



Die physiologische Funktion der GABAA Autorezeptoren im Kleinhirn

Joël Chavas

► **To cite this version:**

Joël Chavas. Die physiologische Funktion der GABAA Autorezeptoren im Kleinhirn. Diplomarbeit from Joel Chavas at the university of Goettingen. Supervisor: Dr Alain Marty. 1999. <hal-00770779>

HAL Id: hal-00770779

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00770779>

Submitted on 7 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Die physiologische Funktion der GABA_A-Autorezeptoren im Kleinhirn

*Diplomarbeit im Fach Biologie
vorgelegt von Joël CHAVAS
aus Pélussin (Frankreich)
angefertigt im
Max Planck-Institut für biophysikalische Chemie,
Göttingen, 1998-99
Unter der Leitung von Alain Marty*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Korb- und Sternzellen in der Molekularschicht des Kleinhirns	4
1.2	Mögliche physiologische Wirkung der Autorezeptoren	5
1.3	Präsynaptische Inhibition und GABA _A -Autorezeptoren	6
1.3.1	Präsynaptische Inhibition im Rückenmark	6
1.3.2	Präsynaptische Inhibition im Hypophysenhinterlappen	7
1.4	GABA _A -Autorezeptoren im Kleinhirn	9
1.5	Ziel der Diplomarbeit	10
2	Experimentelle Methoden	11
2.1	Präparation und Anfertigung von Dünnschnitten	11
2.2	Verwendete Lösungen	11
2.3	"Cell-attached" Experimente	12
2.3.1	Stimulationsprotokoll	12
2.3.2	Datenaufnahme und -auswertung	13
2.4	"Whole-cell"-Experimente	13
2.4.1	Messung der Erregbarkeit der Interneurone	13
2.5	Messung der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle	13
2.5.1	Stimulationsprotokoll	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Abschätzung des Umkehrpotentials von GABA _A -Leitfähigkeiten	15
3.1.1	Verschiedene Methoden zur Messung des GABA _A Umkehrpotentials	15
3.1.2	BK-Kanäle	16
3.1.3	Bestimmung der Muscimol-induzierten Depolarisierung	17
3.1.4	Bestimmung des Umkehrpotentials von Chloridionen	18
3.1.5	Wahl der "physiologischen" intrazellulären Lösung P	19
3.1.6	Bestimmung des "Junction-Potentials" der Lösung P	19
3.2	Kontrollversuche	20
3.2.1	Abschätzung von g_{GABA_A}	20
3.2.2	Entspricht $E_{GABA_A} = E_{Cl}$?	21
3.2.3	Über die Konstanz von E_{GABA_A}	23
3.3	Ein durch GABA _A -R induzierter Strom ist depolarisierend und excitatorisch	23
3.3.1	Das GABA _A -Autorezeptor-Potential	23
3.3.2	Der gabaerge postsynaptische Strom	27

3.3.3	Eine dauerhafte Applikation von GABA oder Muscimol unterdrückt Aktionspotentiale	28
3.4	Die Öffnungswahrscheinlichkeit p von BK-Kanäle verändert sich durch eine dauerhafte Applikation von Muscimol	28
3.4.1	Diese Veränderung von p ist mit Cadmium blockierbar	28
3.4.2	Mechanismus der Veränderung von p	30
4	Diskussion der Versuchsergebnisse	31
4.1	Diskussion der Richtigkeit der Annahme $E_{GABA_A} > V_m$	31
4.2	Verschiedene Effekte einer kurzen Freisetzung und einer dauerhaften Applikation von GABA	33
4.3	Wirkung von $GABA_A$ -Autorezeptoren	34
4.3.1	$GABA_A$ -Autorezeptoren und Calcium	34
4.3.2	$GABA_A$ -Autorezeptoren und "Paired-Pulse Depression"	35
4.3.3	$GABA_A$ -Autorezeptoren und Aktivität des neuronalen Netzes	36
5	Zusammenfassung	36

1 Einleitung

1.1 Korb- und Sternzellen in der Molekularschicht des Kleinhirns

Das Zerebellum besteht aus der Körnerschicht mit sehr dicht gepackten kleinen Körnerzellen, der Purkinje-Zellschicht und der Molekularschicht, ein dichtes Geflecht von Dendriten der Purkinje und Golgizellen sowie der Parallelfasern. 2D-Purkinje-Dendriten liegen in der Molekularschicht.

In der funktionellen Einheit des Zerebellums gibt es zwei Hauptschaltkreise: zum einem bilden Kletterfasern, die aus der unteren Olive stammen, monosynaptische und starke Kontakte mit Purkinjezellen aus, zum anderen stehen Moosfasern, deren Axone aus pontinen Neuronen stammen, über exzitatorische Synapsen mit Körnerzellen in Kontakt; Parallelfasern, die zu Körnerzellen gehören, haben exzitatorische Kontakte mit Purkinjezellen. Purkinjezellen bilden die einzigen Ausgangselemente der Kleinhirnrinde und projizieren via inhibitorische gabaerge Synapsen zu den Vestibulariskernen.

Sternzellen, Korbzellen und Golgizellen sind lokale gabaerge Interneurone; Stern- und Korbzellen, die in der Molekularschicht liegen, werden später noch ausführlich behandelt.

Sternzellen liegen in den oberen Zwei-Dritteln der Molekularschicht. Je höher in der Molekularschicht, desto kleiner sind die Sternzellen. Ihr Durchmesser beträgt 5-9 μm . Die Axone, die 450 μm Länge erreichen können, liegen parallel zu den Oberflächen der Purkinje-Dendriten; es gibt sechszehnmal mehr Sternzellen als Purkinjezellen.

Korbzellen liegen in der Umgebung der Purkinje-Zellschicht. Ihre Dendriten liegen in der Molekularschicht bis zu einer Distanz von 300 μm des Kernes. Ihre Axone liegen parallel zu der Oberfläche der Purkinje-Dendriten senkrecht zu den Parallelfasern. Sie können bis zu einer Distanz von 20 Purkinjezelle-Kernen ziehen und haben synaptische Kontakte mit 150 Purkinjezellen; die Spezifität der Axone der Korbzelle sind die Kollateralen, die den Kern der Purkinjezellen komplett umhüllen. Es gibt sechsmal mehr Korbzellen als Purkinjezellen und jede Purkinjezelle empfängt synaptische Kontakte von 20-30 verschiedenen Korbzellen.

Stern- und Basketzellen empfangen excitatorische Signale von Parallelfasern und Kletterfasern und gabaerge Synapsen von Axonkollateralen der Purkinjezellen und von anderen Korb- und Sternzellen. Sie innervieren Purkinjezellen und andere Stern- und Korbzellen.

Bei einer solchen Komplexität (wie in anderen Teilen des Gehirns) stellt sich die Frage, was für eine Rolle solche Interneurone spielen; dass wir nicht genau die Funktion des Wurms kennen, macht die Antwort komplizierter. Ei-

ne der möglichen Rollen der Interneurone ist es, Verbindungen zwischen sehr lokalisierten Eingängen zu machen, was die Möglichkeit einschliesst, fehlende oder überzählige Aktionspotentiale in einem Erregungsmuster auszugleichen.

In dieser Arbeit wird eine aussergewöhnliche Eigenschaft der Axone dieser Interneurone studiert: die Anwesenheit von GABA_A-Autorezeptoren.

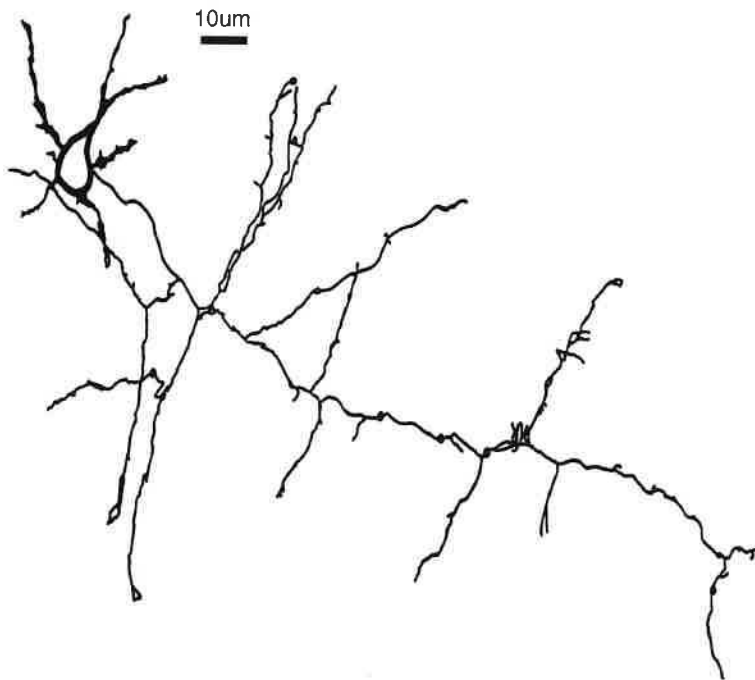


Abbildung 1: Darstellung einer Korbzelle (P14)

1.2 Mögliche physiologische Wirkung der Autorezeptoren

Der Schwerpunkt meiner Arbeit liegt auf den präsynaptischen Autorezeptoren. Definitionsgemäss liegen diese in den Axonen der Zelle.

Es gibt zwei mögliche und getrennten Effekte präsynaptischer Rezeptoren (Dudel und Kuffler 1961):

- sie wirken auf die Erregbarkeit der eigenen Zelle: ein präsynaptischer Strom induziert eine Veränderung des Membranpotentials, so dass sich in der Folge die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials verschiebt. Ausser einer unterschiedlichen Kinetik ist eine solche Wirkung ähnlich der Wirkung von postsynaptischen Ströme,

- sie wirken auf die Effektivität eines einzigen Aktionspotentials:
 - sie können die Ausbreitung von Aktionspotentialen blockieren (Zhang und Jackson 1995),
 - sie können die Form (d.h. die Amplitude und die Länge) von Aktionspotentialen verändern: dieses wirkt auf die durch Depolarisation ausgelösten Calcium-Ströme in Nerven-enderungen und also auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln. Für manche Systeme wurde bewiesen, dass eine Inaktivierung von bestimmten Kalium-Kanälen genug wäre, um den Calcium-Einstrom in der Nervenendigung zu steigern (Jackson et al 1993). Man kann sich vorstellen, dass das von präsynaptischen Rezeptoren induzierte Potential eine solche Inaktivierung (oder Aktivierung) von Kalium- oder Calcium-Kanäle induzieren könnte und damit die Effektivität von einem einzigen Aktionspotential beeinflussen würde,
 - sie können die Aktivität von Proteinen, die die Freisetzung von Neurotransmitters vermitteln, verändern. Zum Beispiel induziert die Bindung von GABA an GABA_B-Rezeptoren die Aktivierung von G-Proteinen und die Phosphorylierung / Dephosphorylierung von bestimmten intrazellulären Proteinen der Axone.

1.3 Präsynaptische Inhibition und GABA_A-Autorezeptoren

1.3.1 Präsynaptische Inhibition im Rückenmark

(Rudomin 1990)

Ein α -Motoneuron des Rückenmarks wird von einer I_a-Spindelfaser erregt: die I_a-Fasern werden durch eine dynamische Dehnung des Muskels aktiviert. Also führt eine Dehnung eines Muskels zu einer Spannungszunahme im agonistischen Muskel. Gleichzeitig nimmt die Spannung des Antagonisten des gedehnten Muskels ab; dies erfolgt über eine dissynaptische Hemmung der Motoneurone über "I_a-Interneurone".

Diese Interneurone werden nicht nur von I_a-Spindelfasern sondern auch von Fasern aus übergeordneten ZNS-Zentren erregt.

Diese Interneurone induzieren eine prä- und postsynaptische Inhibition der Spindelfaser-Motoneuron-Synapse. Die präsynaptische Inhibition erfolgt über eine gabaerge Axon-Axon Synapse zwischen dem Interneuron und einer I_a-Spindelfaser; diese induziert eine Hyperpolarisierung im Motoneuron, die Aktionspotentiale unterdrückt. Es gibt zwei verschiedenen präsynapti-

schen GABA-Rezeptoren, die in der Membran von I_a -Spindelfasern aktiviert werden:

- $GABA_A$ -Autorezeptoren: die Bindung von GABA an diese Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der Cl^- - und einer HCO_3^- - Konduktanz. Dazu wurde gezeigt, dass wegen der Anwesenheit einer Chloridionen-Pumpe die Cl^- Konzentration höher innerhalb der I_a -Fasern als in der extrazellulären Lösung ist. Da das HCO_3^- -Umkehrpotential auch höher als das Ruhemembranpotential ist, führt ein Reiz im Interneuron zu einer $GABA_A$ -Depolarisierung in I_a -Fasern. Diese Depolarisierung hat die Eigenschaften eines postsynaptischen Potentials: d.h. sie ist schnell und lokalisiert. Es wird vermutet, dass die Depolarisierung der Axone zu einer Unterdrückung der Propagierung der Aktionspotentiale oder zu einer Verminderung ihrer Amplitude führt; diese induzieren jeweils eine Unterdrückung oder eine Verminderung der Freisetzung von Hormonen.
- $GABA_B$ -Autorezeptoren: die Aktivierung dieser Rezeptoren verändern die Freisetzungswahrscheinlichkeit in einem breiteren zeitlichen Abstand; diese erfolgt über G-Proteine, die die Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen katalysieren und damit die "Wirkung" von Aktionspotentialen auf die Freisetzung von Hormone auslösen; insbesondere vermittelt die Aktivierung von $GABA_B$ -Rezeptoren eine lange Öffnung von spezifischen K^+ -Kanäle', also eine Verkleinerung der Länge der Aktionspotentialen und eine entsprechende Verkleinerung der Freisetzung von Neurotransmitters.

Für uns sind die Überlegungen über die Wirkung der präsynaptischen $GABA_A$ -Depolarisierung insofern besonders interessant, als sie benutzt werden können, um die physiologische Rolle von $GABA_A$ -Autorezeptoren im Kleinhirn zu bestimmen. Trotzdem sind sich die zwei Systeme nicht sehr ähnlich: in der Tat sind $GABA_A$ -Autorezeptoren vermutlich eher in I_a -Spindelfasern des Rückenmarks lokalisiert als in Interneuronen des Zerebellums; in der Tat sind Autorezeptoren im Rückenmark post-synaptische Rezeptoren in axo-axonale Synapsen.

1.3.2 Präsynaptische Inhibition im Hypophysenhinterlappen

(Zhang und Jackson 1993-95)

Fasern des Hypophysenhinterlappens stammen von den grossen Zellen des Nucleus supraopticus und des Nucleus paraventricularis hypothalami. Die Hypophysenhinterlappenhormone Oxytozin und antidiuretisches Hormon (ADH)

werden in Nervenzellen gebildet; diese werden in Varikositäten in den Axonendigungen des Hypophysenhinterlappens gespeichert; bei elektrischer Erregung der Zelle werden die Hormone in das Blut ausgeschüttet; GABA wird von anderen Fasern freigesetzt.

Zhang und Jackson haben die Wirkung von GABA auf präsynaptische GABA_A-Rezeptoren durch die Patch-Clamp-Ableitung von Varikositäten in den Axonterminalen studiert:

Einfluss der GABA_A-Autorezeptore auf die Erregbarkeit der Zelle

Sie haben bestimmt, dass:

- E_{Cl} in diesen Varikositäten -48mV beträgt,
- die Kurve der Inaktivierung von Natrium-Kanälen besonders hyperpolarisiert ist.

Also induziert eine lange Applikation von GABA eine Depolarisierung, die Natrium-Kanäle inaktiviert; diese Inaktivierung und die Anwesenheit von Varikositäten ($1\text{-}20\mu\text{m}$) in den Axonendigungen können Aktionspotentiale unterdrücken. Unter physiologischen Bedingungen könnte sich freigesetztes GABA über eine grössere Distanz ausbreiten und eine lange Veränderung des Membranpotentials induzieren.

Einfluss der GABA_A-Autorezeptore auf die Freisetzung von Neurotransmittern

In diesem System liegt eine Erleichterung der Freisetzung von Neurotransmitter, die von der Frequenz abhängt (Jackson et al 1991). Gleichzeitig gibt es eine Verbreiterung der Aktionspotentiale, die vermutlich von der Inaktivierung bestimmter Kalium-Kanäle induziert wird. Diese Verbreiterung der Aktionspotentiale könnte die Erleichterung der Freisetzung von Neurotransmitter erklären.

In diesem ausgezeichneten System ist es möglich, Axonendigungen einer Zelle des ZNS zu studieren. In bezug auf die präsynaptische Inhibition ist dieses System dem der Korbzellen im Kleinhirn sehr ähnlich, im Unterschied dazu finden sich hier jedoch Varikositäten in den Axonen.

1.4 GABA_A-Autorezeptoren im Kleinhirn

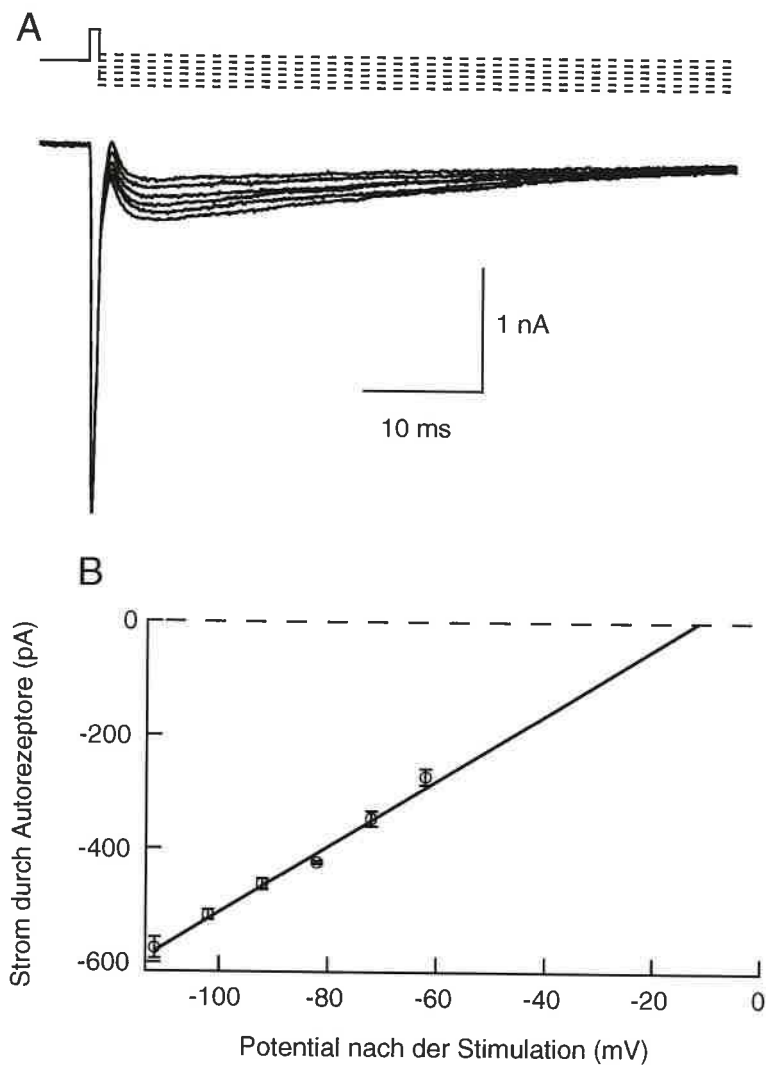


Abbildung 2: Strom-Spannungs-Beziehung der Autorezeptorströme (Pouzat und Marty, 1999). A, Bei Haltepotentiale zwischen -110 und -60mV wurde der Autorezeptor-Strom aufgezeichnet. B, Auftragung der Maximalamplituden aus A gegen das Haltepotential. Das Umkehrpotential der Autorezeptor-Ströme liegt bei -13mV. In diesem Experiment beträgt das Umkehrpotential für Chloridionen (E_{Cl}) 0mV. Der Unterschied zwischen den beiden Umkehrpotentialen wurde in dieser Arbeit (Pouzat und Marty, 1999) erklärt.

In 80% der Korb- und Sternzellen in der Molekularschicht des Kleinhirns wird nach einem Aktionspotential ein transientser Strom gemessen (Pouzat

und Marty 1999). Dieser Strom wird von $50\mu\text{M Cd}^{2+}$ in der extrazellulären Lösung oder von 10mM BAPTA in der Patch-Pipette blockiert. Also hängt der kurze Strom von dem durch Depolarisation ausgelösten Calcium-Einstrom ab.

Dazu wird dieser Strom von Bicuculline ($10\mu\text{M}$) oder Gabazine ($10\mu\text{M}$) blockiert. Er hängt linear vom Potential ab und sein Umkehrpotential entspricht dem erwarteten GABA_A -Umkehrpotential (cf Abb. 2). Also wäre dieser Strom ein gabaerger Strom, der durch GABA_A -Rezeptoren vermittelt wird.

Sein "time to peak" $t_{10\%-90\%}$ ist viel länger als das $t_{10\%-90\%}$ eines synaptischen Stroms, darum ist dieser gabaerger Strom kein autaptischer Strom. Ausserdem ist dieser Strom sehr oft messbar, darum ist es höchst unwahrscheinlich, dass er von elektrischen Verbindungen zwischen Interneuronen des Kleinhirns vermittelt wird.

Schliesslich zeigt eine Modellierung, dass die Kinetik dieses Stromes mit einer hohen Dichte von GABA_A -Rezeptoren in den Axonen kompatibel ist. So gibt es GABA_A -Rezeptoren in der Axone von Korb- und Sternzellen des Kleinhirns, die von dem Molekül GABA aktiviert werden, das von derselben Zelle freigesetzt wird; darum heissen diese Rezeptoren GABA_A -Autorezeptoren und der entsprechende Strom heisst Autorezeptor-Strom.

1.5 Ziel der Diplomarbeit

Es gibt GABA_A -Autorezeptoren in [...den Axonen von...] Korb- und Sternzellen (siehe 1.4), die durch die Freisetzung von GABA von derselben Zelle aktiviert werden. Das Ziel der Diplomarbeit ist der Versuch, die physiologische Rolle der GABA_A -Autorezeptore zu bestimmen. Ihre erste mögliche Wirkung ist es, die Erregbarkeit der Zelle zu verändern (siehe 1.2); darum werden wir zuerst E_{GABA_A} bestimmen und werden dann ihren Einfluss über die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials messen. Die zweite mögliche Wirkung ist eine Veränderung des Effekts eines einzigen Aktionspotentials auf die Freisetzung von Neurotransmitters; die Bestimmung dieses Effekts scheint schwierig zu sein. Dafür haben wir trotzdem ein weiteres Ergebnis erhalten: eine qualitative Messung der Veränderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die von einer dauerhaften Applikation von GABA vermittelt wird.

2 Experimentelle Methoden

2.1 Präparation und Anfertigung von Dünnschnitten

Ratten (zwölf bis dreizehn Tage alt) werden ohne Betäubung dekapitiert. Das "Vermis" wird schnell sezirt und in eine eiskalte Ringerlösung überführt. Nach zwei Minuten wird das Kleinhirn auf einen Schneideblock geklebt. Die Kammer wird dann mit kalter Ringerlösung aufgefüllt, bis das Kleinhirn vollständig bedeckt ist. Durch diese Anordnung bleibt die Lösung während des gesamten Schneidens (c.a. 20 min) verhältnis mässig kalt (unter 5°C). Longitudinale (Llano et al, 1991).

2.2 Verwendete Lösungen

Zur Präparation, zum Anfertigen der Dünnschnitte und als Badlösung wurde eine Ringerlösung folgender Zusammensetzung benutzt: 125mM NaCl, 2.5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1.25mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃, 10mM Glucose.

Bei Begasung mit 95% O₂ / 5% CO₂ stellt sich ein hydrogenkarbonatgepufferter pH von 7.4 ein. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur der Badlösung (20-25°C) durchgeführt.

Die Pipettenlösung hat folgende Zusammensetzung:

- "Cell-attached" Experimente für die Messung von E_{GABA_A} (siehe 3.1): 150mM KCl, 2mM CaCl₂, 10mM HEPES, pH=7.3.
- "Cell-attached" Experimente für die Messung der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle: 159mM KCl, 10mM HEPES, 1mM EGTA, pH=7.3,
- "Whole-cell" Experimente: man benutzt dafür die sogenannte Lösung P, die in 3.1.5 gegeben ist.

Während dieser Diplomarbeit werden verschiedene Pharmaka mit der folgenden Konzentrationen benutzt:

- GABA, 20μM¹,
- Muscimol, ein spezifischer Agonist von GABA_A-Rezeptoren: 20μM,
- Bicuculline, ein kompetitiver Antagonist von GABA_A-Rezeptoren: 10μM,

¹man muss daran errinern, das es beide GABA_A und GABA_B Rezeptoren in Basket- und Korn- Zellen von Kleinhirn gibt.

- NBQX, ein kompetitiver Antagonist von AMPA Rezeptoren: $10\mu\text{M}$,
- D-APV, ein kompetitiver Antagonist von NMDA Rezeptoren: $20\mu\text{M}$,
- LAD 62349, ein spezifischer Antagonist von GABA_B Rezeptoren: $0.5\mu\text{M}$,
- Cadmium, um Calciumströme zu blockieren: $100\mu\text{M}$.

2.3 "Cell-attached" Experimente

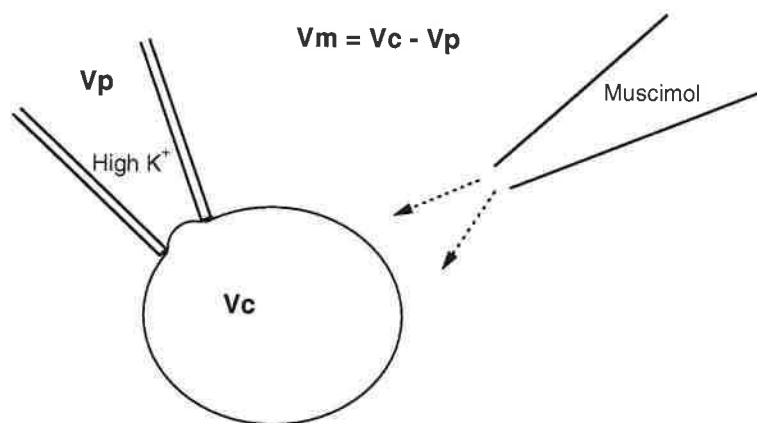


Abbildung 3: Schema des "Cell-attached" Experimentes. V_c = Potential der Zelle, V_p = Haltepotential der Patch-Pipette, $V_m = V_c - V_p$ ist das Membranpotential unter der Patch-Pipette. Die Lösungen und die Eigenschaften der Pipetten sind im Text beschrieben.

Für alle "Cell-Attached" Experimente hat die Patch-Pipette einen Widerstand von c.a. $7\text{-}9\text{ M}\Omega$. Die Applikationspipette ist eine Pipette von c.a. $2\text{ }\mu\text{m}$ (mit einem Widerstand von c.a. $2.5\text{ M}\Omega$). Die Patch-Pipette enthält eine Lösung mit hoher Kalium-Konzentration, deren Zusammensetzung obenstehend angeführt wird; die Lösung in der Applikationspipette ist eine Ringer-Lösung, die $20\mu\text{M}$ Muscimol enthält.

2.3.1 Stimulationsprotokoll

Das Haltepotential der Patch-Pipette ist $V_p = 0\text{ mV}$. Wir führen das folgende Protokoll durch: alle zwei Sekunden wird die Patch-Pipette zu einem Potential V ($V = 0, -10, -20, \dots, -150\text{ mV}, \dots$) während 500ms geklemmt.

Wir warten systematisch eine Minute nach der Applikation von Muscimol, bevor wir das Protokoll durchführen; nach dieser Minute verändert sich die

Amplitude von BK-Kanäle nicht mehr. Wenn zum Zeitpunkt t_0 die Applikation von Muscimol endet, erscheinen allmählich die Aktionspotentiale wieder (siehe Abb.12); vier Minuten nach dem Zeitpunkt t_0 wird mit dem Protokoll für das Auswaschen begonnen. Eine Zelle wird akzeptiert, wenn es spontane Aktionspotentiale in der Kontrolle und im Auswaschen gibt.

2.3.2 Datenaufnahme und -auswertung

Die Amplitude der BK-Kanäle wird mit dem Programm PulseFit 8.03 gemessen (siehe auch Abb 5). Für jede Zelle führt man die Auftragung der Einzelkanalamplituden der BK-Kanäle gegen das Haltepotential der Pipette V_p durch. Durch ein Igor-Programm wird dem Ergebnis eine lineare Funktion angepasst.

2.4 "Whole-cell"-Experimente

2.4.1 Messung der Erregbarkeit der Interneurone

Als intrazelluläre Lösung wird die Lösung P benutzt (siehe 3.1.5). Wir führten eine Messung des Effekts der Autorezeptoren auf die Erregbarkeit der Interneurone durch:

Das Experiment wurde in der "Current-Clamp"-Konfiguration gemacht. Als Messung der Erregbarkeit der Interneurone wird I_{min} bestimmt, die die nötige minimale Intensität ist, um ein Aktionspotential zu induzieren (siehe Abb 11). Um I_{min} zu messen, benutzt man Stimulationen, deren Dauer 2ms ist und deren Intensität jeweils I , $I+10$, $I+20$, ..., $J=I+90$ beträgt. I ist gewählt, so dass I_{min} zwischen I und J hingestellt wird. Die Frequenz der Stimulation ist 2Hz; das Protokoll wird für die erste und die zweite Stimulation jeweils in der Kontrolle und in der Anwesenheit von Bicuculline angefertigt.

Wegen des Auswaschens der Autorezeptor-Ströme mit einer Halbwertszeit von 10-20 Minuten (Pouzat und Marty 1999) wird das ganze Protokoll in Kontrolle in weniger als 6 min durchgeführt.

2.5 Messung der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle

2.5.1 Stimulationsprotokoll

Das Stimulationsprotokoll ist ähnlich wie die obenstehenden "Cell-attached"-Experimente. Aber während des Sprunges von 500ms wird das Potential der

Pipette zwischen -100 und -200mV gehalten, so dass die Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle gross wird².

Bemerkung: wenn man die extrazelluläre Lösung verändert, verändert man auch die Lösung in der Applikationspipette, so dass die Lösung in der Applikationspipette der extrazellulären Lösung plus 20 μ M Muscimol entspricht. Also:

- wenn die extrazelluläre Lösung die Ringerlösung ist, hat die Lösung in der Applikationspipette die folgende Zusammensetzung: Ringerlösung + Muscimol 20 μ M,
- wenn es Cadmium in der extrazellulären Lösung gibt, hat die Lösung in der Applikationspipette die folgende Zusammensetzung: Ringerlösung + 20 μ M Muscimol + 100 μ M Cadmium.

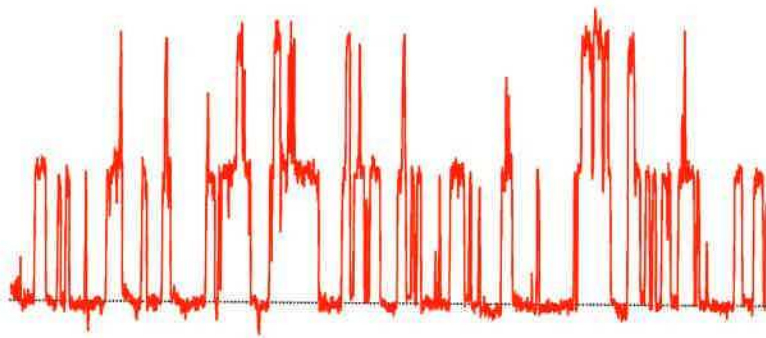


Abbildung 4: Protokoll der Messung von der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle. Auf dieser Abbildung gibt es keinen, einen oder zwei offene BK-Kanäle zu jeder Zeit t . Es sei i der mittlere Einzelkanalstrom. Es sei l_1 und l_2 die waagerechten Linien. Diese werden jeweils zu $\frac{i}{2}$ und $\frac{3i}{2}$ positioniert. Ein Igor-Programm berechnet die Anzahl n_1 und n_2 der Punkte, die sich über den Linien l_1 und l_2 befinden. Es sei n die gesamte Nummer von Punkten. Es sei N die gesamte Anzahl der Kanäle unter der Pipette. Demzufolge wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle als $p = \frac{n_1+n_2}{n \times N}$ berechnet. Diese wird für jede Zelle und für jedes Potential über $6 \times 0.5 = 3$ s gemessen.

Statistische Analyse Das Protokoll der Messung der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle ist in Abbildung 4 beschrieben. Zu bemerken ist, dass die Linien l_1, l_2, \dots, l_n mit dem Auge positioniert werden. Die Berechnung der

²Entgegen der Messung von E_{GABA_A} gibt es in der Patch-Pipette kein Calcium; unter diesen Bedingungen verkleinert sich die Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle.

Anzahl der Punkte oberhalb jeder Linie und die Anpassung des Ergebnis mit der Funktion

$$\frac{1}{1 + \exp(-a(V - V_0))}$$

werden durch ein Igor Programm erfüllt.

3 Ergebnisse

3.1 Abschätzung des Umkehrpotentials von GABA_A-Leitfähigkeiten

3.1.1 Verschiedene Methoden zur Messung des GABA_A Umkehrpotentials

Um das GABA_A Umkehrpotential zu messen, gibt es drei in der Literatur beschriebene Methoden (In allen dieser Methoden wird die "On-Cell"-Konfiguration benutzt):

1. "Gramicidin Perforated Patch" : Leitfähigkeit von Chlorid- und Bicarbonate- Ionen durch einen "Gramicidin Perforated Patch" ist gleich Null; durch eine stetige Application von Muscimol können wir das GABA_A-Umkehrpotential messen, ohne die Konzentration von Chlorid- und Bicarbonate- Ionen zu verändern (Owens et al, 1996),
2. die zweite Methode benutzt das Umkehrpotential von Kalium-Strömen. In der Patch-Pipette gibt es eine hohe Konzentration von Kalium, so dass das Umkehrpotential von Kalium zwischen der Pipette und dem Inneren der Zelle gleich Null ist. Eine Strom-Spannungs-Beziehung dieser Kalium-Ströme wird erstellt. Das Potential in der Pipette V_p , für das die Kalium-Ströme gleich Null sind, gibt das Potential der Zelle V_c jeweils in der Kontrolle und in der Anwesenheit von Muscimol (Verheugen et al 1999),
3. die dritte Methode leitet sich aus der zweiten ab: diesmal werden nicht die allgemeinen Kalium-Ströme gemessen, sondern die Amplitude der Einzelkanalströme der BK-Kanäle (siehe Abb 3). Diese Methode wurde benutzt bei Zhang und Jackson 1993, um die intrazelluläre Chloridionen-Konzentration der "Peptidergic Secretory Nerve Terminals" des Hypophysen-Hinterlappens zu bestimmen. Es wird eine hohe Konzentration von Kalium in der Pipette benutzt, so dass die Strom-Spannungs-Beziehung der BK-Kanäle (gemäss der GHK Gleichung) linear in der Nähe von $V_m = 0$ ist. $V_p(0)$, wofür der Einzelkanalstrom der BK-Kanäle gleich

Null ist, entspricht dem Potential der Zelle V_c ; aus $V_p(0)$ wird nach wenigen Annahmen (siehe unten) das $GABA_A$ -Umkehrpotential errechnet (siehe Abb. 6).

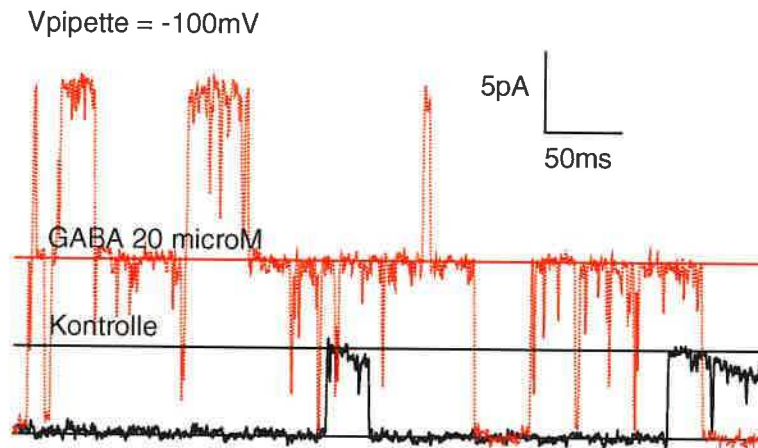


Abbildung 5: Messung von der Amplitude der BK-Kanäle. In dieser Zelle wurde GABA anstatt Muscimol benutzt. In dieser Abbildung ist erkennbar, dass der Einzelkanalstrom grösser ist, wenn es GABA in der Lösung gibt.

3.1.2 BK-Kanäle

BK-Kanäle sind Kalium-Kanäle, die von einer Depolarisierung, einer hohen intrazellulären Calcium-Konzentration und einem basischen intrazellulären pH-Wert aktiviert werden.

BK-Kanäle gibt es in Korb- und Sternzellen des Kleinhirns. Sie werden hier benutzt, um das $GABA_A$ Umkehrpotential zu messen (siehe die dritte Methode oben und Abb.5).

3.1.3 Bestimmung der Muscimol-induzierten Depolarisierung

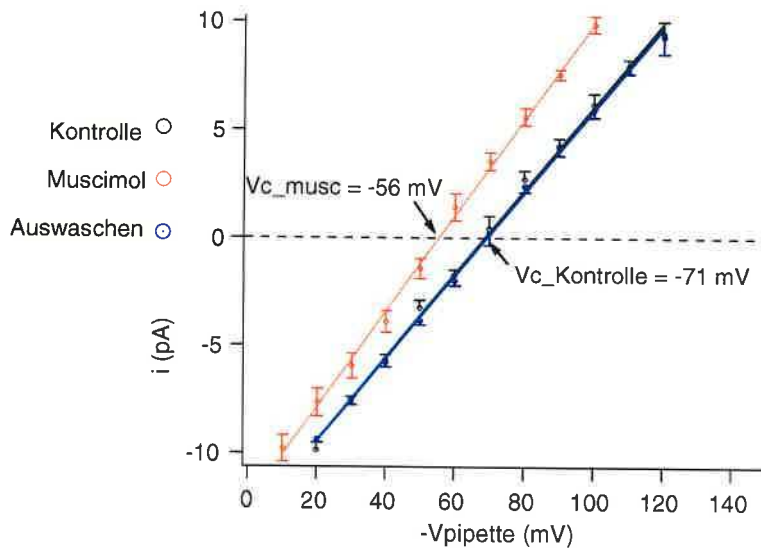


Abbildung 6: Auftragung der Einzelkanalamplituden der BK-Kanäle gegen das Haltepotential der Pipette $-V_p$ ($n = 10$ Zellen). Der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht dem Potential der Zelle V_c ; dieses Potential beträgt -71mV in der Kontrolle und -56mV in der Anwesenheit von Muscimol; aus der Steigung der Regressionsgeraden ergeben sich die Einzelkanalleitfähigkeiten in der Kontrolle und in Anwesenheit von Muscimol jeweils mit 190 pS und 220 pS .

Der Einzelkanalstrom ist grösser in der Anwesenheit von Muscimol als in der Kontrolle:

$$\Delta I = 3.1\text{pA} \pm 0.3\text{pA}$$

Also induziert Muscimol eine Depolarisierung von

$$13.5 \pm 1.5\text{mV}$$

Das Potential der Zelle beträgt in Anwesenheit von Muscimol

$$-56 \pm 1.7\text{mV}$$

und in der Kontrolle (siehe Abb 6)

$$-71 \pm 2\text{mV}$$

Dieses Experiment zeigt, dass das Umkehrpotential von GABA_A -Leitfähigkeiten während einer stetigen Applikation von Muscimol höher als das Ruhemembranpotential ist. Wenn wir annehmen, dass die Muscimol-induzierten

Leitfähigkeiten viel grösser als die anderen Leitfähigkeiten unter den Bedingungen des Experimentes sind und dass das GABA_A-Umkehrpotential konstant in der Laufzeit des Experimentes bleibt, dann ergibt dieses Umkehrpotential -56 mV.

3.1.4 Bestimmung des Umkehrpotentials von Chloridionen

Bei der Annahme, dass in der "Whole-Cell" Konfiguration das GABA_A-Umkehrpotential vor allem von Chloridionen Konduktanzen abhängig ist, erhält man als Cl⁻-Umkehrpotential:

$$E_{Cl} = -56mV$$

Ausserdem ist die Chloridionen-Konzentration $[Cl^-]_e$ in der extrazellulären Lösung 133.5 mM; gemäss der Nernst-Gleichung bestimmt man die entsprechende intrazelluläre Chloridionen-Konzentration:

$$\begin{aligned} E_{Cl} &= \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e} \\ &= U \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_e} \\ U &= \frac{RT}{F} \\ \Rightarrow [Cl^-]_i &= [Cl^-]_e \exp\left(\frac{E_{Cl}}{U}\right) \\ \Delta[Cl^-]_i &= [Cl^-]_e \frac{\Delta E_{Cl}}{U} \exp\left(\frac{E_{Cl}}{U}\right) \\ &= [Cl^-]_i \frac{\Delta E_{Cl}}{U} \end{aligned}$$

Numerischer Ergebnis:

$$\begin{aligned} T &\simeq 298K \\ \Rightarrow U &= 25.7mV \\ [Cl^-]_i &= 133.5 * \exp\left(-\frac{56}{25.7}\right) \\ &\simeq 15mM \\ \Delta[Cl^-]_i &= 15 * \frac{1.7}{25.7} \\ &\simeq 1mM \end{aligned}$$

Es folgt:

$$[Cl^-]_i = (15 \pm 1)mM$$

3.1.5 Wahl der "physiologischen" intrazellulären Lösung P

In dem Artikel von Pouzat und Marty 1999 wurden die sogenannten K-Cl und K-Gluconat intrazelluläre Lösung benutzt³; die Lösung P ist eine Mischung der zwei Lösungen, so dass die Konzentration von Chloridionen $[Cl^-]_i$ 15mM ergibt; die Lösung P ist in der folgenden Tabelle gegeben:

	mM	
K-Gluconate	144.0	
KCl	6.0	
MgCl ₂	4.6	pH = 7.3
HEPES acid	10.0	mit ~ 150μl KOH 1M
EGTA	1.0	Osm = 300 mOsm
CaCl ₂	0.1	
ATP-Na	4.0	
GTP-Na	0.4	

Tabelle 1: Die Lösung P.

3.1.6 Bestimmung des "Junction-Potentials" der Lösung P

Das "Junction-Potential" der Lösung P wird durch eine in der Literatur beschriebene Methode gemessen (Neher 1991). Wir haben das "Junction-Potential" für der Lösung P, die K-Cl und die K-Gluconate Lösung bestimmt. Der klassische Wert für eine K-Cl Lösung ist $V_{JP} = +3mV$ (Barry):

Lösung	V_{JP}
KCl	+3
K-Gluconat	+12
P	+11

Tabelle 2: gemessenes V_{JP} für verschiedene Lösungen.

³Eine K-Cl Lösung besitzt vor allem 150mM KCl; eine K-Gluconat Lösung, 150mM K-Gluconat.

Untenstehend wird das "Junction-Potential" von der Lösung P systematisch korrigiert; dieses Problem wird nicht mehr während dieser Diplomarbeit betrachtet werden.

3.2 Kontrollversuche

Mit dem obenstehenden Experiment wurde das Chloridionen-Umkehrpotential durch drei Annahmen bestimmt:

1. in der Anwesenheit von Muscimol sind die nicht von Muscimol induzierten Leitfähigkeiten unbedeutend; das heisst, dass die Zelle zu dem Umkehrpotential der GABA_A Konduktanzen E_{GABA_A} geklemmt wird,
2. E_{GABA_A} entspricht E_{Cl} ,
3. E_{GABA_A} verändert sich nicht während einer stetigen Applikation von Muscimol.

3.2.1 Abschätzung von g_{GABA_A}

Das Experiment ist in der Abbildung 7 gezeichnet und zeigt, dass

$$g_{GABA_A} \simeq 20 * g_L$$

(g_{GABA_A} entspricht der Muscimol-induzierten Konduktanzen der Zelle und g_L , den anderen Konduktanzen).

Ausserdem ist das Membranpotential durch die folgende Gleichung gegeben:

$$V_m = \frac{g_{GABA_A} E_{GABA_A} + g_L E_L}{g_{GABA_A} + g_L}$$

Wenn g_{GABA_A} zwanzigmal grösser als g_L ist, ist dann $(V_m - E_{GABA_A})$ nicht grösser als 1mV; wir können also feststellen, dass die Zelle in Anwesenheit von Muscimol zum GABA_A Umkehrpotential geklemmt wird. Diese Überlegungen unterstützen die erste Annahme.

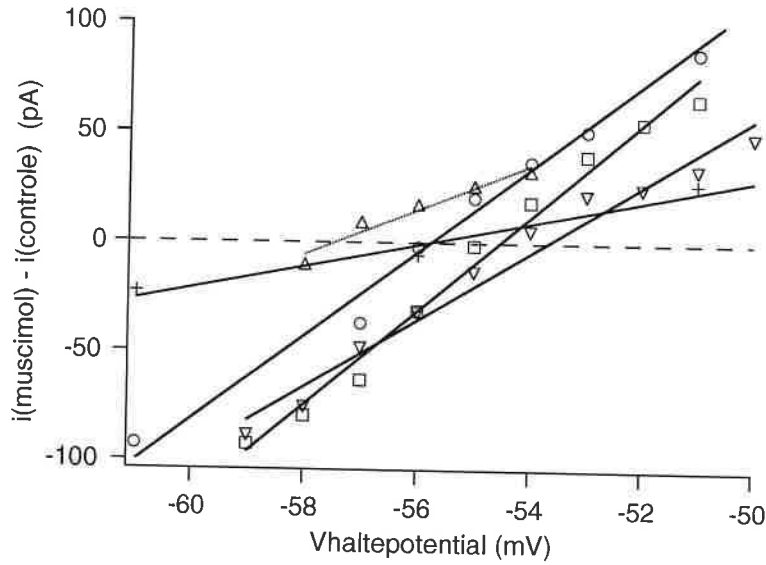


Abbildung 7: Messung von g_{GABA_A} und von E_{GABA_A} : die intrazelluläre Lösung ist die Lösung P; die Zelle wird zwischen -50mV und -60mV geklemmt; $i(\text{muscimol})$ ist die gemessene Intensität in Anwesenheit von Muscimol; $i(\text{kontrolle})$ ist die entsprechende Intensität in Kontrolle. Mit der Gleichung $i(\text{muscimol}) - i(\text{kontrolle}) = g_{GABA_A} * (V - E_{GABA_A})$ wird bestimmt, dass g_{GABA_A} , g_L und E_{GABA_A} jeweils (14.3 ± 3) nS, (0.77 ± 0.15) nS und (-56 ± 0.6) mV ertragen ($n = 5$ Zellen; jede Zelle wird mit einem verschieden Symbol gezeichnet.).

3.2.2 Entspricht E_{GABA_A} E_{Cl} ?

Mit der Lösung P in der Pipette beweist das obenstehende Experiment (siehe Abb 7), dass das $GABA_A$ -Umkehrpotential genau E_{Cl} entspricht. Die Bikarbonat-Leitfähigkeit durch $GABA_A$ -Rezeptoren wurde als nicht unbedeutend bezeichnet (Kaila und Voipio 1987, Bormann et al 1987). Untenstehend wird das erwartete E_{GABA_A} berechnet, das eine Funktion von E_{HCO_3} und von E_{Cl} ist:

Zuerst können wir das HCO_3^- -Umkehrpotential abschätzen: in Schnitten und mit einem konstanten Druck von CO_2 wird im Equilibrium das HCO_3^- -Umkehrpotential von dem H^+ -Umkehrpotential bestimmt; Kaila und Voipio 1987 geben im Hypophysenhinterlappen $pH_i = 7.2$ und $pH_e = 7.4$; Und in einem "Whole-Cell" Experiment haben wir $pH_i = 7.3$ und $pH_e = 7.4$, daraus folgt:

$$\begin{aligned} E_{HCO_3} &= (pH_i - pH_e) * 58mV \\ &\simeq -6mV \end{aligned}$$

Dann braucht man E_{GABA_A} abzuschätzen, wenn E_{HCO_3} , E_{Cl} und $\frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}}$ jeweils -12mV, -56mV und 0.2 betragen (das Permeabilitätsverhältnis $\frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}} = 0.2$ wurde für GABA_A Rezeptoren von Neuronen des Rückenmarkes einer Maus bestimmt (Bormann et al 1987)⁴). Bei der Benutzung der GHK Gleichung (Hille 1992) erwarten wir, dass E_{GABA_A} mehr als E_{Cl} depolarisiert ist:

$$I_{Cl} = P_{Cl} \frac{EF^2}{RT} \frac{[Cl^-]_e - [Cl^-]_i \exp(\frac{E_{GABA_A}}{U})}{1 - \exp(\frac{E_{GABA_A}}{U})} \quad (1)$$

$$I_{HCO_3} = P_{HCO_3} \frac{EF^2}{RT} \frac{[HCO_3]_e - [HCO_3]_i \exp(\frac{E_{GABA_A}}{U})}{1 - \exp(\frac{E_{GABA_A}}{U})} \quad (2)$$

$$I_{Cl} + I_{HCO_3} = 0 \quad (3)$$

Dann folgt:

$$\frac{I_{HCO_3}}{I_{Cl}} = \frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}} \frac{[HCO_3]_e}{[Cl^-]_e} \left\{ \frac{10^{pH_i - pH_e} - \exp(\frac{E_{GABA_A}}{U})}{\exp(\frac{E_{Cl}}{U}) - \exp(\frac{E_{GABA_A}}{U})} \right\} = -1$$

$$\Rightarrow E_{GABA_A} = U * \ln\left(\frac{\exp(\frac{E_{Cl}}{U}) + \frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}} \frac{[HCO_3]_e}{[Cl^-]_e} 10^{pH_i - pH_e}}{1 + \frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}} \frac{[HCO_3]_e}{[Cl^-]_e}}\right)$$

$$E_{GABA_A} \simeq -53mV$$

Also erhält man $E_{GABA_A} > E_{Cl}$; aber in Abbildung 7 hat man $E_{GABA_A} = E_{Cl}$. Dieser Unterschied könnte durch einen experimentellen Fehler (z.B. in der Bestimmung des "Junction-Potential" der Lösung P) bedingt sein. Sonst wäre es möglich, dass in der "Whole-Cell" Konfiguration die Annahme, dass das HCO_3^- -Umkehrpotential -12mV ergibt, falsch ist.

In der Tat enthält die Lösung P kein HCO_3 und das HCO_3 -Umkehrpotential wird gleichzeitig von der Diffusion von CO_2 durch die Membrane aus der extrazellulären Lösung zum Inneren der Zelle und von dem Austausch von CO_2 zwischen der Pipette und der Innere der Zelle bestimmt; also ist E_{HCO_3} mehr hyperpolarisiert als in der "Cell-attached" Konfiguration und E_{GABA_A} nähert sich in der "Whole-Cell" Konfiguration von E_{Cl} .

Trotzdem wollen wir vorallem den Effekt von der GABA_A-Autorezeptor-Depolarisierung betrachten, egal ob das GABA_A-Umkehrpotential von Chlorid-Konduktanzen oder von HCO_3^- -Konduktanzen bestimmt wird; dafür reicht

⁴In dieser Berechnung machen wir also die Annahme, dass $\frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}}$ auch 0.2 für GABA_A Rezeptoren und Autorezeptoren in Basket- und Korb- Zellen beträgt. Es gibt keine Rechtfertigung dafür, aber das Werk von Borman et al ist die einzige Messung in der Literatur von $\frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}}$ für GABA_A-Rezeptoren in Neuronen.

die Lösung P und wird untenstehend benutzt. Aber wir müssen uns daran erinnern, dass die mögliche Veränderung des pH_i in den Axonen, das von HCO_3^- -Ströme induziert würde, auch eine wichtige Rolle für die synaptische Transmission haben könnte und von der Lösung P blockierbar sein wird.

Untenstehend berechnen wir E_{Cl} , wenn E_{GABA_A} und $\frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}}$ jeweils -56 mV und 0.2 ergeben, um zu beweisen, dass E_{Cl} auf diesem Fall immer höher als V_m ist; diese Berechnung rechtfertigt die zweite Annahme:

$$\begin{aligned} \bar{E}_{Cl} &= U * \ln\left[\exp\left(\frac{E_{GABA_A}}{U}\right) - \frac{P_{HCO_3}}{P_{Cl}} \frac{[HCO_3]_e}{[Cl^-]_e} (10^{pH_i - pH_e} - \exp\left(\frac{E_{GABA_A}}{U}\right))\right] \\ &\simeq -60.5mV \end{aligned}$$

3.2.3 Über die Konstanz von E_{GABA_A}

Schliesslich hat die dritte Annahme (d.h. E_{GABA_A} verändert sich nicht während einer stetigen Applikation von Muscimol) viele interessante Kritiken bekommen (Staley et al 1995, Kalia und Voipio 1987); darum denken wir, dass ein weiteres Experiment nötig sein wird, um diesen Wert von E_{GABA_A} zu bestätigen (oder zu verwerfen). Diese Kritiken und das zukünftige Experiment werden im ersten Teil der Diskussion beschrieben.

3.3 Ein durch $GABA_A$ -R induzierter Strom ist depolarisierend und excitatorisch

3.3.1 Das $GABA_A$ -Autorezeptor-Potential

Die Zelle wird in der "Current-Clamp" Konfiguration gehalten, die die beste Konfiguration ist, um die physiologische Rolle der Autorezeptoren zu studieren; die intrazelluläre Lösung ist die Lösung P; mit dieser Lösung wird die Form des Potentials nach einer Stimulation studiert. In der Anwesenheit von Bicuculline gibt es eine Hyperpolarisierung nach dem Aktionspotential, die wahrscheinlich von Kalium-Strömen abhängt. In Kontrolle gibt es eine lange Depolarisierung, deren $t_{10\%-90\%}$ 13.4ms beträgt und deren Verkleinerung eine Halbwertszeit von $t_{\frac{1}{2}} = 100ms$ hat. Die Amplitude der Autorezeptor-Depolarisierung ist $(6 \pm 0.4)mV$; eine kleine Amplitude dieser Depolarisierung könnte den Zellen entsprechen, deren Axon bei der Präparation Schaden genommen hat.

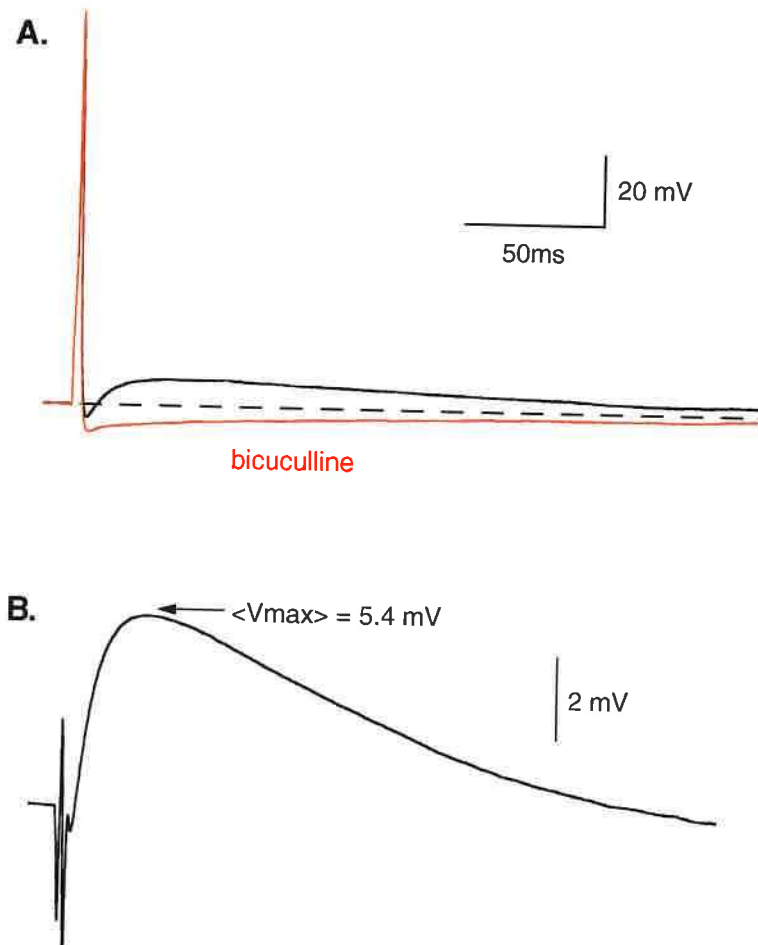


Abbildung 8: Die Autorezeptor-Depolarisierung. A. Auftragung des Potentials der Zelle nach einer Stimulation in Kontrolle und in Anwesenheit von Bicuculline ($n = 1$ Zelle). B. Differenz zwischen den Kurven des Potentials nach einer Stimulation in Kontrolle und in Anwesenheit von Bicuculline ($n = 20$ Zellen). Diese Differenz entspricht definitionsgemäss der autorezeptor-induzierten Depolarisierung. Der Artefakt am Anfang entspricht der Differenz zwischen der induzierten Aktionspotentiale.

Die Autorezeptor-Depolarisierung ist exzitatorisch

Wir wollen ein Protokoll finden, das den Effekt der Autorezeptoren messen kann.

Zur Messung der Erregbarkeit der Interneurone berechnen wir in "Current-Clamp" Konfiguration die minimale Intensität I_{min} , um ein Aktionspotential zu induzieren. Zwei Stimulationen werden gegeben, die von einem Intervall Δt getrennt sind (In Abb.9, $\Delta t=30\text{ms}$). Wir berechnen I_{min} für die zweite

Stimulation in Anwesenheit von Bicuculline und in Kontrolle. Der Unterschied entspricht dem Effekt von Autorezeptoren. In Abbildung 10-A wird so bewiesen, dass dieser Effekt exzitatorisch ist; dazu beweist die Abbildung 10-B, dass je grösser die Amplitude der Autorezeptor-Depolarisierung ist, desto stärker ist der obenstehende exzitatorische Effekt. Diese Experimente beweisen, dass das Autorezeptor-Potential exzitatorisch ist, und dass diese grössere Erregbarkeit nicht ein Effekt von Bicuculline über andere Kanäle ist.

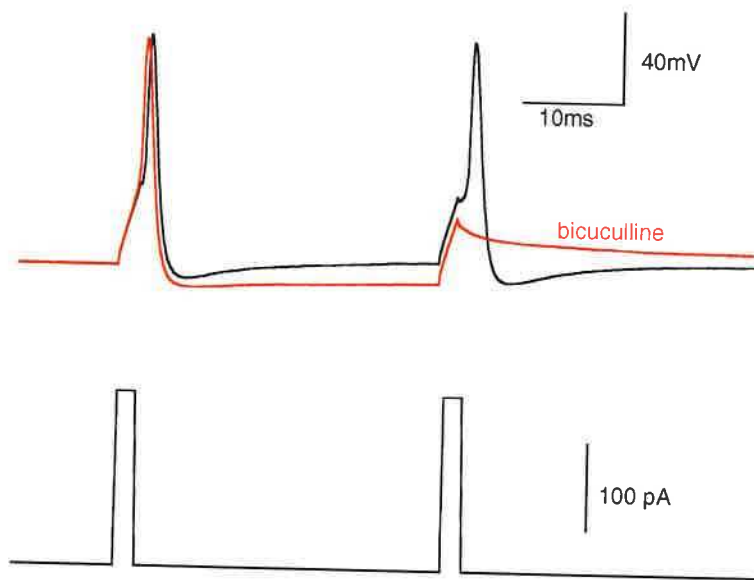


Abbildung 9: Messung des Effekts der Autorezeptoren. Die Zelle wird zweimal stimuliert (Stimulation: 2ms, 200pA; Intervall zwischen zwei Stimulationen = 30 ms; Frequenz der Stimulationsequenz = 0.5 Hz). Zur Kontrolle werden zwei Aktionspotentiale induziert, während kein zweites Aktionspotential in der Anwesenheit von Bicuculline induziert wird *Bemerkung: die Intensität von der Clamp wird immer neu ausgerichtet, so dass das mittlere Potential der Zelle c.a. -70 mV ergibt.*

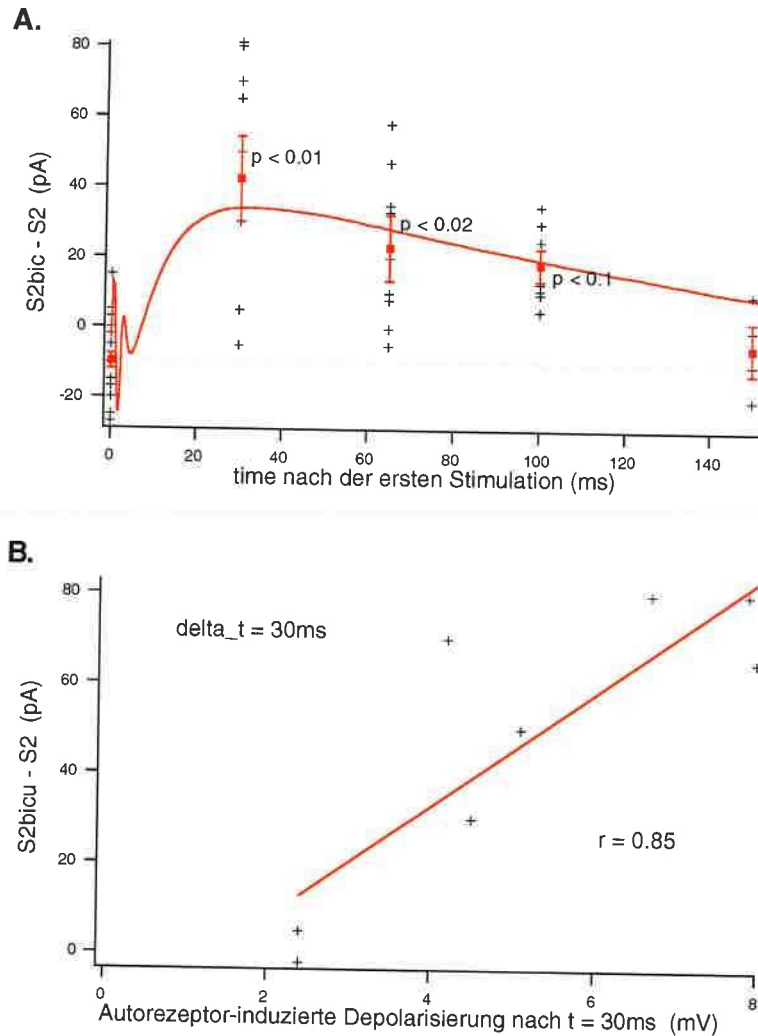


Abbildung 10: Die Autorezeptor-Depolarisierung ist exzitatorisch. A. Das Protokoll ist in Abbildung 9 beschrieben. Über der Abzisse wird das Intervall zwischen den zwei Stimulationen übertragen. Es sei I_1 , I_2 , I_{1bicu} und I_{2bicu} , die minimalen Stimulationsintensitäten, um ein Aktionspotential jeweils nach der ersten und nach der zweiten Stimulation in der Kontrolle und nach der ersten und nach der zweiten Stimulation in der Anwesenheit von Bicucculine zu induzieren. $S_2 = I_2 - I_1$; $S_{2bicu} = I_{2bicu} - I_1$. Wir betrachten, dass $(S_2 - S_{2bicu})$ dem Effekt von Autorezeptoren über die Erregbarkeit der Interneurone entspricht (siehe Experimentelle Methoden 2.4.1). Jeder Punkt steht für eine Zelle. Die waagerechte Linie entspricht der mittleren $I_{1bicu} - I_1$ ($n = 27$ Zellen). Die rote Kurve ist die skalierte Autorezeptor-Depolarisierung (siehe Abb 8). Bei Abstand $\Delta t = 0$ wurde $I_{1bicu} - I_1$ aufgetragen. B. Auftragung der $(S_{2bicu} - S_2)$ gegen die Amplitude der Autorezeptor-Depolarisierung (siehe Abb.A) 30 ms nach der ersten Stimulation für jede Zelle. Die Korrelation ist signifikant ($p < 0.01$; $n = 8$ Zellen).

3.3.2 Der gabaerge postsynaptische Strom

Wir wollen den Effekt des GABA_A-Autorezeptor-Stroms mit dem Effekt eines postsynaptischen gabaergen Stroms vergleichen; d.h. wir wollen den Effekt eines postsynaptischen gabaergen Stroms auf die Erregbarkeit der Zelle bestimmen.

Dafür wird das Interneuron in "Current-Clamp" Konfiguration gehalten, in der die Intensität immer neu ausgerichtet wird, so dass das mittlere Potential der Zelle ca -70mV beträgt. Die intrazelluläre Lösung ist die Lösung P; in der extrazellulären Lösung gibt es D-APV und NBQX, um die glutamatergen exzitatorischen Potentiale zu blocken. Eine extrazelluläre Stimulation wird aufgetragen, so dass keine direkte Stimulation sondern ein gabaerges postsynaptisches Potential induziert wird. Wir messen dann die nötigen kleinsten Intensitäten $I_{min}^{kontrolle}$ und I_{min}^{stim} , um ein Aktionspotential zu induzieren, jeweils in der Kontrolle (das heisst ohne extrazelluläre Stimulation vorher) und 30ms nach der extrazellulären Stimulation.

Die Variation der Amplitude von postsynaptischen Potentiale ist gross, so dass I_{min}^{stim} keinen konstanten Wert ergibt. Trotzdem erscheint in dieser Zelle, dass I_{min}^{stim} immer viel kleiner als $I_{min}^{kontrolle}$ ist, insofern das postsynaptische Potential nicht gleich Null ist; manchmal ist das postsynaptische Potential allein ausreichend, um ein Aktionspotential zu induzieren (siehe Abb 11). In dieser Zelle von einer Ratte, die 13 Tage alt war, ist also die gabaerge postsynaptische Depolarisierung exzitatorisch.

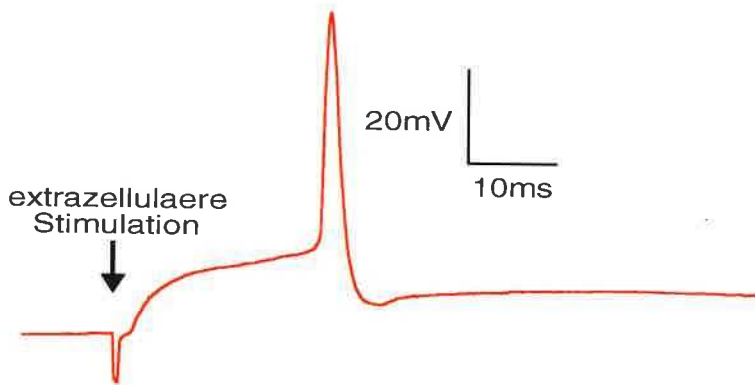


Abbildung 11: Ein gabaerges postsynaptisches Potential kann ein Aktionspotential induzieren (n = 1 Zelle).

Zum Schluss induziert eine kurze (d.h. synaptische) Freisetzung von GABA eine Depolarisierung, die auf jedem Fall exzitatorisch ist.

3.3.3 Eine dauerhafte Applikation von GABA oder Muscimol unterdrückt Aktionspotentiale

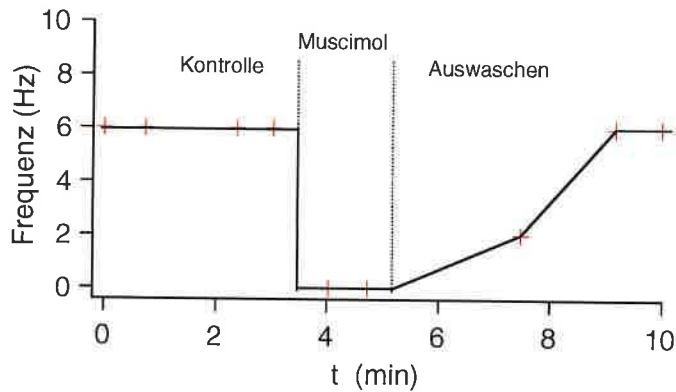


Abbildung 12: Der sogenannte "Shunt der Aktionspotentiale" in der Anwesenheit von Muscimol ($n = 1$ Zelle). Die Anzahl n_a von spontanen Aktionspotentiale werden in einer Zeit t ($t \simeq 5s$) berechnet. Ein Punkt in dieser Abbildung entspricht der Frequenz der Aktionspotentiale $\frac{n_a}{t}$.

In der Anwesenheit von Muscimol gibt es überhaupt kein spontanes Aktionspotential ($n = 10$ Zellen, "On-Cell" Konfiguration). Dieses Ergebnis wird in der Abb 12 für eine Zelle veranschaulicht. Also haben eine kurze Freisetzung von GABA und eine dauerhafte Applikation von Muscimol verschiedene Wirkungen auf die Erregbarkeit der Zelle. Dieser Unterschied wird weiter in der Diskussion betrachtet werden.

3.4 Die Öffnungswahrscheinlichkeit p von BK-Kanäle verändert sich durch eine dauerhafte Applikation von Muscimol

3.4.1 Diese Veränderung von p ist mit Cadmium blockierbar

Die Zelle wird in der "Cell-attached" Konfiguration gemessen und das Experiment läuft, wie es in experimentelle Methoden beschrieben wird.

$V_{0.5}$, das in der Abbildung 13 definiert wird, ist charakteristisch der Öffnungswahrscheinlichkeit eines Kanales. $V_{0.5}^{muscimol}$ ist 50mV kleiner als $V_{0.5}^{kontrolle}$ für die Zelle, die in Abb 13 gezeichnet wird; diese Verkleinerung ist blockierbar mit Cadmium. Dieses Experiment wurde in acht Zellen wiederholt, der Unterschied ist signifikant (siehe Abb.14).

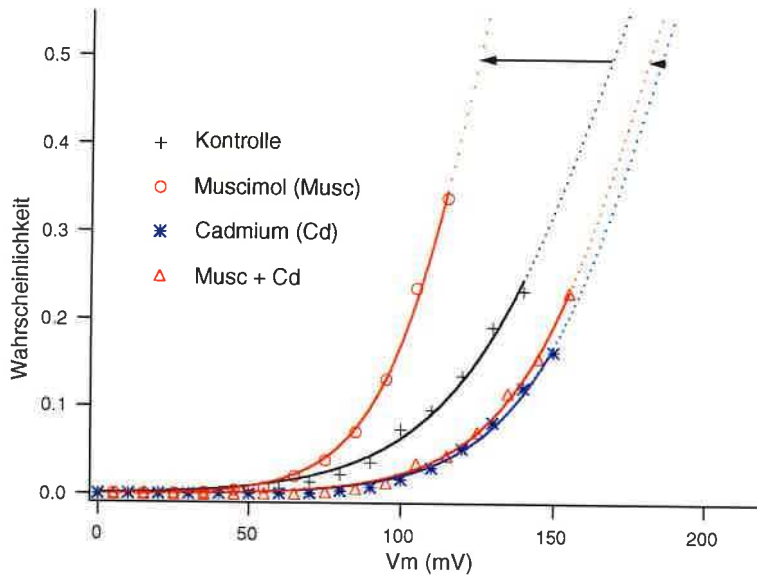


Abbildung 13: Auftragung der Öffnungswahrscheinlichkeit p gegen das Membranpotential unter der Pipette V_m ($n = 1$ Zelle). Wir betrachten, dass V_c -70mV und -55mV jeweils in der Kontrolle und in der Anwesenheit von Bicuculline ergibt. Jeder Punkt ist eine Messung der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle über 3s . Jede Messung gehört derselben Zelle und wurde nacheinander in der Kontrolle, in der Anwesenheit von Muscimol, von Cadmium bzw. von (Muscimol + Cadmium) gemacht. Die Kurven werden mit der Funktion $\frac{1}{1+\exp(-a(V-V_{0.5}))}$ angepasst. $V_{0.5}$ ist das gefolgerte Potential, wofür die Einzelkanalöffnungswahrscheinlichkeit $\frac{1}{2}$ ergibt. In dieser Zelle folgt

$$V_{0.5}^{\text{Kontrolle}} - V_{0.5}^{\text{Muscimol}} > V_{0.5}^{\text{Cadmium}} - V_{0.5}^{\text{Musc+Cd}}.$$

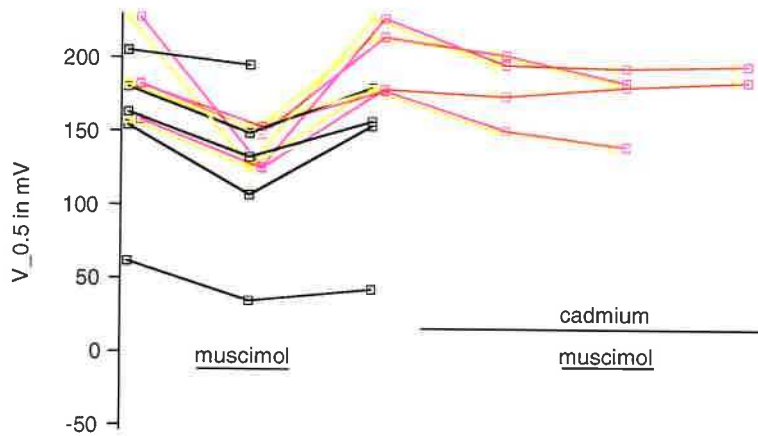


Abbildung 14: Messung von $V_{0.5}$ unter verschiedenen Bedingungen: das Protokoll, dass in der Abbildung 13 gegeben wurde, wurde benutzt; acht Zellen wurden in der Kontrolle und in der Anwesenheit von Muscimol gemessen; drei Zellen wurden auch in der Anwesenheit von Cadmium und (Cadmium + Muscimol) gemessen. Der Unterschied zwischen $\frac{V_{0.5}^{Muscimol}}{V_{0.5}^{Kontrolle}}$ und $\frac{V_{0.5}^{Musc+Cad}}{V_{0.5}^{Cadmium}}$ ist signifikant ($P < 0.001$, Student's t Test).

3.4.2 Mechanismus der Veränderung von p

Aus 3.1.2. gilt, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit p der BK-Kanäle vom Membranpotential, von der intrazellulären Calcium-Konzentration und von pH_i abhängt. Wir können annehmen, dass die Veränderung von p von einer Verkleinerung von pH_i induziert wird. Aber da das Umkehrpotential von HCO_3^- c.a. $-12mV$ im Equilibrium beträgt (Kaila und Voipio 1987), gibt es einen Einstrom von HCO_3^- durch $GABA_A$ -Rezeptoren, d.h. eine Vergrößerung von pH_i ; aber ein basisches pH_i induziert eine Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle (Marty und Neher 1985). Also hängt die Vergrößerung von p nicht von einer Veränderung von pH_i ab.

Ausserdem beweist das obenstehende Experiment, dass diese Veränderung wenigstens zum Teil von Cadmium $100\mu M$ in der extrazellulären Lösung geblockt werden. In dieser Konzentration blockiert Cadmium die Mehrheit der Calciumströme, die durch Depolarisation ausgelöst sind ($VDCC_{Ca^{2+}}$ -Kanäle). Ein möglicher Mechanismus ist, dass Muscimol eine Depolarisierung von c.a. $14 mV$ induziert (siehe 3.1.3); diese Depolarisierung ist genug, um $VDCC_{Ca^{2+}}$ -Kanäle zu eröffnen; diese Öffnung erhöht Ca_i^{2+} in der ganzen Zelle und auch unter der Pipette; es könnte genug sein, um die Öffnungswahrscheinlichkeit p der BK-Kanäle zu verändern.

So induziert eine dauerhafte Applikation von Muscimol eine Erhöhung

von Ca_i^{2+} in der ganzen Zelle. Aber dieses Experiment gibt uns leider keine Information über die Lokalisation dieser $\text{VDCC}_{\text{Ca}^{2+}}$ -Kanälen. Höchst interessant wäre eine axonale Lokalisation von diesen $\text{VDCC}_{\text{Ca}^{2+}}$ -Kanälen; dieses lässt uns vermuten, dass GABA_A -Autorezeptoren bei der indirekten Wirkung auf Calcium-Kanäle eine zweite physiologische Rolle haben könnten (siehe Diskussion).

4 Diskussion der Versuchsergebnisse

4.1 Diskussion der Richtigkeit der Annahme $E_{\text{GABA}_A} > V_m$

Wir haben bestimmt, dass das GABA_A -Umkehrpotential nach einer stetigen Applikation von Muscimol -56mV ergibt. Dafür haben wir angenommen, dass dieses Umkehrpotential sich nicht während einer grossen Aktivierung von GABA_A Rezeptoren verändert (siehe 3.2). Untenstehend folgt die Diskussion über diese Annahme:

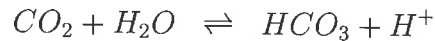
Im Artikel von Kaila und Voipio 1987⁵ wird bewiesen, dass eine grosse Aktivierung von GABA_A -Rezeptoren eine bezeichnende Verringerung von pH_i aufgrund von HCO_3^- -Strömen induziert. Diese Verschiebung von pH_i könnte die Aktivierung von manchen Proteinen beeinflussen. Zum Beispiel könnte es auf die $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Pumpe einwirken, so dass die intrazelluläre Konzentration von Chloridionen $[\text{Cl}^-]_i$ und demzufolge E_{GABA_A} sich verändern.

Dazu gibt es eine andere Kritik, die von Staley et al 1995⁶ formuliert wurde. Er beweist, dass das GABA_A -Umkehrpotential sich während einer dauerhaften Aktivierung von GABA_A -Rezeptoren verändern könnte: beachte, dass E_{Cl} viel kleiner als V_m sei, dass E_{HCO_3} und $\frac{P_{\text{HCO}_3}}{P_{\text{Cl}}}$ jeweils -12mV und 0.2 betragen werden und demzufolge dass E_{GABA_A} kleiner als V_m sei. Eine grosse Aktivierung von GABA_A Rezeptoren würde einen Einstrom von Chloridionen und einen Ausstrom von HCO_3 induzieren. Nur die Ionenpumpen (wie die $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Pumpe) könnten den Einstrom von Chloridionen ausgleichen: also wird der Einstrom von Chloridionen durch GABA_A -Kanäle nicht kompensiert, deswegen ginge E_{Cl} zu einem mehr depolarisierten Wert; was HCO_3 betrifft gäbe es einen anderen Mechanismus: es gibt zwischen der extrazellulären Lösung und dem Innere der Zelle einen sehr schnellen Austausch von CO_2 ; im Inneren der Zelle gibt es dann ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und

⁵Kaila und Voipio haben in "Cray Fish Skeletal" Muskel gearbeitet.

⁶Staley et al haben mit "Hippocampal Pyramidal" Zellen gearbeitet.

HCO₃⁻:



Wegen dieses Gleichgewichtes wäre der Ausstrom von HCO₃⁻ durch den Einstrom von CO₂ kompensiert und $E_{HCO_3^-}$ könnte konstant bleiben, oder wenigstens sich nicht so schnell verringern wie sich E_{Cl} erhöht; also würde sich E_{GABA_A} erhöhen. Staley et al behaupten, dass E_{GABA_A} zu einem Wert von -55mV erhöht werden könnte, auch wenn E_{GABA_A} vor der Aktivierung kleiner als V_m gewesen wäre.

Auf diese beiden Kritiken können unsere Kontrollversuche nicht antworten. Wir schlagen das folgende Kontrollexperiment vor: das Interneuron wird in der "Cell-attached" Konfiguration gehalten. In der extrazellulären Lösung gibt es NBQX und D-APV, um die durch Glutamat aktivierten postsynaptischen Ströme zu blocken. Als intrazelluläre Lösung wird die Lösung P benutzt. Eine extrazelluläre Stimulation wird gemacht, um ein gabaerges postsynaptisches Potential zu induzieren. Wir vergleichen dann die Frequenz der spontanen Aktionspotentiale nach der extrazellulären Stimulation und vor der extrazellulären Stimulation (wenn t=0 der Zeitpunkt der Stimulation ist, wird die mittlere Frequenz der Aktionspotentiale jeweils in Fenster [-100ms, 0ms] und [30ms, 130ms] bestimmt⁷. Das Protokoll wird dann in Anwesenheit von Bicuculline wiederholt⁸. Immer mit derselben Intensität der extrazellulären Stimulation gehen wir dann in der "Whole-Cell" Konfiguration, um nachzuweisen, dass es in der Tat ein postsynaptisches Potential gab. Wir erwarten, dass die Stimulation die Frequenz der Aktionspotentiale in der Anwesenheit von Bicuculline nicht verändert, aber dass in der Kontrolle die mittlere Frequenz von Aktionspotentiale nach der Stimulation grösser als vor der Stimulation ist (siehe 3.3.2). Ein positives Ergebnis ist genug, um alle obenstehenden Kritiken zu beantworten und um unser Ergebnis zu bestätigen; ein negatives Ergebnis wird ohne andere Kontrolle die Behauptung $E_{GABA_A} > V_m$ verwerfen.

⁷die Halbwertszeit der Verkleinerung der gabaergen postsynaptischen Depolarisierung ist grösser als 150ms in Current-Clamp Experimenten (Ergebnis nicht gezeigt).

⁸wenn ein Unterschied auch in der Anwesenheit von Bicuculline gesehen wird, ist das Experiment nicht machbar.

4.2 Verschiedene Effekte einer kurzen Freisetzung und einer dauerhaften Applikation von GABA

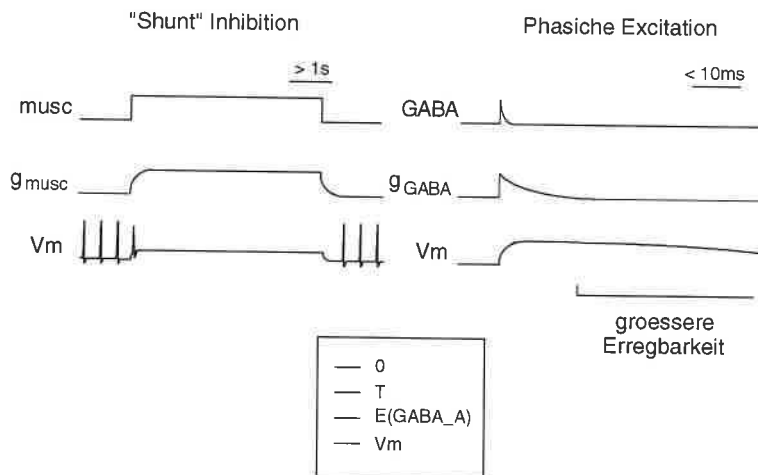


Abbildung 15: "Shunt" Inhibition und phasische Exzitation (für Diskussion, siehe Text).

Es sei T das minimale benutzte Potential, um ein Aktionspotential zu induzieren ("Treshold"). Betrachte, dass E_{GABA_A} kleiner als T sei. Betrachte, es gebe keine Inaktivierung der Natrium-Kanäle, wenn das Potential kleiner als T sei. Dann beweist ein elektrisches Model, dass die Intensität I_T , die gebraucht ist um T zu erreichen, grösser ist, wenn es eine dauerhafte Applikation von Muscimol gibt. In der Tat führen die GABA_A -Ströme zum E_{GABA_A} zurück und unterdrücken also Aktionspotentiale. Dies ist der s.o.g. "Shunt". Bemerkenswert ist, dass der Inhibitorische Effekt von GABA_A -R Ströme mit der Konzentration von Muscimol korreliert ist aber immer anwesend ist, egal wie klein die stetige Konzentration von Muscimol oder von GABA ist. Demzufolge wird eine lange Anwesenheit von GABA in der Umgebung, die zum Beispiel eine starke und allgemeine Stimulation der Interneurone folgt, immer inhibitorisch sein.

Aber es wurde bewiesen, dass ein gabaerger postsynaptischer oder presynaptischer Strom sehr stark exzitatorisch ist; in diesem Fall ist die Halb-Zeit der Abnahme der gabaergen Leitfähigkeit (einzige Millisekunden) kleiner als die Zeitkonstante der Zelle (, die c.a. 100ms beträgt); dass heisst, dass die induzierte Depolarisierung noch besteht, wenn die gabaergen Leitfähigkeiten schon gleich Null sind. Es gibt keinen "Shunt"-Effekt mehr. Aber das Potential der Zelle ist stärker depolarisiert d.h. näher an T . Unter der Annahme, dass für diese kleine Veränderung des Membranpotentials die Inaktivierung

von Natrium-Kanäle nicht gross ist, verändert T sich nicht; daher ist die Intensität, die gebraucht wird, um T zu erreichen, kleiner; also ist ein gabaerger synaptischer Strom exzitatorisch.

Diese Überlegungen, die in Abbildung 15 gezeichnet sind, beweisen, dass das Wort "Exzitation" zwei verschiedenen Konzepten entspricht: die tonische Exzitation und die phasische Exzitation. In dieser Diplomarbeit wurde phasische Exzitation untersucht.

4.3 Wirkung von GABA_A-Autorezeptoren

4.3.1 GABA_A-Autorezeptoren und Calcium

Wir haben bestimmt, dass es einen Calciumstrom während einer dauerhaften Applikation von Muscimol gibt. Trotzdem weiss man nicht, ob dieser Calcium-Einstrom in der somato-dendritischen Compartment oder in den Axonen stattfindet. Da wir am physiologischen Effekt der Autorezeptoren interessiert sind, wäre es wichtig zu wissen, ob dieser Calciumstrom, der mit einem "Cell-Attached"-Experiment gemessen wird, vor allem aus den Axonen kommt. Es wurde bewiesen, dass die meisten durch Depolarisation aktivierten Calcium-Kanäle in der Axone liegen würden (Llano et al 1997). So könnte die von Muscimol induzierte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ auch von axonalen Calcium-Kanäle kommen.

Ausserdem gibt es in den Axonen eine hohe Dichte von GABA_A-Rezeptoren und vermutlich auch von BK-Kanälen (Kanäle, die im somato-dendritischen Compartment anwesend sind) und von Cl(Ca) (Chloridionen-Kanäle, die von einer Depolarisierung und von einer hoher intrazellulären Konzentration von Calcium aktiviert werden; einige Experimente lassen vermuten, sie würden in den Axonen der Korb- und Sternzellen anwesend sein). Eine starke Aktivierung von GABA_A-Autorezeptoren würde eine Depolarisation und einen Einstrom von Calcium induzieren; der Eingang von Calcium würde Cl(Ca) aktivieren, die die Axone weiter depolarisieren würde (siehe Abb 16); Auf jedem Fall würden auch nach einer Weile BK-Kanäle aktiviert, die die Zelle hyperpolarisieren.

Also könnte ein solcher Mechanismus wichtig für die Regulierung von Aktionspotentialen sein: Autorezeptoren werden von einem Aktionspotential aktiviert und erleichtern die Bildung eines neuen Aktionspotential, also erleichtern Autorezeptoren die sogenannte "Bursts" von Aktionspotentialen, die in Korb- und Basketzellen vorkommen. Aber eine solche Aktivierung von "Burst" muss kontrolliert werden: der obenstehende Mechanismus von Aktivierung von BK-Kanäle nach einer starken oder langen Autorezeptor-Depolarisierung könnte erklären, wie die Bursts enden.

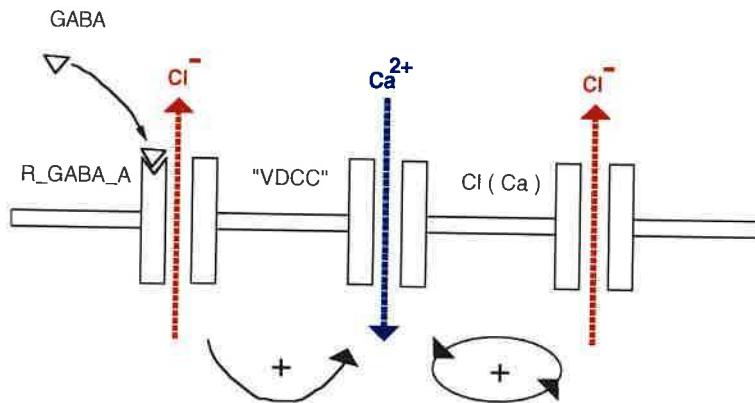


Abbildung 16: GABA induziert eine Depolarisierung über Autorezeptoren. Diese findet in den Axonen statt und breitet sich passiv bis zum somato-dendritischen Compartment aus. In der Axone könnte diese Depolarisierung einen Calciumstrom induzieren, der durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle vermittelt wird. Diese Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ könnte die sogenannten Cl(Ca) (Hille 1991) eröffnen, die die Axone wieder depolarisieren. Dieser Mechanismus würde $[Ca^{2+}]_i$ in den Axonen sehr erhöhen (für weitere Diskussionen, siehe Text.)

4.3.2 GABA_A-Autorezeptoren und "Paired-Pulse Depression"

Manche Experimente beweisen, dass es in Korb- und Sternzellen eine "Paired-Pulse Depression" (PPD) gibt: d.h. zwei Stimulationen werden gemacht, die von einem Intervall von 20ms getrennt sind. Der mittlere postsynaptische Strom ist grösser nach der ersten Stimulation als nach der zweiten Stimulation (Pouzat und Hestrin 1991).

Ein erster möglicher Mechanismus der PPD ist eine Verminderung der Länge oder der Amplitude des zweiten Aktionspotentials; diese könnte durch eine Inaktivierung von Natrium-Kanäle oder eine grössere Aktivierung von Kalium-Kanäle vermittelt werden. Der obenstehende Mechanismus von Öffnung von Chlorid- und BK-Kanäle könnte also die PPD erklären. Um herauszufinden, ob Bicuculline die Amplitude von der PPD moduliert, haben wir extrazelluläre Stimulation in Kontrolle und in Anwesenheit von Bicuculline gemacht: das Experiment war schwierig und hat kein Ergebnis ergeben. Dazu scheint die präsynaptische intrazelluläre Konzentration von Chloridionen die PPD nicht zu beeinflussen (Pouzat und Hestrin 1991).

Ein zweiter möglicher Mechanismus der PPD ist die sogenannte Depletion von Vesikeln: d.h. die Freisetzungswahrscheinlichkeit ist niedriger nach der zweiten Stimulation als nach der ersten Stimulation, weil es weniger freisetzungsbereite Vesikeln gibt; dieser Mechanismus könnte am Wichtigsten für Stern- und Korbzellen sein. Wir würden das folgende Experiment vor-

schlagen: wenn der präsynaptische Calciumstrom derselbe nach der ersten und nach der zweiten Stimulation wäre, während der mittlere postsynaptische Strom sich verändern würde, dann würde es bewiesen, dass die PPD am Meistens von der Depletion der Vesikel oder von postsynaptischen Phänomenen abhängt.

4.3.3 GABA_A-Autorezeptoren und Aktivität des neuronalen Netzes

Die Aktivität eines Netzes ist von Verbindungen zwischen Einheiten und von Eigenschaften der Einheit (hier einer Zelle) bestimmt. Wir haben bewiesen, dass die Funktion der GABA_A-Autorezeptoren eine zeitliche Regulierung von spontanen Aktionspotentialen ist, d.h. eine Aktivitätsmodulierung der Zelle selbst.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit kamen wir zu folgenden Ergebnisse:

1. Das Umkehrpotential von GABA_A-Leitfähigkeiten in Korb- und Sternzellen vom Kleinhirn beträgt -56mV, das mit Werten, die in Hypophysenhinterlappen ($E_{GABA_A} = -48mV$, Zhang und Jackson 1993) gefunden wurden, zu vergleichen ist.
2. Die GABA_A-Autorezeptor-Depolarisierung ist in 100% der Zellen (n=27) nachweisbar; ihre durchschnittliche Amplitude beträgt 6mV.
3. Der Effekt von GABA_A-Autorezeptor-Depolarisierung ist eine phasische Exzitation; er ist dem Effekt eines gabaergen postsynaptischen Potentials ähnlich.
4. Eine tonische Applikation von Muscimol induziert eine Öffnung von BK-Kanäle, die von Cadmium geblockt wird; also induziert Muscimol eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$, die wahrscheinlich durch Depolarisation ausgelösten Calcium-Einströme vermittelt wird.

Das letzte Experiment lässt uns hoffen, dass es eine Erhöhung von Ca^{2+} in den Axonen gibt, die von der Autorezeptor-Depolarisierung vermittelt wird. Diese interessante Möglichkeit kann mit "Ca²⁺ imaging" von Nervenendigungen studiert werden. Das technische Problem der Interneurone ist das schnelle Auswaschen von Autorezeptor-Ströme.

Die Autorezeptor-Depolarisierung könnte auch die Öffnung oder Inaktivierung von anderen Kanälen induzieren (siehe Diskussion). Um solche Effekte zu studieren, wäre es schön, zu beobachten, was eine starke Aktivierung von GABA_A-Autorezeptoren induzieren könnte, was für ein Potential es nach vielen Stimulationen gäbe und was für eine Rolle GABA_A-Autorezeptoren in der PPD spielen.

Zum Schluss bleibt die Frage, welche Wirkung die Autorezeptoren nicht nur auf die Zelle selbst sondern auf die Aktivität des umgebenden Netzwerks hat. Offenbar hat die indirekte Untersuchung axonaler Ströme in einer Patch-Clamp-Messung des Zellsomas hier schon weitergeführt; der logische weitere Schritt wäre das Studium von möglichen Bicuculine-abhängigen Calcium-Ströme in Nervenendigungen. Wegen des Auswaschen der Autorezeptor-Ströme und der Geometrie des Systems müssen wir befürchten, dass solches Experiment schwierig sein wird. Eine parallele Untersuchung von mehreren ähnlichen GABA_A-Autorezeptor-Systemen (Kleinhirn, Hypophysenhinterlappen) wäre dafür optimal, um endlich die Regulation des Potentials in der Axone zu verstehen und um etwas über die Funktion von präsynaptischen Rezeptoren in ZNS zu ahnen. Diese Diplomarbeit ist ein kleiner Schritt in dieser Richtung.

Literatur

- [1] Barnes S und Hille B (1989) Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors. *J Gen Physiol* 94:719-743.
- [2] Barry HB und Lynch JW (1991) Liquid Junction Potentials and Small Cell Effects in Patch-Clamp Analysis. *J Membrane Biol* 121:101-117.
- [3] Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurons. *J Physiol (London)* 494:451-464.
- [4] Dudel J, Kuffler SW (1961) Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 155:543-562.
- [5] Hille B (1991) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Second Edition.
- [6] Jackson MB, Konnerth A, Augustine GJ (1991) Action Potential Broadening and frequency-dependent Facilitation of Calcium Signals in Pituitary Nerve Terminals. *PNAS* 88(2):380-384.
- [7] Kailia K, Voipio J (1987) Postsynaptic fall in intracellular pH induced GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330:163-165.
- [8] Langer SZ (1997) Twenty-five years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 18:95-99.
- [9] Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth AM (1991) Synaptic and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J Physiol (London)* 434:182-213.
- [10] Llano I, Tan YP, Caputo C (1997) Spatial heterogeneity of intracellular Ca^{2+} signals in axons of basket cells from rat cerebellar slices. *J Physiol (London)* 502:509-519
- [11] Leinekugel X, Tseeb V, Ben-Ari Y, Bregestovski P (1995) Synaptic GABA_A activation induces Ca^{2+} -rise in pyramidal cells and interneurons from rat hippocampal neonatal slices. *J Physiol (London)* 487:319-329.
- [12] Marrion NV, Tavalin SJ (1998) Selective activation of Ca^{2+} -activated K^+ -channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature* 395:900-905.

- [13] Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaphin. *J Physiol* 367:117-141.
- [14] Matthews G, Ayoub GS, Heidelberger R (1994) Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors via novel pharmacology. *J neurosci* 14(3):1079-1090.
- [15] McGehee DS, Role LW (1996) Presynaptic ionotropic receptors. *Curr Op Neurobiol* 6:342-349.
- [16] Neher E (1992) Correction for Liquid Junction Potentials in patch-clamp experiments. *Methods Enzymology* 207:123-131.
- [17] Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidins perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16(20):6414-6423.
- [18] Pouzat C, Hestrin S (1997) Developmental regulation of basket/stellate cell -> Purkinje cell synapses in the cerebellum. *J Neurosci* 17(23):9104-9112.
- [19] Pouzat C, Marty A (1999) Somatic recording of GABAergic autoreceptor current in cerebellar stellate and basket cells. *J Neurosci* 19(5):1675-1690.
- [20] Rudomin P (1990) Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in the mammalian spinal cord. *Trends Neurosci* 13:499-505.
- [21] Shepherd GM (1990) *The synaptic organization of the brain*, third edition, oxford university press.
- [22] Staley KJ, Solso BL, Proctor WR (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269:977-981.
- [23] Verheugen JAH, Fricker D, Miles R (1999) Noninvasive measurements of the membrane potential and GABAergic action in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19(7):2546-2555.
- [24] Vincent P, Marty A (1996) Fluctuations of inhibitory postsynaptic currents in Purkinje cells from rat cerebellar slices. *J Physiol (London)* 494:183-199.

- [25] Zhang SJ, Jackson MB (1993) GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. *Science* 259:521-534.
- [26] Zhang SJ, Jackson MB (1995) GABA_A receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. *J Physiol (London)* 483:583-595.

Die hier vorliegende Arbeit entstand am Max Planck-Institut für biophysikalische Chemie in der Arbeitsgruppe Zelluläre Neurobiologie.

Ich danke Dr. Alain Marty für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe und für die intensive Betreuung der Arbeit. Isabelle Llano möchte ich für die Unterstützung während den Experimenten bedanken. Christophe Pouzat, der ein Doktorant des Labors war, hat mich am Anfang dieser Diplomarbeit viel geholfen. Vera Dinkelacker verdanke ich viele konstruktiven Korrekturen.

