

3. Material und Methoden

Alle Experimente wurden an akuten Hirnschnitten von C57BL/6J-Mäusen der Altersspanne P 1-9 (postnataler Tag 1-9) durchgeführt. Nach Dekapitation der Tiere in tiefer Ethernarkose wurde das Gehirn zügig freipräpariert, und sagittale Schnitte (200 μm) wurden unter Einschluss des visuellen Kortex mittels eines Vibratoms angefertigt.

Elektrophysiologie: Hierfür wurden die akuten Hirnschnitte in eine Submersionskammer transferiert und kontinuierlich mit artifiziell *Liquor cerebrospinalis* umspült. Zur Messung von (postsynaptischen) Strömen kam der *Voltage-clamp-Modus* der *Ganzzell-Patch-clamp-Technik* zur Anwendung, zur Registrierung von Potentialen der *Current-clamp-Modus*. Für die Visualisierung nutzten wir ein Wasserimmersionsobjektiv (40x) sowie eine Phasenkontrastoptik. Der Signalakquisition dienten ein EPC-7-Verstärker, ein 16-Bit-AD/DA-Wandler (ITC-16) sowie die Software TIDA 4.11. Alle Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (22-25 °C) durchgeführt. Postsynaptische Ströme wurden durch minimale (extrazelluläre) elektrische Stimulation mittels Glaspipetten (Widerstand ca. 10 M Ω) evoziert.

Binomialmodell der synaptischen Übertragung: Die vorliegende Arbeit gründet auf der Vorstellung, dass postsynaptische Ströme durch das binomiale Modell der synaptischen Übertragung hinreichend beschrieben werden können²³. Dieses Modell beinhaltet folgende Annahmen: 1) Es existiert eine konstante Anzahl von Freisetzungstellen (*release sites*, N), die Vesikel mit einer mittleren Wahrscheinlichkeit p_r entleeren; 2) ein einzelnes Vesikel produziert einen invarianten (quantalen) postsynaptischen Strom (q); 3) alle Freisetzungstellen sind voneinander unabhängig; 4) jede einzelne Freisetzungsstelle setzt in Reaktion auf ein Aktionspotential entweder ein einziges Vesikel oder nichts frei. Im Rahmen dieses Modells berechnet sich die mittlere Amplitude der (inhibitorischen) postsynaptischen Ströme (IPSC, *inhibitory postsynaptic currents*) gemäß folgender Gleichung: $\text{IPSC} = N * p_r * q$.

Dabei verwendeten wir die mediane Amplitude der *miniature* IPSC (mIPSC, in 1 μM Tetrodotoxin) als Maß für die quantale Größe (q). Die Zahl der Freisetzungstellen (N) berechneten wir indirekt über die Größe des *readily releasable pool* (RRP). Zu dessen Bestimmung benutzten wir ein Hochfrequenzstimulationsprotokoll (20 Hz, 40 Pulse). Unter der Annahme, die dabei beobachtete Depression der evozierten IPSC (eIPSC)

beruhe größtenteils auf einer transienten Reduktion der unmittelbar freisetzbaren Quanta, ist es möglich, die RRP-Größe auf der Basis der kumulativen eIPSC-Amplituden zu berechnen²⁴⁻²⁶.

Digitale Bildgebung: Zur Registrierung intrazellulärer $[Ca^{2+}]$ -Änderungen nutzten wir Oregon Green 488 BAPTA-1, ein Ca^{2+} -sensitives Fluorochrom. Eine CCD-Kamera diente der Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale (TILL Photonics). Für die Signalakquisition sowie die Datenevaluierung kam die Software Vision 4.0 zur Anwendung. In einigen Experimenten wurde das Fluorochrom *Lucifer Yellow* zur vollständigeren Visualisierung der Zelle der Pipettenlösung zugefügt.

Immunhistochemie: Die hier verwendeten Primärantikörper waren gerichtet gegen Epitope von Reelin sowie die α_{1G} - bzw. α_{1I} -Untereinheit von T-Typ- Ca^{2+} -Kanälen. Entsprechende Sekundärantikörper waren mit FITC (Fluorescein-isothiocyanat) bzw. TRITC (Tetramethylrhodamin-isothiocyanat) konjugiert. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskopes unter Verwendung geeigneter Filtersets.

Datenanalyse: Alle elektrophysiologischen Daten wurden mittels TIDA 4.11 (HEKA Elektronik) und PeakCount 3.2 (C. Henneberger, Berlin) ausgewertet. Bei den hier verwendeten statistischen Prüfverfahren erfolgte die Ablehnung der Nullhypothese bei einem Signifikanzniveau von mindestens $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung des experimentellen Objektes (Kirmse, Grantyn & Kirischuk, *Eur. J Neurosci.*, 2005)

In einer ersten Reihe von Versuchen korrelierten wir unter Verwendung einer mit *Lucifer Yellow* (LY) angereicherten Pipettenlösung die zelluläre Morphologie des Phasenkontrastbildes mit derjenigen des LY-Fluoreszenzbildes, welches eine vollständigere Visualisierung der Zelle erlaubte. Zudem charakterisierten wir die passiven und aktiven Membraneigenschaften der jeweiligen Zellen. In immunhistochemischen Experimenten konnten wir belegen, dass Zellen, deren Morphologie den von uns aufgestellten Kriterien genügte, immunopositiv für Reelin waren, welches gegenwärtig als der spezifischste Marker für CR-Zellen angesehen