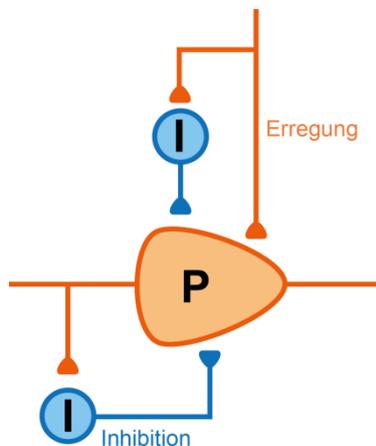
Interneurone lassen sich anhand ihrer Morphologie, intrinsischer Membraneigenschaften, Netzwerkverbindungen und der Wirksamkeit und Dynamik der Input- und Output-Synapsen, einhergehend mit der Expression spezifischer molekularer Marker, in verschiedene Subklassen einteilen (Ascoli et al. 2008, Cauli et al. 1997, Kawaguchi und Shindou 1998, Markram et al. 2004, Somogyi und Klausberger 2005, Yuste 2005). GABA-freisetzende (GABAerge) Interneuronenklassen variieren zudem in ihrer Reaktion auf Neuromodulatoren, ihren Aktivitäten die hochgradig die Funktionen von neokortikalen Netzwerken beeinflussen und sie sind verantwortlich für dynamische Veränderungen, welche mit Änderungen des Gehirnzustandes und Verhaltensweisen verknüpft sind (Bacci et al. 2005, Fanselow et al. 2008, Gao et al. 2003, Kawaguchi 1997, Kruglikov und Rudy 2008, Xiang et al. 1998).

Anhand der Marker Parvalbumin, Somatostatin und Serotoninrezeptor 5HT3a lassen sich GABAerge Interneuronen im Neokortex in die drei entsprechenden Klassen unterteilen (Ascoli et al. 2008, Rudy et al. 2011). Im Hippokampus liegen hingegen PV-positive und cholecystokin-positive Korbzellen, axo-axonische Chandelier-Zellen, *oriens-lacunosum-moleculare*-Interneurone sowie *bistratified* und Efeu-Zellen (Blasco-Ibáñez und Freund 1995, Fuentealba et al. 2008, Klausberger und Somogyi 2008, Kullmann 2011). Ein Kriterium der Einteilung stellt hierbei die Art der Netzwerkverbindungen dar. Die Korbzellen zeichnen sich durch die Bildung axosomatischer Synapsen aus, Chandelier-Zellen hingegen durch axo-axonische Verbindungen (Kandel 2013).

Interneurone wirken im Normalfall inhibierend auf nachgeschaltete Neurone (Abbildung 2). Darüber hinaus existieren auch wenige exzitatorische Interneurone. Zum einen befinden sich glutamatergere Interneurone in Schicht IV des Kortex sowie im Rückenmark, zum anderen sind acetylcholinerge Interneurone im *Striatum* beschrieben (Zhou et al. 2001, Santos et al. 2007).

Der Großteil der Interneurone setzt jedoch den Neurotransmitter GABA frei. Obwohl GABAerge Interneurone nur einen kleinen Teil aller Neurone im gesamten Nervensystem ausmachen, spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Koordination der neuronalen Aktivität (Kawaguchi et al. 1987). GABAerge Interneurone sind über die Inhibition in die Synchronisation des neuronalen Netzwerks involviert (Cobb et al. 1995, Ylinen et al. 1995b). GABA stellt den hauptsächlich inhibitorischen Transmitter in höheren Hirnregionen dar, während Glyzin den größten Teil inhibitorischer Neurotransmitter im Stammhirn und im Rückenmark ausmacht. So können Interneurone im Hinterhorn des Rückenmarks GABA und/oder Glyzin freisetzen (Chéry und de Koninck 1999, Jonas et al. 1998).

Einzelne Interneurone können hunderte von Pyramidenzellen kontrollieren (Halasy et al. 1996, Mohajeri und Cherubini 2005). Dadurch wird der Output dieser Zellen reguliert und ihre Aktivität in verschiedene Frequenzbänder synchronisiert (Cobb et al. 1995, Ylinen et al. 1995b, Ylinen et al. 1995a, Galarreta und Hestrin 1999, Gibson et al. 1999, Tamás et al. 2000, Szabadics et al. 2001).



**Abbildung 2:** *feedback* und *feedforward* Inhibition. Bei der Vorwärtshemmung (*feedforward*, oben) werden Zielneuron (P, Pyramidenzelle) und modulierendes Interneurone (I) parallel erregt. Bis zum Abklingen der Hemmung löst das Zielneuron kein Aktionspotential aus und die Reizweiterleitung wird verzögert (Pouille und Scanziani 2001). Bei der *feedback* Inhibition (unten) erregt das Zielneuron ein Interneuron, welches wiederum das Zielneuron inhibiert. Die Dauer und die Ausbreitung eines Signals kann so begrenzt werden (Watanabe et al. 1998).

Solche Netzwerkoszillationen werden im gesunden Hirn mit kognitiven Fähigkeiten speziell beim Lernen und bei der Gedächtnisbildung sowie neuronaler Plastizität und höheren Fähigkeiten in Verbindung gebracht (Engel et al. 2001, Singer 1993, Gray und Singer 1989, Singer 2012, Rodriguez et al. 1999, Miltner et al. 1999). Im EEG lassen sich verschiedene neuronale Aktivitäten spezifischen Frequenzbändern zuordnen (Tabelle 1).

So zeigt zum Beispiel der Hippokampus eine große Bandbreite periodisch synchroner Aktivitätsmuster. In aktiven Mäusen treten hier neben theta-Oszillationen auch gamma-Oszillationen sowohl bei der Erkundung bzw. als auch während des *rapid eye movement* (REM)-Schlafes auf (Montgomery et al. 2008). Hochfrequente Oszillationen (*Ripp-*

les, 120-200 Hz) zeigen sich hingegen während des *slow-wave* Schlafes. Auch die Interaktion verschiedener Frequenzbänder, wie die Kopplung des hippokampalen theta-Rhythmus und der gamma-Oszillationen beim REM-Schlaf, ist nachweisbar (Bragin et al. 1995, Buzsáki et al. 2003).

**Tabelle 1:** Frequenzbänder im EEG

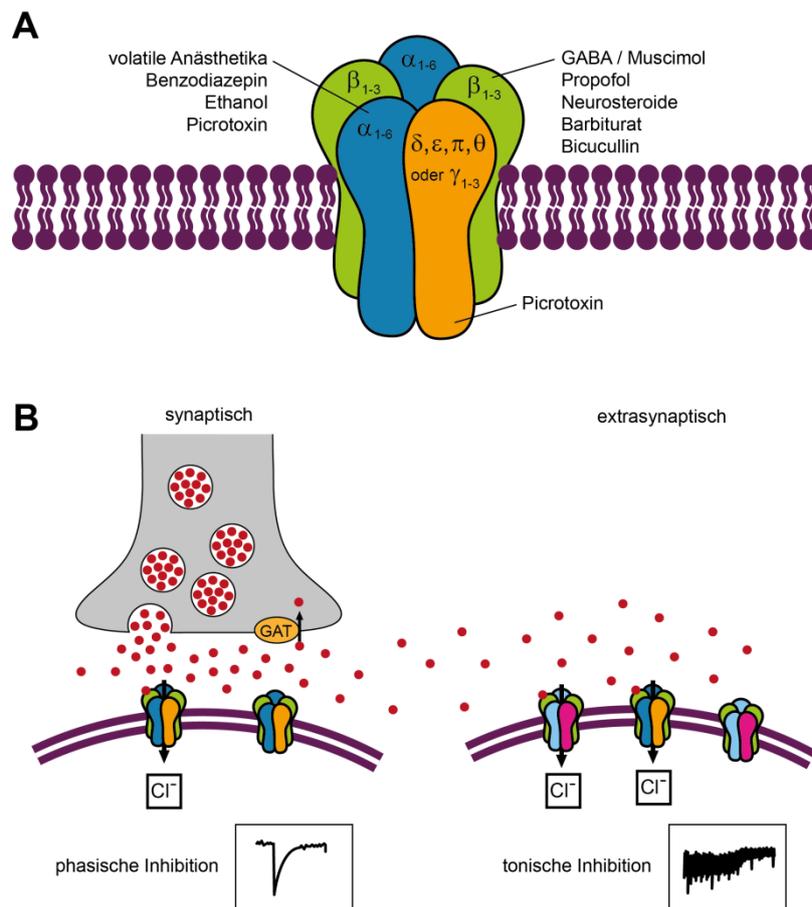
Name	Frequenz	Besonderheiten, Auftreten
alpha	8 - 13 Hz	thalamischer Herkunft, bei Entspannung und geschlossenen Augen
beta	13 - 30 Hz	bei Bewusstsein, über den Motorkortex mit gleichbleibenden Muskelkontraktionen assoziiert, bei wechselnden vermindert
gamma	30 - 100 Hz	bewusste Wahrnehmung, somatosensorischer Kortex
delta	< 4 Hz	hohe Amplitude, non-REM-Schlaf, geht aus Thalamus oder Kortex hervor
theta	4 - 8 Hz	REM-Schlaf, Erkunden, motorische Aufgaben (Laufen), hippokampalen oder kortikalen Ursprungs

### 2.3 GABA und GABAerge Synapse

Die durch Interneurone ausgeschütteten Neurotransmitter modulieren die Erregbarkeit nachfolgender Nervenzellen durch indirekte Veränderungen des Membranpotentials (Krnjević, 1974). Bei GABA-Rezeptoren werden drei Klassen unterschieden: GABA<sub>A</sub>Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>R), GABA<sub>A</sub>-rho-Rezeptoren (GABA<sub>ρ</sub>R) und GABA<sub>B</sub>Rezeptoren (GABA<sub>B</sub>R) (Johnston, 1996).

Die metabotropen G-Protein-gekoppelten GABA<sub>B</sub>R setzen eine *second-messenger*-Kaskade in Gang, die inhibitorisch wirkt. Molekular stellt der GABA<sub>B</sub>R ein Heterodimer aus den zwei Untereinheiten GABA<sub>B(1a,2)</sub> und GABA<sub>B(1b,2)</sub> dar (Schwenk et al. 2010). Die GABA<sub>B2</sub> Untereinheit trägt hierbei die wichtige Bindestelle für das G-Protein (Bowery et al. 2002). Eine Aktivierung des GABA<sub>B</sub>R führt zu einer G-Protein vermittelten Signaltransduktion und infolgedessen zur Regulation der Aktivität von Kir3-Typ Kaliumkanälen, spannungsgesteuerten Kalziumkanälen und der Adenylatzyklase (Gassmann und Bettler 2012). Die hyperpolarisierende Wirkung ist durch den postsynaptischen Ausstrom von K<sup>+</sup> sowie die Inaktivierung spannungsgesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle an der Präsynapse bedingt. Somit nähert sich das Membranpotential dem Gleichgewichtspotential von K<sup>+</sup> bzw. verringert den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> und folglich die Freisetzung von Neurotransmittern (Chalifoux und Carter 2011). Das Umkehrpotential des GABA<sub>B</sub>R ist hierbei mit -100 mV deutlich negativer als das des GABA<sub>A</sub>R (Ulrich und Huguenard 1996).

Die GABA<sub>A</sub>R und GABA<sub>A</sub>-rho-R sind pentamere ligandenabhängige Ionenkanäle in der Plasmamembran (Olsen und Sieghart 2009). Sie bestehen meist aus zwei  $\alpha$ -, zwei  $\beta$ -, und einer  $\gamma$ -Untereinheiten, können sich jedoch aus einem Pool von sechs  $\alpha$ -, drei  $\beta$ -, drei  $\gamma$ - sowie jeweils eine  $\delta$ -,  $\varepsilon$ -,  $\theta$ - und  $\pi$ - bzw. drei  $\rho$ -Untereinheiten zusammensetzen (Zhang et al. 1995, Moss und Smart 2001, Olsen und Sieghart 2008). Ausschließlich  $\rho$ -Untereinheiten formen die GABA<sub>A</sub>- $\rho$ -Rezeptoren (Enz und Cutting 1998, Ogurusu et al. 1999, Connolly et al. 1996). Die Zusammensetzung des GABA<sub>A</sub>R determiniert das pharmakologische Profil, die Kinetik und die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors (Fisher 2004, Fritschy et al. 2006) (Abbildung 3 A). Allen gemein ist die Bildung einer ionenselektiven Pore für Cl<sup>-</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des GABA<sub>A</sub>R. **(A)** Der GABA<sub>A</sub>R kann in verschiedenen Kompositionen der Untereinheiten auftreten. Zudem sind bekannte Bindungsstellen verschiedener Agonisten und Antagonisten angegeben (modifiziert nach Reddy 2011). **(B)** Phasische (links) und tonische Inhibition (rechts) werden von GABA<sub>A</sub>R unterschiedlicher Zusammensetzung vermittelt. Synaptisch:  $\alpha_{1-3,5}$ ,  $\beta_x$ ,  $\gamma_2$ ; extrasynaptisch:  $\alpha_{4,6}$ ,  $\beta_x$ ,  $\delta$ . GABA diffundiert hierbei aus dem synaptischen Spalt (*spillover*). Aus dem synaptischen Spalt wird GABA durch den GABA-Transporter 1 (GAT) wieder aufgenommen (*reuptake*) (modifiziert nach Benarroch 2007, Hines et al. 2012).

Der durch GABA hervorgerufene Strom ist im adulten Hirn aufgrund des  $\text{Cl}^-$ -Gradienten, der durch den  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  Kotransporter KCC2 aufrecht erhalten wird, meist nach außen gerichtet und resultiert in einem hyperpolarisierenden GABAergen Strom (Payne 1997, Farrant und Kaila 2007). Dies ist Voraussetzung für die schnelle synaptische Inhibition und reduziert die Wahrscheinlichkeit, Aktionspotentiale auszulösen, da die Zelle am Erreichen des Schwellenwertes, bei welchem wiederum ein Aktionspotential ausgelöst wird, gehindert wird (Kandel 2013).

Da das  $\text{Cl}^-$ -Umkehrpotential ( $E_{\text{GABA}}$ ) ist in vielen Neuronen nahe dem Ruhemembranpotential ( $U_M$ ), verursacht der GABA eine so genannte *shunting inhibition* (engl. überbrücken) ungeachtet der Richtung des Stromflusses, der in einigen Regionen des *Gyrus dentatus* einwärts gerichtet ist und so depolarisierend wirkt (Staley und Mody 1992). Diese Überbrückungseigenschaft der  $\text{GABA}_A\text{Rn}$  resultiert in diesen Fällen daraus, dass die relativ geringe treibende Kraft für einen  $\text{Cl}^-$ -Strom nur einen kleinen Ionenstrom auslöst, jedoch den Eingangswiderstand ( $R$ ) des Neurons aufgrund der geöffneten  $\text{Cl}^-$ -Kanäle reduziert. Dies schaltet die einfließenden Ströme ( $I$ ) parallel und vermindert deren Einfluss auf die Änderung der membranalen Spannung, beschrieben durch das Ohmsche Gesetz:  $U_M = I \times R$  (Gao et al. 1998, Lu und Trussell 2001). Obwohl  $\text{GABA}_A\text{Rezeptor-Subtypen}$ , die die tonische Inhibition vermitteln, im Vergleich mit jenen der synaptischen Inhibition schätzungsweise seltener vorkommen, ermöglicht dieser Effekt eine starke inhibierende Kraft durch Überbrücken der elektrischen Signaltransmission (Möhler et al. 2002).

Aktiviert  $\text{GABA}_A\text{R}$  können das Membranpotential auch über den Schwellenwert depolarisieren, so dass es zum Auslösen eines Aktionspotentials kommt. In fast allen fetalen und frühen postnatalen Neuronen ist die intrazelluläre Chloridkonzentration ( $[\text{Cl}^-]_i$ ) durch den Na-K-Cl Kotransporter 1 (NKCC1) und vor allem durch das Fehlen des K/Cl-Kotransporters 2 (KCC2) auf 25 - 40 mM (adult: 5mM) erhöht (Balakrishnan et al. 2003, Khirug et al. 2008). GABA vermittelt dabei den Efflux von  $\text{Cl}^-$  und wirkt also exzitatorisch. Da hier sowohl das  $E_{\text{HCO}_3^-}$  (-10 mV) als auch das  $E_{\text{Cl}^-}$  (-40 mV, adult: -70mV) deutlich positiver als das Ruhemembranpotential (-50 mV; adult: -70 mV) sind, wirkt GABA depolarisierend und somit exzitatorisch (Delpy et al. 2008).

Wird durch GABA-vermittelte Ströme nicht direkt der Schwellenwert zur Auslösung eines Aktionspotentials erreicht, können sich durch GABA spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen, so die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen und wiederum spannungsgesteuerte Kationenkanäle öffnen und final zur Depolarisation führen (Leinekugel

et al. 1997, Owens et al. 1996). Dieses exzitatorische postsynaptische Potential ist ähnlich dem der glutamatergen Exzitation. Die erregende Wirkung von GABA könnte ein Faktor für frühe Netzwerkaktivitäten, Netzwerkformierung, neuronale Migration und der Differenzierung von Synapsen sein (Ben-Ari et al. 2007, Ben-Ari et al. 1989, Caiati et al. 2010, Leinekugel et al. 1999, Leinekugel et al. 1997, Owens und Kriegstein 2002a, Owens und Kriegstein 2002b).

Abhängig von seiner ortsspezifischen Expression und der Komposition seiner Untereinheiten vermittelt der GABA<sub>A</sub>R entweder eine synaptische phasische oder eine extrasynaptische tonische Inhibition (Farrant und Nusser 2005) (Abbildung 3 B). Beide Arten der Inhibition kontrollieren die Erregbarkeit der Zelle (Brickley et al. 1996). Die Kombination der oben genannten Untereinheiten, vor allem der Einbau der  $\delta$ -Untereinheit, verleihen extrasynaptischen Rezeptoren eine höhere Affinität für GABA (Farrant und Kaila 2007, Glykys et al. 2008). Durch die erhöhte Leitfähigkeit sind mehr exzitatorische Signale nötig, um ein Aktionspotential auszulösen. Das ambiente GABA stammt hierbei aus Gliazellen oder dem sogenannten *spillover* der phasischen Hemmung, bei dem synaptisch ausgeschüttetes GABA den synaptischen Spalt verlässt (Glykys und Mody 2007, Mapelli et al. 2009).

Eine weitere Modulation GABAerger Aktivität durch Recycling von GABA obliegt Gliazellen und präsynaptischen Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>-gekoppelten Transportern wie dem GABA-Transporter 1, der verantwortlich für die Wiederaufnahme von GABA ist (Engel et al. 1998, Dalby 2003).

## 2.4 Manipulation neuronaler Netzwerke

Für eine genaue *in vivo* Untersuchung der Aktivität von Hirnregionen, Nervenzellgruppen bis hin zur Ableitung einzelner Nervenzellen wurden Methoden wie das EEG, das funktionelle *Neuroimaging: Positron Emission Tomography, Functional Magnetic Resonance Imaging* bzw. das *Patch-Clamp* Verfahren entwickelt (Neher und Sakmann 1976, Ogawa et al. 1990, Phelps 2006, Swartz 1998). Darüber hinaus werden Computer zur Simulation von Netzwerken genutzt. Diese künstlichen neuronalen Netze entstanden aus dem Bestreben, die grundlegenden Mechanismen des menschlichen Gehirns nachzuahmen. Analog zum Menschen sollen die Probleme nicht durch Programmieren, sondern durch Lernprozesse gelöst werden und sich das Netzwerk durch Lernvorgänge selbst organisieren (Zaun 1999).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten neuronale Netzwerke gezielt zu manipulieren. Mechanisch können bestehende Verbindungen getrennt oder Läsionen induziert werden (Cramer et al. 2008, Jin et al. 2009). Die Neuromechanik untersucht Netzwerke durch äußere Einflussnahme (Edwards 2010). Die Neuromodulation hingegen zielt darauf ab, die Aktivität des Nervensystems mittels pharmazeutischer Wirkstoffe, elektrischer Impulse oder anderer Energiestimuli zu verstärken oder zu hemmen. Neurale Schnittstellen sollen mithilfe technischer Geräte neuronale Funktionen verstärken oder ersetzen. Die Stimulation spezifischer Regionen stellt hierbei die Funktion des neuronalen Gewebes wieder her (Cullen et al. 2011). Daneben kommen Mikroelektroden, die Optogenetik und andere optische Verfahren, wie die Zwei-Photonen-Mikroskopie, zum Einsatz (Cullen und Pfister 2011, Deisseroth & National Institutes of Health (U.S.) 2012).

Artifizielle neuronale Netzwerke können aus theoretischen und berechneten Modellen abgeleitet und auf Computern anhand theoretischer oder experimenteller Daten implementiert werden. So lassen sich ggf. das Verhalten neuronaler Systeme hinsichtlich Ionenkonzentrationsdynamik, Kanaldynamik, Einzelneuronverhalten oder Systemtheorien überprüfen bzw. vorhersagen (LaPlaca et al. 2005).

Die schnelle synaptische Übertragung ist auf Ionenströme durch ligandengesteuerte Kanäle angewiesen (Hille 2001). Werden diese manipuliert, kann auf die Erregbarkeit der Zelle und somit auf das Netzwerk Einfluss genommen werden.

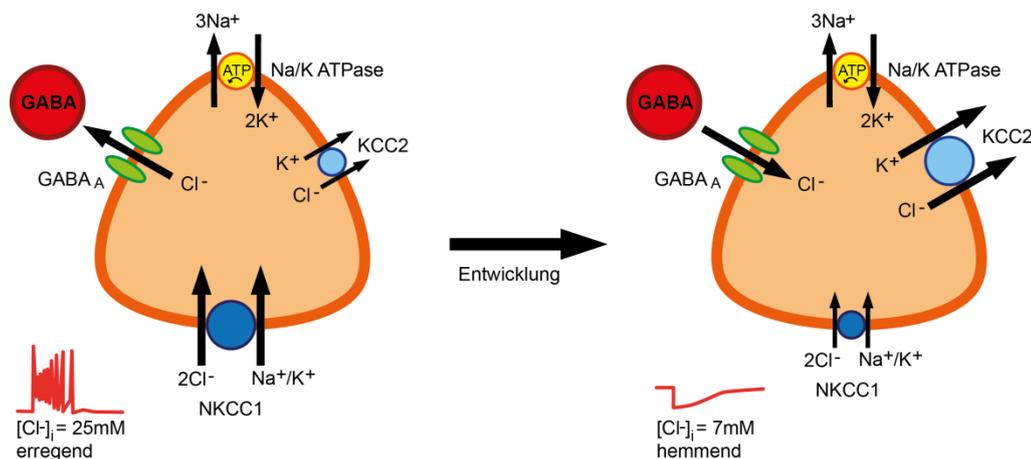
Durch gezielte genetische Manipulationen können bei der Einstellung und Beeinflussung des Membranpotential und des Gleichgewichtspotential involvierte Proteine in ihrer Funktion verstärkt, gehemmt oder ausgeschaltet werden und somit die Erregbarkeit der Zellen ändern. Diese Expressionssysteme ermöglichen eine zelltypspezifische, lokal und temporär begrenzte und somit hochauflösende Modulation des Netzwerkes. Das bedeutet, durch gezieltes Ausschalten bestimmter Ionenkanäle in definierten Neuronpopulationen und Untersuchungen an einem solchen Netzwerk lassen sich Rückschlüsse auf dessen Funktion ziehen, um die Komplexität des Gesamtnetzwerkes leichter verstehen zu können.

## **2.5 Der $K^+/Cl^-$ -Kotransporter 2 (KCC2)**

Die Genfamilie *solute carrier family 12* (SLC12a) umfasst neun Gene (Gamba 2005). Vier Mitglieder KCC1, KCC2, KCC3 und KCC4 dieser KCC-Genfamilie wurden bereits identifiziert und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer gewebespezifischen Expression

(Mount et al. 1999). KCC2 (SLC12a5) wird exklusiv in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert (Payne et al. 1996, Williams et al. 1999).

Bisher sind zwei KCC2-Isoformen bekannt, KCC2a und KCC2b, wobei KCC2a einen längeren N-Terminus ausweist. Während KCC2a in Mäusen ein geringes, fast gleichbleibendes Expressionsniveau besitzt, unterliegt KCC2b (ab hier KCC2) einer entwicklungsabhängigen Expressionsänderung. Zwischen embryonalem Tag 17 (E17) und postnatalem Tag 14 (P14) erhöht sich die Expression um den Faktor 10 bis 35, ab P20 ist das adulte Expressionsniveau erreicht (Williams et al. 1999, Hübner et al. 2001, Stein et al. 2004, Khirug et al. 2005, Takayama und Inoue 2006, Nardou et al. 2011). Diese Entwicklung geht mit einer drastischen Reduzierung von NKCC1 einher (Gulyás et al. 2001, Rivera et al. 1999, Stein et al. 2004, Hübner et al. 2001) (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Ionentransport durch die Kotransporter NKCC1 und KCC2 in unreifen (links) und reifen (rechts) Neuronen. Der aktive Transporter Na-K-ATPase erhöht die intrazelluläre Kaliumkonzentration bei gleichzeitiger Senkung der intrazellulären Natriumkonzentration. NKCC1 und KCC2 nutzen die Energie des so erzeugten elektrochemischen Gradienten um K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> zusammen mit Wasser in bzw. aus der Zelle zu transportieren. Beide beeinflussen somit die Regulierung des Zellvolumens und die Effizienz bzw. Polarität der Glyzin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten synaptischen Transmission. (modifiziert nach: Ben-Ari 2002)

KCC2 ist ein elektroneutraler Transporter, denn es wird jeweils ein K<sup>+</sup> zusammen mit einem Cl<sup>-</sup> aus der Zelle exportiert, wobei der K<sup>+</sup>-Gradient, welcher durch die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase erzeugt wird, als Triebkraft wirkt (Uvarov et al. 2005). Die Chloridkonzentration spielt bei vielen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der sensorischen Transduktion eine Rolle. Zudem determiniert sie die GABA-vermittelte Reaktion. Neben KCC2 transportiert u.a. der natriumabhängige Anionenaustauscher NDCBE (*Na<sup>+</sup>-driven chloride/bicarbonate exchanger*) Cl<sup>-</sup> nach außen und über den Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher bzw. den NKCC1 wird Cl<sup>-</sup> aufgenommen (Karadsheh und Delpire 2001, Payne et al.

2003, Gonzalez-Islas et al. 2009, Bellemer et al. 2011). Das Zusammenspiel aller Transporter determiniert die  $[Cl^-]_i$  und somit die exzitatorische oder inhibitorische GABA-Wirkung.

Dem Kotransporter KCC2 werden aber auch weitere ionentransportunabhängige Funktionen beim neuronalen Wachstum, der Formation von reifen Dendriten, der Ausbildung von funktionellen exzitatorischen Synapsen und der Erhaltung ihrer Funktion sowie der Netzwerkaktivität zugeschrieben. KCC2 fungiert durch direkte Interaktion mit dem neuronalen Zytoskelett-assoziierten Protein 4.1N als Ankerpunkt des Aktinzytoskeletts (Denker und Barber 2002, Li et al. 2007, Baines et al. 2009).

Expression und Funktion von KCC2 sind eng mit der Regulation neuronaler Aktivität verbunden und weitgehend unabdingbar für die Funktion eines intakten zentralen Nervensystems (Fiumelli und Woodin 2007). Besonders stark wird KCC2 sowohl in dendritischen *spines* von Pyramidenzellen als auch in Interneuronen exprimiert (Gulyás et al. 2001).

Räumlich und zeitlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der  $[Cl^-]_i$  und der Expression von KCC2 (Khirug et al. 2005, Rivera et al. 1999, Stein et al. 2004). Im adulten zentralen Nervensystem ist  $E_{Cl^-}$  negativer als das Membranpotential, sodass das Öffnen der GABA<sub>A</sub>R zur Hyperpolarisation und somit zur Inhibition des Neurons führt. In adulten Neuronen lokalisiert der Chloridextruder KCC2 somatisch und dendritisch, der Chloridimporter NKCC1 hingegen im Axon und Axoninitialsegment, wodurch  $E_{GABA}$  je nach intrazellulärer Region um ~20 mV differieren kann (Mercado et al. 2004, Szabadics et al. 2006).

Für KCC2 sind folgende Antagonisten beschrieben: Furosemid, ML077 und SAR (Payne et al. 1996, Korpi und Lüddens 1997, Delpire et al. 2012). Adulte hippocampale Neurone weisen beim *in-vitro* KCC2-*knock-down* eine reduzierte Dichte von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionische Säure (AMPA) Rezeptoren auf (Gauvain et al. 2011).

KCC2 Knockout-Mäuse sterben früh nach der Geburt. Sie weisen neurologische Defekte in Form von schweren motorischen Störungen und Atemversagen auf (Hübner et al., 2001). Schon im Hippokampus von E18.5 Knockout-Mäusen kann neben spontanen epileptiformen Ereignissen auch eine erhöhte Dichte GABAerger und glutamaterger Synapsen nachgewiesen werden (Li et al. 2007, Khalilov et al. 2011). Das Aktin-

Zytoskelett selbst wird durch Überexpression von KCC2 in embryonalen Neuronen verändert (Horn et al. 2010).

## 2.6 Photostimulation

Alternativ zur Nutzung der Stimulationselektrode der klassischen Elektrophysiologie mit ihren Limitationen hinsichtlich der räumlichen Auflösung können elektrische Signale in Zellen mithilfe der Photostimulation auslöst werden (Cogan 2008). Lichtstrahlen lassen sich lokal und zeitlich gut auflösen und wurden erstmals 1971 genutzt um neuronale Verbindungen zu kartieren, ohne dabei Schädigungen hervorzurufen (Fork 1971). Inzwischen gibt es verschiedene Methoden der Photostimulation: u.a. lichtvermitteltes „Befreien“ (*uncaging*), chemisch veränderte Ionenkanäle bzw. Rezeptoren und die Expression lichtsensitiver Proteine (Callaway und Katz 1993, Nagel et al. 2002, Banghart et al. 2004, Shoham et al. 2005).

Beim *uncaging* wird das Membranpotential oder die Signaltransduktion einer Zelle durch Freisetzung biochemisch aktiver Stoffe verändert. Die in Vesikel verpackten Signalmoleküle werden durch Licht freigesetzt (Ellis-Davies 2007). Neben Glutamat und GABA werden *second messenger* wie  $Ca^{2+}$  verwendet, um größere Netzwerke, Nervenzellregionen bis hin zu einzelnen Neuronen zu stimulieren (Pettit et al. 1997). Eine zelltypspezifische Aktivierung ist aufgrund der Heterogenität erregbarer Zellen schwierig (Teichberg 1991).

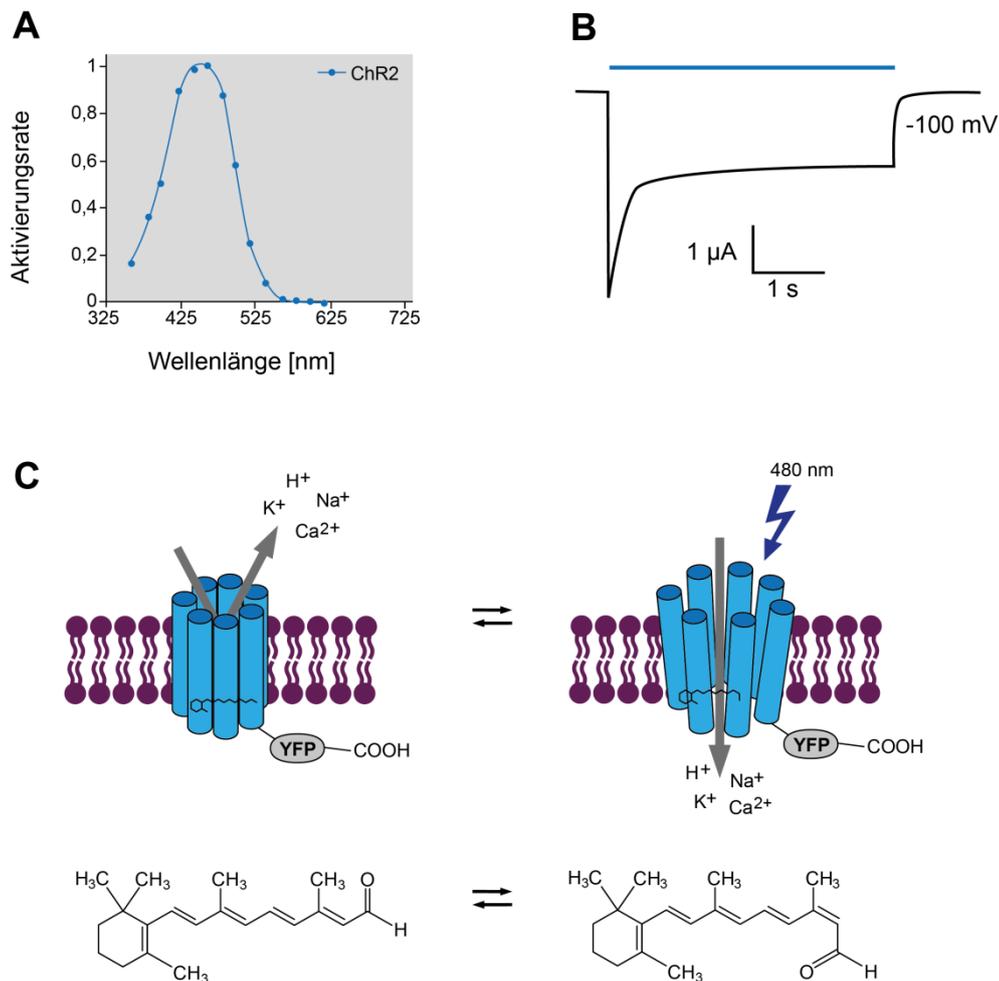
Der Shaker-Kaliumkanal ist ein Beispiel für chemisch modifizierte Ionenkanäle und Rezeptoren (Chambers et al. 2006). Eine Azobenzengruppe wird kovalent in der Nähe des aktiven Zentrums eines Kaliumkanalantagonisten integriert. Diese kann durch Licht isomerisiert werden und stellt so den Photoschalter dar. Mit lang- bzw. kurzwelligem Licht kann die Azobenzengruppe zwischen *cis* und *trans* geschaltet werden und der Kanal sich folglich öffnen oder schließen (Banghart et al. 2004). Die langsame Antwort auf das Lichtsignal stellt hier die größte Limitation dar.

## 2.7 Optogenetik

Die Optogenetik kombiniert Techniken aus Optik und Genetik. Diese Art der Neuromodulation ermöglicht die Kontrolle und die Überwachung einzelner Zellen in lebendem Gewebe bis hin zu sich frei bewegenden Tieren (Deisseroth et al. 2006). Anstelle der Verwendung exogener Substanzen werden lichtsensitive Proteine zellspezifisch expri-

miert. Auf nichtinvasive Weise lassen sich Neurone mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung manipulieren (Szobota et al. 2013).

Opsine zählen zu den natürlich vorkommenden photosensitiven Proteinen und spielen bei der Phototaxis oder der Sehkraft eine Rolle (Wald, 1968, Sineshchekov et al., 2002). Die Opsine von Typ I, die aus Mikroorganismen stammen, beeinflussen Membranströme direkt. Als Beispiele sind Protonenpumpen wie Bakteriorhodopsine, Halorhodopsine sowie Ionenkanäle (Kanalarhodopsine) zu nennen (Oesterhelt und Stoeckenius 1971, Matsuno-Yagi und Mukohata 1977, Nagel et al. 2003, Nagel et al. 2002).



**Abbildung 5:** (A) Aktivierungsspektrum von ChR2 mit einem Absorptionsmaximum bei circa 480 nm (Zhang et al. 2007a). (B) Durch Photonen ausgelöster Strom (Photostrom) in ChR2 exprimierenden Oozyten (2-Elektroden-Spannungsklemme) bei Stimulation mit blauem Licht (Balken) (Nagel et al. 2003). (C) Schematische Darstellung von ChR2 mit sieben Transmembrandomänen. Links: geschlossener Zustand, Retinal (unten) *all-trans*. Rechts: Konformationsänderung durch Exposition mit blauem Licht öffnet eine unspezifische Pore, Retinal *cis* (modifiziert nach E. Bamberg, <http://www.biophys.mpg.de/de/bamberg.html>, 20.06.2013).

Kanalarhodopsine öffnen entsprechend der Dauer und Intensität eines Lichtsignals und leiten dabei unspezifisch die folgenden Kationen H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> (Ernst et al. 2008). *In*

*vivo* und *in vitro* Studien nutzten ChR2 um Lichtsensitivität in Neuronen zu implementieren (Boyden et al. 2005, Nagel et al. 2003 und 2005, Zhang et al. 2007b).

Das Wildtyp (WT)-Protein des ChR2 besteht aus 737 Aminosäuren. Anwendung findet u.a. eine trunke Variante, da die ersten 315 Aminosäuren für ein funktionales Protein ausreichen. Der intrazellulär gelegene C-Terminus ist nicht funktional und kann zum Beispiel zur Detektierbarkeit mit einem fluoreszierenden Reporterprotein modifiziert werden (Boyden et al. 2005).

Im aktiven Zentrum der Pore, am Lys296, lokalisiert ein *all-trans* Retinal (Nagel et al. 2003). Bei Bestrahlung (Absorptionsmaximum circa 480 nm ) erfahren die  $\alpha$ -Helices binnen weniger Millisekunden eine Konformationsänderung (Bamann et al. 2008, Radu et al. 2009) (Abbildung 5 A, C). Es wird eine 6 Å große Pore gebildet, so dass die Ionen passieren die Membran ihrem elektrochemischen Gradienten folgend. Nach circa 10 ms kehrt das Retinal in seinen Grundzustand der *all-trans* Form zurück, folglich schießt der Kanal, der Ionenfluss kommt zum Erliegen und der Photozyklus ist beendet (Nagel et al. 2003).

Bei einer Stimulationsrate von 16,7 Hz kann ChR2 wiederholt Aktionspotentiale auslösen (Ishizuka et al. 2006). Bei fortwährender Stimulation wird zunächst ein Maximum und anschließend ein stabiler Zustand erreicht (Abbildung 5 B). Neurone können mit ChR2 zeitlich präzise, zuverlässig und repetitiv erregt werden, ohne die Zellen zu schädigen, da lediglich eine Lichtstärke von 5 bis 12 mW/mm<sup>2</sup> benötigt wird (Boyden et al., 2005, Nagel et al., 2005).

### 3 Ziele der Arbeit

In neuronalen Netzwerken werden Information durch Aktivitätsmuster repräsentiert. Für die Verarbeitung der Informationen ist das exakte Zusammenspiel von Hemmung und Erregung der Neurone von zentraler Bedeutung. Zeigen mehrere Neurone einer Region die gleiche Aktivität, spiegelt sich dies in Netzwerkoszillationen wider. Netzwerkoszillationen beeinflussen die Auswahl der Eingangssignale, verbinden Neuronen zeitweise zu funktionellen Einheiten und ermöglichen synaptische Plastizität, wodurch die temporäre oder langzeitliche Konsolidierung von Informationen unterstützt wird (Buzsáki und Draguhn 2004). GABAerge Interneurone spielen bei der Kontrolle der Netzwerkaktivität eine bedeutende Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es daher, verschiedene Ansätze zu realisieren, um das neuronale Netzwerk über eine Modulation der Aktivität der Interneurone zu beeinflussen:

- I. Generierung einer Mauslinie mit konditionalem Knockout von KCC2 in Parvalbumin-exprimierenden Interneuronen
- II. Phänotypische Charakterisierung des generierten Mausmodells durch elektrophysiologische Untersuchungen (Messung von IPSCs an Pyramidenzellen, lokale Feldpotentialregistrierungen an Hippokampus und Kortex, *in vivo* EEG-Ableitungen) und Verhaltenstest
- III. Etablierung einer konditionalen ChR2 Mauslinie. Anschließende Verpaarung der konditionalen ChR2-Mauslinie mit einem Cre-Deleter-Mausstamm bzw. gewebe-spezifisch Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinien.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) in der Qualität „zur Analyse“, die verwendeten Restriktionsenzyme von New England Biolabs (UK) und Fermentas (Sankt Leon-Rot) bezogen.

#### 4.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Name	Zusammensetzung
<i>broth</i> Medium	4 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM KCl, 0,3 % w/v Tetracyclin
Transformationspuffer 1	pH 5,8, 15 % v/v Glycerin, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub>
Transformationspuffer 2	15 % v/v Glycerin, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM RbCl
<i>Super Optimal broth</i> Medium	pH 7, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 2 % w/v Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
LB-Platte	1,5 % w/v Agar in LB Medium
LB-Medium	1 % w/v Tryptone, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 1 % w/v NaCl
Einfriermedium	10 % v/v DMSO, 90 % v/v FCS
Auftaumedium	95 % v/v DMEM + Glutamax + 4,5 g/l + Pyruvat, 5 % v/v FCS
Standard-Kulturmedium	94,5 % v/v DMEM + Glutamax + 4,5 g/l + Pyruvat, 5 % v/v FCS, 0,5 % v/v Pen/Strep
Borat-gepufferte Salzlösung	pH 7, 50 mM N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
Ausplattiermedium	89,4 % v/v Neuronenmedium 10 % v/v Pferdeserum, 0,6 % w/v Glucose
Neuronenmedium	97,8 % v/v Neurobasalmedium, 1 mM Glutamin, 2 % v/v B27, 0,1 % v/v Pen/Strep
MEF-Medium	88 % v/v DMEM + Glutamax + 4,5 g/l, 10 % v/v FCS, 1 % v/v nicht essentielle Aminosäuren (100x), 1 % v/v Pen/Strep
Einfriermedium (MEF)	50 % v/v FCS, 40 % v/v ES-Medium, 10 % v/v DMSO
ES-Medium	80 % v/v DMEM + 4,5 g/l + 25 mM HEPES, 14,8 % v/v FCS, 1 % v/v Glutamin [200 mM], 1 % v/v nicht-essentielle AS, 1 % v/v Pen/Strep, 1 % v/v Nucleosidmix (3 mM Adenosin, 3 mM Guanosin, 3 mM Cytidin, 3 mM Uridin, 1 mM Thymidin), 1 % v/v Natriumpyruvat (11 mg/ml), 0,15 % v/v 2-Mercaptoethanol (50 mM), 0,01% v/v leukaemia inhibitory factor (107 Units/ml)

2x Einfriermedium (ES)	80 % v/v FCS, 20 % v/v DMSO
DEPC-Wasser	0,1 % v/v DEPC
Agarosegel <i>Nothern Blot</i>	1 % Agarose, 1 % MOPS, 16,7 % Formaldehyd
5x RNA-Ladepuffer	0,16 % v/v gesättigte wässrige Bromphenolblaulösung, 0,8 % v/v 0,5 M EDTA pH 8.0, 7,2 % v/v Formaldehyd (37 %), 20 % v/v Glycerol, 31,8 % v/v Formamid, 40 % v/v 10x MOPS
10x MOPS	pH 7, 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10mM EDTA
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris-HCl pH 7.4, 1,5 M NaCl
20x SSC	pH 7, 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat
4 % Formaldehyd	pH 7.4, 4 % w/v Para-Formaldehyd in PBS
PBS	pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBST	0,1 % v/v Tween-20 in PBS
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	0,48 % w/v Tris-Base, 0,11 % v/v Essigsäure 100 %, 1 mM EDTA
Proteinase-K-Lösung	30 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,00013 w/v Proteinase K
Acetylierungspuffer	pH 8, 22,7 mM Essigsäureanhydrid in 0,1 M TEA
0,1 M TEA	1,5 % w/v Triethanolamin, 3,6 % v/v HCl 37 %
Hybridisierungslösung	0,42 % v/v Lachs-DNA, spezifische Sonde, in Hyb-A
Hyb-A	50 % v/v Formamid, 2 % v/v EDTA (500 mM), 15 % v/v 20xSSC, 2 % v/v 50x Denhardt's Reagenz, 20 % v/v 50 % Dextransulfat, 11 % v/v DEPC-H <sub>2</sub> O
50x Denhardt's Reagenz	1 % w/v Rinder-Serumalbumin, 1 % w/v Ficoll (MW=400kD), 1 % w/v Polyvinylpyrrolidon (MW=10kD)
Lösung (feuchten Kammer)	50 % v/v Formamid, 50 % v/v 2x SSC
Maleinsäurepuffer (MABT)	pH 7.5, 0,1 M Maleinsäure, 0,25 M NaCl, 0,1 % v/v Tween-20
Blockpuffer-1	1 % v/v <i>blocking</i> -Reagenz in MABT
Substratlösung	50 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 % v/v 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat (75 mg/ml in 70 % DMF), 0,375 % v/v Nitroblautetrazoliumchlorid (50 mg/ml in 100 % DMF), in NMT
Na-Mg-Trispuffer (NMT)	0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 9,5 bzw. pH 8.0, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Blockpuffer-2	10 % v/v <i>blocking</i> -Reagenz in MABT
alkalischer Lysepuffer	25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA
Neutralisierungspuffer	40 mM Tris-HCl

10x DNA-Ladepuffer	50 % v/v Glycerol, 0,125 % w/v Xylencyanol, 0,125 % w/v Bromphenolblau, 0,625 % w/v SDS
Transferpuffer	0,4 M NaOH
Lysepuffer (ES)	0,1 % w/v SDS, 0,1 % v/v Proteinase K (280 mg/ml), 0,1 % v/v RNase A (100 µg/ml)
TE-Puffer	pH 7.4, 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA
Hybridisierungspuffer (DNA)	7 % w/v SDS, 10 % v/v Polyethylenglykol, 1,5 x Natrium-Phosphat-EDTA- Lösung, 0,1 mg/ml Fischspermien-DNA
Waschpuffer	10 % v/v, 20x SSC, 0,1 % w/v SDS
Protein-Lysepuffer	1 % v/v Chaps, 10 % v/v Glycerol, 30 mM Tris-Base, 1 mM NaF, 150 mM NaCl, 1 % w/v NP-40, 10 mM KCl, 1 mM EDTA Frisch: Proteaseinhibitoren/10 ml (Roche), 0,1 Volumen 10 % SDS
5x Laemmli-Puffer	0,3 M Tris-HCl pH 6.8, 50 % v/v 10 ml Glycerol, 25 % v/v β-Mercaptoethanol, 10 % w/v SDS, 5 % v/v Bromphenolblau 1 %, 50 mM DTT
Laufpuffer (PAGE)	pH 7.4, 250 mM Tris-Base, 1,9 M Glyzin, 1 % w/v SDS
Blotpuffer (Western)	pH 8.3, 25 mM Tris-Base, 150 mM Glyzin, 20 % v/v Methanol
Tris-Puffer	pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-Base
TBST-Puffer	0,1 % v/v Tween 20 in Tris-Puffer
Blockpuffer	3 - 5 % w/v Magermilchpulver in TBST
βGal-Puffer	10 % v/v 10x PBS, 2 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 5 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 0,1 % w/v X-Gal (40 mg/ml in DMSO), 0,2 % w/v NP40, 0,1 % w/v Natriumdesoxycholat
Anästhetikagemisch	1,28 % w/v Ketamin, 0,17 % v/v Rompun, 67,5 % v/v NaCl-Lösung 0,9 %
PBS-T	0,25 % v/v Triton X-100 in PBS
Blockpuffer (Immunhisto)	5 % v/v Normalziegenserum, 95 % v/v PBS-T
AK-Lösung	3 % v/v Normalziegenserum, 97 % v/v PBS-T, AK
aCSF	120 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,3 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 12,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 10 mM Glucose, 25 mM NaHCO <sub>3</sub>
Karbogen	5 % CO <sub>2</sub> , 95 % O <sub>2</sub>
CsCl intrazelluläre Lösung	pH 7.3, 122 mM CsCl, 8 mM NaCl, 0,2 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP, 0,5 mM Na-GTP, 10 µm 6-Cyanoano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione, 50 µm (2R)-Amino-5-Phosphonovalerische Säure

**4.1.4 Primer**

Primer	5'-Sequenz-3'	Zyklen	Produkt (Basenpaare)
ROSA-fw	GTA AGG GAG CTG CAG TGG A		
ROSA-rv-WT	TCT GTG GGA AGT CTT GTC C	35	250 Bp
ROSA-rv-TG	GTA GAT GTA CTG CCA AGT A	35	290 Bp
Chr2-fw	GCT AAC CAT GTT CAT GCC TTC		
Chr2-rv-NR	ACC AGG CAA AGC GCC ATT C	35	382 Bp
Chr2-rv-R	CAT TGC AGC ACG TTC GAC G	35	317 Bp
K2-fw	TCT GCC TGG AAC ACT CTC CTG C		
K2-rv	CAA CCT GAA CTC CCA AGG ATA CC	35	WT 250 Bp KO 500 Bp
mKA1-fw	AAC AGC AGC GAG CCC GAG TAG TG		
mKA1-rv	TAA GAA CTA GAC CCA GGG TAC AAT G	35	388 Bp
Cre-fw	AAA CGT TGA TGC CGG TGA ACG TGC	35	
Cre-rv	TAA CAT TCT CCC ACC GTC AGT ACG	35	214 Bp
tom-WT-fw	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA		
tom-WT-rv	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC	35	297 Bp
tom-tg-fw	GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC	35	196 Bp
YFP-fw	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT		
YFP-rv-WT	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG	35	600 Bp
YFP-rv-TG	AAG ACC GCG AAG AGT TTG TC	35	320 Bp

Die Auswahl der Primer erfolgte anhand der „MGI-Datenbank“ (<http://www.informatics.jax.org/>), der „NCBI-Datenbank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und mithilfe der Onlinewerkzeuge von LabLife (<https://www.lablife.org/ll>), per „Primer-Blast“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) überprüft und bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt. Wenn möglich erfüllte die Primer folgende Kriterien: eine Länge von 18 bis 30 Nukleotiden, ein ausgeglichenes Verhältnis von A/T (Adenin, Thymin) zu G/C (Guanin, Cytosin) und am 3'-Ende möglichst ein G oder C.

#### 4.1.5 Plasmide

Die jeweiligen Plasmidkarten befinden sich im Anhang. Die digitale Version befinden sich zusammen auf der beigefügten DVD.

pCMV-ChR2-YFP	Georg Nagel
pROSA26	Phil Soriano
pCMV-EGFP	Addgene
pCMV-EYFP	Addgene
pROSA26-ChR2	Ralf Dittmann

#### 4.1.6 Antikörper

Antikörper für den Western Blot

	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen- Anti-GFP-IgG	1: 10000	Abcam (ab6556)
Maus-Anti- $\beta$ -Aktin-IgG	1: 10000	Santa Cruz (sc-47778)
<i>horse raddish peroxidase</i> -Ziege-Anti-Hase-IgG	1: 2000	Amersham Biosciences (NA9310V)
<i>horse raddish peroxidase</i> -Ziege-Anti-Maus-IgG	1: 2000	Amersham Biosciences (NA9240V)

Antikörper für die Immunohistochemie

	Verdünnung	Hersteller
Maus-Anti-Parvalbumin	1: 5000	Swant (235)
Kaninchen-Anti-KCC2-IgG	1: 1000	Milipore (# 07-432)
Kaninchen -Anti-GFP-IgG	1: 10000	Abcam (ab6556)

#### 4.1.7 Software

Adobe Photoshop CS3	Adobe, USA
Geldokumentationssoftware	UVP, UK
LSM510 integrated 4.0 SP1	Carl Zeiss Microimaging, Deutschland
Office 2010 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft, USA
Zen 2009, Zen2010	Carl Zeiss Microimaging, Deutschland
GraphPadPrism5.0	Graph Pad Software Inc., USA
Signal 3	Cambridge Electronic Design, UK
pClamp10.0	Axon Instruments, USA

#### 4.1.8 Zelllinien

HEK293T/17	ATCC® CRL-110268™ humane Nierenzelllinie
R1	Andreas Nagy murine embryonale Stammzellen aus 129X1 x 129S1

#### 4.1.9 Mauslinien

B6;129P2-Pvalb <sup>tm1(cre)Arbr</sup> /J	The Jackson Laboratory: 008069
KCC2-floxed	Christian Hübner
B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor <sup>tm1(EYFP)Cos</sup> /J	The Jackson Laboratory: 006148
B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor <sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup> /J	The Jackson Laboratory: 007914
C57BL/6J	The Jackson Laboratory: 000664

### 4.2 Kultur prokaryotischer Zellen

#### 4.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen. *E.coli* XL 1 *blue* wurden in einer Vorkultur in 5 ml *broth* Medium vermehrt. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator (Type 3033, GFL) erfolgte das Animpfen der Hauptkultur in 500 ml *broth* Medium. Wurde die optische Dichte OD<sub>600</sub> von circa 0,5 erreicht, wurden die Bakterien auf Eis gekühlt. Das durch anschließende Zentrifugation (4 °C, 3220 g, 5 min) entstandene Pellet wurde in 150 ml eiskaltem Transformationspuffer 1

resuspendiert und nach 1,5 h Inkubationszeit auf Eis erneut zentrifugiert (4 °C, 3220 g, 5 min). Nach Resuspension des Pellet in 30 ml steril filtriertem eiskalten Transformationspuffer 2, erfolgte die Aliquotierung auf Eis und die Schockfrostung in flüssigem Stickstoff. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80 °C.

#### **4.2.2 Transformation kompetenter Bakterien**

Kompetente Bakterien sind in der Lage, Plasmid-DNA aufzunehmen. Ein Aliquot mit 50 µl kompetenten *E.coli* XL 1 *Blue* Suspension wurde auf Eis für die Transformation aufgetaut, mit 0,1 bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 1,5 min bei 42 °C blieb die Suspension 2 min auf Eis, bevor die Zugabe von 500 µl 37 °C warmen *Super Optimal broth* Medium folgte. Im Thermomixer (Eppendorf) inkubierten die Bakterien 45 min bei 37°C und 500 Umdrehungen/min. Nach einer Zentrifugation (Raumtemperatur, 1500 g, 3 min) wurde das Pellet in 50 µl *Super Optimal broth* Medium gelöst und die Suspension auf einer LB-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Agarplatte inkubierte anschließend über Nacht bei 37 °C im Wärmeofen (Typ T6, Heraeus). Gewachsene Kolonien verblieben bis zum Animpfen von flüssigen Bakterienkulturen bei 4 °C.

#### **4.2.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Vermehrung rekombinanter Plasmid-DNA diente der bereits oben genannte Bakterienstamm. In 5 ml LB-Medium mit plasmidspezifischem Antibiotikum vermehrten sich die transformierten Bakterien über Nacht bei 37 °C und 180 Umdrehungen/min in einem Bakterenschüttler (Typ 3032, GFL). Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden 2 ml der Vorkultur in 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Die Flasche wurde über Nacht unter oben genannten Bedingungen inkubiert, um die Plasmid-DNA mithilfe der Midi-DNA-Präparation (Qiagen, vgl. 4.5.3) zu isolieren.

#### **4.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Das Arbeiten mit allen Zellkulturen fand ausschließlich unter einer Sterilwerkbank (Typ HS12, Heraeus) statt. Verwendete Materialien, Geräte und Substanzen wurden steril vom Hersteller bezogen, desinfiziert, autoklaviert (Varioklav, H+P) oder steril filtriert und nur unter der Sterilwerkbank geöffnet und verwendet.

Die Vermehrung sämtlicher Zellen erfolgte in sterilen Petrischalen verschiedener Durchmesser (Tabelle 2) im Brutschrank (Typ UT6760, Heraeus) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte.

**Tabelle 2:** Genutzte Kulturgefäße und deren Fläche. Ausgesäte Zellzahl und verwendete Volumen, Kulturmedium, PBS und Trypsin

Schalendurchmesser	Fläche	Zellzahl	Medium	PBS	Trypsin
10 cm	57 cm <sup>2</sup>	2,5 x 10 <sup>6</sup>	10 ml	10 ml	1,0 ml
6 cm	21 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	5,0 ml	5 ml	0,3 ml
6 Well	9,6 cm <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>	2,5 ml	2,5 ml	0,3 ml
24 Well	2,0 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	1,0 ml	1 ml	0,15 ml
96 Well	0,32 cm <sup>2</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup>	0,2 ml	0,2 ml	0,04 ml

Adhärent wachsende Säugerzelllinien sowie embryonale Stammzellen wurden in sterilen Petrischalen dem entsprechendem mit Kulturmedium im Brutschrank vermehrt. Waren die Zellen ausreichend dicht, jedoch ohne Kontakt der Kolonien, erfolgten bei HEK293T-Zellen zwei Waschschriffe mit 10 ml Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-freiem PBS und eine Inkubation mit 1 ml 0,05 %igen Trypsin/EDTA für 4 min bei 37 °C. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellzahl wurde bestimmt (vgl. 4.3.1) und eine definierte Zellzahl auf neuen Petrischalen mit frischem Medium weiter kultiviert. Die Verfahrensweise bei ES-Zellen wird unten aufgeführt (vgl. 4.3.5)

#### 4.3.1 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Vor dem Einfrieren konnte mittels Neubauer-Zählkammer (*improved*) die Zellzahl bestimmt werden. Aus vier unter dem Mikroskop ausgezählten Quadranten ließ sich dann wie folgt die Zellzahl bestimmen:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\sum \text{Zellzahl aller Quadranten}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{Volumen der Zellsuspension}$$

2x10<sup>7</sup> Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und in Kryoröhrchen (TruCool™) überführt. Die Kryoröhrchen kühlten langsam in einer Polysterolbox für 2 h bei -20 °C, anschließend für 24 h bei circa -80 °C ab. Die Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen im Wasserbad kurz erwärmt und die angetauten Zellen sofort in 10 ml des vorgewärmten Auftaumediums überführt. Nach Zentrifugation (Raumtemperatur, 1000 g, 3 min) wurde das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und die Suspension auf eine 10 cm Kulturschale überführt. Nach circa 48 h Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen passagiert oder gesplittet werden.

### 4.3.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Mittels Transfektion wird zirkuläre Fremd-DNA/RNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Bei einer transienten Transformation integriert die DNA/RNA nicht in das Genom der Wirtszelle, sondern wird nur vorübergehend – also transient – exprimiert. 24 h vor der Transfektion wuchsen die Zellen in Kulturmedium ohne Antibiotika bis zu einer Konfluenz von 60 bis 90 %. Nach der Transfektion der Zellen inkubierten diese für 48 h im Brutschrank.

Für die Transfektion wurde Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen), ein Reagenz, welches Liposomen in wässriger Umgebung formen kann, gemäß Angabe des Herstellers eingesetzt: Das Kulturmedium der 10 cm-Schale wurde durch 800 µl OptiMEM (Gibco) ersetzt. Nach 2 h erfolgte die Zugabe von 200 µl Transfektionsgemisch, welches aus OptiMEM, 30 µg Plasmid-DNA und 45 µl Lipofectamin™ 2000 bestand und 20 min bei Raumtemperatur inkubierte. Nach 5 h Inkubation bei 37 °C wurde das Suspension durch Standard-Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert.

Alternativ können Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert werden. Hierbei fällt der Komplex aus DNA und Kalziumphosphat aus und wird durch Endozytose von den Zellen aufgenommen. Für eine 10 cm-Petrischale wurde eine Lösung aus 15 µg DNA und 437,5 µl 37 °C warmen Wasser mit einem Gemisch aus vorgewärmten 62,5 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und 500 µl 2x Borat-gepufferter Salzlösung versetzt. Nach kurzem Mischen und Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur (Raumtemperatur) folgte die Zugabe zur Kultur tröpfchenweise. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt.

### 4.3.3 Hippokampale und kortikale primäre Neuronenkulturen der Maus

Für die Kultivierung neuronaler Zellen aus Mäusen wurden P0 bis P3 Tiere dekapitiert, das Gehirn isoliert und in eisgekühltes HBSS (Gibco) mit 7 mM HEPES und 0,5 % Penicillin/Streptavidin (Pen/Strep) überführt. Die Isolation der Hippokampi bzw. Kortizes erfolgte unter einem Präparationsmikroskop (Stemi 2000-C mit Lichtquelle CL 1500 Eco, Carl Zeiss). Gestopfte Pasteurpipetten wurden vor Verwendung mit Sigmacote (Sigma) gespült, getrocknet und vor dem Autoklavieren zweimal mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gewaschen. Mit diesen Pipetten wurde das Gewebe in 5 ml HBSS überführt und dreimal mit HBSS gewaschen. Nach Entfernen des Überstands erfolgte die Inkubation mit 5 ml aktiviertem Trypsin (20 min bei 37 °C, 0,05 % für Hippokampi und 0,25 % für

Kortizes, 10 mM HEPES, 1 % Pen/Strep) und 50  $\mu$ l DNase I (Applichem). Während der Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 30 min wurden die Proben im Intervall von 5 min geschüttelt. Nach Entfernen des Trypsins folgten drei Waschschrte mit HBSS, wobei beim letzten Durchgang circa 1,5 ml HBSS auf den Proben verblieben. Für die Homogenisierung wurden 20  $\mu$ l DNase I zugegeben und mittels beschichteter gestopfter Pasteurpipetten mit sich verjüngender Öffnung unterschiedlichen Durchmessers drei bis viermal zerrieben. Nach Zentrifugation (Raumtemperatur, 160 g, 5 min) der Einzelzellen resuspendierte das Pellet in 1 ml Ausplattiermedium. Eine 24-Well Platte (CellStar bzw. Becton Dickinson) mit fettfreien, 1 h bei 37 °C mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (Durchmesser 13 mm, Thermo Scientific) und 300  $\mu$ l Ausplattiermedium äquilibrierte 1 h im Brutschrank. Anschließend wurden circa 40000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und 30 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurden nicht neuronale Zellen durch Austauschen des Mediums gegen vorgewärmtes Neuronenmedium entfernt. Ein partieller Austausch der Nährlösung erfolgte frühestens nach 7 Tagen, wobei die Hälfte des alten Mediums abgenommen und durch frisches ersetzt wurde.

#### **4.3.4 Kultivierung embryonaler Maus-Fibroblasten**

Die Kultivierung embryonaler Maus-Fibroblastenzellen (MEF-Zellen) und ES erfolgten in enger Kooperation mit Frau Dr. A. Hübner und Frau K. Schorr.

Die Kultur von ES-Zellen erfolgte immer auf einem Rasen mit inaktivierten MEF. Um MEF-Zellen zu gewinnen, wurden Embryonen der 129PI3K Mauslinie (E13,5) in PBS homogenisiert, zentrifugiert (Raumtemperatur, 700 g, 5 min), mit PBS gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml MEF-Medium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte initial mit  $2 \times 10^6$  Zellen in einer Petrischale (Durchmesser 15 cm) mit 20 ml MEF-Medium. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden nach der Inkubation im Brutschrank mit 25 ml PBS gewaschen, 4 min bei 37 °C mit 0,05 % Trypsin/EDTA behandelt, vereinzelt und gleichmäßig auf 4 neue Petrischalen (15 cm Durchmesser) verteilt. Die Inaktivierung der MEF-Zellen erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Mitomycin C zum Kulturmedium. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium verworfen, zweimal mit 25 ml PBS gewaschen, 2 ml Trypsin für 5 min zugegeben und die Fibroblasten in MEF-Medium aufgenommen. Nach der Zentrifugation (Raumtemperatur, 250 g, 5 min) resuspendierte das Pellet in Einfriermedium, so dass Aliquots mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml langsam eingefroren werden konnten (vgl.4.3.1). Für die ES-Zellkultivierung wurden 18 h zuvor  $5 \times 10^4$  MEF-Zellen/cm<sup>2</sup> auf Petrischalen verschiedener Durchmesser ausgesät.

#### 4.3.5 Kultivierung von ES-Zellen

Die genetische Manipulation erfolgte an Zellen der ES-Zelllinie R1. Petrischalen für das Wachstum von ES-Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Gelatine beschichtet. Circa 18 h vor Start der ES-Zellkultur mit  $5 \times 10^4$  MEF-Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte täglich. Circa jeden zweiten Tag erreichten die Zellenkolonien die Größe, dass keine Konfluenz bestand, und wurden im Verhältnis von 1: 4 bis 1: 6 gesplittet. Die Vermehrung sämtlicher Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchte.

#### 4.3.6 Auftauen von ES-Zellen

$1 \times 10^6$  Zellen wurden nach dem Antauen im Wasserbad (37 °C) in 5 ml vorgewärmtes ES-Medium überführt, zentrifugiert (Raumtemperatur, 250 g, 5 min), in ES-Medium resuspendiert und danach auf einer Petrischale mit MEFs (10 cm Durchmesser) ausplattiert.

Bis zu einer Konfluenz von circa 80 % gewachsene Zellen wurden mit Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-freiem PBS gewaschen, 4 min bei 37 °C mit 0,25 %igen Trypsin/EDTA inkubiert und vereinzelt. Nach Zugabe von 10 ml ES-Medium erfolgten die Bestimmung der Zellzahl und die Kryokonservierung der ES-Zellen (vgl. 0).

Vor dem Einfrieren der ES-Zellklone in 96-Well-Platten wurden die Zelldichten jeder Kammer protokolliert und das Medium gewechselt. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank folgte ein Waschschrift mit 200 µl PBS und anschließend die Behandlung für 4 min bei 37 °C mit 40 µl 0,25 %igem Trypsin/EDTA. Bei erfolgreicher Vereinzlung erfolgte die Zugabe von 60 µl ES-Medium und 100 µl 2x Einfriermedium. Die Suspension wurde vorsichtig mit 50 µl Mineralöl überschichtet, die Platte mit Klebeband versiegelt und in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren.

#### 4.3.7 Transfektion und Selektion von ES-Zellen

ES-Zellen wurden in einer Petrischale (10 cm Durchmesser) in 10 ml ES-Medium bis zur o.g. Dichte kultiviert. 2 h vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Nach zweimaligem Waschen mit Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-freien PBS schloss sich eine 4 minütige Behandlung bei 37 °C mit 2 ml 0,25 %igem Trypsin/EDTA an. Die vereinzelten Zellen wurden nach Zugabe von 8 ml ES-Medium zentrifugiert (Raumtemperatur, 250 g, 5 min), in 10 ml PBS gewaschen, erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 800 µl PBS aufgenommen. Die Suspension wurde mit 30 µg gereinigter linearisierter

Plasmid-DNA versetzt und in einer 0,4 cm Küvette bei  $U = 240 \text{ V}$  und  $C = 500 \text{ }\mu\text{F}$  elektroporiert (Gen Pulser Xcell, Biorad). Der Ansatz inkubierte 10 min bei Raumtemperatur. Nach gleichmäßigem Verteilen auf vier Petrischalen mit MEFs (10 cm Durchmesser) mit jeweils 10 ml ES-Medium erfolgte täglich ein Wechsel des Mediums. 24 h nach der Elektroporation enthielt das Medium zur Selektion zusätzlich 0,6 % v/v und später dann 0,3 % v/v G418 (50 mg/ml, Geneticin®, Gibco). Nach circa einer Woche wurden einzelne Kolonien unter dem Mikroskop (Stemi 2000-C mit CI 1500 Eco als Lichtquelle) in eine 96-Well Platte mit 40  $\mu\text{l}$  0,25 %iges Trypsin pro Vertiefung transferiert, 4 min bei 37 °C inkubiert und die vereinzelt Klone in eine 96-Well Platte mit MEF-Zellen und 200  $\mu\text{l}$  ES-Medium überführt. Innerhalb von 2 bis 3 Tagen erreichten die Zellkolonien die ausreichende Größe. Nach Waschen mit PBS, Trypsinieren und Zugabe von ES-Medium wurden die Zellen 1: 4 auf neue Platten transferiert. Hierbei waren zwei Platten für die DNA-Isolierung nur mit Gelatine beschichtet. Bis zur Konfluenz gewachsene Klone wurden eingefroren (vgl. 4.3.6), bzw. zur Isolierung der genomischen DNA (vgl. 4.5.10) für das anschließende *Southern Blot Screening* (vgl. 4.5.9) genutzt. Es wurden Zellen mit korrekt integriertem Konstrukt identifiziert, entsprechende Klone aufgetaut und für die Blastozysteninjektion (vgl. 4.7.1) vermehrt.

#### **4.4 RNA-Methoden**

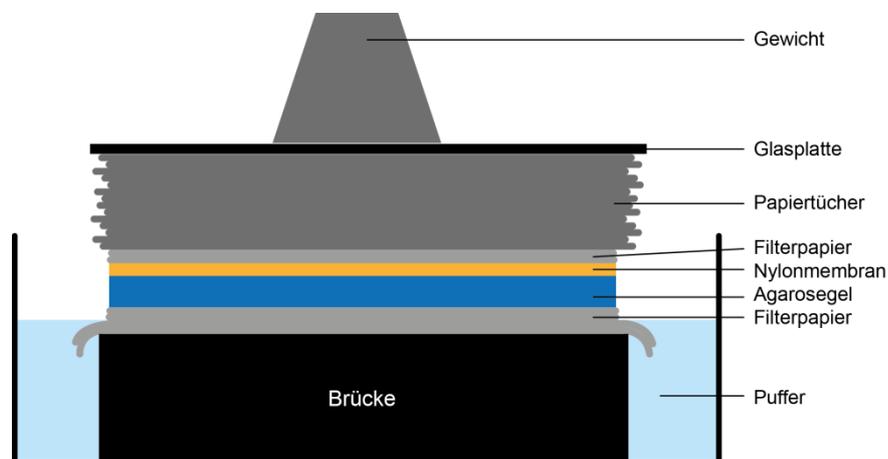
##### **4.4.1 RNA-Isolation**

100 mg frisch präpariertes, in flüssigem Stickstoff gemörsertes Gewebe bzw.  $10^7$  Zellen inkubierten mit 800  $\mu\text{l}$  Trizol 5 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 0,2 Volumen Chloroform, intensivem Mischen per Hand und 3 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation (4 °C, 10000 g, 15 min) und die Überführung der oberen, wässrigen Phase in 1 Volumen 100 %igem Isopropanol. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA pelletiert (4 °C, 20000 g, 20 min), kurz an der Luft getrocknet und in 50  $\mu\text{l}$  DNase-/RNase-freiem Wasser gelöst. Zur Gewinnung von DNA-freier RNA erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C mit 1  $\mu\text{l}$  DNase I (Invitrogen, 1 Unit/ $\mu\text{l}$ ) oder sie wurde weiter mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) gemäß den Angaben des Herstellers aufbereitet. Die RNA-Probe wurde hierfür auf eine spezifisch RNA-bindende Säule transferiert und zentrifugiert (Raumtemperatur, 8000 g, 15 s). Waschpuffer I bzw. Waschpuffer II reinigten die gebunden RNA. Final wurde die RNA mit 50  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

#### 4.4.2 Northern Blot

Zur Untersuchung von RNA-Proben diente die *Northern Blot* Analyse. Die verwendete Glasware wurde bei 250 °C gebacken und damit sterilisiert. Alternativ wurden RNase-freie Einwegprodukte verwendet. Puffer setzen sich aus RNase-freien diethylpyrocarbonatbehandeltem DEPC-Wasser und RNase-freien Chemikalien zusammen.

Das *Northern Blot* Agarosegel in 1 % 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) als Laufpuffer erhielt eine Vorlaufzeit von 30 min bei 30 V. Währenddessen denaturierten die RNA-Proben in 5x RNA-Ladepuffer 10 min bei 65 °C. Nach Beladen des Gels lag zunächst eine Spannung von 40 V für 5 h und anschließend von 100 V für 3 h an. Der Puffer wurde jede Stunde durchmischt, um der Bildung eines pH-Gradienten vorzubeugen.



**Abbildung 6:** Aufbau eines *Northern* bzw. *Southern Blots* zur Überführung von RNA/DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran respektive Nylonmembran. Von unten nach oben: Whatman-Filterpapier auf einer Brücke mit Enden im Transferpufferreservoir, Agarosegel, Nitrozellulosemembran, in Transferpuffer getränkte 3 Lagen Filterpapier, 6 Lagen trockenes Filterpapier, 15 cm Papiertücher, Glasplatte, Gewicht.

Der Transfer der RNA vom Gel auf eine Nylonmembran (GE Healthcare) erfolgte per Kapillarblot (Abbildung 6). Das Gel wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült und zunächst 30 min in Denaturierungspuffer, anschließend 30 min in Neutralisierungspuffer und schließlich 30 min in 10x SSC inkubiert. Die 10 min in DEPC-H<sub>2</sub>O gespülte Membran äquilibrierte 10 min in Transferpuffer. Über Nacht erfolgte der Blot, anschließend das *Cross-linking* der RNA durch Erhitzen der Membran für 2 h bei 80 °C. Nach zwei Waschschritten in 2x SSC konnte die RNA durch Färben der Membran mit 0,04 % Methylblau in 5 %iger Essigsäure nachgewiesen bzw. 18 S und 28 S RNA als Größenmarker gekennzeichnet werden. Die Membran wurde in 2x SSC entfärbt. Durch die Hybridisierung mit radioaktiv

markierten Sonden konnten spezifische RNA-Transkripte nachgewiesen werden (vgl. 4.5.11).

#### 4.4.3 Synthese komplementärer DNA

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde aus der isolierten RNA zunächst einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert.

Zur Herstellung von cDNA (*1st strand* cDNA Synthesis Kit, Roche) wurden 1 µg Gesamt-RNA in insgesamt 10,5 µl DNase-/RNase-freiem Wasser resuspendiert und 5 min bei 65 °C denaturiert. Auf Eis folgte die Zugabe von 2 µl 10x Reaktionspuffer, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 µl 0,5 µg/µl Oligo-(dT)-Primer, 2 µl dNTP-Mix und 0,5 µl Reverse-Transkriptase. Nach 10 min bei 25 °C, 90 min bei 42 °C und 5 min bei 99 °C wurde die Lösung mit 30 µl DNase/RNase-freiem Wasser und 1 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt. Der Inkubation für 15 min bei 37 °C schloss sich die Aufreinigung der cDNA über eine DNA-bindende Säule an (vgl. 4.5.3). cDNA-Proben lagerten bei -20 °C.

#### 4.4.4 *In situ* Hybridisierung

Die Detektion der mRNA des Kalium-Chlorid-Kotransporters-2 (KCC2) und der von Parvalbumin in Hirnschnitten von KCC2<sup>flox/flox</sup> PV-Cre<sup>+</sup> und PV-Cre<sup>-</sup> Tieren mittels *in situ* Hybridisierung wurde in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. G. Zimmer durchgeführt. Für beide mRNAs wurde eine spezifische Sonde mittels PCR (vgl. 4.5.6) hergestellt.

Hirn-Kryostatschnitte auf Objektträgern trockneten für 30 min bei 50 °C. Sie wurden sie 10 min in 4 % Formaldehyd fixiert. Nach Abspülen und zweimaligem Waschen für 5 min mit PBST schloss sich eine Inkubation für 10 min mit Proteinase-K-Lösung an. Es folgte ein zweimaliges Waschen und eine erneute Fixierung mit dazugehörigem Abspülen und Waschen. Die Schnitte wurden nun für 10 min mit Acetylierungspuffer überschichtet, wieder abgespült und gewaschen. Die mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespülten Objektträger trockneten für 30 min bei Raumtemperatur. Mit 300 µl Hybridisierungslösung und einem mit Poly-L-Lysin beschichtetem Deckgläschen abgedeckt, inkubierten die Proben in einer feuchten Kammer im Hybridisierungsofen über Nacht bei 65 °C. Die Deckgläschen wurden in vorgewärmtem 5x SSC-Puffer abgelöst, die Objektträger bei 60 °C in 50 % Formamid / 0,5 x SSC für 30 min, in 2x SSC für 20 min und zweimal in 0,2 x SSC bei 60 °C behandelt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min in Maleinsäurepuffer (MABT:) und für 1 h in Blockpuffer-1 (1 % v/v *blocking*-Reagenz in MABT). Die Schnitte wurden mit der Sonde gegen PV in 300 µl Blockpuffer-1 überschichtet und für mindestens 2 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Nach viermaligem

Waschen mit MABT für 5 min bei Raumtemperatur, inkubierten sie über Nacht bei Raumtemperatur mit 300 µl Substratlösung in einer feuchten Kammer. Die mit Natrium-Magnesium-Trispuffer gespülten Objektträger wurden wiederum zweimal 5 min in PBS gewaschen, 10 min in 4 % Formaldehyd in PBS fixiert, zweimal in PBS und zweimal in MABT gewaschen. Nach einstündiger Behandlung bei Raumtemperatur in Blockpuffer-2, erfolgte die Hybridisierung mit 300 µl in Blockpuffer-2 inklusive der primären Sonde gegen KCC2 über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach viermaligem Waschen mit MABT, äquilibrierten die Proben 10 min in NMT und wurden schließlich mit 1 ml Fast Red Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Spülen mit NMT wiederholten sich die Wasch- und Fixierungsschritte. Hoechst 33258 (1: 1000, Invitrogen, DAPI) im letzten Waschschrift färbte die Zellkerne an. Nach Spülen und Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurden die Objektträger mit 100 µl Mowiol (Sigma) und einem Deckglas (Marienfeld) versehen, getrocknet und mit Nagellack (P2) versiegelt. Die Dokumentation der behandelten Hirnschnitte erfolgte mittels Mikroskop (VHX-600 Digitalmikroskop, Keyence; TCS SP5, Leica).

## **4.5 DNA-Methoden**

### **4.5.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Plasmid-DNA aus Bakterien wurde unter Zuhilfenahme eines Midi Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Pelletierte Bakterien wurden in Resuspensionspuffer gelöst, mit Lysepuffer aufgeschlossen und mit Neutralisierungspuffer auf einen pH-Wert von 7.0 gebracht. Durch Zentrifugation konnten Zelltrümmer pelletiert werden. Der Überstand wurde auf Säulen (Tip 100, Qiagen) gegeben und aus dem Durchfluss schließlich die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt (4.5.3).

### **4.5.2 Hot-Shot DNA Extraktion aus Schwanzbiopsien**

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von Mäusen wurden circa 0,3 cm lange Gewebeproben in 150 µl alkalischem Lysepuffer 45 min bei 96 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 150 µl Neutralisierungspuffer zugegeben. Bis zur Verwendung wurde der Ansatz bei Raumtemperatur gelagert.

### **4.5.3 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren**

Zur Aufreinigung von DNA-Proben aus 4.5.1 wurde das Probenvolumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 µl eingestellt, 1 Volumen Phenol zugegeben und der Ansatz mindestens 30 s geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (4 °C, 14000 g, 15 min) folgte der Trans-

fer der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und die Zugabe von 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol. Nach Schütteln und Zentrifugation (4 °C, 14000 g, 15 min) konnte wiederum aus der oberen Phase die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol 100 % und 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat pH-Wert 5.2 gefällt werden. Das entstandene DNA-Konglomerat wurde mithilfe eines sterilen Glashakens entnommen, in 70 % Ethanol gewaschen und schließlich in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Fotospektrometer (NanoDrop® ND-1000, PeqLab).

#### 4.5.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse der DNA nach PCR oder Restriktionsverdau wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Abhängig von den aufzutrennenden DNA-Fragmentlängen wird 1 bis 2 g Agarose und 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer aufgelöst. Die erwärmte Lösung wurde in eine Gelform mit Lade-Kämmen (PeqLab) überführt und nach dem Auskühlen in der Elektrophorese-Kammer mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer transferiert. Die DNA wurde 1 : 5 mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt, aufgetragen und bei 150 V elektrophoretisch getrennt (Standard Power Pack, Biometra). Die Detektion der Proben erfolgte unter UV-Licht (Benchtop ZUV Transilluminator, UVR; VisiDoc It Imaging™ System, UVR).

#### 4.5.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das entsprechende Gelfragment unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte mit dem Gel DNA Recovery Kit (Zymoclean). Das Gel inkubierte bis zum vollständigen Lösen in 500 µl Agaroselösepuffer bei 50 °C. Das Gemisch wurde auf eine Säule (Zymo-Spin™ Column, Zymoclean) transferiert, zentrifugiert (Raumtemperatur, 8000 g, 30 s) und zweimal mit Waschpuffer gespült. Durch Zugabe von 20 µl ddH<sub>2</sub>O und Zentrifugation konnte die DNA eluiert werden.

#### 4.5.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Die PCR-Reaktionen fanden in einem deckelbeheizten PCR-Block (Thermo Cycler T3000, Biometra) statt. Ein PCR-Ansatz (20 µl) bestand aus 14,6 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl Reaktionspuffer (10 x), 0,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 8 mM), 0,5 µl *sense*-Primer (100 nM), 0,5 µl *antisense*-Primer (100 nM), 0,08 µl Taq-

Polymerase (Invitrogen). Für jede spezifische Reaktion wurden geeignete Primerpaare synthetisiert und ein optimiertes PCR-Programm verwendet.

#### 4.5.7 Restriktionsverdau

Durch die Verwendung sequenzspezifischer Endonukleasen (Restriktionsenzyme) konnten definierte DNA-Fragmente generiert werden.

Ein Restriktionsansatz (20  $\mu$ l) bestand aus: 1  $\mu$ g genomischer bzw. 100 ng Plasmid-DNA, 2  $\mu$ l 10x Puffer und der DNA-Menge entsprechend Restriktionsenzym. Die Reaktion inkubierte über Nacht bei enzymespezifischer Temperatur und wurde 20 min bei 80 °C gestoppt. Kamen zwei Restriktionsenzyme zum Einsatz, wurde ein Puffer verwendet, in welchem beide Aktivität zeigten oder ein sequenzieller Verdau durchgeführt.

#### 4.5.8 Ligation

Bei der Konstruktion rekombinanter Plasmidvektoren wurde ein DNA-Fragment gezielt in ein Plasmid ligiert. Vektor und Insert inkubierten mit den gleichen oder kompatiblen Restriktionsenzymen, sodass beide wenn möglich passende „klebrige“ Enden (*sticky ends*) besaßen. Konnten keine entsprechenden Überhänge erzeugt werden, wurde das zu ligierende DNA-Fragment durch entsprechende Primer mittels PCR (vgl. 4.5.6) mit den benötigten endständigen Restriktionsstellen bzw. Sequenzen versehen. War keine Generierung kompatibler Enden möglich, wurden glatte Enden (*blunt ends*) erzeugt. Nach Restriktion und Inaktivierung der Restriktionsenzyme inkubierte der Ansatz mit 1  $\mu$ l dNTPs und 1  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase (Fermentas) 20 min bei 11 °C, um schließlich bei 10 min bei 75 °C inaktiviert zu werden. Die Behandlung mit 1  $\mu$ l alkalischer Phosphatase (20 Units/ $\mu$ l) für 1 h bei 37°C verhinderte eine Selbstligation des Vektors. Beide Ansätze, Insert und Vektor, wurden mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 4.5.4) und anschließender Gelextraktion aufbereitet (vgl. 4.5.5).

Ein Ligationsansatz (20  $\mu$ l) bestand aus 1  $\mu$ g dephosphorylierter Plasmid-DNA, 1 bis 10  $\mu$ l zu klonierender DNA, 2  $\mu$ l 10x Ligationspuffer und 1  $\mu$ l Ligase (New England Biolabs). Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden kompetente Bakterien (4.2.2) mit 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes transformiert. Mittels DNA-Minipräparation aus Flüssigkulturen (vgl. 3.5.1) und anschließendem Restriktionsverdau (vgl. 4.5.7) konnten einzelne Bakterienkolonien charakterisiert werden.

#### 4.5.9 Southern Blot

Mit Restriktionsenzym geschnittene (vgl. 4.5.7) und elektrophoretisch aufgetrennte genomische DNA (vgl. 4.5.4) wurde zusammen mit einem Fluoreszenzlineal unter UV-Licht fotografiert. Die Depurinierung der DNA erfolgte circa 15 min in 0,25 M HCl bis ein Farbumschlag des DNA-Ladepuffers von blau zu gelb feststellbar war. Nach Verwerfen der Salzsäure und dem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O äquilibrierte das Gel 20 min in Transferpuffer. Eine dem Gel angepasste Nylonmembran wurde währenddessen 5 min in ddH<sub>2</sub>O aktiviert und mindestens 10 min in 0,4 M NaOH äquilibriert. Nach dem Aufbau des Blots (Abbildung 6) erfolgte der Transfer über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend trocknete die Membran für 2 h bei 80 °C. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Vor Gebrauch wurde die Membran in 2x SSC gewaschen.

#### 4.5.10 Screening von ES-Zellen

Für jedes Konstrukt wurde DNA aus circa 384 verschiedenen Klonen (vgl. 4.3.7) isoliert und untersucht. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer.

ES-Zellklone kultivierten für die Isolation der DNA in 96-Well Platten bis zur Konfluenz. Nach Waschen mit PBS folgte der Zellaufschluss mit jeweils 100 µl Lysepuffer über Nacht bei 55 °C. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 8 M LiCl und 100 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt, durch Zentrifugation (Raumtemperatur, 3000 g, 30 min) pelletiert und zweimal mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Verwerfen der Flüssigkeit trocknete die DNA kurz bei 55 °C und löste in 100 µl  $\frac{1}{10}$  TE-Puffer über Nacht bei 37 °C. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Für die Charakterisierung der Klone wurden jeweils circa 10 µg DNA mit 20 *Units* eines geeigneten Restriktionsenzym und mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Nach Mischen und Inkubation bei 37 °C über Nacht folgte eine elektrophoretische Auftrennung (vgl. 4.5.4) und der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran mittels *Southern Blot* (vgl. 4.5.9). Diese konnte dann mittels Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde auf geeignete Klone untersucht werden (vgl. 4.5.11).

#### 4.5.11 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Hybridisierung

Zur Charakterisierung von Ribonukleinsäuren bzw. Desoxyribonukleinsäuren auf *Northern* (vgl. 4.4.2) oder *Southern Blot* (vgl. 4.5.9) Membranen wurden Sonden mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert.

Als Matrize diente ein 300 bis 700 Bp langes DNA-Fragment, das enzymatisch aus einem Plasmid geschnitten oder mittels PCR gewonnen wurde. Die Synthese der radioaktiv markierten Sonde erfolgte mit dem Rediprime II DNA Labelling System (GE Healthcare). Circa 35 ng der Sonden-DNA in 45 µl 0,1x TE wurden bei 95 °C 5 min denaturiert, auf Eis 10 min abgekühlt und nach kurzem Zentrifugieren in das Rediprime II Reaktionsgefäß mit lyophilisiertem dATP, dTTP, dGTP und DNA-Polymerase pipettiert. Nach Zugabe von 5 µl <sup>32</sup>P-dCTP (SPR-205, 370 MBq /ml, Hartmann Analytik) inkubierte der Reaktionsansatz für 30 min bei 37 °C.

Die Aufreinigung der Sonde erfolgte über eine G50 Sepharose Säule (GE Healthcare). Die Matrix der Säule wurde durch Schütteln und anschließende Zentrifugation (Raumtemperatur, 2000 g, 2min) vorbereitet, die markierte Sonde in die Mitte der Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die aufgereinigte markierte Sonde. Die Aktivität wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt. Vor Verwendung wurde die Sonde denaturiert und auf Eis abgekühlt. Währenddessen äquilibrierte die Membran in Hybridisierungspuffer bei 68 °C für 2 h im Hybridisierungs-ofen (DUO-Therm-Hybridisierungs-ofen, Biometra). Die Sonde wurde in 25 ml 68 °C warmen Hybridisierungspuffer überführt und auf die präparierte Membran gegeben. Der Ansatz ersetzte den Puffer auf der Membran und verblieb über Nacht bei 68 °C unter Rotation im Hybridisierungs-ofen. Nach Spülen und zweimaligem Waschen der Membran mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 68 °C für 20 min wurde diese in Klarsichtfolie verpackt und die Radioaktivität mit einem Geigerzähler bestimmt. Bei Werten über 150 Bq folgten wiederholte Waschschrte. Die Radioaktivität wurde durch eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm (BioMax MS, Kodak) bzw. einer *Phosphorimager*-Platte (Fuji) detektiert.

## **4.6 Protein-Methoden**

### **4.6.1 Isolation von Proteinen**

Der Aufschluss von in flüssigem Stickstoff gemörsertem Gewebe (100 mg Biomasse) bzw. Zellen (10<sup>6</sup> Zellen) erfolgte in 400 µl Protein-Lysepuffer für 10 min auf Eis. Die Suspension wurde zusätzlich 30 min im Ultraschallbad behandelt oder mechanisch (Potter S, Sartorius) weiter homogenisiert. Nach Denaturieren für 5 min bei 95 °C und Abkühlen für 1 h auf Eis konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden (vgl. 4.6.2). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C im Gefrierschrank.

#### 4.6.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Zur Quantifizierung von Protein wurde das BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) genutzt. Aliquots der Standardproben (20 bis 2000 µg/ml) zum Erstellen der Eichkurve und der zu messenden Lösungen wurden 1: 20 in Lysepuffer verdünnt, 30 min bei 37 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte die Messung der Absorption bei 562 nm (NanoDrop® ND-1000, PeqLab). Anhand der erstellten Eichkurve konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### 4.6.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Separation von Proteinen erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Trenn- und Sammelgel (Tabelle 3) wurden 16 h vor der Elektrophorese im Kühlschrank zur Auspolymerisierung aufbewahrt.

Das SDS-Gel wurde in der PAGE-Apparatur (Biorad, München) mit Laufpuffer überschichtet, die Proben (5 bis 30 µg Protein) mit 5x Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und damit die Geltaschen beladen. Bis die blaue Lauffront das Trenngel erreichte, verlief die elektrophoretische Trennung bei einer Stromstärke von 10 mA, anschließend bei einer Spannung von 100 V. Die Separation der Proteine endete, nachdem die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE

	Trenngel 8 %	Sammelgel 3 %
ddH <sub>2</sub> O	5,2 ml	6,5 ml
1,88 M Tris pH-Wert 8.8	1,8 ml	1,8 ml
40 % Polyacrylamid	1,8 ml	0,625 ml
10 % SDS	90 µl	90 µl
10 % APS	40 µl	40 µl
Tetramethylethyldiamin	5 µl	5 µl

#### 4.6.4 Western Blot Analyse

Elektrophoretisch separierte Proteine (vgl. 4.6.3) wurden mit Hilfe der *Western Blot* Analyse detektiert (Towbin et al. 1979, Burnette 1981). Für diese Methode wurde das Nassblotverfahren angewandt, um die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel (vgl. 4.6.3) auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) zu transferieren. Nach dem Blot mit einer Stromstärke von 2,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1,5 h erfolgte die Inkubation der Membran in 3 %igen Blockpuffer für mindestens 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend inkubierte diese über Nacht bei 4 °C in 10 ml 1 %igem

Blockpuffer mit den primären Antikörper (Rollschüttler RM 5-80V, CAT). Nach drei Waschschritten mit 45 ml TBST-Puffer folgte die Inkubation mit dem sekundären Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper in 1 %igem Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Nach weiteren vier Waschschritten für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit 45 ml TBST-Puffer verblieb die Membran 4 min in Detektionslösung, welche aus 2 ml Peroxidlösung und 2 ml Substratlösung (Immobilon™ Western, Millipore) bestand. Die Chemolumineszenz wurde mit dem Hyperfilm™ ECL Kit (GE Healthcare) detektiert.

#### **4.6.5 Nachweis von Beta-Galaktosidase ( $\beta$ -Galaktosidase-Assay)**

Das lacZ-Gen kann als genetischer Marker zur Insertionskontrolle verwendet werden. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseexpression diente als Kontrolle der Insertion der einzufügenden DNA.

In eine 12-Well Platte wurde je Vertiefung 500  $\mu$ l frisch angesetzter  $\beta$ Gal-Puffer vorgelegt und das Präparat zugegeben.  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal bei 37 °C, wobei ein blauer Farbstoff freigesetzt wird. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Probe für die Dokumentation am Mikroskop (VHX-600 Digitalmikroskop, Keyence; Axiovert 40 CFL mit CCD Kamera, Carl Zeiss) auf Objektträgern fixiert.

### **4.7 Eingriffe an Mäusen**

Alle Experimente mit Mäusen wurden vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz in den Tierversuchsvorhaben: „PV-KCC2 konditionales KO (cKO) Mausmodell“ Reg.-Nr. 22-2684-04-02-066/11 und „Channelrhodopsin (ChRh) und Halorhodospin (NpHr) Knockin-Mausmodelle“ Reg.-Nr. 22-2684-04-02-033/09 genehmigt. Die Elektroenzephalografie wurde in Hamburg durchgeführt und dort separat beantragt und bewilligt.

#### **4.7.1 Injektion von ES-Zellklonen in Blastozysten**

Klone der beim Screening positiv getesteten ES-Zellen (vgl. 4.5.10) wurden aufgetaut (vgl. 4.3.6) und die entsprechenden Klone in 6-Well Platten kultiviert (vgl. 4.3.5). Am Tag der Injektion wurde das Medium erneuert. Nach 2 h Inkubationszeit folgten drei Waschschrritte mit PBS und die Behandlung der Zellen mit 300  $\mu$ l Trypsin für 4 min bei 37 °C. Bei ausreichender Vereinzelung wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml ES-Medium gestoppt, die Suspension zentrifugiert (Raumtemperatur, 200 g, 5min), das Pellet in circa 600  $\mu$ l ES-Medium resuspendiert und auf Eis bis zur Injektion aufbewahrt.

Die Blastozysten (E3.5) wurden aus trächtigen C57Bl/6 Weibchen isoliert und mithilfe eines mechanischen Mikromanipulators (Leica Mikrosystems) injiziert. Nach der Injektion folgte die Implantation der Blastozysten in pseudo-trächtige CBA-F<sub>1</sub> Ammenmäuse (circa E2.5), welche vorher mit vasktomierten Männchen verpaart worden waren (Hogan et al., 1994).

#### **4.7.2 Rotarod**

Die Analyse der Motorik bei 28 bis 120 Tage alten Mäusen erfolgte durch den Rotarod-Test (Jones et al., 1968). Die Tiere zudem dreimal wöchentlich gewogen. Beim Rotarod-Leistungstest liefen die Tiere auf einer rotierenden Rundstange mit 5 cm Durchmesser (Rota-Rod, FBI Science GmbH). Die Tiere wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen und am Versuchstag durch 3-mal wiederholtes zweiminütiges Laufen bei konstanter minimaler Geschwindigkeit (4 Umdrehungen/min) an das Gerät und die Prozedur gewöhnt. Beim Rotarod-Leistungstest erfolgte eine lineare Erhöhung der Rotationsfrequenz von 4 auf 40 Umdrehungen/min innerhalb von 5 min. Jedes Tier wurde dreimal getestet und die Zeit auf dem Rotarod gemessen. Nach jedem Lauf gewährte man den Tieren eine Ruhezeit von mindestens 15 min.

#### **4.7.3 Transkardiale Perfusion von Mäusen**

Der Maus wurde das Anästhetikagemisch (Ketamin, Rompun, vgl. Material) intraperitoneal injiziert. Bei vollständig narkotisierten Mäusen wurde der Brustkorb geöffnet, die linke Herzkammer mit einer Injektionsnadel perforiert und mit einem Druck von circa 120 mmHg PBS eingespült. Die Öffnung des rechten Vorhofs ermöglichte den Abfluss des Blutes bzw. der injizierten Flüssigkeiten. Nach 3 min wurde das PBS durch 4 %iges Formaldehyd ersetzt. Nach weiteren 5 min wurde die Kanüle entfernt, die gewünschten Organe präpariert und die Gewebe über Nacht in 4 % Formaldehyd im Kühlschrank nachfixiert. Vor dem Einfrieren zur späteren Verwendung erfolgte eine Behandlung bei 4 °C für jeweils 24 h in 15 % und anschließend in 30 %iger Saccharose-Lösung.

#### **4.7.4 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Um aus der Maus entnommene Organe histologisch und immunohistochemisch zu untersuchen, wurden am Schlittenmikrotom (SM2000R, Leica) 20 bis 40 µm oder am Kryostat (CM1850, Leica) 8 bis 20 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

Für das Schneiden am Schlittenmikrotom wurde das Gewebe auf dem circa -30 °C kaltem Trägertisch mit 5 % Saccharose-PBS fixiert. Die Schnitte lagerten in PBS mit 0,2 % Natriumazid bei 4 °C.

Am Kryostat konnte sowohl fixiertes als auch unfixiertes Gewebe geschnitten werden. Die Präparate wurden mit Tissue-Tek® (Sakura) eingebettet und am Kryostat bei circa -22 °C mindestens 30 min akklimatisiert. Die Schnitte wurden auf einen beschichteten Adhäsionsobjektträger (HistoBond<sup>+</sup>, Marienfeld) überführt und 1 h bei Raumtemperatur bzw. bei Präparaten für die *in-situ* Hybridisierung 30 min bei 56 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Vor Lagerung bei -20 °C erfolgte ein Waschschrift für 5 min in PBS und eine wiederholte Trocknung der Objektträger.

#### 4.8 Antikörperfärbung von Gewebeschnitten

Am Schlittenmikrotom angefertigte Gewebeschnitte wurden freischwimmend in einer 24-Well Platte gefärbt. Nach Überführung mit einem feinen Pinsel in 1 ml PBS-T folgten drei Waschschriffe für 10 min in 1 ml PBS-T unter leichtem Schütteln. Mit Blockpuffer inkubierten Schnitte zunächst 1h bei Raumtemperatur, anschließend in 500 µl primärer AK-Lösung in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Wiederum folgte ein dreimaliges Waschen für je 10 min mit 1 ml PBS-T. Anschließend wurden die Präparate im Dunkeln 2 h bei Raumtemperatur in sekundärer AK-Lösung inkubiert und dreimal für 10 min mit 1 ml PBS gewaschen, während beim zweiten Waschschrift Hoechst 33342 (1:10000) zur Färbung der Zellkerne eingesetzt wurde. Die Schnitte wurden in PBS auf Objektträger (Superfrost, Thermo Scientific) aufgezogen, mit Fluoromount® (Calbiochem) überschichtet und mit einem Deckgläschen und durchsichtigem Nagellack versiegelt. Bis zur Dokumentation mittels konfokaler Lasermikroskopie (TCS SP5, Leica), *Cell Observer* (ApoTom), *spinning disk confocal microscope* oder LSM510/LSM710 (alle Carl Zeiss) lagerten die Schnitte bei 4 °C.

Auf Objektträgern fixierte Schnitte wurden in einer *Shandon* Kassette (Thermo Electron Corporation) gefärbt. Dazu wurden die Objektträger in die *Shandon* Kassette eingespannt. Die einzelnen Schritte waren denen aus der oben beschriebenen Methode identisch, es variierte lediglich die Applikation der Lösungen.

#### 4.9 Antikörperfärbung von Zellkulturen

HeLa- bzw. HEK293T Zellen wurden zur immunzytochemischen Untersuchung auf runden Deckgläschen mit 12 bzw. 18 mm Durchmesser in einer 12-Well Zellkulturplatte ausgesät, transfiziert und 48 h kultiviert. Es folgte ein Waschschrift in PBS und die Fi-

xierung mit 4 % Formaldehyd. Die Deckgläschen wurden in Fluoromonut® eingebettet und mit Nagellack fixiert. Für den Nachweis endogener Proteine erfolgte zunächst die Permeabilisierung der Zellen in PBS-T. Nach Inkubation für 30 min in Blockpuffer inkubierten die Zellen in primärer AK-Lösung für 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Nach drei Waschschritten für 10 min in PBS wiederholte sich die Prozedur mit dem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten sekundären Antikörper. Die abschließenden Schritte gleichen denen aus 4.8.

## **4.10 Elektrophysiologie**

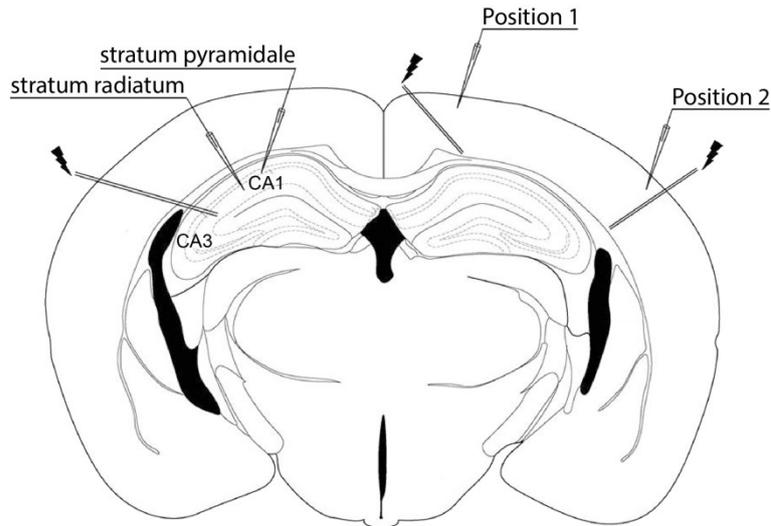
### **4.10.1 Präparation akuter Hirnschnitte**

Sofort nach Dekapitierung von Mäusen wurde das Hirn aus dem Schädel präpariert, der Frontallappen und das Kleinhirn entfernt und das Gewebe in 4 °C kaltem Karbogenbegasten (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>) künstlichem Liquor (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) überführt. Am Vibratom (VT 1000S, Leica Instruments) wurden die akuten Schnitte wie von Liebmann et al. (2009) beschrieben für Feldpotentialmessungen (400 µm) und *Patch-Clamp* Messungen (350 µm) gefertigt. Vor Beginn der Messungen äquilibrierten die Schnitte mindestens 1 h in mit Karbogen begaster aCSF bei Raumtemperatur.

### **4.10.2 Messung von lokalen Feldpotentialen**

Akute Hirnschnitte wurden in eine Interphase-Kammer transferiert, dort bei 35 °C von Karbogen begaster aCSF mit 2 bis 3 ml/min umspült und vor der Messung für mindestens 1 h äquilibriert.

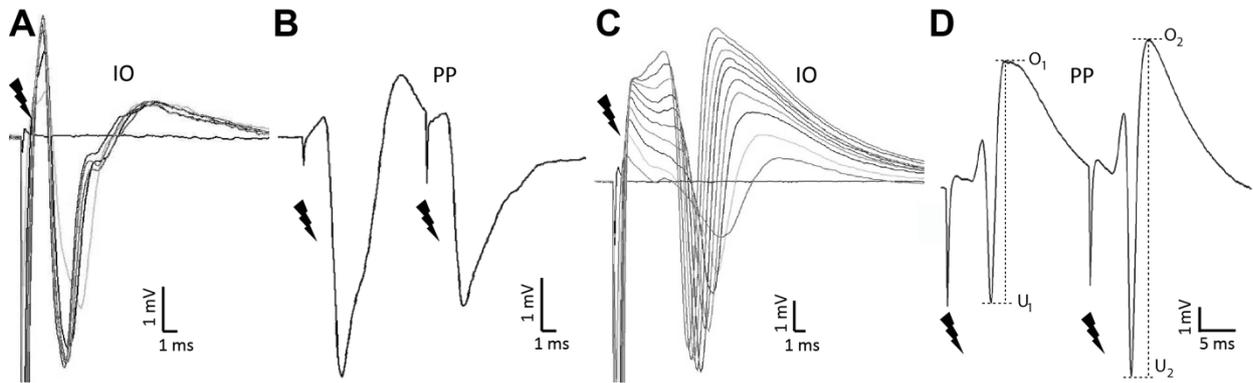
Im Hippokampus wurden bipolare Stimulationselektroden mit einem Spitzendurchmesser von 100 µm (SNE-200, Science Produkts) unter einem binokularen Mikroskop (SZH, Olympus) in die Fasern der Schaffer-Kollateralen platziert. Zur Analyse von Feldpotentialen erfolgte die Registrierung der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale mithilfe von Glasmikroelektroden (2 bis 5 MΩ, aCSF gefüllt) (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Stimulations- und Registrierungspositionen für Feldpotentialmessungen. Die beiden kortikalen Positionen sind auf der rechten Seite gezeigt (Position 1 und Position 2 jeweils in Schicht II/III). Ableitelektroden im Hippokampus sind auf der linken Seite markiert. Die Lagen der Stimmungs Elektroden sind mit Blitzen angedeutet und befanden sich in der kortikalen Schicht VI bzw. in den Schaffer-Kollateralen des Hippokampus.

Das *Paired-Pulse*-Stimulationsprotokoll ist die Anwendung zweier kurz aufeinander folgender Stimuli. Es erlaubt die Messung der kortikalen Erregbarkeit durch die Messung des suppressiven Effekts auf den zweiten Stimulus im Vergleich zum ersten. Die *Paired-Pulse-Rate* ergibt sich aus dem Verhältnis der Amplitude der Antwort auf die zweite Stimulation zur Antwort auf die erste. Kleine *Paired-Pulse*-Raten weisen auf eine erhöhte Hemmung bzw. reduzierte Erregbarkeit, große Raten auf hohe Erregbarkeit hin.

Zunächst wurde für jede Messung in Kortex und Hippokampus durch sequenzielle Erhöhung des Stimulationspulses ( $50 \mu\text{s}$ ) von 0 auf 100 V (Inter-Stimulus-Interwall, ISI = 30 s und 10 V) die halbmaximale Stimulationsstärke bestimmt (Abbildung 8 A, C). Aus der ermittelten sigmoiden Messkurve konnte anhand der Input/Output-Kurve die halbmaximale Anregungsintensität abgeleitet werden. Diese Stimulationsintensität wurde anschließend zur Analyse nach dem *Paired-Pulse*-Paradigma angewendet (Abbildung 8 B, D). Folgende ISIs wurden gemessen: 6, 9, 15, 20, 30, 50, 80, 120, 180, 280, 430, 650 und 1000 ms. Die Ruhezeit zwischen den Messungen betrug jeweils 30 s.



**Abbildung 8:** Beispiele für Feldpotentialmessungen. **(A)** Ermittlung einer Input/Output-Kurve im Kortex und **(C)** im Hippokampus. Überlagerung der Stimuli von 0-100 mV mit einem Intervall von 10 mV **(B)** Paired-Pulse-Paradigma (PP) im Kortex mit Depression (ISI 9 ms). **(D)** und Hippokampus mit Fazilitierung (ISI 20 ms). Stimulationsartefakt

Die Paired-Pulse-Ratio wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$PPR = \frac{O_2 - U_2}{O_1 - U_1} = \frac{\text{Amplitude 2}}{\text{Amplitude 1}}$$

Die Datenerfassung und die Auswertung der Feldpotentiale erfolgte mit der Software Signal 3 (Cambridge Electronic Design).

#### 4.10.3 Patch-Clamp Messungen

Patch-Clamp Messungen der Membranpotentiale und Ionenströme an kortikalen und hippokampalen Pyramidenzellen wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn L. Liebmann durchgeführt.

Akute Hirnschnitte (vgl. 4.10.1) wurden permanent in der Messkammer mit begaster aCSF bei einer Flussrate von 2 – 3 ml/min bei 32 °C umspült. Aus Borosilikatglas (äußerer Durchmesser 1,5 mm, Science Products) wurden mit einem Mikropipettenpuller (P-97, Sutter Instrument) Patch-Pipetten mit einer elektrischen Impedanz von 3 – 4 MΩ hergestellt. Die Messungen erfolgten unter visueller Kontrolle mit Differentialinterferenzkontrast mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40x, BX51WI, Olympus). Nach leichtem Ansaugen wurde bei Zellen im Hippokampus CA1 bzw. im Kortex Schicht II/III mit der Typmorphologie von Pyramidenzellen die Verbindung zwischen Elektrode und Membran abgedichtet (*seal*, Widerstand > 1 MΩ, *cell attached patch*) und anschließend aufgebrochen (*whole cell Patch*). Ausschließlich Zellen, deren Zugangswiderstand kleiner als 15 MΩ und deren Ruhemembranpotential negativer als -55 mV waren, flossen in die Auswertung ein. Die Aufnahme der Signale erfolgte mit einer Abtastfrequenz von 20

kHz (Digidata 1440, Molecular Devices), einem *Patch-Clamp* Verstärker (Multiclamp 700B, Molecular Devices) und einem 4 kHz Tiefpassfilter.

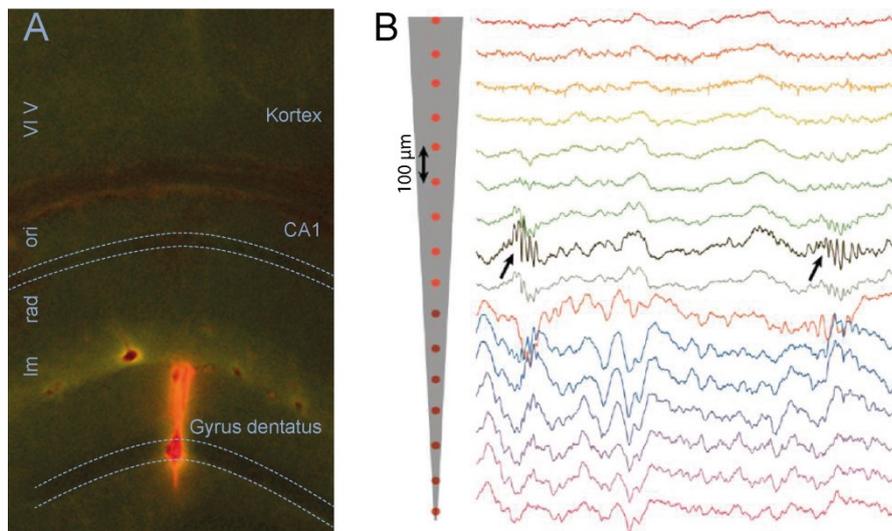
Spontane inhibitorische postsynaptischer Ströme (sIPSCs) wurden bei einem Haltepotential von -70 mV gemessen. Die Elektroden beinhalten eine auf CsCl-basierende intrazelluläre Lösung. Die Zugabe von 0,5 µM Tetrodotoxin (Tocris, TTX) zum Perfusat blockte spannungsabhängige Natriumkanäle. Zusammen ermöglichte dies die Isolation von *miniature*-IPSCs (mIPSCs).

Sämtliche Daten wurden mittels PC und der Software pClamp 10.2 bzw. Clampfit 10.2 (Axon Instruments) aufgenommen, gespeichert und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte offline. Der Grenzwert wurde auf 5 pA (Ersatzwert) gesetzt und Ströme wurden als Ereignis aufgefasst, sobald die Anstiegszeit schneller als die Abklingzeit war. Folgende Parameter konnten so erfasst werden: Kapazität, Widerstand, Frequenz, Halbwertszeit, Abklingzeit ( $\tau$ ) und „Peak“-Amplitude.

#### **4.10.4 Aufnahme lokaler Feldpotentiale (LFPs) im Hippokampus**

LFPs von  $KCC2^{flox/flox}$  PV-Cre<sup>+</sup> und PV-Cre<sup>-</sup> Mäusen wurden von Herrn Prof. Dr. Dirk Isbrandt und dessen Mitarbeitern im Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt. EEGs wurden von der Skalpoberfläche, Elektrokortikogramme von der Dura und LFPs intrakraniell abgeleitet.

Erwachsene männliche Mäuse wurden initial mit 1-1,5 % Isofluran in 100 % Sauerstoff anästhesiert und die Körpertemperatur fortan durch ein Wärmekissen (WPI) auf 36 °C reguliert. Die Fixierung erfolgte in einem Stereotakt (Kopf Instruments). Die Haut am Scheitel wurde eingeschnitten, der Schädel zugänglich gemacht und zwei Löcher mit einem Durchmesser von 0,8 mm gebohrt. Als Bezugs- und Referenzelektrode diente eine rostfreie Schraube über dem Kleinhirn ( $\lambda$  -1,5 mm, lateral 1 mm). Diese Schraube war mit dem Erdungskabel verbunden. Für die Hippokampus-Siliziumelektrode („*silicon probe*“) befand sich das Bohrloch 2 mm hinter dem Bregma und 1,6 mm rechts der Mittellinie. Diese Elektrode besaß 16 Aufnahmestellen im Abstand von 100 µm (Neuronexus Technologies, A1x16,5mm-100-177-A16) und wurde senkrecht in den dorsalen Hippocampus entlang der CA1-Gyrus dentatus Achse eingesetzt. Die Position der Siliziumsonde wurde im Anschluss überprüft (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Kontrolle der Lage der Siliziumelektroden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil in NeuroTrace<sup>TM</sup> fluoreszierenden Nissl-gefärbten (Invitrogen) koronalen Schnitten. *Stratum lacunosum moleculare* (lm), *radiatum* (rad), *pyramidale* (pyr) und *oriens* (ori). Rechts: LFP-Beispielaufnahmen: Die Pfeile indizieren *Ripple*-Oszillationen

Die Tiere erhielten nach der Operation intraperitoneal eine Anästhesie mit 1,1-1,4 mg Urethan (10 % w/v) pro 1 g Körpergewicht in 0,9 %iger NaCl-Lösung. Die Atemfrequenz der Tiere wurde durch einen piezoelektrischen Sensor unter dem Brustkorb erfasst. Die Datenerfassung startete bei stabilen Bedingungen etwa 15-30 Minuten nach Einführen der Sonde.

Die Signale wurden durch einen 1x Vorverstärker (Neuralynx Inc.) geleitet, gefiltert (0,5 bis 9000 Hz Bandpass), digitalisiert und als 16-Bit Zahlen mit einer Abtastrate von 32 kHz unter Verwendung eines digitalen Lynx Datenerfassungssystem (Neuralynx Inc.) aufgenommen.

Die Datenanalyse und Visualisierung erfolgte mit Matlab (Mathworks) oder Neuroscope (Hazan *et al.*, 2006). Feldpotentiale wurden auf 1252 kHz heruntergerechnet; die Stromquellendichten (CSDs) wurden mit der Spline-Methode berechnet (Pettersen *et al.* 2006).

Der Nachweis der *Ripples* erfolgte durch Filterung zwischen 100-250 Hz mit einem Butterworthfilter 14ter Ordnung und anschließender Berechnung der momentanen Schwingungsamplitude mithilfe der Absoluten aus der Hilbert-Transformation. Diese Absoluten dienten bei manuell ausgewählten Sequenzen zur Bestimmung der Mittelwerte und der Standardabweichung. Als *Ripple* galten Ereignisse, deren Momentanamplitude die vierfache Standardabweichung überschritt. Anfang und Ende der *Ripples* wurden bei einer Amplitude mit 1,75-facher Standardabweichung determiniert. Die Amplitude berechnete

sich aus der durchschnittlichen Peak-zu-Peak-Differenz, die Frequenz aus den durchschnittlichen Abständen zwischen den Peaks, die *Ripple*-Häufigkeit aus der Anzahl positiv bestimmter Peaks und der Aufnahmezeit im *slow wave sleep*-ähnlichem Zustand. Nur bei einer Dauer von mehr als 25 ms galt ein *Ripple* als bestimmt.

Für die Zuweisung der Kanäle zu den einzelnen Zellschichten dienten folgende Parameter: die Pyramidenzellschicht durch die höchsten *Ripple*-Amplitude, das *Stratum radiatum* durch die größte negative Abweichung in der CSD in den *Ripples*, das *Stratum lacunosum moleculare* durch den größten Rückstrom während der *Ripples*.

Für die Analyse der Amplituden während des REM-ähnlichen Schlafes wurden Multispektrogramme mit Chronux berechnet ([www.chronux.org](http://www.chronux.org), NFFT = 4096 Punkte, Schiebefenster 2048 Punkte). Daraus konnte ein Diagramm erstellt werden, welches den zeitlichen Verlauf der Amplituden frequenzabhängig aufzeigt.

Theta- und gamma-Amplitude berechneten sich durch Integration der Fläche unter dem theta- und gamma-Peak (4-8 Hz und 20-50 Hz.), die Spitzenfrequenzen durch die Maxima in einem Powerspektrum nach *Whitening* (Mitra e Pesaran, 1999) .

Die Phasenmodulation der gamma-Amplitude wurde durch die Kullback-Leibler Divergenz ermittelt (Tort et al 2010). Dazu wird die theta-Phase von gefilterten CSDs mittels Hilbert-Transformation mit einem Butterworthfilter 3. Ordnung berechnet und in 18 Fächer und 20 Stufen aufgeteilt. Aus der Absoluten der Hilbert-Transformation mit einem Butterworthfilter 6. Ordnung von gefilterten CSDs ergab sich die mittlere momentane gamma-Amplitude für jedes Fach. Die Kullback-Leibler Divergenz wurde dann durch den statistischen Abstand zwischen der erhaltenen gamma-Amplitudenverteilung über die theta-Phase und einer einheitlichen unmodulierten Verteilung berechnet. Die Aufteilung dieser Abstände führt zu einer logarithmischen Skalierung von 0 (keine Modulation) bis 1 (maximale Modulation).

Die Asymmetrie von theta-Wellen wurde durch Teilen der Dauer des Anstiegs des theta-Zyklus durch die Dauer des Abfallens errechnet, wobei die Signale eine Modulation durch einen Butterworthfilter 3. Ordnung bei 1-50 Hz durchliefen. Ein Verhältnis von 0,7 bedeutete, dass der aufsteigende Teil 70 % der Länge des absteigenden Teils aufwies.

#### 4.11 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism. Dabei wurden Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Für statistische Analysen wurden folgende Tests verwendet:

*students* t-Test, ungepaart, zweiseitig: Immunoquantifizierung, *Patch-Clamp* Messungen, EEG (mit Welchkorrektur)

2-Wege-Anova mit Bonferroni posthoc-test: Überlebenskurve, Gewicht, Rotarod, *Paired-Pulse*-Protokoll

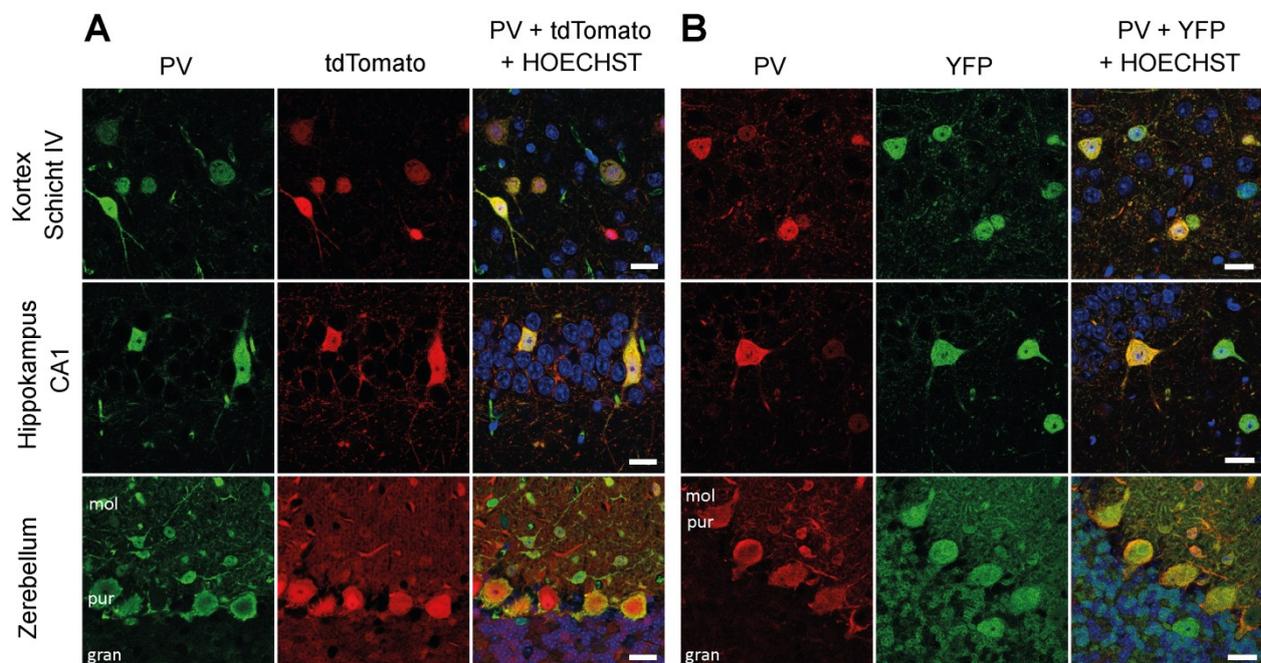
Mantel-Cox-Test:Kaplan-Meier-Überlebenskurve

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Funktionelle Charakterisierung von PV-spezifischen KCC2 KO Mäusen

#### 5.1.1 Immunhistochemischer Nachweis der PV<sup>cre</sup> Spezifität

Die Mauslinie B6;129P2-Pvalb<sup>tm1(cre)Arbr</sup>/J exprimiert PV-abhängig die Cre-Rekombinase (Hippenmeyer et al, 2005) (PV<sup>cre+</sup>, Abbildung 11 B). Zunächst wurde die zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase in PV-exprimierenden Zellen durch Verpaarung mit den Reportermauslinien B6.129X1-Gt(ROSA) 26Sor<sup>tm1(EYFP)Cos</sup>/J oder B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J überprüft. Beide Mauslinien können ihr Reportergen nur nach Cre-vermittelter Rekombination exprimieren. Hirnschnitte 11 Wochen alter Tiere wurde immunohistochemisch gegen PV und YFP gefärbt. tdTomato-Antikörper waren aufgrund der starken Eigenfluoreszenz von tdTomato nicht nötig. In beiden transgenen Mauslinien konnte nahezu eine vollständige Kolokalisation von PV und tdTomato bzw. YFP in Kortex, Hippokampus und Zerebellum gezeigt werden (Abbildung 10). Der Nachweis des entsprechenden Reportergens ließ auf eine hohe Rekombinationsrate schließen.

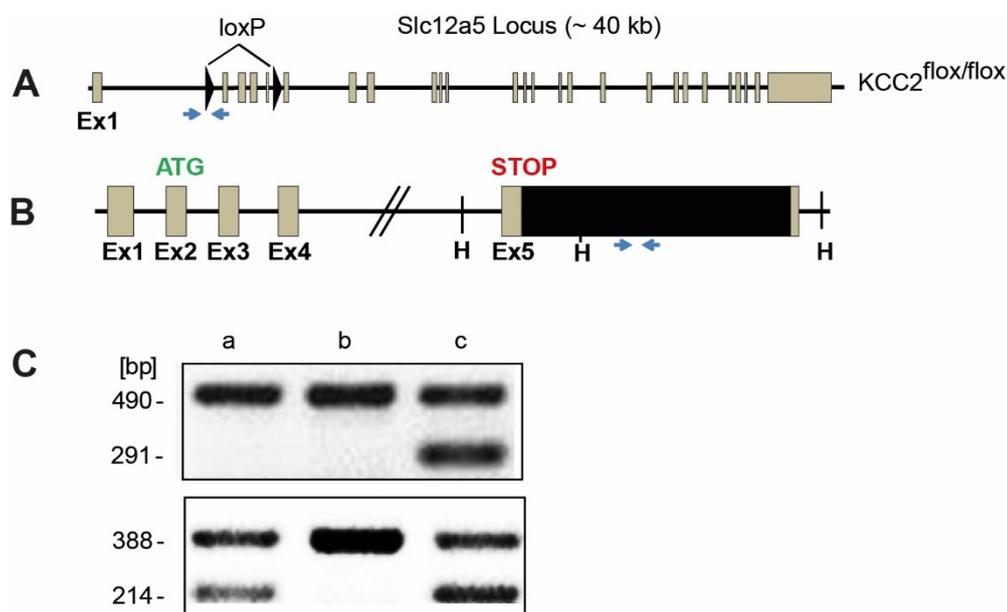


**Abbildung 10:** Immunhistochemie an Hirnschnitten. **(A)** PV<sup>cre+</sup> tdTomato<sup>flox/-</sup> mit einem spezifischen Antikörper gegen PV (grün) und Detektion von tdTomato (rot). In der Molekularschicht (mol) war tdTomato u.a. in Korbzellen detektierbar. Während Purkinjezellen (pur) ein starkes Expressionssignal erkennen ließen, war in der Körnerzellschicht (gran) nur eine diffuse Färbung zu sehen. **(B)** PV<sup>cre+</sup> YFP<sup>flox/-</sup> zeigten hinsichtlich des Reportergens eine ähnliche Expression. Die Zellkerne (blau) wurden mit HOECHST33258 gefärbt. In allen PV-positiven Neuronen war tdTomato bzw. YFP detektierbar und somit die Cre-vermittelte Rekombination spezifisch. Maßstab 20 µm.

### 5.1.2 Generierung PV-spezifischer KCC2 KO Mäuse

Für die Generierung von Mäusen mit PV-KCC2-Knockout wurde zuvor eine gefloxtete Mauslinie, die in der Arbeitsgruppe Hübner generiert wurde, verwendet (Abbildung 11 A) (Seja et al., 2012). Diese Linie trägt ein KCC2-Allel bei dem die Exons 2-5 des KCC2-Gens von loxP-Stellen flankiert werden.

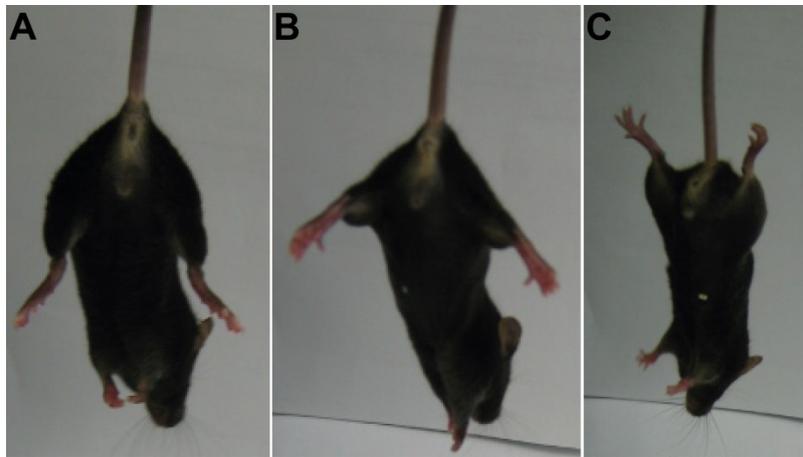
Nach der Bestätigung der PV<sup>cre</sup>-Aktivität erfolgte die Generierung von Mäusen mit PV-spezifischem KO von KCC2 durch Verpaarung der zwei genannten Mauslinien. Die entstandenen Genotypen werden folgend vereinfacht: homozygoter Knockout (KO) = PV<sup>cre+</sup>KCC2<sup>flox/flox</sup>, (gefloxter) Wildtyp (WT) = PV<sup>cre-</sup> KCC2<sup>flox/flox</sup> und heterozygoter KO (HET) = PV<sup>cre+</sup> KCC2<sup>flox/+</sup> genannt. Eine KCC2-spezifische PCR resultierte in einem Signal von 490 Bp bei konditionalem Allel, respektive 291 Bp beim Wildtypallel. Die Cre-Rekombinase wurde mit Hilfe einer unabhängigen spezifischen PCR detektiert. Bei Vorhandensein der Cre-Rekombinase konnte ein Signal bei 214 Bp detektiert werden. Zusätzlich wurde im selben Ansatz das Gen des Glutamatrezeptor KA1 als interne Kontrolle bei 388 Bp amplifiziert (Abbildung 11 C). Die Cre-vermittelte Rekombination deletiert den geflochten Bereich (Seja et al., 2012).



**Abbildung 11:** Strategie zum spezifischen KO von KCC2 in PV-exprimierenden Zellen. **(A)** Schematische Darstellung einer geflochtenen KCC2 Mauslinie: loxP-Stellen flankieren Exon 2-4. **(B)** PV-abhängige Expression der Cre-Rekombinase (nach Hippenmeyer et al., 2005): Die *knock-in* Maus kodiert nach dem STOP-Codon in Exon 5 (Ex5) über eine IRES-Kassette für die Cre-Rekombinase (schwarzer Balken, PV<sup>cre+</sup>); H - HindIII-Schnittstelle für das Screening. **(C)** Genotypisierungs-PCR zur Bestimmung des KCC2-Genotyps (oben: 490 Bp = gefloxt KCC2<sup>flox</sup>, 291 Bp = WT KCC2<sup>+/+</sup>) und PV<sup>cre</sup> (388 Bp = interne Kontrolle KA1-Gen, 214 Bp = PV<sup>cre+</sup>). (a) KO: KCC2<sup>flox/flox</sup> / PV<sup>cre+</sup>; (b) WT: KCC2<sup>flox/flox</sup> / PV<sup>cre-</sup>; (c) heterozygoter KO (HET): KCC2<sup>flox/+</sup> / PV<sup>cre+</sup>, Primerbindungsstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

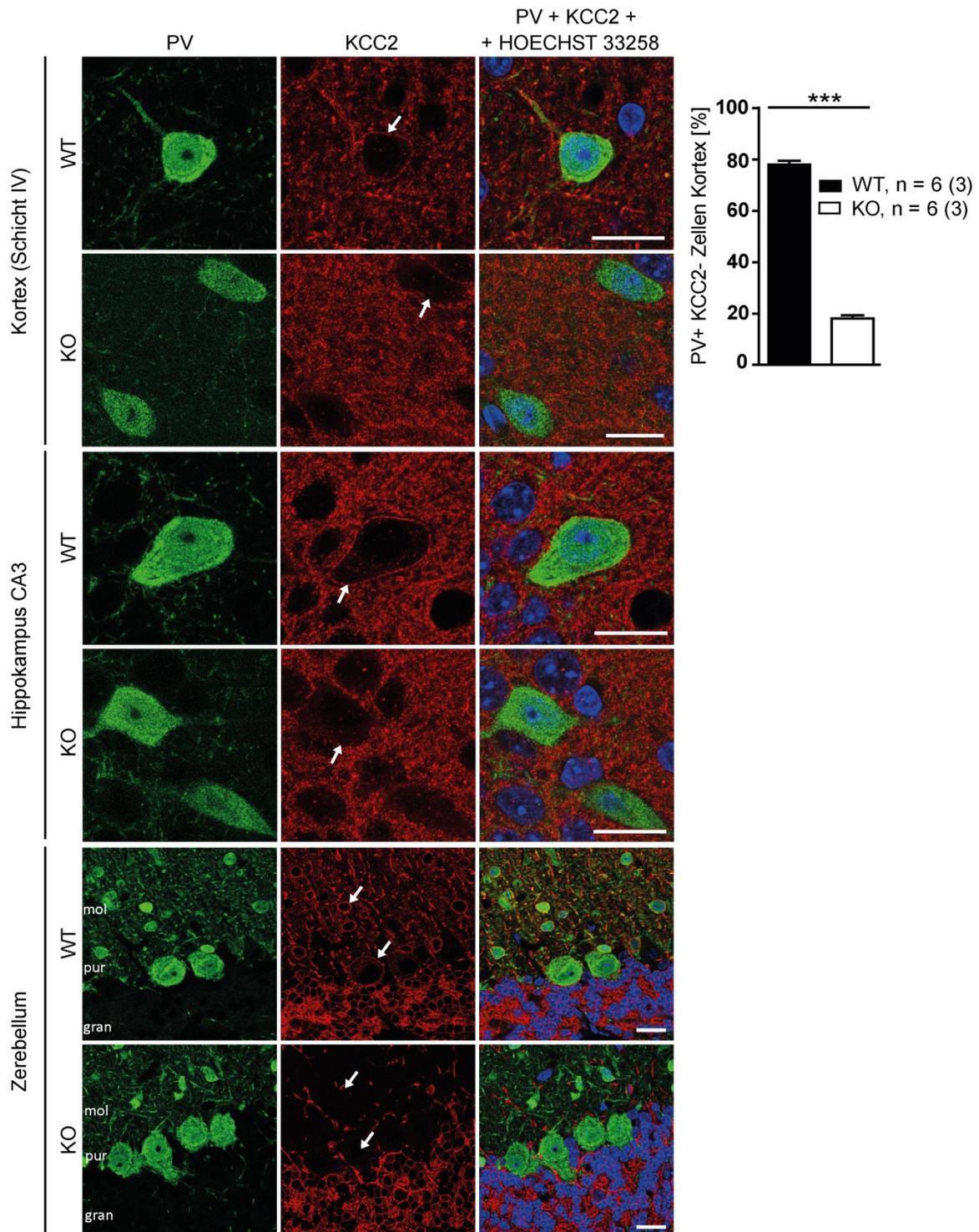
### 5.1.3 Allgemeine Beobachtungen bei PV<sup>cre+</sup> KCC2<sup>flox/flox</sup> und KCC2<sup>flox/+</sup> Mäusen

Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten (Tag/Nacht: 14 h / 10 h von 6:00 - 20:00 Uhr, relative Luftfeuchte = 55 % ± 10 %, Temperatur = 21 °C ± 2 °C, Luftwechsel 14/h). Ein Unterschied zwischen den Genotypen konnte erstmals im Alter von fünf Wochen festgestellt werden. Beim Anheben am Schwanz während des Umsetzens spreizten KOs ihre hinteren Extremitäten im Vergleich zum WT auffällig zur Seite bzw. nach hinten ab (Abbildung 12 A, C). Bei heterozygotem Genotyp konnten ebenfalls Fehlstellungen der Hinterläufe festgestellt werden (Abbildung 12 B). Der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Beinspreizung variierte hierbei. Im Alter von 14 Wochen zeigten alle KOs eine Spreizung ihrer Hinterbeine.



**Abbildung 12:** Veränderte Haltung der hinteren Extremitäten. (A) WT-Mäuse strecken ihre Hinterläufe nach unten (B) HET zur Seite und (C) KO nach hinten.

Zusätzlich unterschieden sich KOs noch in weiteren Eigenschaften von WT-Tieren. So zeigten sie eine reduzierte Aktivität, d.h. sie bewegten sich weniger und langsamer. Außerdem war eine progressive Verschlechterung des Gleichgewichtes bei der Fortbewegung, was teilweise mit Zittern des ganzen Körpers einherging, erkennbar. Diese äußerte sich zunächst in einem unsicheren ataktischen Gang und verschlimmerte sich bis zum Umfallen in höherem Alter (Anhang: Video 1 und 2 WT, Video 3 und 4 KO ). Die Mäuse wirkten schwächer und teilweise ängstlicher. Bei einem Teil der Mäuse wurden epileptische Anfälle dokumentiert, welche vor allem in Stresssituationen auftraten (Anhang: alle KO, Video 5: schwacher Anfall, Video 6: schwerer Anfall). Zudem konnte beobachtet werden, dass Tiere nach einem Anfall deutlich desorientiert waren (Video 7: Regeneration nach einem Anfall). Alle genannten Auffälligkeiten traten frühestens bei fünf Wochen alten Tieren auf. Jedoch blieben auch einige KO-Tiere bis zum Alter von neun Wochen symptomlos.

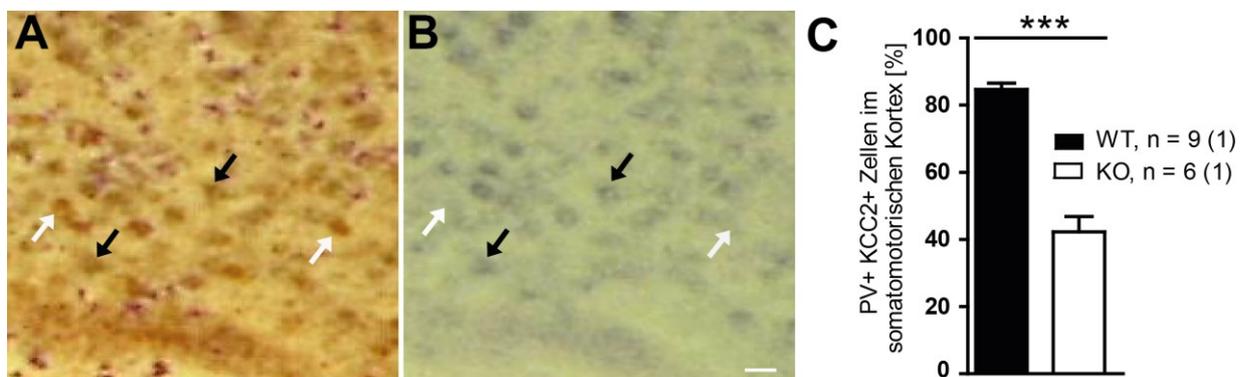


**Abbildung 13:** Immunofluoreszenz an Hirnschnitten von  $PV^{cre-} KCC2^{flox/flox}$  (WT) und  $PV^{cre+} KCC2^{flox/flox}$  (KO) mit spezifischen Antikörper gegen PV (grün) und KCC2 (rot) im Hippokampus (Region CA3), Zerebellum und Kortex Schicht IV. Die Zellkerne (blau) wurden mit HOECHST33258 gefärbt. PV-positive Neurone in der Pyramidenzellschicht des WT zeigten ein deutliches membranständiges KCC2-Signal, das im KO nicht zu erkennen war. In den Membranen PV-erger WT Neurone, zum Beispiel Purkinjezellen (pur) oder Basketzellen in der Molekularschicht (mol), konnte ein charakteristisches KCC2-Signal detektiert werden (Pfeil). Im KO war hingegen keine Markierung dieser Zellen für KCC2 nachzuweisen. Die deutliche Färbung von KCC2 in Somata von Körnerzellen (gran) war sowohl im WT als auch im KO zu erkennen. Plasmamembranen nicht PV-erger Zellen waren ebenfalls erkennbar. PV-positive Neurone im WT zeigten im Kortex ein deutliches KCC2-Signal in den Plasmamembranen, welches im KO nicht detektierbar war. In PV-negativen Zellen im KO waren jedoch Signale erkennbar. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ . rechts: Quantifizierung von PV-positiven Neuronen im motorischen Kortex bzw. somatomotorischen Kortex Area 1/2 hinsichtlich ihrer KCC2-Expression. (t-test, ungepaart, zweiseitig:  $p < 0,0001$ )

FA-fixierte, 40 µm dicke Hirnschnitte beider Genotypen wurden auf die Expression von KCC2 und PV immunohistochemisch untersucht. In WT-Präparaten konnte in Hippokampus, Zerebellum und Kortex eine Kolokalisation der beiden Proteine festgestellt werden. Die meisten PV-exprimierende Zellen zeigten ein deutliches KCC2-Signal in der Plasmamembran. Diese grenzte die positiv für PV gefärbte Zelle klar von der Umgebung ab. Schnitte beider Genotypen wurden hinsichtlich der Kolokalisation von PV und KCC2 quantifiziert. Hierzu wurden insgesamt 870 WT bzw. 673 KO PV-positive Zellen im motorischen Kortex bzw. im somatomotorischen Kortex Areal 1/2 in die Analyse einbezogen. Es war deutlich zu erkennen, dass der Prozentsatz KCC2-exprimierender Zellen im KO mit  $18,1 \pm 1,3 \%$  signifikant niedriger war als im WT mit  $77,9 \pm 1,5 \%$  (Abbildung 13). Jedoch ist festzuhalten, dass weder alle PV-positiven Neuronen im WT KCC2 exprimieren, noch dass KCC2 komplett in PV-positiven Zellen ausgeschaltet wurde.

#### 5.1.4 Verifizierung des zelltypspezifischen KO von KCC2

Um zu prüfen, ob KCC2 in allen PV-positiven Zellen von KO-Mäusen nicht mehr exprimiert wird, erfolgte zusätzlich zur immunohistochemischen Analyse eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene. Hierzu wurden insgesamt 412 WT bzw. 263s KO PV-positive Zellen im im somatomotorischen Kortex analysiert.



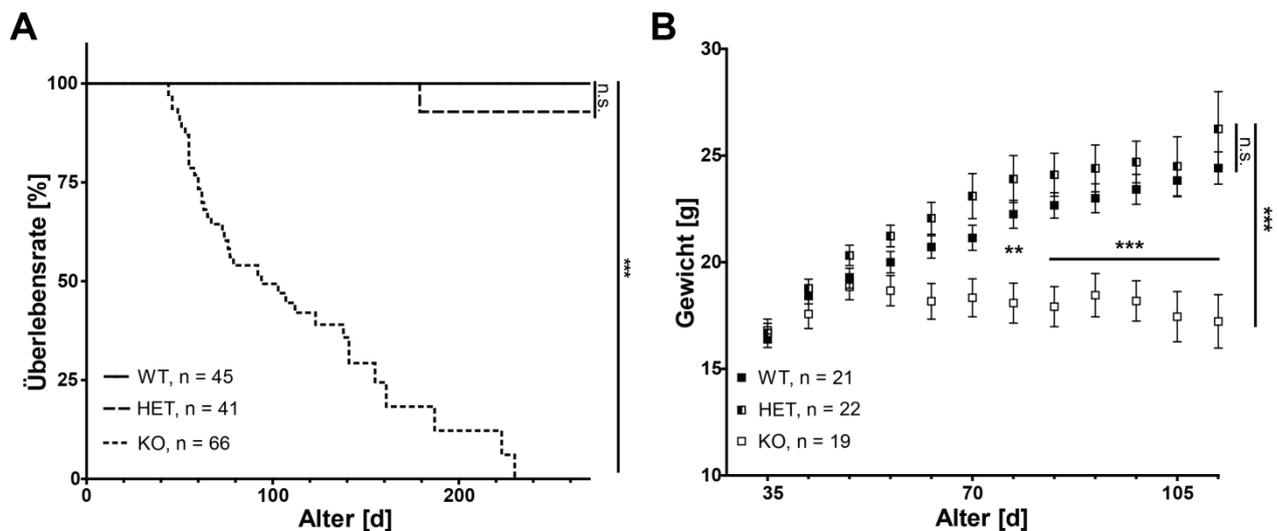
**Abbildung 14:** Doppel-*in-Situ*-Hybridisierung zur Detektion von PV- und KCC2 mRNA. In 20 µm sagittalen Gefrierschnitten (WT, KO, 16 Wochen) war eine Reduzierung von KCC2-exprimierenden PV-positiven Zellen im KO detektierbar. **(A)** PV und **(B)** KCC2-RNA im somatosensorischen Kortex des KOs. Im Gegensatz zum WT (nicht gezeigt) war bei weniger Zellen eine Kolokalisation beider RNAs (schwarze Pfeile) als im KO nachweisbar. Hier traten häufiger PV-positive Zellen ohne KCC2-Expression auf (weiße Pfeile) finden. Maßstab 20 µm. **(C)** Quantifizierung PV+ KCC2+ Zellen hinsichtlich ihrer KCC2-mRNA Expression. n ist die Anzahl der Schnitte, in Klammern die Anzahl der Tiere die analysiert wurden (*students t-test*, ungepaart, zweiseitig,  $p < 0,0001$ ).

Die Mehrheit der PV-positiven Neurone im WT exprimierten auch KCC2-mRNA. Es konnten KCC2-positive Zellen unabhängig vom Signal für PV detektiert werden und umgekehrt (Abbildung 14 A, B). Beim KO wurde eine geringere Kolokalisationsrate

festgestellt. Die Quantifizierung PV-erger und KCC2-exprimierender Zellen erfolgte im somatomotorischen Kortex. Hierfür wurden pro Genotyp von einem Tier mehrere Kryoschnitte (WT n = 9, KO n = 6) analysiert. Die Ausmaß der Kollokalisation von PV und KCC2 variierte dabei: Im WT  $84,7 \pm 1,9 \%$  zu  $42,2 \pm 4,6 \%$  im KO ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 14 C).

### 5.1.5 Analyse der Überlebensrate bis Tag 250

Der allgemein schlechte Zustand nach Einsetzen der Symptome bei KO-Tieren spiegelte sich in einer erhöhten Mortalität wieder. Für die Analyse der Überlebensrate wurden 45 WT-, 41 HET- und 66 KO-Mäusen über einen Zeitraum von 250 Tagen untersucht. Beim WT konnte kein Todesfall dokumentiert werden, beim HET lediglich einer. Die Überlebenszeit der KOs variierte hingegen stark. Erste Mäuse starben bereits im Alter von 42 d. Das älteste Tier erreichte ein Alter von 240 Tagen. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug für KO-Tiere betrug 94 Tage (Abbildung 15 A). Der Unterschied zwischen den Genotypen WT und KO war signifikant ( $p < 0,0001$ ).

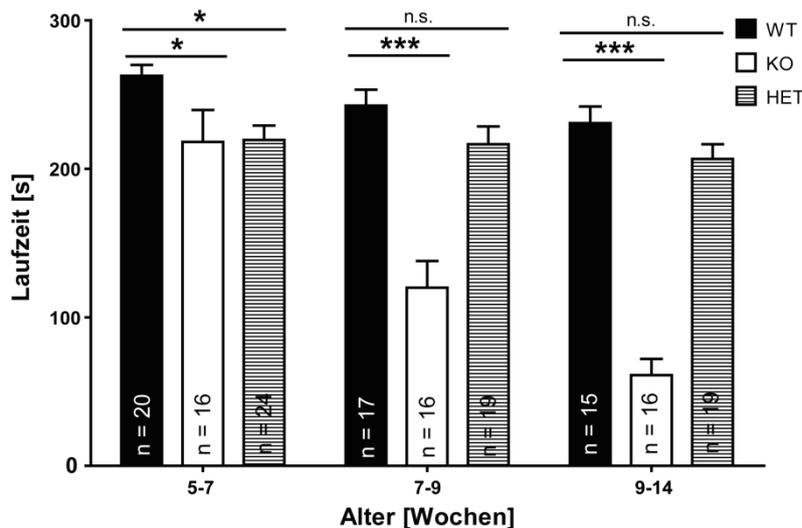


**Abbildung 15: (A)** Kaplan-Meier-Überlebenskurve von KO (gepunktete Linie), HET (gestrichelt Linie) und WT (durchgehende Linie) Tieren. KO-Mäuse zeigten eine stark erhöhte Mortalität ( $p < 0,0001$ , Mantel-Cox-Test) d.h. sie starben durchschnittlich im Alter von 94 d, während der WT keine verfrühte Mortalität vorwies. Bei HET trat während der Dauer der Beobachtungen von 0 bis 250 Tagen lediglich ein Todesfall im Alter von circa 26 Wochen auf. **(B)** Gewichtsentwicklung von KCC2 Mäusen – WT (■), HET (▣) und KO (□). Die Entwicklung der Körpermasse des KO zeigte im Vergleich zu WT und HET signifikante Differenzen ( $p < 0,0001$ , 2-Wege-ANOVA).

### 5.1.6 Gewichtsanalyse und ROTAROD-Motoriktest

Um die Veränderungen der Motorik zu charakterisieren, wurde eine Rotarod-Analyse durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten: Im Alter von 5 - 7 (20 WT, 16 KO, 24 HET), 7 - 9 (17 WT, 16 KO, 19 HET) und 9 - 14 (15 WT, 16

KO, 19 HET) Wochen (Abbildung 16). Soweit möglich, wurden die gleichen Tiere für jeden Zeitpunkt analysiert. KO ( $218,1 \pm 21,5$  s) sowie HET ( $219,3 \pm 9,7$  s) im Alter von 5-7 Wochen zeigten im Vergleich zum WT ( $262,6 \pm 7,3$  s) eine verminderte Laufzeit (2-Wege-ANOVA, Bonferroni posthoc-Test,  $p < 0,05$ ). Die Laufzeit der KOs verschlechterte sich jedoch mit zunehmendem Alter (7-9 Wochen) auf  $120,1 \pm 17,8$  s und somit um fast 50 % ( $p < 0,001$ ), wobei die Laufzeit des WT ( $242,6 \pm 10,7$  s) nahezu unverändert war. Der Unterschied zwischen beiden Genotypen vergrößerte sich bis zum spätesten Zeitpunkt der Analyse um weitere 20 % (WT:  $230,7 \pm 11,2$  s, KO:  $61 \pm 11$  s,  $p < 0,001$ ). Die Differenz zwischen WT und HET ( $219,3 \pm 9,7$  s) war nur beim ersten Zeitpunkt der Analyse zu beobachten. Bei späteren Messpunkten waren die Unterschiede nicht signifikant ( $216,6 \pm 11,9$  s;  $206,7 \pm 9,9$  s;  $p > 0,05$ ). Bei der Durchführung der Test konnte zudem beobachtet werden, dass KO-Mäuse sich weniger explorativ verhielten und mehr Fehlritte als Mäuse der anderen Genotypen machten (Anhang: Video 8 und 9 WT, Video 10 und 11 KO, Video 12 HET).



**Abbildung 16:** Rotarod-Motorik-Test zu drei verschiedenen Zeitpunkten (5 - 7, 7 - 9 und 9 - 14 Wochen). Leichte Unterschiede zu Beginn, bei 5 - 7 Wochen, zwischen WT (schwarzer Balken) und KO/HET (weiß/gestreift). Bei der zweiten und dritten Messung sind signifikante Laufzeitverringerungen beim KO nachweisbar (2-Wege-Anova,  $p < 0,001$ ) während sich die Differenz zu HET verringerte.

Ferner fiel auf, dass sich KO und WT in der Entwicklung ihres Körpergewichts unterschieden. Zur Quantifizierung wurden 21 WT, 22 HET und 19 KO Tiere im Alter von 5 bis 15 Wochen dreimal wöchentlich gewogen. Das Gewicht wurde wochenweise gemittelt. Zwischen WT und HET und während der ersten acht Wochen zwischen WT und KO zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Im Alter von 9 Wochen traten erste charakteristische Differenzen ( $p < 0,01$ ) zwischen WT ( $20,7 \pm 0,5$  g) und KO ( $18,2 \pm 0,8$  g) auf. Mit zunehmendem Alter vergrößerte sich dieser Unterschied. Während WT und

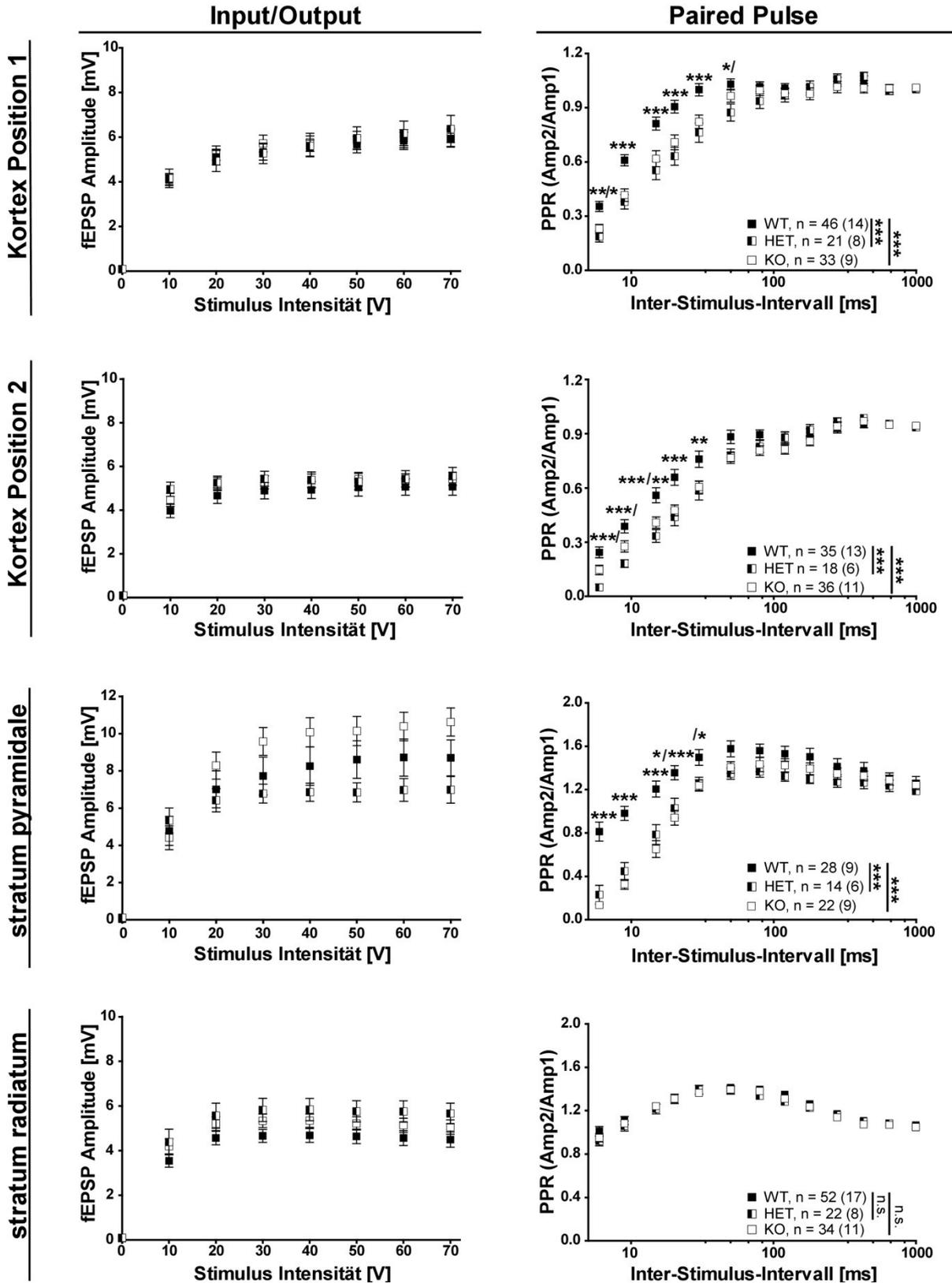
HET kontinuierlich an Gewicht zunehmen, stagnierte das Gewicht der KO-Tiere ab einem Alter von 8 Wochen. Am Ende der Messungen reduzierte sich das Gewicht von KO-Tieren (Abbildung 15 B). Zum Beispiel wog der WT im Alter von 10 Wochen  $21,1 \pm 0,6$  g, später im Alter von 15 Wochen  $23,8 \pm 0,8$  g. KO-Tiere verloren im selben Zeitraum fast ein Gramm (10 Wochen:  $18,3 \pm 0,9$  g; 15 Wochen:  $17,5 \pm 1,2$  g;  $p < 0,001$ ).

### 5.1.7 Messung lokaler Feldpotentiale nach dem *Paired-Pulse Paradigma*

Um mögliche Veränderungen des neuronalen Netzwerkes in Folge der gezielten Deletion von KCC2 in PV-positiven Interneuronen funktionell zu charakterisieren, wurden akute Hirnschnitte elektrophysiologisch analysiert.

Bei Messungen an der kortikalen Position 1 konnte eine verminderte *Paired-Pulse-Rate* beim WT bei den ersten sechs ISI (6, 9, 15, 20, 30, 50 ms) festgestellt werden. Bei 9 ms standen der Rate im WT von  $0,61 \pm 0,03$  im KO  $42 \pm 0,04$  bzw. im HET  $0,38 \pm 0,04$  gegenüber ( $p < 0,001$ ). Diese Differenz von circa 0,2 blieb auch bei den folgenden drei Pulsabständen bestehen ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 17). Die numerischen Ergebnisse aller elektrophysiologischen Messungen sind im Anhang tabellarisch gelistet.

Die Daten für Position 2 waren mit den Ergebnissen der kortikalen Position 1 vergleichbar. Auch hier zeigte sich in HET und KO eine Reduzierung der *Paired-Pulse-Rate* während der ersten sechs ISIs (6 - 50 ms). Signifikant hingegen waren hier nur die Unterschiede zwischen WT und KO bei 15 ms, 20 ms und 30 ms. *Paired-Pulse-Raten* im HET zeigten bei ISI bis 50 ms charakteristische Unterschiede (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Messung lokaler Feldpotentiale an akuten Hirnschnitten. N = Anzahl der gemessenen Schnitte, in Klammern die Anzahl der Tiere, PPR = *Paired-Pulse Ratio*. Links: bei der Analyse der Input/Output-Kurven (links) war kein Unterschied zwischen WT (■), HET (■) und KO (□) feststellbar. Rechts: HET und KO zeigten bei Messungen lokaler Feldpotentiale nach dem *Paired-Pulse*-Paradigma im Kortex sowie im Hippokampus *Stratum pyramidale* bei den kurzen ISIs signifikante Unterschiede zum WT (2-Wege-ANOVA  $p < 0,0001$ ). Die einzelnen Bonferroni posthoc-Tests sind den jeweiligen Werten zugeordnet. Die Messwerte im *Stratum radiatum* legten keine Unterschiede offen.

Auch im Hippokampus zeigten sich Differenzen zwischen den Genotypen. Im *Stratum pyramidale* war ein deutlicher Unterschied des Kurvenverlaufs von HET und KO gegenüber dem WT erkennbar. Besonders während der ersten ISI zeigte sich in HET und KO eine reduzierte *Paired-Pulse-Ratio*. Während die Ratio beim 6 ms Intervall bei  $0,81 \pm 0,09$  lag, betrug sie im KO nur  $0,14 \pm 0,02$  ( $p < 0,001$ ) bzw.  $0,23 \pm 0,02$  ( $p < 0,0001$ ). Auch bei den folgenden Intervallen konnten signifikante Unterschiede detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte im *Stratum radiatum* keine Differenz der *Paired-Pulse-Ratio* gemessen werden. Das Verhalten von KO, HET und WT war bei allen Zeitspannen nahezu identisch (Abbildung 17).

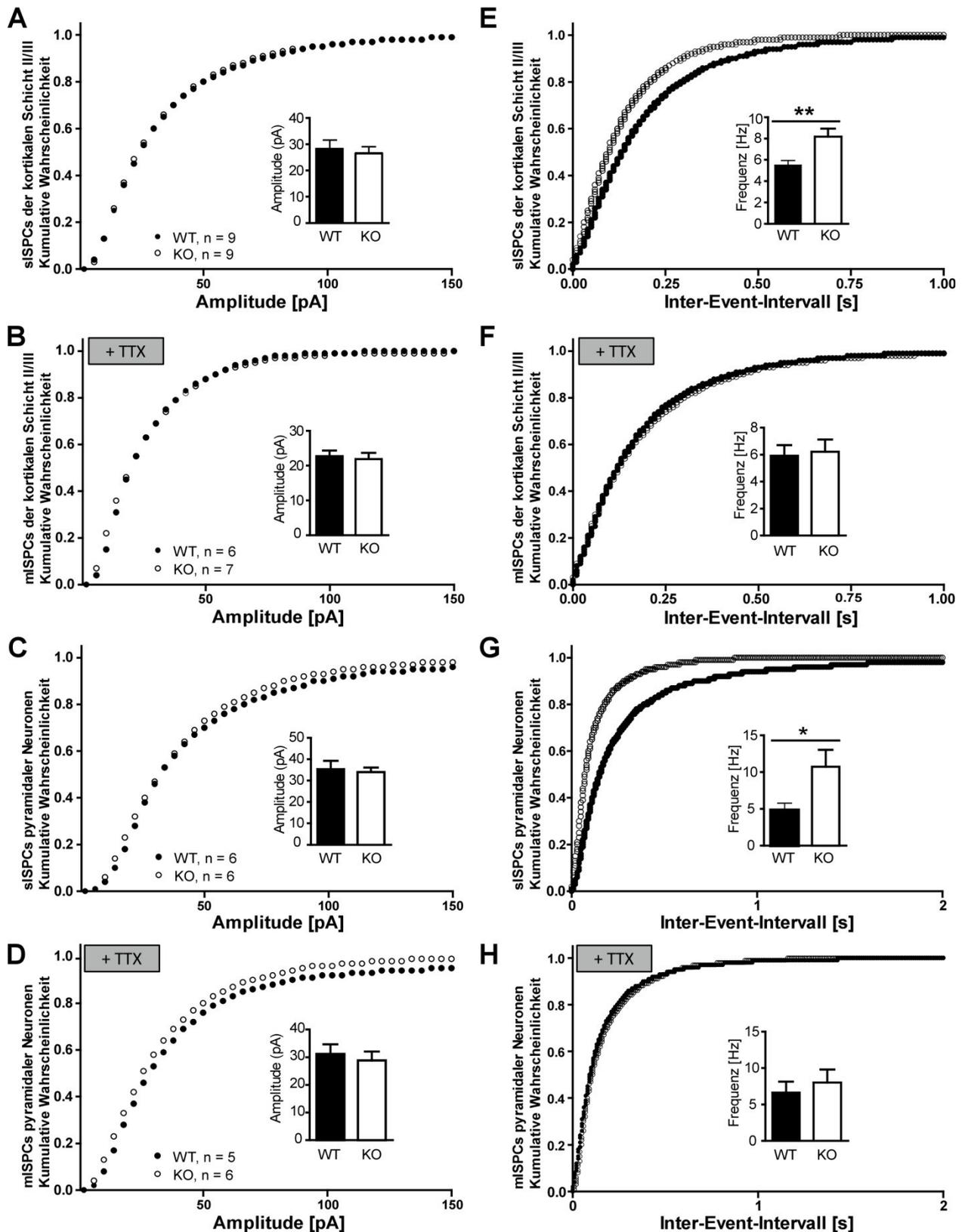
### 5.1.8 *Patch-Clamp* Aufnahmen kortikaler Pyramidenzellen

Im folgenden sollte das Verhalten einzelner Neurone in akuten 350  $\mu\text{m}$  dicken Hirnschnitten analysiert werden. Hierzu wurden IPSCs kortikaler Neurone aus Schicht II/III und hippokampaler Pyramidenzellen aus der CA1-Region mittels *Patch-Clamp* Technik im *whole cell mode* gemessen.

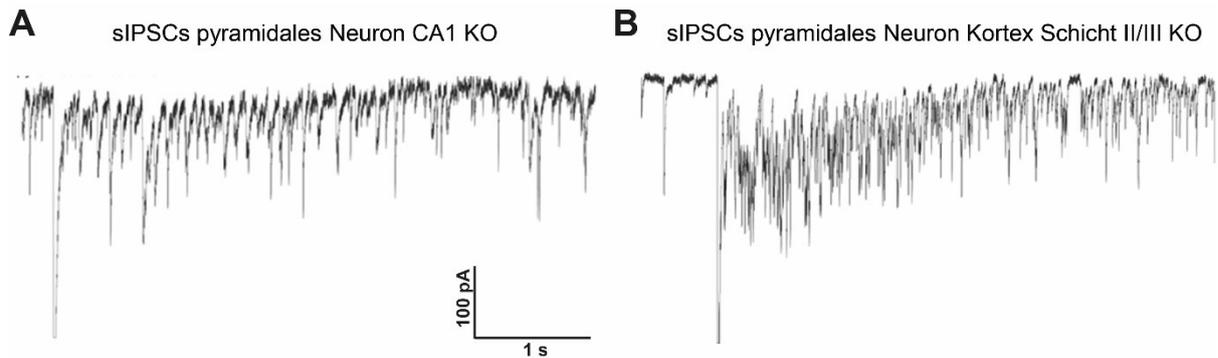
Bei Betrachtung der Amplituden der gemessenen Ströme konnte zwischen WT und KO kein Unterschied festgestellt werden. Hingegen traten signifikante Unterschiede in der Frequenz der IPSCs auf. KO Pyramidenzellen zeigten hier eine höhere Frequenz (Abbildung 18 B, D, E, H).

Durch TTX wurden netzwerkabhängige Aktionspotentiale blockiert. Hierbei blockiert das Toxin die Pore spannungsabhängiger Natriumkanäle und verhindert so deren Funktion. Die gemessenen sIPSCs stellten nun spontan auftretende Ströme dar, welche als mIPSCs bezeichnet werden. Die Amplitude der Ströme unterschieden sich hier jedoch nicht (Abbildung 18 A, C, E, G).

Eine charakteristische Auffälligkeit zeigten KO Zellen. Während der Messung konnten hier immer wieder sIPSC *Bursts* festgestellt werden. Diese waren charakterisiert durch ein initial hohes Signal mit mehreren folgenden Entladungen mittlerer Amplitude jedoch höherer Frequenz. Diese Besonderheit trat ebenfalls bei Pyramidenzellen im Hippokampus auf (Abbildung 19).



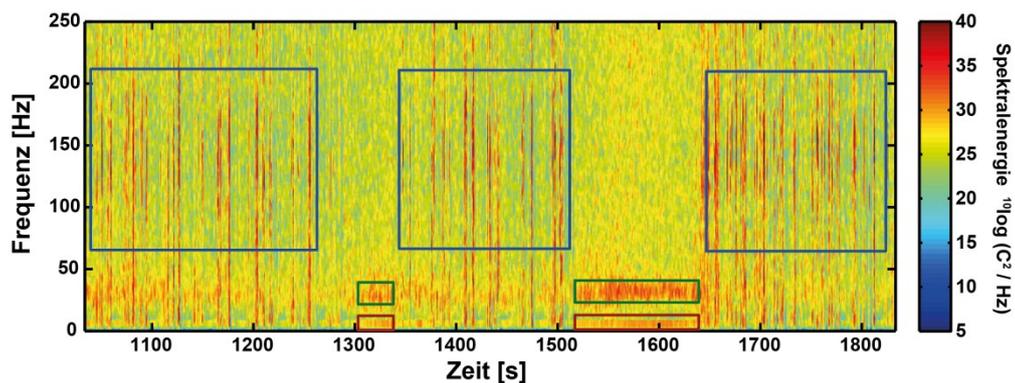
**Abbildung 18:** Patch-Clamp Messung spontaner inhibitorischer postsynaptischer Ströme (sIPSCs) und mIPSCs in Pyramidenzellen in WT (schwarz ●) und KO (weiß ○). In kortikalen pyramidalen Neuronen sind Amplitude und die Verteilung der Amplitudenintensitäten annähernd gleich (A-D). Die erhöhte Frequenz im WT bei sIPSCs (E, G) konnte bei Messungen der mIPSC mit TTX nicht mehr detektiert werden. Die Unterschiede im Kortex (students t-test.  $p = 0,007$ ) und im Hippokampus waren signifikant (students t-test.  $p = 0,07$ ).



**Abbildung 19:** Bei KO Pyramidenzellen in Hippokampus (A) und Kortex (B) traten unvermittelt Mehrfachentladungen (*Bursts*) auf.

### 5.1.9 Analyse der hippokampalen LFP-Tiefenprofile

Nachdem Ströme einzelner Neurone und lokale Feldpotentiale (LFPs) separater Hirnareale *in vitro* registriert wurden, erfolgte die Analyse lokaler Feldpotentiale *in vivo*. Von Mäusen beider Genotyps konnten mithilfe implantierter Sonden gleichzeitig LFPs unterschiedlicher Regionen registriert werden.



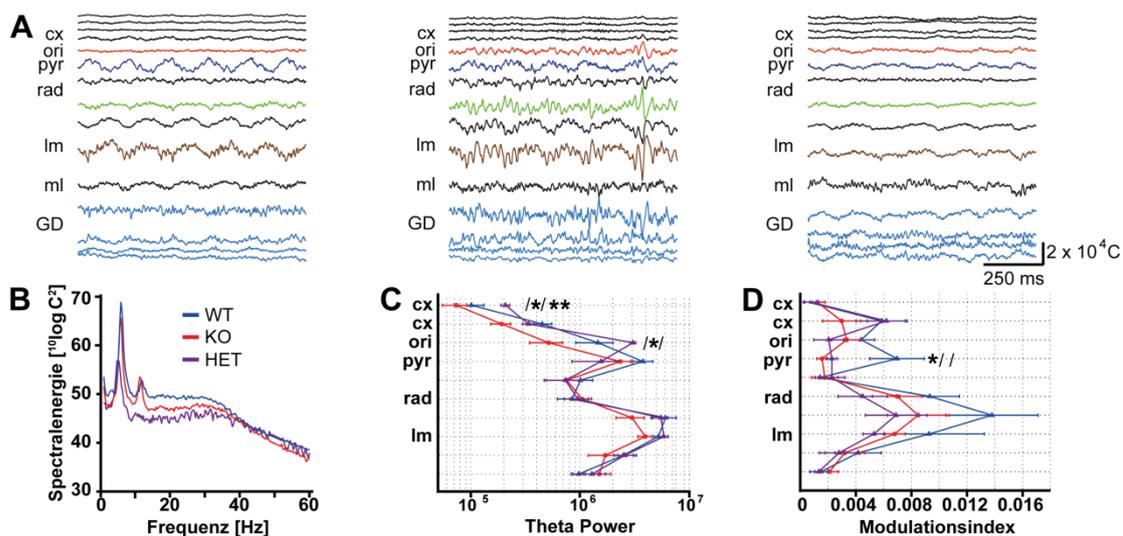
**Abbildung 20:** Rohdaten der LFP-Aufzeichnungen eines Arbeitskanals in der CA1-Pyramidenzellschicht im Multispektrum. blaues Rechteck: *slow wave sleep* mit hochfrequenten *Ripples*, grünes Rechteck: gamma-Oszillationen während REM-ähnlichen Schlafes, rotes Rechteck: theta-Oszillationen während REM-ähnlichem Schlaf.

Die Aufnahme der LFPs von WT und Knockout-Mäusen erfolgte unter Urethannarkose, in welcher die Tiere spontan zwischen einer Tiefschlaf-ähnlichen Phase (*slow wave sleep* bzw. NREM-Schlaf) und einer REM-Schlafphase alternieren (Abbildung 20). Verschiedene Aktivitäten und Prozesse werden mit verschiedenen LFP-Frequenzbändern oder LFP-Wellen in Verbindung gebracht. So sind bestimmte Aktivitätsmuster in LFP-theta-Wellen (4-8 Hz) für den REM-Schlaf charakteristisch. Es wurden sieben WT, acht HET und acht KO-Tiere analysiert, wobei für die Auswertung der theta- und gamma-Frequenzen jeweils ein Datensatz nicht auswertbar gewesen ist.

LFP-Tiefenprofile wurden bei WT, HET und KO Mäusen aufgenommen und eine Spektralanalyse durchgeführt (Abbildung 21 A, B). Signifikante Änderungen der Amplitude und der Frequenz konnten bei Betrachtung des gamma-Frequenzbandes nicht nachgewiesen werden (Abbildung 22 A, B). Auch die Frequenz des theta-Frequenzbandes blieb unverändert, während die Amplitude und die Modulationsindizes zur gamma-Frequenz lokal und genotypspezifisch bedingten verschiedenen Änderungen unterlagen.

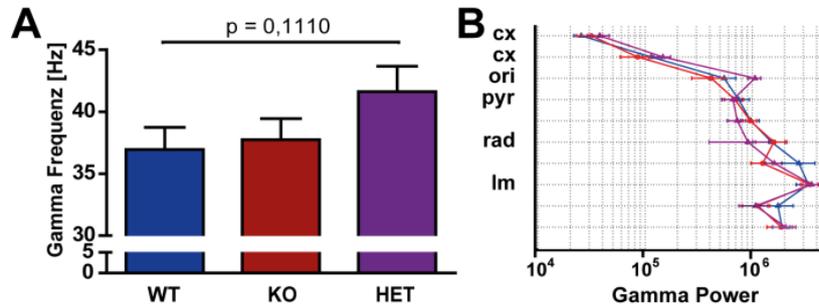
Im theta-Frequenzband zeigten sich abhängig von der Region und vom Genotyp diverse Reaktionsmuster. Zum Beispiel lassen sich im Kortex (Cx1) und im *Stratum oriens* (ori) signifikante Unterschiede in der theta-Amplitude in KO und HET im Vergleich zum WT finden (Abbildung 21 C). An anderen Positionen (Cx2, Pyr, Rad-LM) ist der Unterschied nicht signifikant, zeigt jedoch einen Trend.

Auch bei der Modulation zwischen gamma- und theta-Rhythmus ist eine heterogene Verteilung der Effekte festzustellen. Im *Stratum pyramidale* konnte beim KO und beim HET eine signifikante Entkopplung der theta- von der gamma-Frequenz detektiert werden. Ebenfalls in anderen Schichten waren Unterschiede detektierbar, die jedoch weit aus geringer ausfielen. Auffällig war hierbei, dass beim „ori“, „rad“, „rad-lm“, „lm“ und „lm+1“ die Modulation beim KO reduziert, beim HET jedoch am geringsten war (Abbildung 21 D).



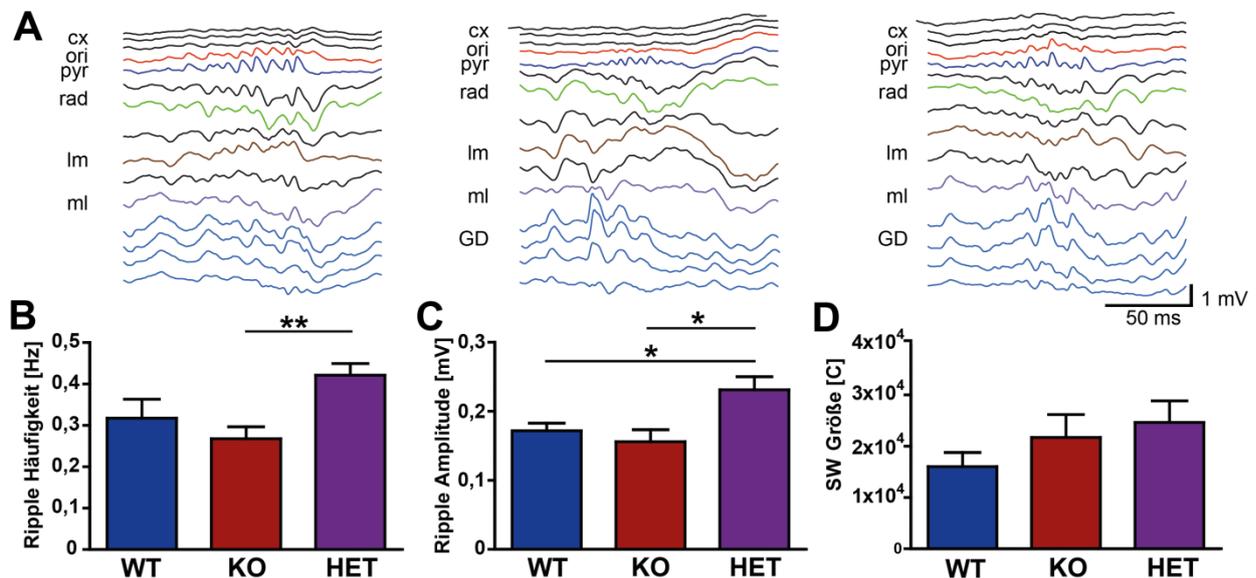
**Abbildung 21:** Analyse der theta-Oszillationen bei konditionalen KCC2-Knockout Mäusen. **(A)** theta-Rohdaten von WT (links, 6 Tiere), KO (mittig, 7 Tiere) und HET (rechts, 7 Tiere). **(B)** Spektralanalyse. **(C)** Die theta-Amplitude und **(D)** der Modulationsindex zur gamma-Oszillation in den verschiedenen Hirnregionen: Kortex Schicht IV/V (Cx), Hippokampus CA1 *Stratum oriens* (ori), *pyramidale* (pyr), *radiatum* (rad), *lacunosum moleculare* (lm) von WT (blau), KO (rot) und HET (lila).

Die Aufnahmen von WT, KO und HET wurden nach *Ripples* gescannt (Abbildung 23 A) und deren Frequenz, Auftreten, Länge und Amplitude ausgewertet. Bei der Frequenz und der Länge von *Ripples* konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 22:** Analyse der gamma-Oszillationen bei konditionalen KCC2-Knockout Mäusen. Weder **(A)** die Frequenz noch **(B)** die Amplitude des gamma-Rhythmus im Tiefenprofil zeigten signifikante Unterschiede

*Ripples* traten im WT alle  $0,32 \pm 0,05$  Hz, im KO alle  $0,27 \pm 0,03$  Hz und im HET alle  $0,42 \pm 0,03$  Hz auf (Abbildung 23 B). Kein Unterschied war zwischen WT und KO ( $p = 0,38$ ) bzw. zwischen WT und HET ( $p = 0,08$ ) zu detektieren, während *Ripples* im HET deutlich häufiger auftreten als im KO ( $p = 0,0018$ ).



**Abbildung 23:** *Ripple*-Analyse konditionalen KCC2-Knockout Mäusen. **(A)** Rohdaten von WT (7 Tiere), KO (8 Tiere) und HET (8 Tiere) in Kortex Schicht IV/V (Cx), Hippokampus CA1 *Stratum oriens* (ori), *pyramidale* (pyr), *radiatum* (rad), *lacunosum moleculare* (Im) und *Gyrus dentatus* (DG). **(B)** Häufigkeit und **(C)** Amplitude der *Ripples* sowie **(D)** *sharp wave* (SW) Größe

Auch bei die *Ripple*-Amplitude war in HET ( $0,23 \pm 0,02$  mV) signifikant höher als beim WT ( $0,17 \pm 0,01$  mV;  $p = 0,021$ ) und beim KO ( $0,16 \pm 0,02$  mV;  $p = 0,0116$ ) (Abbildung

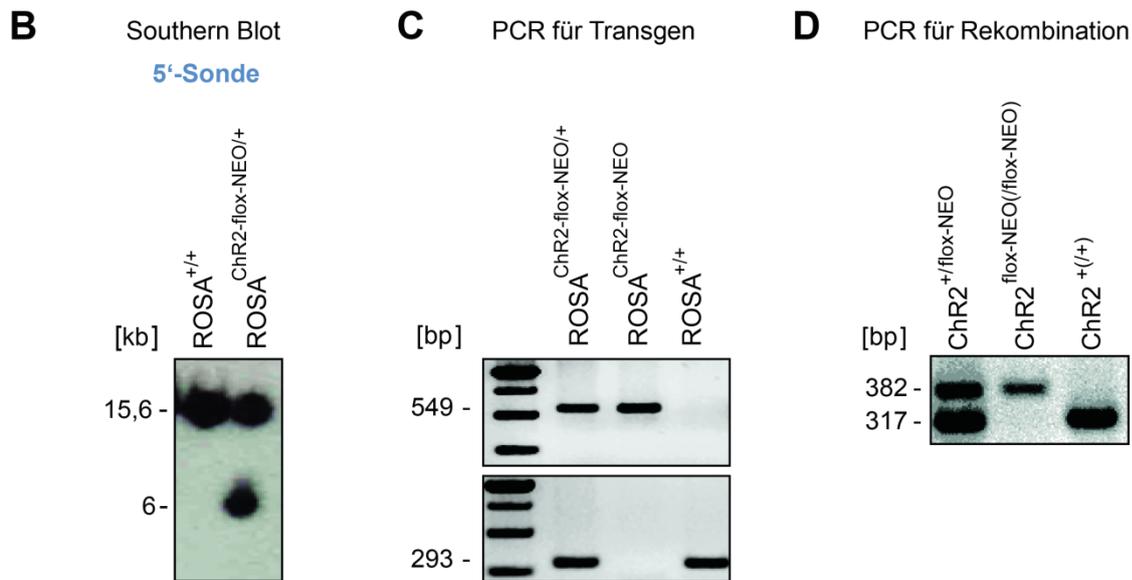
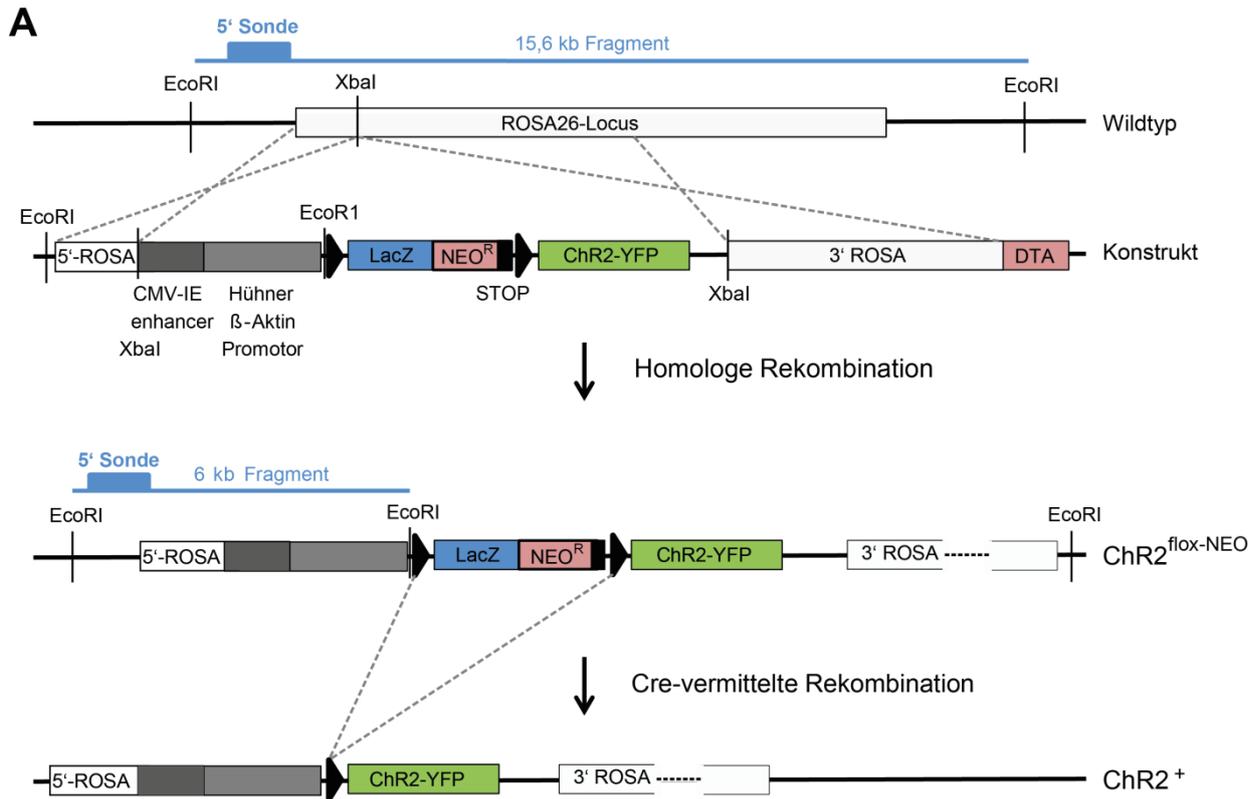
23 C). Hingegen stellte sich *Ripples* zwischen WT und KO als unverändert dar ( $p = 0,45$ ). Keine Unterschiede bestanden zwischen den Genotypen bei der *sharp wave* Größe. Der KO wies mit  $2,17 \pm 0,45 \times 10^4$  C leicht vergrößerte *sharp waves* gegenüber dem WT mit  $1,6 \pm 0,28 \times 10^4$  C auf. Lediglich der Unterschied zwischen WT und HET mit  $2,46 \pm 0,42 \times 10^4$  C zeigt einen Trend, jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,1130$ ) (Abbildung 23 D).

## 5.2 Herstellung des konditionalen ChR2 Mausmodells

### 5.2.1 Generierung einer „geflochten“ ChR2-Mauslinie

Das im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Mausmodell ermöglichte die Manipulation eines Subtyps von Neuronen durch konstitutiven Knockout von KCC2. Das System unterliegt jedoch dabei einigen Restriktionen. Zum einen erfolgt der Knockout in allen PV-positiven Zellen. Diese sind untereinander verschieden und in sämtlichen Hirnregionen vertreten. Zum anderen ist der Zeitpunkt der Cre-vermittelten Deletion unkontrollierbar und irreversibel. Wünschenswert wäre eine Mauslinie, in der Zellen (bzw. Subtypen) regional und temporär modifiziert werden können. Als mögliche Strategie wurde die transgene Expression von Channelrhodopsin-2 gewählt.

Das Mausmodell für eine konditionale Expression von ChR2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde durch homologe Rekombination eines modifizierten genomischen Fragments des ROSA26-Locus (Friedrich und Soriano, 1991) in ES-Zellen generiert (Smithies et al. 1985, Kuehn et al. 1987, Thomas und Capecchi 1987). Hierbei kam die Cre-loxP Strategie zur Anwendung. Eine Fusions-cDNA von ChR2 und EYFP (YFP), die für ein Fusionsprotein (A) kodiert, wurde 3' mit einer loxP-Stellen flankierten STOP-Kassette (gefloxt) kloniert. Diese bestand aus dem LacZ-Gen, einer Neomycinresistenz ( $NEO^R$ ) und einer STOP-Sequenz. Der CMV-IE *Enhancer* als auch der  $\beta$ -Aktin-Promotor aus Hühnchen gewährleisteten eine robuste ubiquitäre Expression. Die STOP-Sequenz verhindert die Transkription der folgenden Gene. Der Nachweis des Transgens vor Rekombination erfolgte über das  $\beta$ -Galaktosidase/LacZ-Gen mittels X-Gal-Färbung. Bei der Cre-vermittelten Rekombination wird die circa 5000 Bp lange Sequenz zwischen den beiden loxP-Stellen inklusive des Stopp-Signals deletiert. Unter dem Einfluss des CMV-IE Enhancers und des Hühner  $\beta$ -Aktin Promotors wird die ChR2-YFP cDNA exprimiert. Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde zunächst die ChR2-YFP cDNA hinter die o.g. Kassette kloniert.



**Abbildung 24:** Strategie zur konditionalen Expression von ChR2-YFP. **(A)** Schematische Darstellung des ROSA26-Locus (oben). Ein Konstrukt aus CMV-IE Enhancer, Hühner-β-Aktin Promotor, gefloxtem β-Galaktosidasegen (LacZ), Neomycinresistenzkassette (NEO<sup>R</sup>) mit STOP-Sequenz und ChR2-YFP-cDNA wurde über homologe Rekombination in das Genom von ES-Zellen integriert (Mitte). Durch Cre-vermittelte Rekombination erfolgte die Deletion des gefloxtens Abschnitts, was die Expression von ChR2-YFP ermöglicht (unten). & = EcoRI, ▶ = loxP-Stelle. **(B)** Southern Blot Analyse von ES-Zellklonen mit einer 5' bindenden Sonde: WT 15,6 kb, konditionales Allel: 6 kb. **(C)** Genotypisierung von Mäusen mittels PCR und Agarosegelelektrophorese (1,5 %): KI-Allel ChR2<sup>flox-NEO</sup> bei 549 Bp (oben), WT-Allel ChR2 bei 293 Bp (unten). Resultierende Genotypen: heterozygot (ChR2<sup>flox-NEO/-</sup>) und homozygot gefloxt (ChR2<sup>flox-NEO/flox-NEO</sup>), WT (ChR2<sup>-/-</sup>). **(D)** Genotypisierungs-PCR nach Verpaarung mit Cre-Deleter-Mäusen. Bande nach Rekombination bei 382 Bp, Bande bei gefloxtem Gen bei 317 Bp. Resultierende Genotypen: heterozygot (ChR2<sup>+/flox-NEO</sup>) und mindestens auf einem Allel rekombiniert (ChR2<sup>+/+</sup> oder ChR2<sup>+/-</sup>) bzw. unrekombiniert (ChR2<sup>flox-NEO/-</sup> oder ChR2<sup>flox-NEO/flox-NEO</sup>). Zur Bestimmung des Genotyps war eine zusätzliche Genotypisierung erforderlich (siehe C)

Alle relevanten DNA-Elemente wurden über die XbaI-Restriktionsstelle in das pRO-SA26-1 Plasmid kloniert, welches 6000 Bp des ROSA26-Locus kodierte.

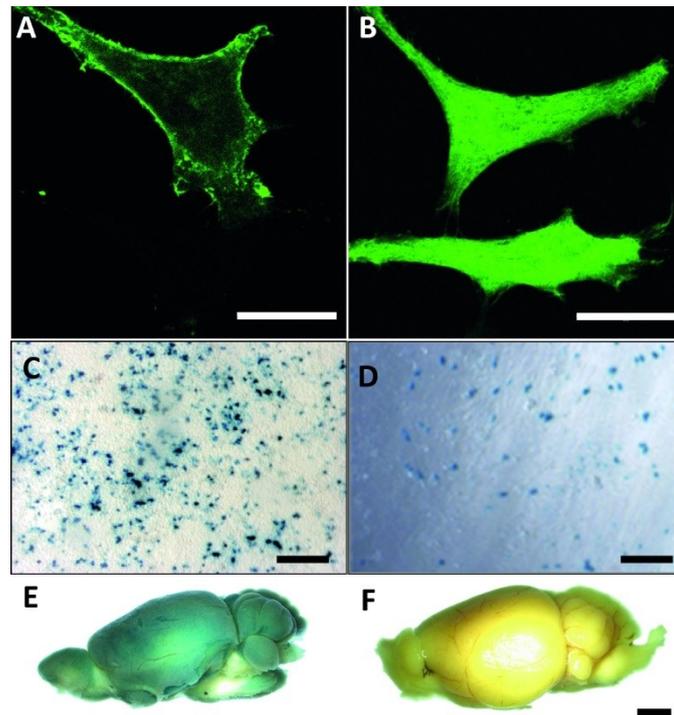
Da sich die XbaI Schnittstelle im ROSA26-Locus bei circa 1100 Bp 5' befand, entstanden zwei Homologiearme. Eine Diphtherietoxin-Fragment A (DTA)-Kassette zur negativen Selektion wurde am Ende des 3' Arms positioniert (Abbildung 24 A). Das fertige Konstrukt wurde zur Kontrolle der  $\beta$ -Galaktosidaseexpression in HEK293T-Zellen transfiziert (Abbildung 24 D). Das Plasmid wurde über *AscI* linearisiert und für die ES-Zellkultur mittels Phenol-Chloroform-Aufreinigung vorbereitet.

Zur Erzeugung genetisch modifizierter Mäuse wurden murine ES-Zellen durch Elektroporation mit dem Konstrukt transfiziert. Durch homologe Rekombination integrierte die Vektor-DNA in das ES-Zellgenom. Nach Selektion wurden 284 Neomycin-resistente Klone auf korrekte Rekombination mittels EcoRI-Verdau, Southern Blot und Screening unter Zuhilfenahme einer 5' bindenden externen Sonde überprüft. Bei 21 Klonen konnte zusätzlich zur WT-Bande von 15,6 kb ein Signal von circa 6 kb detektiert werden (Abbildung 24 B). Falsch positive Klone konnten über eine  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung aussortiert werden, wobei mit dem Konstrukt transfizierte HEK293T-Zellen als Kontrolle dienten (Abbildung 25 C, D). Ein Klon mit kräftiger Blaufärbung wurde für die Blastozysteninjektion zur Erzeugung chimärer Mäuse verwendet, vier hieraus hervorgegangene männliche Chimären wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Der Nachweis des eingebrachten Konstrukts erfolgte nun mithilfe einer PCR mit DNA einer Schwanzbiopsie (Abbildung 24 C).

### 5.2.2 Generierung und Charakterisierung einer ChR2-Mauslinie

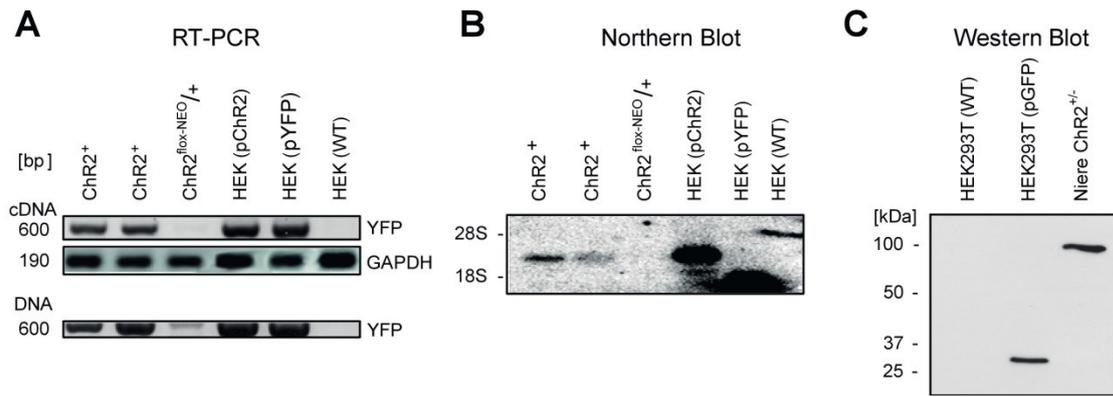
Heterozygot gefloxt Nachkommen ( $\text{ChR2}^{\text{floxed-NEO}^-}$ ) der Chimären wurden auf die Expression des LacZ-Gens mithilfe der LacZ-Färbung überprüft (Abbildung 25 E) und nach Bestätigung der Expression mit C57BL/6 Mäusen (WT,  $\text{ChR2}^{-/-}$ ) zurückgekreuzt sowie mit Cre-Deleter Mäusen (Schwenk et al., 1995) verpaart. Cre-Deleter-Mäuse exprimieren ubiquitär und fortdauernd Cre-Rekombinase, welche den Bereich zwischen gleichorientierten loxP-Stellen deletiert. In Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen, die das Transgen  $\text{ChR2}^{\text{floxed-NEO}}$  trugen, wurde die 5 kb Sequenz der LacZ-NEO-Kassette aus dem Genom „herausrekombiniert“ und somit ChR2-YFP exprimiert (Abbildung 25 A). Die Cre-vermittelte Rekombination konnte mittels PCR-Analyse (Abbildung 25 D) und folgendem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay überprüft werden (Abbildung 25 F). Der Nachweis der ChR2-YFP-mRNA erfolgte auf zwei Wegen: Direkt über eine YFP-spezifische

radioaktiv markierte Sonde und indirekt über reverse Transkription der mRNA in cDNA und anschließender PCR.



**Abbildung 25:** Klonierung eines konditionalen ChR2-Konstrukts zur Generierung von ChR2-Mäusen. Die Expression von ChR2 wurde durch Transfektion von HEK293T-Zellen mithilfe des (A) pCMV-ChR2-YFP Expressionsplasmids überprüft. Ein spezifisches membranständiges Signal war im Gegensatz zum (B) ubiquitär exprimierten YFP nach Transfektion mit pCMV-YFP detektierbar. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ . (C) Kontrolle des zur Transfektion von ES-Zellen genutzten pROSA-ChR2-YFP. In transfizierten HEK293T-Zellen ließ sich die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression nachweisen. Maßstab 500  $\mu\text{m}$  (D) rekombinante murine ES-Zellklone mit der 6 kb Bande beim Screening (Abbildung 24 B) exprimieren  $\beta$ -Galaktosidase. Maßstab 1000  $\mu\text{m}$ . (E) LacZ-Expression im Hirn bei Nachkommen chimärer ROSA<sup>ChR2-flox-NEO/+</sup> Mäuse. (F) Nach Cre-vermittelter Rekombination durch Verpaarung mit Cre-Deleter Mäusen konnte die charakteristische X-Gal-Färbung im Hirn nicht mehr festgestellt werden. Maßstab 2 mm

ChR2-YFP kodiert für ein Fusionsprotein aus ChR2 und YFP. Wird YFP nachgewiesen, ist eine Expression von ChR2 sehr wahrscheinlich. Untersucht wurde die mRNA aus Mäusen (ChR2<sup>+/-</sup>, ChR2<sup>flox-NEO/-</sup>) und HEK293T-Zellen (WT, transfiziert: pCMV-ChR2-YFP, pCMV-YFP). Das ins Genom integrierte YFP-Gen konnte per PCR nachgewiesen werden (Abbildung 26 A). Durch spezifische Primer konnte per Raumtemperatur-PCR die YFP-mRNA in ChR2<sup>+</sup>-Mäusen und den beiden transfizierten HEK293T-Zelllinien nachgewiesen werden. WT HEK293T-Zellen und ChR2<sup>flox-NEO/-</sup> Mäuse exprimierten hingegen kein YFP. Das Ergebnis wurde über eine spezifische radioaktiv markierte Sonde gegen ChR2 nach *Northern Blot* Analyse bestätigt (Abbildung 26 B).



**Abbildung 26:** Expressionsanalyse durch **(A)** YFP-spezifische PCR mit revers-transkribierter mRNA (cDNA) aus Nieren von ChR2<sup>+/-</sup>- und ChR2<sup>lox-NEO/-</sup> Mäusen, HEK293T Zellen mit dem Expressionsplasmid pCMV-ChR2-YFP bzw. pCMV-YFP transfiziert oder untransfiziert (WT, oben). Interne Kontrolle mit GAPDH-spezifischen Primern (Mitte) und Nachweis von YFP-DNA (unten). **(B)** Northern Blot mit YFP-spezifischer Sonde bei ChR2<sup>+/-</sup>-Mäusen, HEK293T (pCMV-ChR2-YFP, pCMV-YFP). Keine Signale der ChR2<sup>lox-NEO/-</sup> Maus und WT HEK293T. **(C)** Western Blot mit Proteinlysaten aus HEK293T-Zellen (pCMV-ChR2-YFP, pCMV-GFP) sowie aus der Niere einer ChR2<sup>+/-</sup>-Maus zeigten auf eine YFP/GFP-Antikörper spezifische Signale. WT-HEK293T exprimierten kein GFP/YFP.

Um zu klären, ob auch das Fusionsprotein exprimiert wird, erfolgte eine Western Blot Analyse mit einem GFP/YFP-spezifischen Antikörper. Als Kontrollen diente das Lysat pCMV-GFP- und untransfizierten HEK293T-Zellen. WT-HEK293T-Zellen exprimierten kein YFP. Ein Signal bei circa 27 kDa war in Zellen, die YFP und GFP exprimierten, detektierbar. Außerdem konnte in einem Nierenlysat einer ChR<sup>+/-</sup>-Maus bei 100 kDa eine spezifische Bande nachgewiesen werden (Abbildung 26 C). Die Nieren wurden hierbei nach Perfusion der Mäuse mit PBS entfernt, die Gehirne für immunhistochemische Analysen genutzt. Keine der generierten Mauslinien zeigte offensichtliche Auffälligkeiten.

## 6 Diskussion

Die Diskussion ist in zwei Abschnitte untergliedert. Im ersten Abschnitt wird die funktionelle Charakterisierung eines Mausmodells mit Parvalbumin (PV)-spezifischem Knockout des Kalium-Chlorid-Kotransporter KCC2 erörtert. Der zweite Abschnitt setzt sich mit der Generierung konditionaler Channelrhodopsin-2-Mäuse (ChR2) auseinander.

### 6.1 Deletion des $K^+/Cl^-$ Kotransporters KCC2 in PV-positiven Interneuronen

Mäuse mit konstitutivem KCC2-Knockout (KO,  $PV^{cre+}KCC2^{flox/flox}$ ) sterben aufgrund eines respiratorischen Versagens sofort nach der Geburt (Hübner et al. 2001). Um die Rolle von KCC2 in PV-positiven Interneuronen zu untersuchen, wurde eine Maus mit einem geflochten KCC2 Locus mit einer PV-spezifischen Cre-Linie ( $PV^{cre}$ ) verpaart. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von KCC2 in PV-positiven Interneuronen erfolgreich war, sich sowohl auf der Ebene der einzelnen Zelle als auch auf der Netzwerkebene auswirkt und einen schwerwiegenden Phänotyp beim Knockout hervorruft. Pyramidenzellen, die von PV-positiven Interneuronen inhibiert werden, zeigen eine höhere Frequenz spontaner postsynaptischer inhibierender Ströme. Ableitungen nach dem *Paired-Pulse*-Protokoll an akuten Hirnschnitten im Kortex und im Hippokampus deuten auf einen erhöhten GABAergen Tonus hin. *In vivo* konnten veränderte Oszillationen im theta-Frequenzband und bei *Ripple*-Oszillationen festgestellt werden. Auf der makroskopischen Ebene zeigten die Mäuse motorische Störungen, Zeichen einer Epilepsie und verstarben bereits im Alter von ca. 100 Tagen.

Grundsätzlich kann die Deletion von KCC2 eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration hervorrufen (Rivera et al. 2004, Lee et al. 2007). Die Folge wäre ein veränderter Gradient für Chlorid, der zu einem abgeschwächten Ausstrom von Chlorid durch die geöffneten  $GABA_A$ -Rezeptorporen oder gar einer Umkehr des Chlorid-Stroms als GABA-Antwort führen kann (Andersen et al. 1980, Bormann et al. 1987, Kaila et al. 1993, Owens et al. 1996). Gezeigt wurden solche Depolarisationen in KCC2-defizienten hippocampalen Pyramidenzellen und spinalen Motoneuronen (Rivera et al. 1999, Hübner et al. 2001, Khirug et al. 2005, Khirug et al. 2008, Nardou et al. 2011, Stein et al. 2004, Williams et al. 1999, Takayama und Inoue 2006). Die Deletion von KCC2 in PV-positiven Interneuronen könnte hier durch eine veränderte GABA-Antwort disinhibierend wirken und folglich zur erhöhten perisomatischen Inhibition von hippocampalen Pyramidenzellen beitragen.

Einen Beleg dafür ergaben die Messungen der Frequenz der netzwerkabhängigen inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSC) an akuten Hirnschnitten. Im KO war die Frequenz um ~60 % im Kortex und um ~100 % im Hippokampus erhöht. Dies passt zur Annahme einer vermehrten Ausschüttung von GABA durch Disinhibition PV-positiver Interneurone (Bragin et al. 1995, Jones und Bühl 1993, Woodruff und Sah 2007). Da der Chlorid-Gradient in den Pyramidenzellen selbst nicht verändert sein sollte, war keine veränderte Amplitude zu erwarten. Die unterschiedlichen intrazellulären Chloridkonzentrationen in PV-positiven Interneuronen des homo- und heterozygoten KCC2 Knockouts sollten fortführend durch eine direkte Messung gezeigt werden (Kuner und Augustine 2000, Kyrozis und Reichling 1995).

Die Veränderungen auf Zellebene korrelieren mit den vorgenommenen Feldmessungen an akuten Hirnschnitten. Die verstärkte GABAerge Inhibition durch Disinhibition PV-positiver Interneuronen äußerte sich in einer deutlichen Abnahme der *Paired-Pulse-Rate* (PPR) beim KO und beim heterozygoten Knockout (HET, PV<sup>cre+</sup>KCC2<sup>flox/+</sup>). Veränderungen der PPR, sowohl bei *Paired-Pulse-Fazilitierung* (PPR >1) als auch bei *Paired-Pulse-Depression* (PPR <1), haben meist präsynaptische Ursachen, können mitunter auf postsynaptische Modifikationen von AMPA-Rezeptoren zurückgeführt werden (Chen et al. 1996, Gottschalk et al. 1998, Commins et al. 1998, Wang und Kelly 1997, Wang und Kelly 2001). Aufgrund der Zellspezifität des KCC2-Knockouts sollte die Ursache der verminderten *Paired-Pulse-Rate* präsynaptischen Ursprungs sein (Real et al. 2003, Dávila et al. 2005, Fuchs et al. 2007). Nichtsdestotrotz kann eine *Paired-Pulse-Depression* wie im Kortex aus einer Desensibilisierung der postsynaptischen Rezeptoren resultieren, die Folge einer vermehrten GABAergen Hemmung sein oder auch auf eine verminderte Anzahl präsynaptischer Vesikel und/oder auf inaktivierte präsynaptische Kalziumkanäle zurückzuführen sein (Bellingham und Walmsley 1999, Xu et al. 2007, Zucker und Regehr 2002). Die *Paired-Pulse-Fazilitierung* wie bei den Messungen im Hippokampus *stratum pyramidale* resultiert aus einer erhöhten präsynaptischen Kalziumkonzentration, in deren Folge verstärkt Neurotransmitter-enthaltende synaptische Vesikel freigesetzt und die Amplituden des zweiten postsynaptischen Potentials erhöht werden (Del Castillo und Katz 1954, Fortune und Rose 2001, Zucker und Regehr 2002). Die in beiden Fällen reduzierte PPR lässt auf einen stärkeren GABAergen Tonus schließen, welcher höchstwahrscheinlich GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-bedingte Antworten beeinflusst, da die unveränderten Inter-Stimulus-Intervalle > 100 ms repräsentativ für langsamere GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelte Antworten sind (Kujirai et al. 1993, Newberry und

Nicoll 1984, Otis und Trussell 1996, Ziemann et al. 1996, Solís und Nicoll 1992). Denkbar ist, dass diese höhere Konzentration von GABA durch eine gesteigerte Depolarisationsrate PV-erger Interneuronen verursacht wird. Ein erstes indirektes Anzeichen dafür ist die erhöhte sISPC-Frequenz der postsynaptischen PV<sup>cre+</sup>-KCC2<sup>flox/flox</sup> Pyramidenzellen. Die erhöhte extrazelluläre GABA-Konzentration könnte zudem die vom Chloridgradienten abhängige Wiederaufnahme von GABA aus dem synaptischen Spalt beeinflussen (Wu et al. 2009, Razik et al. 2013, Scimemi 2014). Generell lässt die stark reduzierte PPR Rückschlüsse auf den großen Einfluss der PV-positiven Interneuronen in Kortex und Hippokampus zu. Dass dieser Einfluss nicht noch größer ausfällt, hat zwei Ursachen. Zum einen ist bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen, dass PV-positive Interneurone im Neokortex nur 40 % und im Hippokampus nur 25 % aller Interneurone darstellen und alle anderen Interneurone in unserem Mausmodell unverändert sind (Condé et al. 1994, Freund und Buzsáki 1996, Rudy et al. 2011). Zum anderen waren, wie in anderen Arbeiten unter Verwendung der gleichen Cre-Linie, nur ca. 80 % der PV-positiven Zellen vom Knockout betroffen (Hippenmeyer et al. 2005, Shao et al. 2002, Araki et al. 1997). Im CA1 *stratum radiatum*, wo keine PV-positiven Interneuronen detektiert werden konnten, war auch die *Paired-Pulse*-Plastizität sowohl in KO und HET als auch im Wildtyp (WT, PV<sup>cre+</sup>-KCC2<sup>+/+</sup>) minimal. Interneurone dieser Region sind meist PV-negativ und werden durch Afferenzen aus dem *Gyrus dentatus*, dem entorhinalen Kortex sowie der CA3-Region stimuliert (Cope et al. 2002, Ascoli et al. 2009, Freund und Antal 1988, Christie et al. 2000, Sun et al. 2005, Savić et al. 2001, Gulyás et al. 1998).

In dieser Studie wurde die schnelle GABA<sub>A</sub>-vermittelte Inhibition auf PV-positive Interneurone durch zelltypspezifische Deletion von KCC2 moduliert. Es konnte gezeigt werden, dass die theta-Oszillationen in KO und HET sowie die Interaktion zwischen theta- und gamma-Oszillationen in HET, jedoch nicht gamma-Oszillationen per se, abhängig von dieser synaptischen Inhibition auf PV-positive Zellen sind.

PV-positive Zellen bieten eine gute Möglichkeit, neuronale Netzwerke zu untersuchen, da sie unter anderem an der kortikalen Rhythmusgenerierung beteiligt sind und auch im Hippokampus mit verschiedenen oszillationsabhängigen Synchronisationsstadien, wie z.B. der theta-Rhythmus abhängigen Bewegung im Raum, dem paradoxen Schlaf und Erinnerungsprozessen, in Verbindung gebracht werden (Buzsáki 2002, Fries et al. 2007, Sohal et al. 2009, Buzsáki et al. 2003). Zwar sind bei letzterem Herkunft sowie die extra- und intrahippokampalen Generatoren gut untersucht, jedoch herrscht, wie bei

kortikalen Ereignissen, größtenteils Unklarheit über die involvierten Rezeptoren, Zelltypen und Neurotransmitter (Kocsis et al. 1999, Montgomery et al. 2008, Cardin et al. 2009).

Die gezeigte Veränderung des theta-Rhythmus könnte zum Beispiel mesiale PV-positiven Interneuronen modulieren und in der Pyramidenzellschicht zu IPSCs in theta-Frequenz führen (Tóth et al. 1997, Buzsáki 2002, Stewart und Fox 1990). Für die Generation dieser hippocampalen theta-Oszillationen spielt das mediale Septum eine entscheidende Rolle (Andersen et al. 1979, Buzsáki et al. 1983, Buzsáki 2002, Stewart und Fox 1990). Von dort erhält der Hippokampus cholinerge und GABAerge Afferenzen, wobei die PV-positiven GABAergen „*long-range*“ Projektionsneurone ausschließlich hippocampale Interneurone wie PV-positive Korbzellen innervieren (Freund und Antal 1988). Außerdem könnte die vorgenommene Modulation der PV-positiven Interneuronen aufgrund GABAerger Efferenzen vom Hippokampus zum mesialen Septum verstärkend oder kompensierend für die Generierung des theta-Rhythmus sein (Buzsáki 2002, Manseau et al. 2008). Die gemessenen Änderungen bei KO und HET Mäusen unterstützen die Vermutung, dass sich eine Störung der Inhibition der septo-hippocampalen Projektionen gravierend auf den theta-Rhythmus auswirkt.

Neben diesem extern verursachten Rhythmus verfügen hippocampale Netzwerke über intrinsische theta-Oszillationen, wobei sich die Untersuchung der bei der Generierung des theta-Rhythmus beteiligten Neuronenklassen in agilen Lebewesen als schwierig gestaltet (Traub et al. 1996, Gloveli et al. 2005b, Dugladze et al. 2007). So generieren Interneuronen wie oriens *lacunosum-moleculare* (O-LM) und ggf. *radiatum-lacunosum moleculare* (R-LM) Zellen vorzugsweise Aktionspotentiale im theta-Rhythmus (Bourdeau et al. 2007, Chapman und Lacaille 1999, Tort et al. 2007, Gloveli et al. 2005a, Gloveli et al. 2005b). Da jedoch nicht alle Zellen des Zelltyps synchron feuern, sind nicht alle innervierten Neuronenpopulationen im theta-Rhythmus aktiv. Dennoch wurde mithilfe eines Computermodells gezeigt, dass O-LM Zellen bei Interaktion mit Interneuronen in der Lage sind, einen theta-Rhythmus zu generieren (Rotstein et al. 2005). Eine andere Simulation zeigte ein Auflösen des gamma-Rhythmus, wenn inhibitorische Zellen stärker stimuliert werden (Börgers et al. 2008). Außerdem gehen die gezeigten Ergebnisse mit denen anderer Studien an PV-positiven Interneuronen einher. Sowohl die zellspezifische Deletion der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors als auch die des NMDA-Rezeptors resultierten in einer verminderten theta-Amplitude und einer reduzierten theta-Frequenz-koordinierten neuronalen Aktivität (Wulff et al. 2009,

Korotkova et al. 2010). Die genaue Beteiligung PV-positiver Zellen am theta-Rhythmus könnte durch gezielte Knockouts spezifiziert werden.

Im Gegensatz zum theta-Rhythmus waren gamma-Oszillationen in HET und KO nicht signifikant verändert. Die hippocampalen gamma-Oszillationen entstehen aus der Interaktion von Pyramidenzellen und Interneuronen, wobei ebenfalls gegenseitige Wechselwirkungen zwischen PV-positiven Interneuronen ausschlaggebend sind (Engel et al. 2001, Bartos et al. 2002, Csicsvari et al. 2003). Dass diese gegenseitige Inhibition *in vivo für* gamma-Oszillationen unwesentlich ist, könnte auf die Bedeutung der wiederholten Erregung und der Rückkopplungshemmung hindeuten (Csicsvari et al. 2003). Die Vermutungen könnten durch Untersuchungen mittels Computersimulation gestützt werden und zeigen, ob das Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung im HET z.B. durch feedback-Mechanismen im KO kompensiert ist. Zudem deutet die tendenziell leicht erhöhte gamma-Frequenz des HET im Vergleich zu WT und KO darauf hin, dass in PV-positiven Interneuronen verschiedener Hirnregionen das Auslösen von Aktionspotentialen unterschiedlich beeinflusst wird (Alberts 2002).

Zwar war der gamma-Rhythmus nicht verändert, jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die GABAerge Inhibition auf PV-positive Interneurone für die theta-gamma-Kopplung nötig ist. So konnten im HET Genotyp signifikante Abweichungen detektiert werden. In allen Säugetieren wird der gamma-Rhythmus vom parallel laufenden theta-Rhythmus moduliert (Csicsvari et al. 2003, Bragin et al. 1995, Buzsáki et al. 2003, Canolty et al. 2006, Hentschke et al. 2007, Penttonen et al. 1998). Diese Kopplung wird mit der Kodierung serieller Informationen und des Arbeitsgedächtnisses sowie der Koordination verschiedener kortikaler Regionen in Verbindung gebracht (Canolty et al. 2006, Jensen und Colgin 2007, Senior et al. 2008, Sirota et al. 2008, Tort et al. 2008, Gloveli et al. 2005b). Empirische Studien stützen diese Thesen für eine höhere Kopplung während kognitiver Aufgabenstellungen (Canolty et al. 2006, Tort et al. 2008). Anzumerken ist, dass die gezeigte reduzierte Kopplung auf den Mangel an theta-Signalen von externen Schrittmachern – wie z.B. septale GABAerge Zellen – auf die hippocampalen PV-positiven Interneuronen zurückzuführen sein kann. Zusätzlich könnten die reduzierten theta-Oszillationen von der Beeinträchtigung des gesamten Netzwerks im medialen Septum herrühren. GABAerge Projektionsneurone sind hier ebenfalls PV-positiv und erhalten umgekehrt Signale von septo-hippocampalen Projektionen. So kommen intra- und extrahippokampale Faktoren in Frage, die die gezeigten *in vivo* Veränderungen erklären könnten.

Neben theta- und gamma-Rhythmus wurde im HET eine Zunahme der hippocampalen *sharp-wave-Ripples*, kurzlebige oszillatorische Ereignisse, welche synchronen Entladungen von Neuronenpopulationen entsprechen und die Reaktivierung der vorher gebildeten Zellverbände reflektieren, gemessen. Diese *Ripples* spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung des Langzeitgedächtnisses im Neokortex (Buzsáki 2010, Buzsáki und Silva 2012, Girardeau et al. 2009, Lorenz et al. 2012). Ein aktuelles Modell besagt, dass der *Ripple*-Aktivität ein selbstständiger vorübergehender Anstieg der Pyramidenzellenaktivität in der CA3-Region vorangeht. Dieser verursacht eine ausgedehnte Depolarisation sowohl in Pyramidenzellen als auch in Interneuronen im CA1-Bereich und führt so zur Generierung von Netzwerk-*Ripple*-Oszillationen (Buzsáki und Silva 2012, Traub und Bibbig 2000). Die verstärkt auftretenden *Ripples* könnten im HET auf eine reduzierte Hemmung der Interneuronen im CA3- oder bereits im CA1-Bereich hinweisen, da die größere Amplitude auf eine höhere Anzahl gleichzeitig feuender Zellen zurückzuführen ist und somit eine stärkere Synchronizität anzunehmen ist. Jedoch ist zu bedenken, dass das gleichzeitige Feuern vieler PV-positiver Interneuronen durch die parallele Ausschüttung von Kaliumionen ganze Neuronenverbände depolarisieren könnte und so den Übergang zur stark synchroner Aktivität fördert (Trombin et al. 2011). Des Weiteren wird vermutet, dass schnelle hippocampale Oszillationen aus der dynamischen Interaktion zwischen großen Populationen von Pyramidenzellen und Interneuronen hervorgehen (Traub et al. 1998, Csicsvari et al. 2000, Csicsvari et al. 2003, Csicsvari et al. 1999a). Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der exzitatorischen Transmission von Pyramidenzellen auf Interneurone (Csicsvari et al. 1999b, Csicsvari et al. 2000, Fuchs et al. 2007, Ylinen et al. 1995b). Diese ist im verwendeten Modell durch exzitatorisch wirkendes GABA zusätzlich verstärkt, wodurch die Generierung von *Ripple*-Oszillationen beeinflusst würde (Buzsáki und Draguhn 2004, Green und Arduini 1954, Freund und Buzsáki 1996). Vor allem *Ripple*-Oszillationen im CA1 zeigen die vorübergehende synchrone Entladung von vorwiegend PV-positiven Interneuronen. Hierbei scheint eine lokale Ursache wahrscheinlicher als eine indirekte, externe Steuerung aus dem CA3, da dort langsamere Oszillationen generiert werden. Zudem kann die Entladung der CA1-Interneurone phasisch durch die Entladung von CA1-Pyramidenzellen und durch die Wechselwirkung mit anderen Interneuronen verursacht werden (Ylinen et al. 1995c, Buzsáki et al. 1992, Klausberger et al. 2003, Csicsvari et al. 1999b, Csicsvari et al. 2000, Stark et al. 2014). Die dadurch höhere Amplitude der hochfrequenten Entladungen der Pyramidenzellen im HET könnte auf einer fehlerhaften Rekrutierung von Interneuronen und somit eine unzureichende Rückkopplungshemmung während der

Populationsaktivität zurückzuführen sein. Z.B. stehen PV-positive Korbzellen im Verdacht, essentiell für die Generierung von gamma- und *Ripple*-Oszillationen zu sein (Csicsvari et al. 1999a, Csicsvari et al. 2003, Fisahn et al. 1998, Traub et al. 1998, Ylinen et al. 1995c). Abgesehen von möglichen Kompensationsmechanismen könnten die Modifikationen der *Ripples*, nicht aber die Veränderungen der gamma-Oszillationen auf der erregenden Transmission von Pyramidenzellen zu Interneuronen beruhen (Csicsvari et al. 1998, Csicsvari et al. 2000). Darüber hinaus sind Änderungen anderer Determinanten der gamma- und *Ripple*-Oszillationen, wie *gap junctions* oder die phasenweise inhibitorische Kopplung zwischen Interneuronen mit dem Signalweg zwischen Pyramidenzellen und schnell-feuernden Interneuronen, nicht auszuschließen (Draguhn et al. 1998, Draguhn et al. 2000, Wang und Buzsáki 1996). Jedoch zeigt sich die Synchronisation der Neuronen während der *Ripples* bei HET-Mäusen wie bei der zelltypspezifischen Deletion der GluR-A-Untereinheit des AMPA-Rezeptors in PV-positiven Zellen verstärkt (Fuchs et al. 2007, Rácz et al. 2009). Ursächlich ist neben PV-positiver Zellen eine höhere Beteiligung unveränderter PV-negativer Neuronen vorstellbar. Obwohl eine fehlerhafte Rekrutierung nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, sind sie aufgrund der Genablation im spätem Entwicklungsstadium unwahrscheinlich (Fuchs et al. 2007).

Neben der höheren Amplitude von *Ripples* konnte in HET Tieren auch deren häufigeres Auftreten detektiert werden. Dies könnte ein Indiz für eine Änderung der Effizienz entorhinaler oder CA3-Eingangssignale darstellen (Traub et al. 1996, Csicsvari et al. 1999a, Isomura et al. 2006). Beispielsweise wäre eine veränderte, durch kollektive Entladung der Pyramidenzellen im CA3 vermittelte Erregung von CA1 Neuronen während der *Sharp Wave Ripples* die Folge (Chrobak und Buzsáki 1994). Jedoch wurde diskutiert, dass die veränderte Hemmung in PV-positiven Zellen nicht auf die CA1-Region begrenzt ist. Allerdings spielen die Veränderungen in der CA3-Region oder dem entorhinalen Kortex keine wesentliche Rolle für den Phänotyp (Rácz et al. 2009). Dies würde wiederum bedeuten, dass die erhöhte IPSC-Frequenz in Pyramidenzellen mit der erhöhten *Ripple*-Aktivität zusammenhängt. Für die spätere Diskussion ist noch zu berücksichtigen, dass schnelle *Ripple*-Oszillationen vermehrt zu Beginn einiger epileptischer Ereignisse beobachtet werden können (Bragin et al. 2002, Bragin et al. 2004, Staba et al. 2002, Fisher et al. 1992). Um präzisere Daten zu erhalten, sollte hier die Versuchstierzahl erhöht werden. Um die erheblichen Einflüsse der Narkose auf elektro-

physiologische Prozesse auszuschließen, sollten sich frei bewegende Mäuse elektrophysiologisch untersucht werden.

Neben den bisher diskutierten elektrophysiologischen Änderungen wiesen PV-spezifische KCC2-Knockoutmäuse auch auf makroskopischer Ebene Anomalien auf, welche mit spezifischen Netzwerken in Verbindung gebracht werden können. Anhand dieser Anomalien können Rückschlüsse auf möglicherweise betroffene Netzwerke und/oder Oszillationen geschlossen werden. Als auffälligstes Merkmal entwickelten KO Tiere eine Epilepsie, welche – später diskutiert wird und - möglicherweise deren erhöhte Mortalität (mit-) bedingt (Chamma et al. 2012, Fuchs et al. 2007, Li et al. 2007). PV-positive Interneuronen kommen in fast allen Regionen des Zentralen Nervensystems vor und entsprechend vielfältig kann die Auswirkung der KCC2-Deletion in diesen Zellen sein (Celio 1990, Markram et al. 2004, Rudy et al. 2011).

Auch wurde eine Gewichtsabnahme beobachtet. Diese könnte zum Beispiel auf einen veränderten GABAergen Tonus im Hypothalamus hinweisen, welcher eng mit Hunger assoziiert ist (Cone et al., 2001, Wu et al. 2009). Die resultierende reduzierte Nahrungsaufnahme mit einhergehendem Gewichtsverlust der KO-Mäuse ließe sich mittels metabolischer Käfige erfassen. Mithilfe des GABA-Agonist Benzodiazepine könnte dann wiederum der Effekt der KCC2-Modulation reduziert oder aufgehoben werden (Ferrannini 1988, Reddy und Kulkarni 1998). Jedoch sind auch hier motorische Probleme als Ursache nicht auszuschließen.

Auf eine veränderte Physiologie der Motoneuronen weisen die veränderte Stellung der Hinterläufe der KO und HET Tiere und die schlechtere Leistung beim Rotarod-Test der KO Mäuse hin (Boyce et al. 1999, Callahan et al. 1991, Gurney et al. 1996). Zunächst könnte die Deletion von KCC2 die Aktivität von Pyramidenzellen, welche in tiefergelegene Zentren wie Rückenmark oder Stammhirn projizieren, beeinflussen (Gharbawie et al. 2005). Dort lokalisieren wiederum Somata von Muskelzellen-innervierenden Motoneuronen und diese werden direkt oder indirekt z.B. über spinale Interneuronen und segmentale Afferenzen gesteuert (Alvarez et al. 2005, Brownstone und Bui 2010, Gosgnach 2011, Goulding 2009, Kiehn 2006, Kandel 2013, Shepherd 2004). Des Weiteren könnten die detektierten anomalen motorischen Symptome z.B. auf Kleinhirn- oder Rückenmarksebene entstehen. Hier sind ganze Netzwerke PV-positiver Interneuronen an der Koordination von Motoneuronen beteiligt und tragen so zur Fortbewegung durch die rhythmische Steuerung synaptischer Aktivität bei (Alvarez et al. 2005,

Goulding 2009, Grillner 2003, Kernell 1999, Russo und Hounsgaard 1999). Die oben erwähnten motorischen Zentren des Kortex und des Stammhirns kontrollieren die Zentren der retikulären Formation, welche u.a. dazu beitragen, das Gleichgewicht während komplexer Bewegungsabläufen zu behalten, wozu selbstverständlich auch der Vestibularapparat wesentlich beiträgt (Purves und Williams 2001). Eine Beteiligung der mit willkürlichen Bewegungen assoziierten Basalganglien am Phänotyp ist aufgrund der lokal geringen Anzahl PV-positiver Zellen – 0,5 % aller GABAergen Interneurone – wohl eher vernachlässigbar (Angelaki und Cullen 2008, Demêmes et al. 1993, Kalanithi et al. 2005, Paulmann et al. 2008, Samii et al. 2004, Stocco et al. 2010, Walker 2007).

Prädestiniert für eine veränderte koordinierte Bewegung sowie ein verändertes Erlernen motorischer Fähigkeiten wären die PV-positiven Purkinje-Zellen im Zerebellum, die die wesentliche Efferenz des Kleinhirns ausmachen (Gilbert und Thach 1977, Goodkin und Thach 2003, Medina und Lisberger 2008, Thach 2014). Diese Zellen exprimieren stark KCC2 (Seja et al. 2012). Zwar stellen PV-positive Purkinjezellen das alleinige Output-System des zerebellären Kortex dar und projizieren in tiefer gelegene zerebelläre Kerne, jedoch zeigt der purkinjezellspezifische KCC2-Knockout allein keine offensichtlichen motorischen Symptome (Gauck und Jaeger 2000, Ito 2006, Seja et al. 2012). Daher könnten die drei Purkinjezellen-innervierenden Arten GABAerger PV-positiver Interneurone entscheidend für den Phänotyp im KO sein (Meyer et al. 2002, Shepherd 2004). Zu beachten ist, dass der Knockout von KCC2 in Purkinjezellen Beeinträchtigungen bei der kurzfristigen Adaptation und der Konsolidierung des Gelernten verursacht (Seja et al. 2012). Ähnliche Lernstörungen zeigen Mäuse, deren PV-positive Interneurone die GABAerge Inhibition durch Knockout der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors verloren (Leppä et al. 2011). Die beobachteten motorischen Defizite sind daher vermutlich zum Teil auf ein beeinträchtigtes Zerebellum zurückzuführen. Außerdem wurde beim Knockout der  $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ein reduziertes Schmerzempfinden durch eine Beeinträchtigung sensorischer Neurone festgestellt (Leppä et al. 2011). Ein ähnlicher Test zum nozizeptiven Verhalten könnte zeigen, ob eher zentrale oder spinale Signalwege gestört sind (Caggiula et al. 1995).

Zusammengenommen können einzelne Zentren oder eine Kombination aus Störungen verschiedener Regionen, die für Gleichgewicht und Motorik zuständig sind, die beobachteten Auffälligkeiten beim Laufen aber auch bei der Nahrungsaufnahme verursachen.

Die beigelegten Videodaten sowie Meldungen der Tierpfleger belegen, dass KCC2 KO-Mäuse epileptische Anfälle erleiden. Diese Anfälle sind durch eine Versteifung des Körpers und dem rhythmischen Krampfen der Gliedmaßen gekennzeichnet. Charakteristisch sind diese Anzeichen für tonisch/klonische Anfälle, welche den primär generalisierten Anfällen zugeordnet werden. Generell liegt diesen Anfällen ein Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung von Neuronen im Hirn zugrunde. Diese Störung wird durch fehlerhafte spannungsabhängige und synaptische Prozesse hervorgerufen und resultiert in einer unkontrollierten simultanen rhythmischen Erregung von Neuronen (Köhling 2008). Wie schon bei der Diskussion der motorischen Defizite des KO, kommen als Auslöser epileptischer Anfälle auch verschiedene morphologische Veränderungen und verschiedene neuronale Netzwerke in Betracht. Im Kortex, wo fast 50 % aller GABAerger Interneuronen PV-positiv sind, sowie im Hippokampus wirken Veränderungen der Erregbarkeit epileptogen (Wonders und Anderson 2006, Kubota et al. 1994, Tai et al. 2014, Schwaller et al. 2004). Zum Beispiel hat die veränderte Erregbarkeit von Pyramidenzellen der Schicht V Einfluss auf deren Kommunikation untereinander bzw. zu Neuronen in anderen Schichten und kann zur Epileptogenese beitragen (Silberberg und Markram 2007, Berger et al. 2009, Murayama et al. 2009).

Prinzipiell ist im KO von Störungen der GABAergen Transmission, welche in kausalem Zusammenhang mit Epilepsie gebracht werden, auszugehen (Ben-Ari 1979, Traub und Wong 1982, Doring et al. 1995, Avoli und de Curtis 2011). Beispielsweise zeigen KCC2-defiziente murine embryonale Hippokampi Ähnlichkeiten zu humanem epileptischen Gewebe: häufigeres Auftreten, erhöhte Frequenz, höhere Amplituden und längeres Andauern spontaner Netzwerkaktivität (Khalilov et al. 2011, Khalilov et al. 2003, Cohen et al. 2002, Nardou et al. 2011, Wittner et al. 2009). Fehlt KCC2 in PV-positiven Zellen ist deren Chloridkonzentration mutmaßlich höher und infolgedessen die inhibitorische Wirkung von GABA gestört (Zhu et al. 2008). Neben der Bedeutung für die Chlorid-Homöostase greift KCC2 auch morphologisch in die Erregbarkeit verschiedener Netzwerke ein (Viitanen et al. 2010, Smirnov et al. 1999, Kaila et al. 2014a, Kaila et al. 2014b). So wurde im Zusammenhang mit chronischer Epilepsie gezeigt, dass nach einem Anfall ein hohes KCC2-Niveau für die AMPA-Rezeptordichte und die Neuordnung von Dendriten nötig ist (Mathern et al. 1997, Mathern et al. 1998, Swann et al. 2000, Isokawa 2000, Gauvain et al. 2011, Fiumelli et al. 2013). Im Umkehrschluss könnte die Morphologie der Synapsen PV-positiver Interneuronen im KO und HET beeinträchtigt sein und die Epileptogenese fördern. Dass eine Beeinträchtigung der GABAergen Inhi-

bition durch den Verlust bestimmter Interneuronen epileptogen wirken kann, wurde morphologisch und physiologisch an epileptischem Gewebe gezeigt (Babb et al. 1989, Colder et al. 1996, Sloviter 1987, Wittner et al. 2001, Cossart et al. 2001, Mody et al. 1995, Wilson et al. 1998). So liegt die Vermutung nahe, dass die Interneuronen selbst beim Auslösen epileptischer Anfälle eine wichtige Rolle spielen (Gnatkovsky et al. 2008, De Curtis und Gnatkovsky 2009). Zunächst bleibt die KCC2-gesteuerte Migration der Interneuronen bei KO und HET in frühen Entwicklungsstadien unbeeinflusst, da die Deletion von KCC2 PV-spezifisch und daher erst später stattfindet. (Bortone und Polleux 2009). Später könnte bei beiden die Ausbildung und die Beweglichkeit von Spines reduziert sein, was wiederum die Dichte funktionaler glutamaterger Synapsen verringert (Gauvain et al. 2011, Li et al. 2007, Llano et al. 2015). Aufgrund der bestehenden Datenlage scheinen dabei AMPA-Rezeptoren stärker beeinflusst zu sein, da größere Ähnlichkeiten zum PV-spezifischen Knockout des AMPA-Rezeptors als zum Knockout des NMDA-Rezeptors vorliegen (Korotkova et al. 2010, Rácz et al. 2009). Folglich wäre ein Kompensationsmechanismus denkbar: die verringerte glutamaterge Stimulierbarkeit von PV-positiven Interneuronen gleicht die zusätzliche Stimulierbarkeit durch GABA aus. In diesem Szenario wäre eine einem epileptischen Anfall ähnliche neuronale Aktivität denkbar, bei der eine erhöhte extrazelluläre Kaliumionenkonzentration zur Depolarisation umgebender Neurone und ggf. zu einer epileptischen Entladung führt (Bliss und Gardner-Medwin 1973, Bleck und Klawans 1990). Besonders betroffen wären hier Regionen mit hoher Dichte und Vernetzung PV-positiver Interneuronen. Nichtsdestotrotz können andere epileptogene Fehlbildungen bei der Weiterentwicklung der Hirne beim KO nicht ausgeschlossen werden, welche die Altersabhängigkeit der Anfälle mitbestimmen (Cockerell 1996, Hitiris et al. 2007, Tomson 2000). Einen weiteren Ansatzpunkt betrifft die Regeneration/Reorganisation nach epileptischen Anfällen. Normalerweise erhöht sich nach einem Krampfanfall die KCC2 Expression und Zahl KCC2-positiver Interneurone (Karlócai et al. 2016). Vor allem in KO Tieren wäre diese Regeneration gestört und könnte für den folgenden Krankheitsverlauf prägend sein. Unter anderem hätte dies Auswirkungen auf die Bildung synaptischer Dornfortsätze und letztlich auf die verkürzte Lebenszeit des KO Tieres.

Neben den morphologischen Auswirkungen, könnte elektrophysiologisch die Deletion von KCC2 eine GABAerge Disinhibition der PV-positiven Zellen hervorrufen. GABA hätte lokal begrenzt eine erregende Wirkung; mehr GABA würde freigesetzt werden und könnte letztlich epileptogen wirken (Köhling 2007, Köhling 2008, Li et al. 2011, Tan et

al. 2011). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten wird eine GABA-bedingte gesteigerte Synchronisierung des hippocampalen Netzwerkes als Auslöser vermutet (Khazipov und Holmes 2003, Köhling et al. 1998). Vor allem eine erhöhte Erregbarkeit und Aktivität von Pyramidenzellen und ähnlich einer gestörten Repolarisation wirken besonders epileptogen (Khalilov et al. 2011, Treiman 2001, Saito et al. 2009). Von einer höheren Erregbarkeit von Pyramidenzellen ist primär nicht auszugehen. Jedoch wurde auch eine Dysfunktion in der den Pyramidenzellen vorgeschalteten PV-positiven Interneuronen, sowohl durch deren Inhibition als auch Disinhibition wie im KO, mit der Pathogenese von Epilepsie und Ataxie in Zusammenhang gebracht (Dölen et al. 2007, Ogiwara et al. 2007, Rossignol 2011, Rossignol et al. 2013, Verret et al. 2012, Wonders und Anderson 2006).

Aufgrund der Verknüpfung von epileptischen Ereignissen mit Oszillationen rückt das hippocampale Netzwerk, vor allem die im Tierversuch gemessenen veränderten theta-Oszillationen, in den Fokus der Diskussion. (Green und Arduini 1954, Buzsáki und Draguhn 2004). Neben intrahippokampalen Netzwerken sind Afferenzen aus septohippokampalen sowie dem entorhinalen Kortex an der Rhythmusgestaltung und der Organisation des theta-Rhythmus beteiligt (Vinogradova 1995, Freund und Antal 1988, Buzsáki 2002, Bland et al. 1999, Vertes und Kocsis 1997, Misgeld und Frotscher 1986, Gulyás et al. 1990). Entscheidend dabei sind PV-positive Interneuronen, welche als Schrittmacher fungieren können und dabei nur ~30 % aller hippocampalen GABAergen Interneuronen ausmachen (Bezaire und Soltesz 2013, Katsumaru et al. 1988, Kosaka et al. 1987, Varga et al. 2008, Hangya et al. 2009). Hierauf deuten die Abweichungen der Theta-Amplitude – vor allem beim heterozygoten Knockout zu sehen – hin, welche auch bei vielen Epilepsie-Tiermodellen verändert ist (u.a. Butuzova und Kitchigina 2008, Malkov und Popova 2011, Mal'kov et al. 2008, Colom 2006, Lerma et al. 1984). Bemerkenswert ist, dass nur in einem Pilocarpin-Modell für Temporallappen-Epilepsie die Frequenz während der Anästhesie ähnlich wie im KO und HET reduziert war (Colom et al. 2005, Kitchigina und Butuzova 2009, Marcelin et al. 2009, Kitchigina et al. 2013). Die Herkunft der Anfälle lässt sich darüber aber nicht definieren, da die epileptischen Herde in unterschiedlichen Hirnregionen auftraten (Bartolomei et al. 2006). Jede der bei der Rhythmusgestaltung beteiligten Region könnte durch den PV-KCC2-Knockout epileptogene Herde bergen. So obliegt die Generierung hippocampaler Oszillationen stark dem Einfluss des PV-positiven retikulären Thalamus. Jedoch sind vor allem die GABAergen Efferenzen in andere thalamische Regionen bei Unregelmäßigkeiten von theta-

Oszillationen als epileptogen beschrieben worden (Carlén et al. 2012, Fuchs et al. 2007, Jones 1975, Meyer et al. 2002, Steriade 2005, Kitchigina et al. 2013).

Die im verwendeten Tiermodell nachgewiesenen veränderten theta-Oszillationen könnten in sich frei bewegenden Tieren zu anormalen Lernprozessen bzw. zu Problemen bei der Gedächtnisbildung führen. Entsprechende Verhaltensexperimente könnten hier eine genauere Untersuchung ermöglichen (Burgess und Gruzelier 1997). Zu bedenken ist wiederum, dass während der Narkose eine verringerte elektrophysiologische Aktivität vorliegt (Brazhnik und Fox 1999, Vinogradova 1995, Yoder und Pang 2005). Durch die Untersuchung sich bewegendere und explorierender Tiere könnten mögliche Kompensationsmechanismen, die durch die Anästhesie maskiert sind, ausgeschlossen werden.

Hippokampale Interneuronen wirken auch an der Generierung der gamma-Oszillationen mit (Freund und Buzsáki 1996, Csicsvari et al. 2003). Im untersuchten Tiermodell waren die gamma-Oszillationen jedoch unverändert. Dass ungewöhnliche gamma-Frequenzen in Epilepsietiermodellen auftreten können, wurde in einigen Studien belegt (Bragin et al. 2002, Bragin et al. 2004, Staba et al. 2002, Csicsvari et al. 2003, Fisher et al. 1992). Ob der gamma-Rhythmus nun im PV-KCC2-Tiermodell signifikant beeinflusst wird, könnte durch eine Analyse induzierter Anfälle an nicht-narkotisierten Tieren gezeigt werden. Gleichzeitig könnte dieser Ansatz Aufschluss über betroffene Netzwerke geben (Kandratavicius et al. 2014).

Zu beachten ist, dass schnell-feuernde PV-positive Interneuronen eine effiziente Kommunikation zwischen neuronalen Netzwerken ermöglichen (Cardin et al. 2009, Sohal et al. 2009, Bartos et al. 2007). So organisiert der theta-Rhythmus direkt die gamma-Frequenzdynamiken von ganzen neuronalen Zellpopulationen, sodass im Computermodell gamma-Oszillationen durch eine verstärkte Erregbarkeit inhibierender Zellen, wie im untersuchten Tiermodell, zunehmen (Bragin et al. 1995, Csicsvari et al. 2003, Montgomery et al. 2008, Colgin et al. 2009, Börgers et al. 2008). Vor allem im HET ist eine solche Tendenz zu erkennen. Allerdings könnten die Pyramidenzellen ähnlich stark gehemmt werden wie andere Interneuronen und die Modulation hier kompensieren. Im untersuchten Tiermodell war die reduzierte gamma-theta-Modulation im *stratum pyramidale* bei HET besonders auffällig. Diese gesteigerte Modulation unterstützt die Vermutung, dass die Stärke der theta-Synchronisation für die gamma-Modulation von Korbzellen verantwortlich ist (Gloveli et al. 2005). Da die gestörte theta-gamma-Koordination im Hippokampus zu Veränderungen der hippokampalen Informationsver-

arbeitung zu führen scheint und Einfluss auf Kurzzeit- und Arbeitsgedächtnis hat, könnten geeignete Verhaltenstests spezifische Modifikationen aufdecken (Lisman und Idiart 1995, Jensen und Lisman 2005, Lisman und Buzsáki 2008, Morris 1984). Um zusätzliche Informationen über die modulierten Netzwerke, Oszillationen sowie die damit verbundenen kognitiven Fähigkeiten zu erhalten, kommen die Messung der Wahrnehmung bzw. Wiedererkennung neuer Objekte, „open Field“, T-Labyrinth und Y-Labyrinth sowie das Morris-Wasserlabyrinth und die Angstkonditionierung in Betracht (Akwa et al. 2001, Alarcón et al. 2004, Dellu et al. 2000, Florian und Roulet 2004, Lister 1987, Rampon et al. 2000, Rawlins und Olton 1982, Morris 1984, Ennaceur und Delacour 1988, Phillips und LeDoux 1992).

## 6.2 Die murine Expression von Channelrhodopsin-2

Die Integration des konditionalen ChR2 Transgens in den ROSA26-locus durch homologe Rekombination konnte durch *Southern Blot* bestätigt werden. Konditionale ChR2-Mäuse wurden anschließend mit einer Cre-Deleter-Mauslinie verpaart, um so die Stopp-Kassette zu deletieren und damit die Expression von ChR2 zu aktivieren. ChR2 Transkripte waren über *Northern Blot* Analysen nachweisbar. Auch das Protein konnte im *Western Blot* in Lysaten detektiert werden. Demnach ist das Konstrukt grundsätzlich korrekt integriert. Jedoch konnte ChR2-YFP weder über Fluoreszenzmikroskopie, indirekte Immunohistochemie oder elektrophysiologisch nachgewiesen werden.

Es sind verschiedene ChR2-Varianten verfügbar, die schnellere oder verlängerte Verweilzeiten im geöffneten Status, ein verändertes Absorptionsspektrum, eine verminderte Desensibilisierung, eine erhöhte Expression oder erhöhte Photoströme aufweisen (Berndt et al. 2009, Wen et al. 2010, Gunaydin et al. 2010). Die in dieser Arbeit verwendete ChR2 Variante H134R ist für eine höhere Expression in Säugierzellen Codon-optimiert und wurde bereits erfolgreich in zahlreichen Studien verwendet (Berndt et al. 2009, Deisseroth und National Institutes of Health (U.S.) 2012, Xiong und Jin 2012, Zhang et al. 2006). Offenbar ist jedoch die H134R-Varianten zelltoxisch (Miyashita et al. 2013a, b). Axonale Missbildungen treten infolge der *in utero* Elektroporation eines H134R-ChR2-Plasmids auf, nicht jedoch nach viraler Infektion (Nagel et al. 2003, Zhang et al. 2006, Huber et al. 2008, Miyashita et al. 2013a, 2013b). Durch Integration von ChR2 ins Wirtsgenom bieten die Pronukleusinjektion und die angewendete Blastozysteninjektion eine persistente Expression (Wang et al. 2007, Wang und Zylka 2009, Zhao et al. 2011). Durch die bestehenden Erfahrungen mit H134R ChR2 und der Integ-

rationsart sind beide wohl nicht ursächlich für die zu geringe Expression des verwendeten Konstrukts.

Eine andere Ursache könnte der verwendete CAG *Enhancer* / CMV *immediate early* Promotor sein. In murinen ES-Zellen besitzt dieser Promotor nur ein Viertel der ROSA26-Promotor-Expressionsstärke. Die Ausrichtung der Integration, *sense* oder *antisense*, spielt hierbei keine Rolle. Zudem weist auch eine andere Studie auf ein schwaches Expressionsniveau des verwendeten CMV-Promotors im ROSA26-Locus hin (Zhao et al. 2011). Die Expression von ChR2 könnte z.B. durch Einsatz des EF1 $\alpha$ - oder CAG-Promotors erhöht werden, wobei sich die Expression verdoppelt bzw. verzehnfacht (Chen et al. 2011). Von einer Verwendung des noch stärkeren  $\alpha$ CaMKII Promoters ist abzuraten, da die erhöhte Expression wie oben genannt toxisch wirken kann (Miyashita 2013 a,b).

Parallel zu dieser Arbeit wurde eine konditionale ChR2-Maus mit ähnlichem Konstrukt (Promotor, H134R-ChR2-EYFP, LacZ-STOPP-Kassette) hergestellt (Kätzel et al. 2011). Hier wurde eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase verwendet. Es waren lichtvermittelte Ströme detektierbar. ChR2 war aber nur über indirekte Immunfluoreszenz mithilfe von YFP-Antikörpern nachzuweisen, was ein geringes Expressionsniveau vermuten lässt. Diese konditionale ChR2 Maus wurde lediglich in einer Folgestudie verwendet (Kätzel und Miesenböck 2014).

Fast zeitgleich generierte die Arbeitsgruppe um Frau Hongkui Zeng ein Konstrukt, welches den CAG-Promotor und EYFP tdTomato verwendete. Dies steigerte die Expression und erleichterte die Detektion, indem die Überlappung der Emissions-/Absorptionsspektren von YFP und ChR2 umgangen wird (Madisen et al. 2012). Dieses Mausmodell ist funktionstüchtig, mittlerweile kommerziell erhältlich und kann für zukünftige Studien genutzt werden.

Alternativ könnte eine stabile Expression von ChR2 durch Integration mithilfe Adeno-assoziiierter Viren (AAV) erreicht werden (Hamilton et al. 2013). Die Funktion degenerierter Retinazellen konnte z.B. mithilfe von ChR2-Adeno-assoziiierter Virusvektoren (AAV) wiederhergestellt werden (Bi et al. 2006). Zudem konnte durch Infektion mit ChR2-AAV die Sehfunktion in verschiedenen Mausmodellen partiell wieder hergestellt werden (Doroudchi et al. 2011). Die Injektion dieser ChR2-AAVs in zelltypspezifisch Cre-exprimierenden Mäusen stellt eine Alternative zu langwierigen Verpaarungen dar.

Nachteilig wären hierbei jedoch die intrakranielle Injektion und die lokal begrenzte Infektion.

### 6.3 Fazit und Ausblick

Mit Hilfe des konditionalen Mausmodells konnte die Rolle von PV-positiven Interneuronen in adulten neuronalen Netzwerken unabhängig vom schweren früh letalen Phänotyp konstitutiver KCC2-Knockout Mäuse untersucht werden. PV-spezifische Knockout-Mäuse zeigten motorische Defizite, epileptische Anfälle sowie eine erhöhte Sterblichkeit. Die elektrophysiologische Untersuchung zeigte eine veränderte Plastizität sowie eine auffällige Netzwerkaktivität. Elektrophysiologische Netzwerk-Aktivität konnte zum Teil auch bei heterozygoten Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Bei beiden Genotypen könnte eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration aufgrund einer verminderten oder fehlenden Expression von KCC2 die GABA-Antwort ändern und dadurch das Verhalten ganzer Neuronenverbände beeinflussen.

Das generierte Mausmodell bietet aufgrund der bisherigen Ergebnisse eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen PV-positiver Neuronen und deren Mitwirken in verschiedenen neuronalen Netzwerken. Im weiteren Verlauf sollten die Versuchstierzahlen für EEG-Messungen erhöht werden und das GABA-Umkehrpotenzial von PV-positiven Interneuronen durch *Patch-clamp* Messungen untersucht werden. Hierfür wird im Moment eine Mauslinie mit Cre-abhängiger tdTomato eingekreuzt, um die entsprechenden Zellen im *Perforated Patch* zu selektieren.

Um die Einflüsse der Manipulation PV-positiver Interneurone *in vivo* zu untersuchen, sollen weitere Verhaltenstests durchgeführt werden. Beim *Fear conditioning*, bei dem die Tiere die Vorhersage aversiver Ereignisse lernen, ist auch die Amygdala involviert (Maren 2001). Das *Contextual fear conditioning* bezieht zusätzlich hippocampale Regionen mit ein (Kim und Fanselow 1992, Collins und Paré 2000). Die Erkundung einer neuen Umgebung geht ebenfalls mit Angst einher (Bardo et al. 1996). Das damit verbundene explorative Verhalten könnte mittels *Field conditioning* oder *Free choice open field* untersucht werden (Freitag et al. 2003). Zusätzlich könnte räumliches Lernen im Morris-Wasserlabyrinth und Kognition im T-Labyrinth bzw. im Y-Labyrinth analysiert werden (Morris 1984, Olton 1979, Bromley-Brits et al. 2011). Zu beachten ist jedoch, dass sich die Interpretation der Testergebnisse aufgrund des motorischen Phänotyps der PV-spezifischen Knockout-Mäuse schwierig gestaltet.

Ein weitere Bestandteil der Arbeit war die Etablierung eines konditionales Mausmodells für die Expression des lichtinduzierbaren Kationenkanals ChR2. Die mRNA sowie cDNA und das Protein wurden zwar detektiert – offenbar war die Expressionsstärke zu gering um Neuronen gezielt durch Licht zu manipulieren. Ursächlich könnte die Wahl des Promotors sein. Für die geplanten Folgeexperimente kann eine mittlerweile verfügbare Mauslinie der Gruppe um Hongkui Zeng genutzt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akwa Y, Ladurelle N, Covey DF, Baulieu EE. 2001. The synthetic enantiomer of pregnenolone sulfate is very active on memory in rats and mice, even more so than its physiological neurosteroid counterpart: distinct mechanisms? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (24):14033-14037.
- Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A. 2004. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP<sup>+/-</sup> mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, 42 (6):947-959.
- Alberts B. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th Aufl. New York: Garland Science.
- Alvarez FJ, Jonas PC, Sapir T, Hartley R, Berrocal MC, Geiman EJ, Todd AJ, Goulding M. 2005. Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *J Comp Neurol*, 493 (2):177-192.
- Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. 1990. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res*, 83:1-11.
- Andersen P, Bland HB, Myhrer T, Schwartzkroin PA. 1979. Septo-hippocampal pathway necessary for dentate theta production. *Brain Res*, 165 (1):13-22.
- Andersen P, Dingledine R, Gjerstad L, Langmoen IA, Laursen AM. 1980. Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *J Physiol*, 305:279-296.
- Angelaki DE, Cullen KE. 2008. Vestibular system: the many facets of a multimodal sense. *Annu Rev Neurosci*, 31:125-150.
- Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K. 1997. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem*, 122 (5):977-982.
- Ascoli GA, Brown KM, Calixto E, Card JP, Galván EJ, Perez-Rosello T, Barrionuevo G. 2009. Quantitative morphometry of electrophysiologically identified CA3b interneurons reveals robust local geometry and distinct cell classes. *J Comp Neurol*, 515 (6):677-695.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R, Group PIN. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 9 (7):557-568.
- Avoli M, de Curtis M. 2011. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog Neurobiol*, 95 (2):104-132.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH. 1989. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci*, 9 (7):2562-2574.
- Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. 2005. Modulation of neocortical interneurons: extrinsic influences and exercises in self-control. *Trends Neurosci*, 28 (11):602-610.
- Baines AJ, Bennett PM, Carter EW, Terracciano C. 2009. Protein 4.1 and the control of ion channels. *Blood Cells Mol Dis*, 42 (3):211-215.
- Balakrishnan V, Becker M, Löhrike S, Nothwang HG, Güresir E, Friauf E. 2003. Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci*, 23 (10):4134-4145.

- Bamann C, Kirsch T, Nagel G, Bamberg E. 2008. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol*, 375 (3):686-694.
- Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, Kramer RH. 2004. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci*, 7 (12):1381-1386.
- Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG. 1996. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res*, 77 (1-2):23-43.
- Bartolomei F, Bosma I, Klein M, Baayen JC, Reijneveld JC, Postma TJ, Heimans JJ, van Dijk BW, de Munck JC, de Jongh A, Cover KS, Stam CJ. 2006. Disturbed functional connectivity in brain tumour patients: evaluation by graph analysis of synchronization matrices. *Clin Neurophysiol*, 117 (9):2039-2049.
- Bartos M, Vida I, Jonas P. 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci*, 8 (1):45-56.
- Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, Geiger JR, Jonas P. 2002. Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (20):13222-13227.
- Bellemer A, Hirata T, Romero MF, Koelle MR. 2011. Two types of chloride transporters are required for GABA(A) receptor-mediated inhibition in *C. elegans*. *EMBO J*, 30 (9):1852-1863.
- Bellingham MC, Walmsley B. 1999. A novel presynaptic inhibitory mechanism underlies paired pulse depression at a fast central synapse. *Neuron*, 23 (1):159-170.
- Ben-Ari Y. 1979. Hippocampal seizures and failure of inhibition *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*:
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3 (9):728-739.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol*, 416:303-325.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*, 87 (4):1215-1284.
- Benarroch EE. 2007. GABAA receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology*, 68 (8):612-614.
- Berger TK, Perin R, Silberberg G, Markram H. 2009. Frequency-dependent disinaptic inhibition in the pyramidal network: a ubiquitous pathway in the developing rat neocortex. *J Physiol*, 587 (Pt 22):5411-5425.
- Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P, Deisseroth K. 2009. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*, 12 (2):229-234.
- Bezaire MJ, Soltesz I. 2013. Quantitative assessment of CA1 local circuits: knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus*, 23 (9):751-785.
- Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH. 2006. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 50 (1):23-33.
- Bland BH, Oddie SD, Colom LV. 1999. Mechanisms of neural synchrony in the septohippocampal pathways underlying hippocampal theta generation. *J Neurosci*, 19 (8):3223-3237.
- Blasco-Ibáñez JM, Freund TF. 1995. Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci*, 7 (10):2170-2180.
- Bleck TP, Klawans HL. 1990. Convulsive disorders: mechanisms of epilepsy and anticonvulsant action. *Clin Neuropharmacol*, 13 (2):121-128.

- Bliss TV, Gardner-Medwin AR. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232 (2):357-374.
- Börgers C, Epstein S, Kopell NJ. 2008. Gamma oscillations mediate stimulus competition and attentional selection in a cortical network model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (46):18023-18028.
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol*, 385:243-286.
- Bortone D, Polleux F. 2009. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*, 62 (1):53-71.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC. 2007. Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 27 (8):1942-1953.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*, 54 (2):247-264.
- Boyce S, Webb JK, Carlson E, Rupniak NM, Hill RG, Martin JE. 1999. Onset and progression of motor deficits in motor neuron degeneration (mnd) mice are unaltered by the glycine/NMDA receptor antagonist L-701,324 or the MAO-B inhibitor R(-)-deprenyl. *Exp Neurol*, 155 (1):49-58.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 8 (9):1263-1268.
- Bragin A, Wilson CL, Almajano J, Mody I, Engel J. 2004. High-frequency oscillations after status epilepticus: epileptogenesis and seizure genesis. *Epilepsia*, 45 (9):1017-1023.
- Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. 1995. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci*, 15 (1 Pt 1):47-60.
- Bragin A, Wilson CL, Staba RJ, Reddick M, Fried I, Engel J. 2002. Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) in the human epileptic brain: entorhinal cortex. *Ann Neurol*, 52 (4):407-415.
- Brazhnik ES, Fox SE. 1999. Action potentials and relations to the theta rhythm of medial septal neurons in vivo. *Exp Brain Res*, 127 (3):244-258.
- Breindl A, Derrick BE, Rodriguez SB, Martinez JL. 1994. Opioid receptor-dependent long-term potentiation at the lateral perforant path-CA3 synapse in rat hippocampus. *Brain Res Bull*, 33 (1):17-24.
- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M. 1996. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABAA receptors. *J Physiol*, 497 ( Pt 3):753-759.
- Brodman K. 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth.
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. 2011. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*, (53).
- Brophy PJ. 2003. Myelinated nerves: filling in the juxtaparanodal gap. *Curr Biol*, 13 (24):R956-957.
- Brownstone RM, Bui TV. 2010. Spinal interneurons providing input to the final common path during locomotion. *Prog Brain Res*, 187:81-95.
- Burgess AP, Gruzelier JH. 1997. Short duration synchronization of human theta rhythm during recognition memory. *Neuroreport*, 8 (4):1039-1042.

- Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112 (2):195-203.
- Burwell RD. 2000. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci*, 911:25-42.
- Butuzova MV, Kitchigina VF. 2008. Repeated blockade of GABAA receptors in the medial septal region induces epileptiform activity in the hippocampus. *Neurosci Lett*, 434 (1):133-138.
- Buzsáki G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33 (3):325-340.
- Buzsáki G. 2010. Neural syntax: cell assemblies, synapse ensembles, and readers. *Neuron*, 68 (3):362-385.
- Buzsáki G, Draguhn A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304 (5679):1926-1929.
- Buzsáki G, Silva FL. 2012. High frequency oscillations in the intact brain. *Prog Neurobiol*, 98 (3):241-249.
- Buzsáki G, Leung LW, Vanderwolf CH. 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res*, 287 (2):139-171.
- Buzsáki G, Horváth Z, Urioste R, Hetke J, Wise K. 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science*, 256 (5059):1025-1027.
- Buzsáki G, Buhl DL, Harris KD, Csicsvari J, Czéh B, Morozov A. 2003. Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*, 116 (1):201-211.
- Caggiula AR, Epstein LH, Perkins KA, Saylor S. 1995. Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*, 122 (3):301-306.
- Caiati MD, Sivakumaran S, Cherubini E. 2010. In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. *J Neurosci*, 30 (5):1750-1759.
- Callahan LM, Wylen EL, Messer A, Mazurkiewicz JE. 1991. Neurofilament distribution is altered in the Mnd (motor neuron degeneration) mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*, 50 (4):491-504.
- Callaway EM, Katz LC. 1993. Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (16):7661-7665.
- Canolty RT, Edwards E, Dalal SS, Soltani M, Nagarajan SS, Kirsch HE, Berger MS, Barbaro NM, Knight RT. 2006. High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science*, 313 (5793):1626-1628.
- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI. 2009. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, 459 (7247):663-667.
- Carlén M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, Rühlmann C, Jones SR, Deisseroth K, Sheng M, Moore CI, Tsai LH. 2012. A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Mol Psychiatry*, 17 (5):537-548.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci*, 17 (10):3894-3906.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35 (2):375-475.
- Cenquizca LA, Swanson LW. 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*, 56 (1):1-26.

- Chalifoux JR, Carter AG. 2011. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr Opin Neurobiol*, 21 (2):339-344.
- Chambers JJ, Banghart MR, Trauner D, Kramer RH. 2006. Light-induced depolarization of neurons using a modified Shaker K(+) channel and a molecular photoswitch. *J Neurophysiol*, 96 (5):2792-2796.
- Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Lévi S. 2012. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci*, 6:5.
- Chapman CA, Lacaille JC. 1999. Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing. *J Neurosci*, 19 (19):8637-8645.
- Chen CM, Krohn J, Bhattacharya S, Davies B. 2011. A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a  $\Phi$ C31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS One*, 6 (8):e23376.
- Chen Y, Chad JE, Wheal HV. 1996. Synaptic release rather than failure in the conditioning pulse results in paired-pulse facilitation during minimal synaptic stimulation in the rat hippocampal CA1 neurones. *Neurosci Lett*, 218 (3):204-208.
- Chéry N, de Koninck Y. 1999. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 19 (17):7342-7355.
- Christie BR, Franks KM, Seamans JK, Saga K, Sejnowski TJ. 2000. Synaptic plasticity in morphologically identified CA1 stratum radiatum interneurons and giant projection cells. *Hippocampus*, 10 (6):673-683.
- Chrobak JJ, Buzsáki G. 1994. Selective activation of deep layer (V-VI) retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J Neurosci*, 14 (10):6160-6170.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P. 1995. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, 378 (6552):75-78.
- Cockerell OC. 1996. The mortality of epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 9 (2):93-96.
- Cogan SF. 2008. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu Rev Biomed Eng*, 10:275-309.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. 2002. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*, 298 (5597):1418-1421.
- Colder BW, Frysinger RC, Wilson CL, Harper RM, Engel J. 1996. Decreased neuronal burst discharge near site of seizure onset in epileptic human temporal lobes. *Epilepsia*, 37 (2):113-121.
- Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI. 2009. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature*, 462 (7271):353-357.
- Collingridge GL, Lester RA. 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*, 41 (2):143-210.
- Collins DR, Paré D. 2000. Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). *Learn Mem*, 7 (2):97-103.
- Colom LV. 2006. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 96 (3):609-623.
- Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E. 2005. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse*, 58 (3):151-164.
- Commins S, Gigg J, Anderson M, O'Mara SM. 1998. Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the subiculum. *Neuroreport*, 9 (18):4109-4113.

- Condé F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA. 1994. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J Comp Neurol*, 341 (1):95-116.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 Suppl 5:S63-67.
- Connolly CN, Krishek BJ, McDonald BJ, Smart TG, Moss SJ. 1996. Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem*, 271 (1):89-96.
- Cope DW, Maccaferri G, Márton LF, Roberts JD, Cobden PM, Somogyi P. 2002. Cholecystikinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 109 (1):63-80.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C. 2001. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci*, 4 (1):52-62.
- Covolan L, Mello LE. 2000. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*, 39 (2):133-152.
- Cramer SW, Baggott C, Cain J, Tilghman J, Allcock B, Miranpuri G, Rajpal S, Sun D, Resnick D. 2008. The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain*, 4:36.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsáki G. 1998. Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron*, 21 (1):179-189.
- Csicsvari J, Hirase H, Mamiya A, Buzsáki G. 2000. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron*, 28 (2):585-594.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. 2003. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, 37 (2):311-322.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A, Buzsáki G. 1999a. Fast network oscillations in the hippocampal CA1 region of the behaving rat. *J Neurosci*, 19 (16):RC20.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A, Buzsáki G. 1999b. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J Neurosci*, 19 (1):274-287.
- Cullen DK, Pfister B. 2011. State of the art and future challenges in neural engineering: neural interfaces: foreword / editors' commentary (volume 1). *Crit Rev Biomed Eng*, 39 (1):1-3.
- Cullen DK, Wolf JA, Vernekar VN, Vukasinovic J, LaPlaca MC. 2011. Neural tissue engineering and biohybridized microsystems for neurobiological investigation in vitro (Part 1). *Crit Rev Biomed Eng*, 39 (3):201-240.
- Dalby NO. 2003. Inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. *Eur J Pharmacol*, 479 (1-3):127-137.
- Dávila JC, Real MA, Olmos L, Legaz I, Medina L, Guirado S. 2005. Embryonic and postnatal development of GABA, calbindin, calretinin, and parvalbumin in the mouse claustral complex. *J Comp Neurol*, 481 (1):42-57.
- de Curtis M, Gnatkovsky V. 2009. Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity. *Epilepsia*, 50 (12):2514-2525.
- Deisseroth K, National Institutes of Health (U.S.). 2012. Optogenetics development and application Bethesda, Md.: National Institutes of Health,.

- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A, Schnitzer MJ. 2006. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci*, 26 (41):10380-10386.
- DEL CASTILLO J, KATZ B. 1954. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol*, 124 (3):560-573.
- Dellu F, Contarino A, Simon H, Koob GF, Gold LH. 2000. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 73 (1):31-48.
- Delpire E, Baranczak A, Waterson AG, Kim K, Kett N, Morrison RD, Daniels JS, Weaver CD, Lindsley CW. 2012. Further optimization of the K-Cl cotransporter KCC2 antagonist ML077: development of a highly selective and more potent in vitro probe. *Bioorg Med Chem Lett*, 22 (14):4532-4535.
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P. 2008. NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol*, 586 (4):1059-1075.
- Demêmes D, Eybalin M, Renard N. 1993. Cellular distribution of parvalbumin immunoreactivity in the peripheral vestibular system of three rodents. *Cell Tissue Res*, 274 (3):487-492.
- Denker SP, Barber DL. 2002. Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 14 (2):214-220.
- Deuker L, Olligs J, Fell J, Kranz TA, Mormann F, Montag C, Reuter M, Elger CE, Axmacher N. 2013. Memory consolidation by replay of stimulus-specific neural activity. *J Neurosci*, 33 (49):19373-19383.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M. 2003. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol*, 459 (4):407-425.
- Dölen G, Osterweil E, Rao BS, Smith GB, Auerbach BD, Chattarji S, Bear MF. 2007. Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron*, 56 (6):955-962.
- Doroudchi MM, Greenberg KP, Liu J, Silka KA, Boyden ES, Lockridge JA, Arman AC, Janani R, Boye SE, Boye SL, Gordon GM, Matteo BC, Sampath AP, Hauswirth WW, Horsager A. 2011. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther*, 19 (7):1220-1229.
- Draguhn A, Traub RD, Schmitz D, Jefferys JG. 1998. Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature*, 394 (6689):189-192.
- Draguhn A, Traub RD, Bibbig A, Schmitz D. 2000. Ripple (approximately 200-Hz) oscillations in temporal structures. *J Clin Neurophysiol*, 17 (4):361-376.
- Dugladze T, Vida I, Tort AB, Gross A, Otahal J, Heinemann U, Kopell NJ, Gloveli T. 2007. Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (44):17530-17535.
- During MJ, Ryder KM, Spencer DD. 1995. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature*, 376 (6536):174-177.
- Edelman GM. 1987. *Neural Darwinism : the theory of neuronal group selection*. New York: Basic Books.
- Edelman GM. 1989. *The remembered present : a biological theory of consciousness*. New York: Basic Books.
- Edelman GM. 1993. Neural Darwinism: selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron*, 10 (2):115-125.
- Edwards DH. 2010. Neuromechanical simulation. *Front Behav Neurosci*, 4.
- Ellis-Davies GC. 2007. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods*, 4 (8):619-628.

- Engel AK, Fries P, Singer W. 2001. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci*, 2 (10):704-716.
- Engel D, Schmitz D, Gloveli T, Frahm C, Heinemann U, Draguhn A. 1998. Laminar difference in GABA uptake and GAT-1 expression in rat CA1. *J Physiol*, 512 ( Pt 3):643-649.
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31 (1):47-59.
- Enz R, Cutting GR. 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res*, 38 (10):1431-1441.
- Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW. 2008. Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol*, 100 (5):2640-2652.
- Farrant M, Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6 (3):215-229.
- Farrant M, Kaila K. 2007. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog Brain Res*, 160:59-87.
- Ferrannini E. 1988. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism*, 37 (3):287-301.
- Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O. 1998. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature*, 394 (6689):186-189.
- Fisher JL. 2004. The alpha 1 and alpha 6 subunit subtypes of the mammalian GABA(A) receptor confer distinct channel gating kinetics. *J Physiol*, 561 (Pt 2):433-448.
- Fisher RS, Webber WR, Lesser RP, Arroyo S, Uematsu S. 1992. High-frequency EEG activity at the start of seizures. *J Clin Neurophysiol*, 9 (3):441-448.
- Fiumelli H, Woodin MA. 2007. Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr Opin Neurobiol*, 17 (1):81-86.
- Fiumelli H, Briner A, Puskarjov M, Blaesse P, Belem BJ, Dayer AG, Kaila K, Martin JL, Vutskits L. 2013. An ion transport-independent role for the cation-chloride cotransporter KCC2 in dendritic spinogenesis in vivo. *Cereb Cortex*, 23 (2):378-388.
- Florian C, Rouillet P. 2004. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res*, 154 (2):365-374.
- Fork RL. 1971. Laser stimulation of nerve cells in *Aplysia*. *Science*, 171 (3974):907-908.
- Fortune ES, Rose GJ. 2001. Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci*, 24 (7):381-385.
- Freitag S, Schachner M, Morellini F. 2003. Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behav Brain Res*, 145 (1-2):189-207.
- Freund TF, Antal M. 1988. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336 (6195):170-173.
- Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6 (4):347-470.
- Friedrich G, Soriano P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, 5 (9):1513-1523.
- Fries P, Nikolić D, Singer W. 2007. The gamma cycle. *Trends Neurosci*, 30 (7):309-316.
- Fritschy JM, Panzanelli P, Kralic JE, Vogt KE, Sassoè-Pognetto M. 2006. Differential dependence of axo-dendritic and axo-somatic GABAergic synapses on GABAA receptors containing the alpha1 subunit in Purkinje cells. *J Neurosci*, 26 (12):3245-3255.

- Fuchs EC, Zivkovic AR, Cunningham MO, Middleton S, Lebeau FE, Bannerman DM, Rozov A, Whittington MA, Traub RD, Rawlins JN, Monyer H. 2007. Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. *Neuron*, 53 (4):591-604.
- Fuentealba P, Begum R, Capogna M, Jinno S, Márton LF, Csicsvari J, Thomson A, Somogyi P, Klausberger T. 2008. Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron*, 57 (6):917-929.
- Galarreta M, Hestrin S. 1999. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, 402 (6757):72-75.
- Gao WJ, Wang Y, Goldman-Rakic PS. 2003. Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci*, 23 (5):1622-1630.
- Gao XB, Chen G, van den Pol AN. 1998. GABA-dependent firing of glutamate-evoked action potentials at AMPA/kainate receptors in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*, 79 (2):716-726.
- Garrido Sanabria ER, Castañeda MT, Banuelos C, Perez-Cordova MG, Hernandez S, Colom LV. 2006. Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience*, 142 (3):871-883.
- Gassmann M, Bettler B. 2012. Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. *Nat Rev Neurosci*, 13 (6):380-394.
- Gauk V, Jaeger D. 2000. The control of rate and timing of spikes in the deep cerebellar nuclei by inhibition. *J Neurosci*, 20 (8):3006-3016.
- Gauvain G, Chamma I, Chevy Q, Cabezas C, Irinopoulou T, Bodrug N, Carnaud M, Lévi S, Poncer JC. 2011. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (37):15474-15479.
- Gharbawie OA, Gonzalez CL, Whishaw IQ. 2005. Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats. *Behav Brain Res*, 156 (1):125-137.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW. 1999. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature*, 402 (6757):75-79.
- Gilbert PF, Thach WT. 1977. Purkinje cell activity during motor learning. *Brain Res*, 128 (2):309-328.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. 2009. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci*, 12 (10):1222-1223.
- Gloveli T, Dugladze T, Saha S, Monyer H, Heinemann U, Traub RD, Whittington MA, Buhl EH. 2005a. Differential involvement of oriens/pyramidal interneurons in hippocampal network oscillations in vitro. *J Physiol*, 562 (Pt 1):131-147.
- Gloveli T, Dugladze T, Rotstein HG, Traub RD, Monyer H, Heinemann U, Whittington MA, Kopell NJ. 2005b. Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (37):13295-13300.
- Glykys J, Mody I. 2007. Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron*, 56 (5):763-770.
- Glykys J, Mann EO, Mody I. 2008. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci*, 28 (6):1421-1426.
- Gnatkovsky V, Librizzi L, Trombin F, de Curtis M. 2008. Fast activity at seizure onset is mediated by inhibitory circuits in the entorhinal cortex in vitro. *Ann Neurol*, 64 (6):674-686.

- Gonzalez-Islas C, Chub N, Wenner P. 2009. NKCC1 and AE3 appear to accumulate chloride in embryonic motoneurons. *J Neurophysiol*, 101 (2):507-518.
- Goodkin HP, Thach WT. 2003. Cerebellar control of constrained and unconstrained movements. I. Nuclear inactivation. *J Neurophysiol*, 89 (2):884-895.
- Gosgnach S. 2011. The role of genetically-defined interneurons in generating the mammalian locomotor rhythm. *Integr Comp Biol*, 51 (6):903-912.
- Gottschalk W, Pozzo-Miller LD, Figueroa A, Lu B. 1998. Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. *J Neurosci*, 18 (17):6830-6839.
- Goulding M. 2009. Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci*, 10 (7):507-518.
- Gray CM, Singer W. 1989. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (5):1698-1702.
- GREEN JD, ARDUINI AA. 1954. Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*, 17 (6):533-557.
- Grillner S. 2003. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci*, 4 (7):573-586.
- Gulyás AI, Görcs TJ, Freund TF. 1990. Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience*, 37 (1):31-44.
- Gulyás AI, Tóth K, McBain CJ, Freund TF. 1998. Stratum radiatum giant cells: a type of principal cell in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 10 (12):3813-3822.
- Gulyás AI, Sík A, Payne JA, Kaila K, Freund TF. 2001. The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 13 (12):2205-2217.
- Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K, Hegemann P. 2010. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci*, 13 (3):387-392.
- Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED. 1996. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 39 (2):147-157.
- Halasy K, Buhl EH, Lörinczi Z, Tamás G, Somogyi P. 1996. Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, 6 (3):306-329.
- Hamilton LS, Sohl-Dickstein J, Huth AG, Carels VM, Deisseroth K, Bao S. 2013. Optogenetic activation of an inhibitory network enhances feedforward functional connectivity in auditory cortex. *Neuron*, 80 (4):1066-1076.
- Hangya B, Borhegyi Z, Szilágyi N, Freund TF, Varga V. 2009. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci*, 29 (25):8094-8102.
- Hazan L, Zugaro M, Buzsáki G. 2006. Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. *J Neurosci Methods*, 155 (2):207-216.
- Hentschke H, Perkins MG, Pearce RA, Banks MI. 2007. Muscarinic blockade weakens interaction of gamma with theta rhythms in mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*, 26 (6):1642-1656.
- Hille B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. 2nd Aufl. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Hille B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd Aufl.
- Hines RM, Davies PA, Moss SJ, Maguire J. 2012. Functional regulation of GABAA receptors in nervous system pathologies. *Curr Opin Neurobiol*, 22 (3):552-558.

- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S. 2005. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol*, 3 (5):e159.
- Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Brodie MJ. 2007. Mortality in epilepsy. *Epilepsy Behav*, 10 (3):363-376.
- Horn Z, Ringstedt T, Blaesse P, Kaila K, Herlenius E. 2010. Premature expression of KCC2 in embryonic mice perturbs neural development by an ion transport-independent mechanism. *Eur J Neurosci*, 31 (12):2142-2155.
- Huber D, Petreanu L, Ghitani N, Ranade S, Hromádka T, Mainen Z, Svoboda K. 2008. Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature*, 451 (7174):61-64.
- Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. 2001. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, 30 (2):515-524.
- Ishizuka T, Kakuda M, Araki R, Yawo H. 2006. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res*, 54 (2):85-94.
- Isokawa M. 2000. Remodeling dendritic spines of dentate granule cells in temporal lobe epilepsy patients and the rat pilocarpine model. *Epilepsia*, 41 Suppl 6:S14-17.
- Isomura Y, Sirota A, Ozen S, Montgomery S, Mizuseki K, Henze DA, Buzsáki G. 2006. Integration and segregation of activity in entorhinal-hippocampal subregions by neocortical slow oscillations. *Neuron*, 52 (5):871-882.
- Ito M. 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*, 78 (3-5):272-303.
- Jensen O, Lisman JE. 2005. Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer. *Trends Neurosci*, 28 (2):67-72.
- Jensen O, Colgin LL. 2007. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends Cogn Sci*, 11 (7):267-269.
- Jin W, Wang H, Yan W, Zhu L, Hu Z, Ding Y, Tang K. 2009. Role of Nrf2 in protection against traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*, 26 (1):131-139.
- Johnston GA. 1996. GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther*, 69 (3):173-198.
- Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science*, 281 (5375):419-424.
- Jones EG. 1975. Some aspects of the organization of the thalamic reticular complex. *J Comp Neurol*, 162 (3):285-308.
- Jones RS, Bühl EH. 1993. Basket-like interneurons in layer II of the entorhinal cortex exhibit a powerful NMDA-mediated synaptic excitation. *Neurosci Lett*, 149 (1):35-39.
- Kaila K, Voipio J, Paalasmaa P, Pasternack M, Deisz RA. 1993. The role of bicarbonate in GABAA receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. *J Physiol*, 464:273-289.
- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. 2014a. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 15 (10):637-654.
- Kaila K, Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J, Puskarjov M. 2014b. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol*, 26:34-41.
- Kalanithi PS, Zheng W, Kataoka Y, DiFiglia M, Grantz H, Saper CB, Schwartz ML, Leckman JF, Vaccarino FM. 2005. Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (37):13307-13312.
- Kandel ER. 2013. Principles of neural science. 5th Aufl. New York: McGraw-Hill.
- Kandel S, amp, Jessel. 1991. Ion Channels of Excitable Membrane.

- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. 2014. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 10:1693-1705.
- Karadsheh MF, Delpire E. 2001. Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons. *J Neurophysiol*, 85 (2):995-997.
- Karlócai MR, Wittner L, Tóth K, Maglóczy Z, Katarova Z, Rásonyi G, Eröss L, Czirják S, Halász P, Szabó G, Payne JA, Kaila K, Freund TF. 2016. Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct*, 221 (7):3601-3615.
- Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. 1988. Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res*, 72 (2):347-362.
- Kätzel D, Miesenböck G. 2014. Experience-dependent rewiring of specific inhibitory connections in adult neocortex. *PLoS Biol*, 12 (2):e1001798.
- Kätzel D, Zemelman BV, Buetfering C, Wölfel M, Miesenböck G. 2011. The columnar and laminar organization of inhibitory connections to neocortical excitatory cells. *Nat Neurosci*, 14 (1):100-107.
- Kawaguchi Y. 1997. Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol*, 78 (3):1743-1747.
- Kawaguchi Y, Shindou T. 1998. Noradrenergic excitation and inhibition of GABAergic cell types in rat frontal cortex. *J Neurosci*, 18 (17):6963-6976.
- Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. 1987. Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res*, 416 (2):369-374.
- Kennedy MB. 2013. *Synaptic Signaling in Learning and Memory*. Cold Spring Harb Perspect Biol.
- Kernell D. 1999. Repetitive impulse firing in motoneurons: facts and perspectives. *Prog Brain Res*, 123:31-37.
- Khalilov I, Holmes GL, Ben-Ari Y. 2003. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci*, 6 (10):1079-1085.
- Khalilov I, Chazal G, Chudotvorova I, Pellegrino C, Corby S, Ferrand N, Gubkina O, Nardou R, Tyzio R, Yamamoto S, Jentsch TJ, Hübner CA, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Medina I. 2011. Enhanced Synaptic Activity and Epileptiform Events in the Embryonic KCC2 Deficient Hippocampus. *Front Cell Neurosci*, 5:23.
- Khazipov R, Holmes GL. 2003. Synchronization of kainate-induced epileptic activity via GABAergic inhibition in the superfused rat hippocampus in vivo. *J Neurosci*, 23 (12):5337-5341.
- Khirug S, Yamada J, Afzalov R, Voipio J, Khiroug L, Kaila K. 2008. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J Neurosci*, 28 (18):4635-4639.
- Khirug S, Huttu K, Ludwig A, Smirnov S, Voipio J, Rivera C, Kaila K, Khiroug L. 2005. Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur J Neurosci*, 21 (4):899-904.
- Kiehn O. 2006. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci*, 29:279-306.
- Kim JJ, Fanselow MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256 (5057):675-677.

- Kitchigina V, Popova I, Sinelnikova V, Malkov A, Astasheva E, Shubina L, Aliev R. 2013. Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: reasons and consequences. *Exp Neurol*, 247:314-327.
- Kitchigina VF, Butuzova MV. 2009. Theta activity of septal neurons during different epileptic phases: the same frequency but different significance? *Exp Neurol*, 216 (2):449-458.
- Klausberger T, Somogyi P. 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321 (5885):53-57.
- Klausberger T, Magill PJ, Márton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsáki G, Somogyi P. 2003. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, 421 (6925):844-848.
- Kocsis B, Bragin A, Buzsáki G. 1999. Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis. *J Neurosci*, 19 (14):6200-6212.
- Köhling R. 2007. Pathomechanismen der Epilepsie Zeitschrift für Epileptologie: Springer Verlag.
- Köhling R. 2008. Entstehungsmechanismen der Epilepsie: unkonventionelle Hypothesen Zeitschrift für Epileptologie: Springer Verlag.
- Köhling R, Lücke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H, Oppel F. 1998. Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain*, 121 ( Pt 6):1073-1087.
- Korotkova T, Fuchs EC, Ponomarenko A, von Engelhardt J, Monyer H. 2010. NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. *Neuron*, 68 (3):557-569.
- Korpi ER, Lüddens H. 1997. Furosemide interactions with brain GABAA receptors. *Br J Pharmacol*, 120 (5):741-748.
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW. 1987. GABAergic neurons containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res*, 419 (1-2):119-130.
- Krnjević K. 1974. Some neuroactive compounds in the substantia nigra. *Adv Neurol*, 5:145-152.
- Kruglikov I, Rudy B. 2008. Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron*, 58 (6):911-924.
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y. 1994. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res*, 649 (1-2):159-173.
- Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, Evans MJ. 1987. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326 (6110):295-298.
- Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD. 1993. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol*, 471:501-519.
- Kullmann DM. 2011. Interneuron networks in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*, 21 (5):709-716.
- Kuner T, Augustine GJ. 2000. A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 27 (3):447-459.
- Kyrozis A, Reichling DB. 1995. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J Neurosci Methods*, 57 (1):27-35.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.

- LaPlaca MC, Cullen DK, McLoughlin JJ, Cargill RS. 2005. High rate shear strain of three-dimensional neural cell cultures: a new in vitro traumatic brain injury model. *J Biomech*, 38 (5):1093-1105.
- Lee HH, Walker JA, Williams JR, Goodier RJ, Payne JA, Moss SJ. 2007. Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *J Biol Chem*, 282 (41):29777-29784.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. 1997. Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron*, 18 (2):243-255.
- Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R. 1999. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol*, 79:189-201.
- Leite JP, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Yeoman KM, Mathern GW. 1996. Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats. *Epilepsy Res*, 26 (1):219-231.
- Leppä E, Linden AM, Vekovischeva OY, Swinny JD, Rantanen V, Toppila E, Höger H, Sieghart W, Wulff P, Wisden W, Korpi ER. 2011. Removal of GABA(A) receptor  $\gamma 2$  subunits from parvalbumin neurons causes wide-ranging behavioral alterations. *PLoS One*, 6 (9):e24159.
- Lerma J, Herreras O, Muñoz D, Solís JM. 1984. Interactions between hippocampal penicillin spikes and theta rhythm. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 57 (6):532-540.
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinänen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K, Rivera C. 2007. KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*, 56 (6):1019-1033.
- Li KX, Lu YM, Xu ZH, Zhang J, Zhu JM, Zhang JM, Cao SX, Chen XJ, Chen Z, Luo JH, Duan S, Li XM. 2011. Neuregulin 1 regulates excitability of fast-spiking neurons through Kv1.1 and acts in epilepsy. *Nat Neurosci*, 15 (2):267-273.
- Liebmann L, Karst H, Joëls M. 2009. Effects of corticosterone and the beta-agonist isoproterenol on glutamate receptor-mediated synaptic currents in the rat basolateral amygdala. *Eur J Neurosci*, 30 (5):800-807.
- Lisman J, Buzsáki G. 2008. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr Bull*, 34 (5):974-980.
- Lisman JE, Idiart MA. 1995. Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science*, 267 (5203):1512-1515.
- Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92 (2):180-185.
- Llano O, Smirnov S, Soni S, Golubtsov A, Guillemin I, Hotulainen P, Medina I, Nothwang HG, Rivera C, Ludwig A. 2015. KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with  $\beta$ -PIX. *J Cell Biol*, 209 (5):671-686.
- Longo MR, Azañón E, Haggard P. 2010. More than skin deep: body representation beyond primary somatosensory cortex. *Neuropsychologia*, 48 (3):655-668.
- Lorenz A, Osman F, Sun W, Nandi S, Steinacher R, Whitby MC. 2012. The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis. *Science*, 336 (6088):1585-1588.
- Lu T, Trussell LO. 2001. Mixed excitatory and inhibitory GABA-mediated transmission in chick cochlear nucleus. *J Physiol*, 535 (Pt 1):125-131.
- Maccaferri G, McBain CJ. 1995. Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron*, 15 (1):137-145.

- Madisen L, Mao T, Koch H, Zhuo JM, Berenyi A, Fujisawa S, Hsu YW, Garcia AJ, Gu X, Zarella S, Kidney J, Gu H, Mao Y, Hooks BM, Boyden ES, Buzsáki G, Ramirez JM, Jones AR, Svoboda K, Han X, Turner EE, Zeng H. 2012. A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci*, 15 (5):793-802.
- Mal'kov AE, Karavaev EN, Popova IY, Kichigina VF. 2008. Changes in oscillatory activity of neurons in the medial septal area in animals with a model of chronic temporal epilepsy. *Neurosci Behav Physiol*, 38 (9):995-999.
- Malkov AE, Popova IY. 2011. Functional changes in the septal GABAergic system of animals with a model of temporal lobe epilepsy. *Gen Physiol Biophys*, 30 (3):310-320.
- Manseau F, Goutagny R, Danik M, Williams S. 2008. The hippocamposeptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro. *J Neurosci*, 28 (15):4096-4107.
- Mapelli L, Rossi P, Nieuwenhuis T, D'Angelo E. 2009. Tonic activation of GABA<sub>B</sub> receptors reduces release probability at inhibitory connections in the cerebellar glomerulus. *J Neurophysiol*, 101 (6):3089-3099.
- Marcelin B, Chauvière L, Becker A, Migliore M, Esclapez M, Bernard C. 2009. h channel-dependent deficit of theta oscillation resonance and phase shift in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 33 (3):436-447.
- Maren S. 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci*, 24:897-931.
- Maren S, Quirk GJ. 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci*, 5 (11):844-852.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*, 5 (10):793-807.
- Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Bertram EH. 1998. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*, 32 (1-2):154-171.
- Mathern GW, Pretorius JK, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli LM, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Lévesque MF, Adelson PD, Peacock WJ. 1997. Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*, 120 ( Pt 11):1937-1959.
- Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. 1977. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun*, 78 (1):237-243.
- Medina JF, Lisberger SG. 2008. Links from complex spikes to local plasticity and motor learning in the cerebellum of awake-behaving monkeys. *Nat Neurosci*, 11 (10):1185-1192.
- Mercado A, Mount DB, Gamba G. 2004. Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res*, 29 (1):17-25.
- Meyer AH, Katona I, Blatow M, Rozov A, Monyer H. 2002. In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *J Neurosci*, 22 (16):7055-7064.
- Miltner WH, Braun C, Arnold M, Witte H, Taub E. 1999. Coherence of gamma-band EEG activity as a basis for associative learning. *Nature*, 397 (6718):434-436.
- Misgeld U, Frotscher M. 1986. Postsynaptic-GABAergic inhibition of non-pyramidal neurons in the guinea-pig hippocampus. *Neuroscience*, 19 (1):193-206.

- Mitra PP, Pesaran B. 1999. Analysis of dynamic brain imaging data. *Biophys J*, 76 (2):691-708.
- Miyashita T, Shao YR, Chung J, Pourzia O, Feldman DE. 2013a. Corrigendum: Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front Neural Circuits*, 7:45.
- Miyashita T, Shao YR, Chung J, Pourzia O, Feldman DE. 2013b. Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front Neural Circuits*, 7:8.
- Mody I, Otis TS, Bragin A, Hsu M, Buzsáki G. 1995. GABAergic inhibition of granule cells and hilar neuronal synchrony following ischemia-induced hilar neuronal loss. *Neuroscience*, 69 (1):139-150.
- Mohajerani MH, Cherubini E. 2005. Spontaneous recurrent network activity in organotypic rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci*, 22 (1):107-118.
- Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*, 300 (1):2-8.
- Montgomery SM, Sirota A, Buzsáki G. 2008. Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci*, 28 (26):6731-6741.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11 (1):47-60.
- Moss SJ, Smart TG. 2001. Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci*, 2 (4):240-250.
- Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL, Delpire E, Gamba G. 1999. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem*, 274 (23):16355-16362.
- Murayama M, Pérez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, Larkum ME. 2009. Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature*, 457 (7233):1137-1141.
- Nagel G, Szellas T, Kateriya S, Adeishvili N, Hegemann P, Bamberg E. 2005. Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans*, 33 (Pt 4):863-866.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296 (5577):2395-2398.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (24):13940-13945.
- Nardou R, Yamamoto S, Chazal G, Bhar A, Ferrand N, Dulac O, Ben-Ari Y, Khalilov I. 2011. Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. *Brain*, 134 (Pt 4):987-1002.
- Neher E, Sakmann B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260 (5554):799-802.
- Newberry NR, Nicoll RA. 1984. Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 308 (5958):450-452.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol*, 233 (39):149-152.
- Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. 1990. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (24):9868-9872.
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, Yamakawa K. 2007. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis

- for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci*, 27 (22):5903-5914.
- Ogurusu T, Yanagi K, Watanabe M, Fukaya M, Shingai R. 1999. Localization of GABA receptor rho 2 and rho 3 subunits in rat brain and functional expression of homooligomeric rho 3 receptors and heterooligomeric rho 2 rho 3 receptors. *Receptors Channels*, 6 (6):463-475.
- Olsen RW, Sieghart W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev*, 60 (3):243-260.
- Olsen RW, Sieghart W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56 (1):141-148.
- Olton DS. 1979. Mazes, maps, and memory. *Am Psychol*, 34 (7):583-596.
- Otis TS, Trussell LO. 1996. Inhibition of transmitter release shortens the duration of the excitatory synaptic current at a calyceal synapse. *J Neurophysiol*, 76 (5):3584-3588.
- Overk CR, Masliah E. 2014. Pathogenesis of Synaptic Degeneration in Alzheimer's Disease and Lewy Body Disease. *Biochem Pharmacol*.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002a. Developmental neurotransmitters? *Neuron*, 36 (6):989-991.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002b. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, 3 (9):715-727.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. 1996. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci*, 16 (20):6414-6423.
- Paulmann S, Pell MD, Kotz SA. 2008. Functional contributions of the basal ganglia to emotional prosody: evidence from ERPs. *Brain Res*, 1217:171-178.
- Payne JA. 1997. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> regulation. *Am J Physiol*, 273 (5 Pt 1):C1516-1525.
- Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF. 1996. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem*, 271 (27):16245-16252.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci*, 26 (4):199-206.
- Penttonen M, Kamondi A, Acsády L, Buzsáki G. 1998. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur J Neurosci*, 10 (2):718-728.
- Pettersen KH, Devor A, Ulbert I, Dale AM, Einevoll GT. 2006. Current-source density estimation based on inversion of electrostatic forward solution: effects of finite extent of neuronal activity and conductivity discontinuities. *J Neurosci Methods*, 154 (1-2):116-133.
- Pettit DL, Wang SS, Gee KR, Augustine GJ. 1997. Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors. *Neuron*, 19 (3):465-471.
- Phelps ME. 2006. PET : physics, instrumentation, and scanners. New York: Springer.
- Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, 106 (2):274-285.
- Pouille F, Scanziani M. 2001. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*, 293 (5532):1159-1163.
- Purves D, Williams SM. 2001. Neuroscience. 2nd Aufl. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.

- Rácz A, Ponomarenko AA, Fuchs EC, Monyer H. 2009. Augmented hippocampal ripple oscillations in mice with reduced fast excitation onto parvalbumin-positive cells. *J Neurosci*, 29 (8):2563-2568.
- Radu I, Bamann C, Nack M, Nagel G, Bamberg E, Heberle J. 2009. Conformational changes of channelrhodopsin-2. *J Am Chem Soc*, 131 (21):7313-7319.
- Ramón y Cajal S. 1899. Comparative study of the sensory areas of the human cortex. Harvard University.
- Ramón y Cajal S. 1911. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Paris: Maloine.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci*, 3 (3):238-244.
- RASMUSSEN T, PENFIELD W. 1947. Further studies of the sensory and motor cerebral cortex of man. *Fed Proc*, 6 (2):452-460.
- Rawlins JN, Olton DS. 1982. The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behav Brain Res*, 5 (4):331-358.
- Razik DS, Hawellek DJ, Antkowiak B, Hentschke H. 2013. Impairment of GABA transporter GAT-1 terminates cortical recurrent network activity via enhanced phasic inhibition. *Front Neural Circuits*, 7:141.
- Real MA, Dávila JC, Guirado S. 2003. Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum. *J Chem Neuroanat*, 25 (3):151-160.
- Reddy DS. 2011. Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2:38.
- Reddy DS, Kulkarni SK. 1998. The role of GABA-A and mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptors on the effects of neurosteroids on food intake in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 137 (4):391-400.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. 1999. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397 (6716):251-255.
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipilä S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K. 2004. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci*, 24 (19):4683-4691.
- Rodriguez E, George N, Lachaux JP, Martinerie J, Renault B, Varela FJ. 1999. Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature*, 397 (6718):430-433.
- Rossignol E. 2011. Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural Plast*, 2011:649325.
- Rossignol E, Kruglikov I, van den Maagdenberg AM, Rudy B, Fishell G. 2013. Ca<sub>v</sub>2.1 ablation in cortical interneurons selectively impairs fast-spiking basket cells and causes generalized seizures. *Ann Neurol*, 74 (2):209-222.
- Rotstein HG, Pervouchine DD, Acker CD, Gillies MJ, White JA, Buhl EH, Whittington MA, Kopell N. 2005. Slow and fast inhibition and an H-current interact to create a theta rhythm in a model of CA1 interneuron network. *J Neurophysiol*, 94 (2):1509-1518.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. 2011. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol*, 71 (1):45-61.
- Russo RE, Hounsgaard J. 1999. Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Prog Biophys Mol Biol*, 72 (4):329-365.
- Saito H, Okada M, Miki T, Wakamori M, Futatsugi A, Mori Y, Mikoshiba K, Suzuki N. 2009. Knockdown of Cav2.1 calcium channels is sufficient to induce neurological disorders observed in natural occurring *Cacna1a* mutants in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 390 (3):1029-1033.

- Samii A, Nutt JG, Ransom BR. 2004. Parkinson's disease. *Lancet*, 363 (9423):1783-1793.
- Santos SF, Rebelo S, Derkach VA, Safronov BV. 2007. Excitatory interneurons dominate sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat. *J Physiol*, 581 (Pt 1):241-254.
- Savić N, Pedarzani P, Sciancalepore M. 2001. Medium afterhyperpolarization and firing pattern modulation in interneurons of stratum radiatum in the CA3 hippocampal region. *J Neurophysiol*, 85 (5):1986-1997.
- Schwaller B, Tetko IV, Tandon P, Silveira DC, Vreugdenhil M, Henzi T, Potier MC, Celio MR, Villa AE. 2004. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Mol Cell Neurosci*, 25 (4):650-663.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. 1995. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, 23 (24):5080-5081.
- Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B. 2010. Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature*, 465 (7295):231-235.
- Scimemi A. 2014. Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Front Cell Neurosci*, 8:161.
- Seja P, Schonewille M, Spitzmaul G, Badura A, Klein I, Rudhard Y, Wisden W, Hübner CA, De Zeeuw CI, Jentsch TJ. 2012. Raising cytosolic Cl<sup>-</sup> in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning. *EMBO J*, 31 (5):1217-1230.
- Senior TJ, Huxter JR, Allen K, O'Neill J, Csicsvari J. 2008. Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurosci*, 28 (9):2274-2286.
- Shao X, Somlo S, Igarashi P. 2002. Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J Am Soc Nephrol*, 13 (7):1837-1846.
- Shepherd GM. 2004. *The synaptic organization of the brain*. 5th Aufl. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Shoham S, O'Connor DH, Sarkisov DV, Wang SS. 2005. Rapid neurotransmitter uncaging in spatially defined patterns. *Nat Methods*, 2 (11):837-843.
- Silberberg G, Markram H. 2007. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron*, 53 (5):735-746.
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL. 2002. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (13):8689-8694.
- Singer T. 2012. The past, present and future of social neuroscience: a European perspective. *Neuroimage*, 61 (2):437-449.
- Singer W. 1993. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu Rev Physiol*, 55:349-374.
- Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsáki G. 2008. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*, 60 (4):683-697.
- Sloviter RS. 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*, 235 (4784):73-76.
- Smirnov S, Paalasmaa P, Uusisaari M, Voipio J, Kaila K. 1999. Pharmacological isolation of the synaptic and nonsynaptic components of the GABA-mediated

- biphasic response in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, 19 (21):9252-9260.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317 (6034):230-234.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459 (7247):698-702.
- Solís JM, Nicoll RA. 1992. Pharmacological characterization of GABAB-mediated responses in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J Neurosci*, 12 (9):3466-3472.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*, 562 (Pt 1):9-26.
- Staba RJ, Wilson CL, Bragin A, Fried I, Engel J. 2002. Quantitative analysis of high-frequency oscillations (80-500 Hz) recorded in human epileptic hippocampus and entorhinal cortex. *J Neurophysiol*, 88 (4):1743-1752.
- Staley KJ, Mody I. 1992. Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol*, 68 (1):197-212.
- Stark E, Roux L, Eichler R, Senzai Y, Royer S, Buzsáki G. 2014. Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations. *Neuron*, 83 (2):467-480.
- Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hübner CA. 2004. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol*, 468 (1):57-64.
- Steriade M. 2005. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci*, 28 (6):317-324.
- Stewart M, Fox SE. 1990. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci*, 13 (5):163-168.
- Stocco A, Lebiere C, Anderson JR. 2010. Conditional routing of information to the cortex: a model of the basal ganglia's role in cognitive coordination. *Psychol Rev*, 117 (2):541-574.
- Sun HY, Lyons SA, Dobrunz LE. 2005. Mechanisms of target-cell specific short-term plasticity at Schaffer collateral synapses onto interneurons versus pyramidal cells in juvenile rats. *J Physiol*, 568 (Pt 3):815-840.
- Sutula TP. 1990. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*, 31 Suppl 3:S45-54.
- Swann JW, Al-Noori S, Jiang M, Lee CL. 2000. Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus*, 10 (5):617-625.
- Swartz BE. 1998. The advantages of digital over analog recording techniques. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 106 (2):113-117.
- Szabadics J, Lorincz A, Tamás G. 2001. Beta and gamma frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons. *J Neurosci*, 21 (15):5824-5831.
- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G. 2006. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*, 311 (5758):233-235.
- Szobota S, McKenzie C, Janovjak H. 2013. Optical control of ligand-gated ion channels. *Methods Mol Biol*, 998:417-435.
- Tai C, Abe Y, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. 2014. Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (30):E3139-3148.

- Takayama C, Inoue Y. 2006. Developmental localization of potassium chloride co-transporter 2 in granule cells of the early postnatal mouse cerebellum with special reference to the synapse formation. *Neuroscience*, 143 (3):757-767.
- Tamás G, Buhl EH, Lörincz A, Somogyi P. 2000. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci*, 3 (4):366-371.
- Tan GH, Liu YY, Hu XL, Yin DM, Mei L, Xiong ZQ. 2011. Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci*, 15 (2):258-266.
- Teichberg VI. 1991. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J*, 5 (15):3086-3091.
- Thach WT. 2014. Does the cerebellum initiate movement? *Cerebellum*, 13 (1):139-150.
- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51 (3):503-512.
- Tomson T. 2000. Mortality in epilepsy. *J Neurol*, 247 (1):15-21.
- Tononi G, Sporns O, Edelman GM. 1994. A measure for brain complexity: relating functional segregation and integration in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (11):5033-5037.
- Tort AB, Rotstein HG, Dugladze T, Gloveli T, Kopell NJ. 2007. On the formation of gamma-coherent cell assemblies by oriens lacunosum-moleculare interneurons in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (33):13490-13495.
- Tort AB, Kramer MA, Thorn C, Gibson DJ, Kubota Y, Graybiel AM, Kopell NJ. 2008. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (51):20517-20522.
- Tóth K, Freund TF, Miles R. 1997. Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J Physiol*, 500 ( Pt 2):463-474.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9):4350-4354.
- Traub RD, Wong RK. 1982. Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy. *Science*, 216 (4547):745-747.
- Traub RD, Bibbig A. 2000. A model of high-frequency ripples in the hippocampus based on synaptic coupling plus axon-axon gap junctions between pyramidal neurons. *J Neurosci*, 20 (6):2086-2093.
- Traub RD, Whittington MA, Colling SB, Buzsáki G, Jefferys JG. 1996. Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J Physiol*, 493 ( Pt 2):471-484.
- Traub RD, Spruston N, Soltesz I, Konnerth A, Whittington MA, Jefferys GR. 1998. Gamma-frequency oscillations: a neuronal population phenomenon, regulated by synaptic and intrinsic cellular processes, and inducing synaptic plasticity. *Prog Neurobiol*, 55 (6):563-575.
- Treiman DM. 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia*, 42 Suppl 3:8-12.
- Trombin F, Gnatkovsky V, de Curtis M. 2011. Changes in action potential features during focal seizure discharges in the entorhinal cortex of the in vitro isolated guinea pig brain. *J Neurophysiol*, 106 (3):1411-1423.
- Ulrich D, Huguenard JR. 1996. Gamma-aminobutyric acid type B receptor-dependent burst-firing in thalamic neurons: a dynamic clamp study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (23):13245-13249.
- Uvarov P, Pruunsild P, Timmusk T, Airaksinen MS. 2005. Neuronal K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter (KCC2) transgenes lacking neurone restrictive silencer element

- recapitulate CNS neurone-specific expression and developmental up-regulation of endogenous KCC2 gene. *J Neurochem*, 95 (4):1144-1155.
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*, 10 (4):272-282.
- Varga V, Hangya B, Kránitz K, Ludányi A, Zemankovics R, Katona I, Shigemoto R, Freund TF, Borhegyi Z. 2008. The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum. *J Physiol*, 586 (16):3893-3915.
- Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, Mucke L, Palop JJ. 2012. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*, 149 (3):708-721.
- Vertes RP, Kocsis B. 1997. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81 (4):893-926.
- Viitanen T, Ruusuvuori E, Kaila K, Voipio J. 2010. The K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus. *J Physiol*, 588 (Pt 9):1527-1540.
- Vinogradova OS. 1995. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol*, 45 (6):523-583.
- Vyazovskiy VV, Harris KD. 2013. Sleep and the single neuron: the role of global slow oscillations in individual cell rest. *Nat Rev Neurosci*, 14 (6):443-451.
- Wald G. 1968. Molecular basis of visual excitation. *Science*, 162 (3850):230-239.
- Walker FO. 2007. Huntington's Disease. *Semin Neurol*, 27 (2):143-150.
- Wang H, Zylka MJ. 2009. Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons. *J Neurosci*, 29 (42):13202-13209.
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Wang D, Zhang F, Boyden E, Deisseroth K, Kasai H, Hall WC, Feng G, Augustine GJ. 2007. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (19):8143-8148.
- Wang JH, Kelly PT. 1997. Attenuation of paired-pulse facilitation associated with synaptic potentiation mediated by postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol*, 78 (5):2707-2716.
- Wang JH, Kelly P. 2001. Calcium-calmodulin signalling pathway up-regulates glutamatergic synaptic function in non-pyramidal, fast spiking rat hippocampal CA1 neurons. *J Physiol*, 533 (Pt 2):407-422.
- Wang L, Liu YH, Huang YG, Chen LW. 2008. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res*, 1241:157-167.
- Wang XJ, Buzsáki G. 1996. Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci*, 16 (20):6402-6413.
- Watanabe D, Inokawa H, Hashimoto K, Suzuki N, Kano M, Shigemoto R, Hirano T, Toyama K, Kaneko S, Yokoi M, Moriyoshi K, Suzuki M, Kobayashi K, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S. 1998. Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination. *Cell*, 95 (1):17-27.
- Wen L, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Matsuzaka Y, Mushiake H, Ishizuka T, Yawo H. 2010. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. *PLoS One*, 5 (9):e12893.

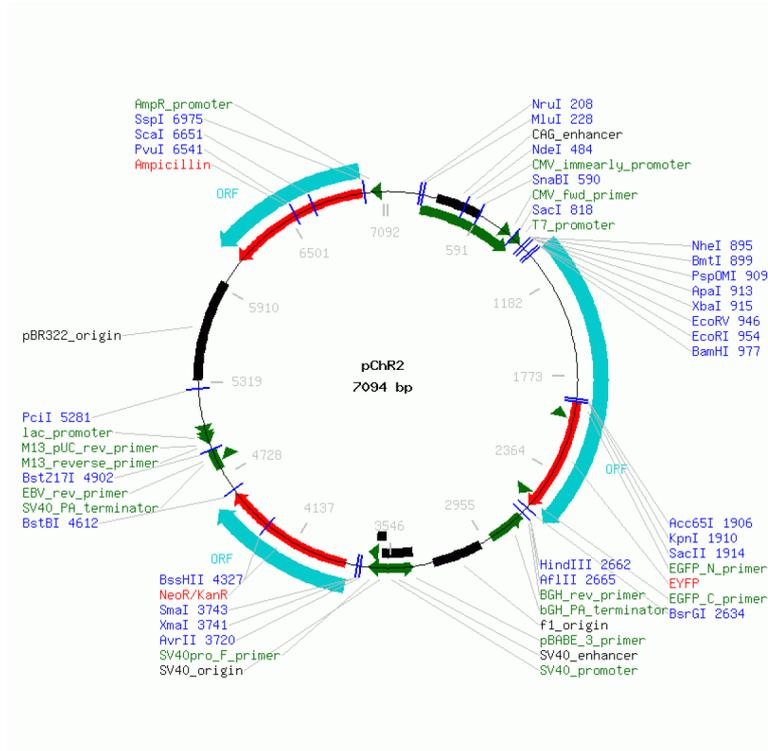
- Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA. 1999. The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *J Biol Chem*, 274 (18):12656-12664.
- Wilson CL, Khan SU, Engel J, Isokawa M, Babb TL, Behnke EJ. 1998. Paired pulse suppression and facilitation in human epileptogenic hippocampal formation. *Epilepsy Res*, 31 (3):211-230.
- Witter MP. 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:43-61.
- Wittner L, Maglóczy Z, Borhegyi Z, Halász P, Tóth S, Eross L, Szabó Z, Freund TF. 2001. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, 108 (4):587-600.
- Wittner L, Huberfeld G, Clémenceau S, Eross L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Maglóczy Z, Miles R. 2009. The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain*, 132 (Pt 11):3032-3046.
- Wonders CP, Anderson SA. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 7 (9):687-696.
- Woodruff AR, Sah P. 2007. Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. *J Neurosci*, 27 (3):553-563.
- Wranke C. 2012. Der Einfluss von Emotionen auf das logische Denken.
- Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. 2009. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell*, 137 (7):1225-1234.
- Wulff P, Ponomarenko AA, Bartos M, Korotkova TM, Fuchs EC, Böhner F, Both M, Tort AB, Kopell NJ, Wisden W, Monyer H. 2009. Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (9):3561-3566.
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA. 1998. Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science*, 281 (5379):985-988.
- Xiong W, Jin X. 2012. Optogenetic field potential recording in cortical slices. *J Neurosci Methods*, 210 (2):119-124.
- Xu J, He L, Wu LG. 2007. Role of Ca(2+) channels in short-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 17 (3):352-359.
- Ylinen A, Káráviáinen R, Riekkinen PJ. 1995a. Long-term efficacy and cognitive effects of vigabatrin. *Acta Neurol Scand Suppl*, 162:47-50.
- Ylinen A, Soltósz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, Buzsáki G. 1995b. Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 5 (1):78-90.
- Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I, Sik A, Buzsáki G. 1995c. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci*, 15 (1 Pt 1):30-46.
- Yoder RM, Pang KC. 2005. Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus*, 15 (3):381-392.
- Yuste R. 2005. Origin and classification of neocortical interneurons. *Neuron*, 48 (4):524-527.
- Zaun DP. 1999. Künstliche neuronale Netze und Computerlinguistik. Tübingen: Niemeyer.
- Zhang D, Pan ZH, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA. 1995. Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (25):11756-11760.
- Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K. 2006. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods*, 3 (10):785-792.

- Zhang F, Aravanis AM, Adamantidis A, de Lecea L, Deisseroth K. 2007a. Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat Rev Neurosci*, 8 (8):577-581.
- Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K. 2007b. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446 (7136):633-639.
- Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G. 2011. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods*, 8 (9):745-752.
- Zhou FM, Liang Y, Dani JA. 2001. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci*, 4 (12):1224-1229.
- Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E. 2008. NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res*, 79 (2-3):201-212.
- Ziemann U, Rothwell JC, Ridding MC. 1996. Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. *J Physiol*, 496 ( Pt 3):873-881.
- Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64:355-405.

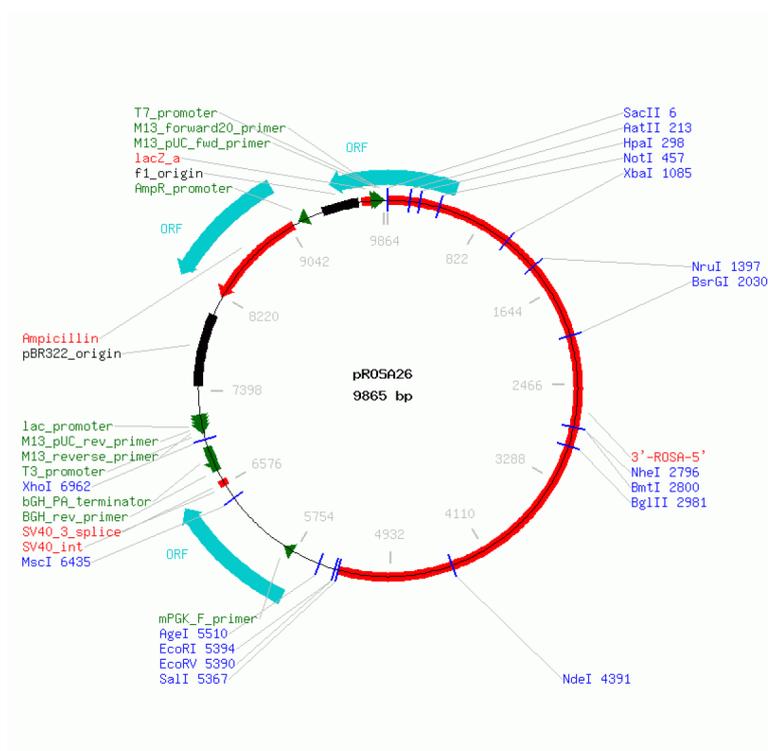
## 8 Anhang

### 8.1 Plasmidkarten

#### pCMV-ChR2-YFP



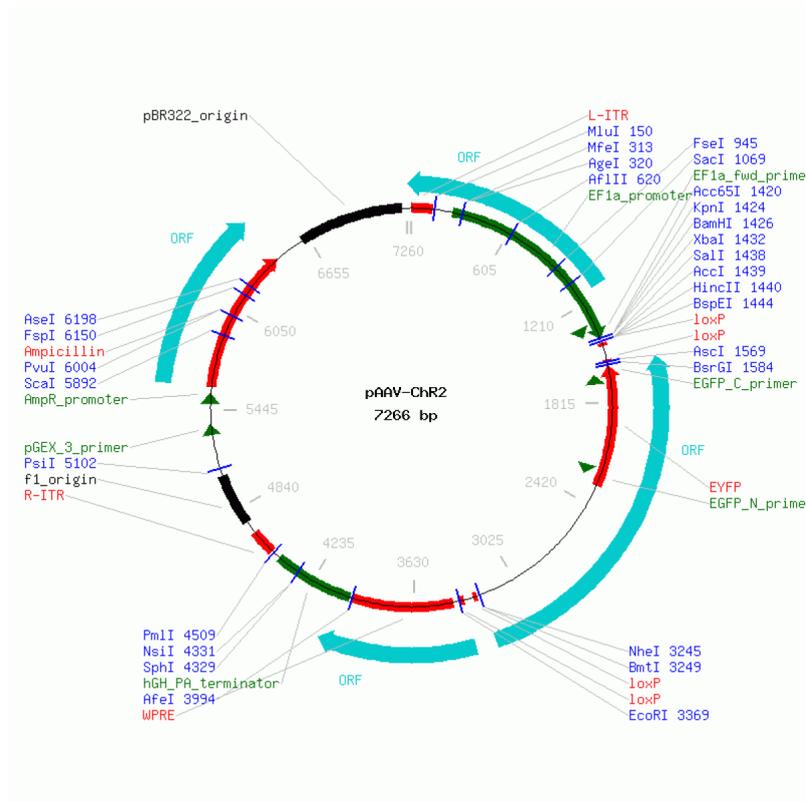
#### pROSA26 (<http://research.mssm.edu/soriano/lab/rosa26.html>)



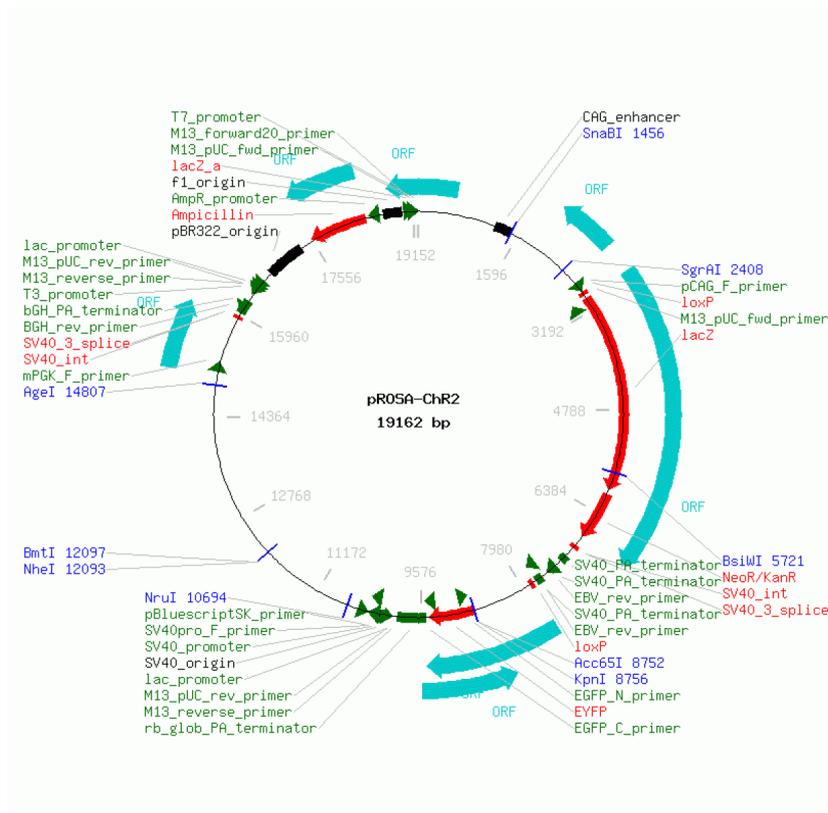


pAAV-ChR2 (pAAV-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-pA)

[http://www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/sequence\\_info.html](http://www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/sequence_info.html)



pROSA-ChR2



## 8.2 Elektrophysiologie – Tabellen

**Tabelle 4:** Messung exzitatorischer Feldpotentiale nach dem *Paired-Pulse*-Paradigma im Kortex Position 1. Im Vergleich zum WT zeigten HET und KO signifikant verminderte *Paired-Pulse* Raten (fESPS2/fESPS1) bei den ISI von 9, 15, 20 und 30 ms. (SEM = mittlerer Standardfehler, P = Wahrscheinlichkeit)

ISI	WT		HET			KO		
	fESPS2/fESPS1	SEM	fESPS2/fESPS1	SEM	P	fESPS2/fESPS1	SEM	P
6 ms	0,35	0,03	0,19	0,03	P<0,01	0,23	0,02	P<0,05
9 ms	0,61	0,03	0,38	0,04	P<0,001	0,42	0,03	P<0,001
15 ms	0,81	0,04	0,55	0,05	P<0,001	0,62	0,04	P<0,001
20 ms	0,91	0,04	0,63	0,05	P<0,001	0,71	0,04	P<0,001
30 ms	1,00	0,03	0,76	0,05	P<0,001	0,82	0,04	P<0,001
50 ms	1,03	0,03	0,87	0,05	P<0,05	0,97	0,03	P>0,05

**Tabelle 5:** Messung exzitatorischer Feldpotentiale nach dem *Paired-Pulse*-Paradigma im Kortex Position 2. Die *Paired-Pulse*-Raten waren bei HET und KO während der ersten ISI reduziert.

ISI	WT		HET			KO		
	fESPS2/fESPS1	SEM	fESPS2/fESPS1	SEM	P	fESPS2/fESPS1	SEM	P
6 ms	0,24	0,03	0,05	0,03	P<0,001	0,15	0,03	P>0,05
9 ms	0,39	0,04	0,18	0,04	P<0,001	0,28	0,03	P>0,05
15 ms	0,56	0,04	0,33	0,05	P<0,001	0,41	0,03	P<0,01
20 ms	0,66	0,04	0,44	0,05	P<0,001	0,48	0,03	P<0,001
30 ms	0,76	0,05	0,59	0,05	P<0,01	0,60	0,03	P<0,01
50 ms	0,88	0,04	0,78	0,05	P > 0,05	0,77	0,03	P>0,05

**Tabelle 6:** Messung exzitatorischer Feldpotentiale nach dem *Paired-Pulse*-Paradigma im *Stratum pyramidale* in WT, HET und KO. Signifikante Unterschiede waren für die ersten 4 ISI (6-20 ms), jedoch nicht bei längeren Messungen detektierbar.

ISI	WT		HET			KO		
	fESPS2/fESPS1	SEM	fESPS2/fESPS1	SEM	P	fESPS2/fESPS1	SEM	P
6 ms	0,81	0,09	0,23	0,02	P<0,001	0,14	0,02	P<0,001
9 ms	0,98	0,07	0,45	0,05	P<0,001	0,33	0,05	P<0,001
15 ms	1,21	0,07	0,78	0,07	P<0,001	0,65	0,08	P<0,001
20 ms	1,35	0,07	1,03	0,07	P<0,05	0,94	0,07	P<0,001
30 ms	1,50	0,07	1,30	0,05	P>0,05	1,24	0,05	P<0,05
50 ms	1,58	0,07	1,35	0,05	P>0,05	1,41	0,05	P>0,05

**Tabelle 7:** Messung exzitatorischer Feldpotentiale nach dem *Paired-Pulse*-Paradigma im *Stratum radiatum* in WT, HET und KO mit verschiedenen ISI. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden.

ISI	WT		HET			KO		
	fESPS2/fESPS1	SEM	fESPS2/fESPS1	SEM	P	fESPS2/fESPS1	SEM	P
6 ms	1,01	0,04	0,92	0,04	P>0,05	0,95	0,04	P>0,05
9 ms	1,11	0,04	1,06	0,04	P>0,05	1,08	0,03	P>0,05
15 ms	1,24	0,03	1,22	0,03	P>0,05	1,24	0,03	P>0,05
20 ms	1,30	0,03	1,31	0,03	P>0,05	1,31	0,03	P>0,05
30 ms	1,39	0,03	1,39	0,03	P>0,05	1,36	0,03	P>0,05
50 ms	1,41	0,03	1,39	0,03	P>0,05	1,40	0,03	P>0,05

**Tabelle 8:** Messung kortikaler und hippocampaler CA1 Pyramidenzellen. Die detektierte Peakamplitude wies keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO auf.

	WT		KO		
	Amplitude [pA]	SEM	Amplitude [pA]	SEM	t-test
sIPSCs Kortex	28,22	3,45	26,32	2,35	0,6553
mIPSCs Kortex	22,72	1,67	21,85	1,82	0,7333
sIPSCs CA1	35,41	3,83	33,93	2,21	0,75
mIPSCs CA1	31,17	3,48	28,83	3,27	0,64

**Tabelle 9:** Messung kortikaler und hippocampaler CA1 Pyramidenzellen. Die detektierte Frequenz war jeweils im KO signifikant erhöht.

	WT		KO		
	Frequenz [Hz]	SEM	Frequenz [Hz]	SEM	t-test
sIPSCs Kortex	5,50	0,45	8,18	0,74	0,007
mIPSCs Kortex	5,77	0,94	6,22	0,91	0,741
sIPSCs CA1	4,83	0,94	10,72	2,31	0,040
mIPSCs CA1	6,63	1,53	8,01	1,79	0,580

**Tabelle 10:** EEG-Analyse des theta-Frequenzbandes. Theta Power (Amplitude) und SEM in [V<sup>2</sup>]. Im Kortex (Cx1) und *Stratum oriens* waren signifikante Unterschiede zu detektieren

	WT		KO		HET		WT vs. KO	WT vs. HET	KO vs HET
	theta Power	SEM	theta Power	SEM	theta Power	SEM			
Cx1	1,01E+05	3,01E+04	7,37E+04	1,88E+04	2,08E+05	3,48E+04	0,4595	0,0431	0,0080
Cx2	4,51E+05	1,01E+05	1,92E+05	3,94E+04	3,37E+05	6,28E+04	0,0540	0,3669	0,0784
Ori	1,46E+06	5,45E+05	5,17E+05	1,72E+05	3,05E+06	9,27E+05	0,1601	0,1730	0,0361
Pyr	3,77E+06	8,53E+05	2,34E+06	7,11E+05	1,55E+06	6,08E+05	0,2259	0,0632	0,4184
Rad-LM	6,05E+06	1,56E+06	2,99E+06	8,59E+05	5,50E+06	1,08E+06	0,1300	0,7784	0,0961

**Tabelle 11:** Analyse der Modulation zwischen gamma- und theta-Frequenzband

	WT		KO		HET		p		
	theta Power	SEM	theta Power	SEM	theta Power	SEM	WT vs. KO	WT vs. HET	KO vs HET
Cx1	0,0005794	0,0002639	0,001228	0,0005370	0,0007795	0,0002516	0,3101	0,5952	0,4714
Cx2	0,005863	0,001842	0,002975	0,001366	0,006194	0,002325	0,2395	0,9135	0,2631
Ori	0,004377	0,0009892	0,003336	0,001072	0,002047	0,0005069	0,4916	0,0743	0,3086
Pyr	0,006969	0,001971	0,001565	0,0003811	0,002273	0,0006020	0,0432	0,0717	0,3437
Rad	0,009317	0,002145	0,006965	0,001776	0,004481	0,0007360	0,418	0,0769	0,2323

### 8.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung - FISH

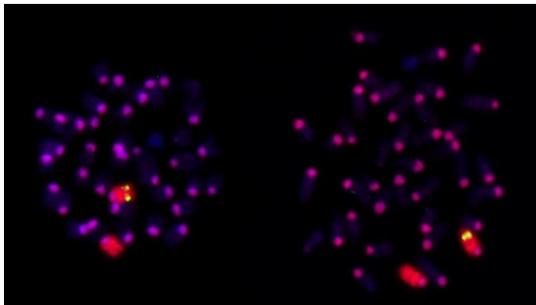
(Nadezda Kosyakova)

Die Milz der Versuchstiere wurde entnommen, gekühlt homogenisiert und kultiviert. Nach dem Ernten konnten bei vielen mit Methanol und Essigsäure fixierten Zellen Metaphasen detektiert werden. Für eine markierte Sonde diente die in den ROSA26-Locus eingebrachte Sequenz als Matrize.

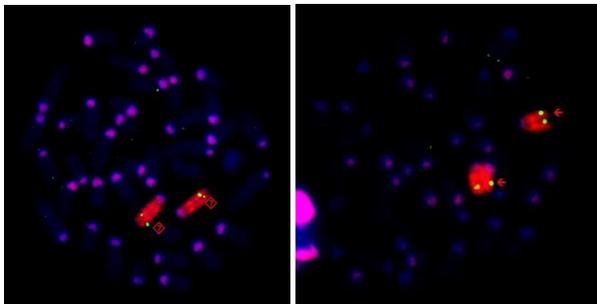
lila/blau = Chromosomen-Marker

rot = Chromosom 6-Marker

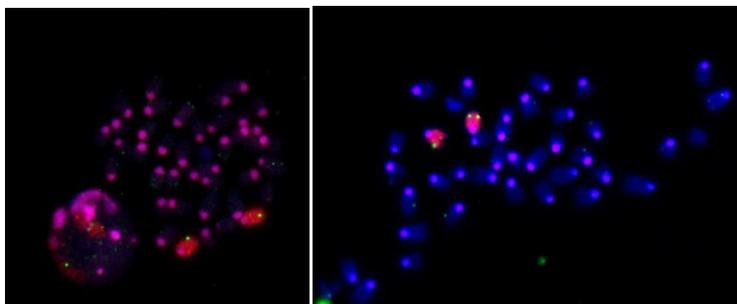
grün = loxP-NEO-Stop-loxP-ChR-EYFP-Sonde



$\text{ChR}^{\text{flox}/-}, \text{cre}^-$



$\text{ChR}^{\text{flox}/\text{flox}}, \text{cre}^-$



$\text{ChR}^{\text{flox}/\text{flox}}, \text{cre}^+$  (mit partieller Rekombination, sodass die Sonde nicht binden kann)

## 8.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Hübner gilt mein besonderer Dank für die Überlassung und ständige Weiterentwicklung eines interessanten Themas, seine engagierte Betreuung während der gesamten Dissertation, seine ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen sowie sein Interesse am Gelingen dieser Arbeit. Ebenso dankbar bin ich an seiner fortwährenden Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Für die Bereitschaft als Gutachter aufzutreten, danke ich Herrn Prof. Dr. Aria Baniahmad, Herrn Prof. Dr. Dirk Isbrandt und Herrn Prof. Dr. Christian Hübner. Für ihre Unterstützung bei der Erzeugung des konditionalen ChR2 Knock-Ins (KI) danke ich Dr. Antje Hübner und Katrin Schorr. Für Ihre umsichtige und aufmerksame Betreuung meiner Mäuse danke ich Maria Zimmermann, Petra Schroth, Sabine Dolke und Volker Dix in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Jena.

Für den regen Gedankenaustausch und die unkomplizierte Durchführung der Elektroenzephalographie-Experimente in Hamburg möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Dirk Isbrandt und seinen Kollegen bedanken. Für die Bereitstellung der konditionalen KCC2 KO sowie der Cre-Deleter Mauslinie danke ich Herrn Prof. Dr. Hübner, für die tdTomato-Reportermaus Herrn Prof. Dr. Knut Holthoff. Im Zusammenhang des ChR2-Projekts möchte ich mich für die tatkräftige und materielle Unterstützung bei Dr. Carsten Wagner, Prof. Dr. Valentin Stein, Jan Herb, Nadezda Kosyakova und der Gruppe um Prof. Dr. Karl Deisseroth bedanken.

Ich danke allen meinen Freunden und Laborkollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die offenen Ohren und die Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde, herzlich danken. Insbesondere Tobias Ulbricht und Sebastian Hölter sowie Christopher Hennings, Christoph Heinze, Theresa Heinrich, Mukhran Khundadze, Florian Kraft und besonders Lutz Liebmann für seine Geduld und motivierenden Worte möchte ich hervorheben.

Und schließlich ein Dankeschön an meine Familie für ihren steten Zuspruch, ihren Beistand und vor allem ihre Geduld.

### **8.5 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Christian Hübner, Dr. Lutz Liebmann und Dr. Tobias Ulbricht, Dr. Sebastian Hölters,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. med. Christian Hübner am Universitätsklinikum Jena, Institut für Humangenetik angefertigt.

Coburg, 25. Juli 2018

Ralf Dittmann