

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

wird. Diese Vorarbeiten ermöglichten uns nachfolgend, CR-Zellen anhand einer einfachen Kombination morphologischer und elektrophysiologischer Merkmale²⁷⁻³¹ im nativen Hirnschnitt sicher zu identifizieren.

4.2. Spontane synaptische Eingänge von Cajal-Retzius-Zellen (Kirmse & Kirischuk, *J Neurosci.*, 2006)

In Übereinstimmung mit früheren Studien^{32,33} zeigten sich sie spontanen postsynaptischen Ströme (sPSC, *spontaneous postsynaptic currents*) unbeeinflusst von den Glutamaterezeptorantagonisten APV (50 μ M) und DNQX (10 μ M). sPSC konnten jedoch vollständig und reversibel durch den GABA_AR-Antagonisten Bicucullin (10 μ M) blockiert werden. Aus Gründen der Konvention werden im Folgenden GABA_AR-vermittelte PSC als IPSC (*inhibitory postsynaptic currents*) bezeichnet, obgleich GABA auf CR-Zellen eine depolarisierende Wirkung besitzt³⁴.

4.3. N-Ethylmaleimid erhöht selektiv die Wahrscheinlichkeit der vesikulären GABA-Freisetzung von GABAergen Synapsen auf Cajal-Retzius-Zellen (Kirmse & Kirischuk, *Eur. J Neurosci.*, 2006)

Unsere ersten Versuchsreihen belegten eine außerordentlich niedrige sIPSC-Frequenz ($\approx 0,01$ Hz)³². Im Rahmen eines pharmakologischen Screening untersuchten wir die Effekte von N-Ethylmaleimid (NEM), von dem eine stimulierende Wirkung auf die Neurotransmitterfreisetzung berichtet ist³⁵. Ferner ist bekannt, dass NEM 1) als Entkoppler von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen wirkt³⁶, welche ihrerseits die präsynaptische Transmitterfreisetzung inhibieren können³⁷, und 2) die ATPase N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor (NSF) hemmt, welche die Dissoziation bereits assemblierter *SNARE*-Kernkomplexe katalysiert³⁸. NEM (50 μ M) führte zu einer drastischen Frequenzsteigerung sowohl der sIPSC als auch der mIPSC, entbehrte hingegen einer Wirkung auf den Haltestrom, den Eingangswiderstand, die Verteilung der mIPSC-Amplituden (und somit die quantale Amplitude) sowie die mIPSC-Kinetik. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluss von NEM auf postsynaptische GABA_A-Rezeptoren. Die Supplementierung der Pipettenlösung mit NEM (50 μ M) erbrachte darüber hinaus keine Erhöhung der mIPSC-Frequenz, was auch die mögliche Freisetzung eines retrograd wirkenden Faktors unwahrscheinlich werden lässt. Des Weiteren erhöhte NEM die Amplitude der evozierten IPSC (eIPSC). Dieser Effekt wurde

begleitet von einer beträchtlichen Abnahme der eIPSC-Fehlerrate (von 45% auf 4%) und des Paarpulsquotienten (PPQ, von 1,3 auf 0,4). Diese Ergebnisse können als Belege für eine Fazilitation der GABA-Freisetzung durch NEM gewertet werden. Im Folgenden untersuchten wir die Wirkung von NEM auf die Größe des *readily releasable pool* (RRP). Es zeigte sich, dass NEM keine signifikante Änderung des RRP induzierte. Im Gegensatz dazu steigerte NEM die Freisetzungswahrscheinlichkeit p_r ($p_r = \text{eIPSC}_1 / (N * q)$) beachtlich (von $\approx 15\%$ in der Kontrolle auf $\approx 50\%$). Überdies verkürzte NEM die Latenz zwischen Stimulus und postsynaptischer Antwort signifikant. In akuten Hirnschnitten, die von Mäusen des Alters P2 präpariert wurden, konnten mIPSC unter Kontrollbedingungen lediglich in 5 von 13 CR-Zellen nachgewiesen werden, nach Applikation von NEM allerdings erhöhte sich der Anteil auf 12 aus 13. Wir werten dies zugleich als Beleg für die Existenz *stummer Synapsen* (i. e. Synapsen mit ausgesprochen niedriger Freisetzungswahrscheinlichkeit) auf Cajal-Retzius-Zellen. Wir schlussfolgern, dass 1) NEM die GABAerge synaptische Übertragung über einen präsynaptischen Mechanismus beachtlich fazilitiert, 2) die unter Kontrollbedingungen geringe Frequenz der m/sIPSC eine niedrige basale Freisetzungswahrscheinlichkeit reflektiert und 3) die überwiegende Mehrheit der CR-Zellen bereits am zweiten postnatalen Tag über funktionelle GABAerge Eingänge verfügt. Da NEM überdies weder die Amplitude noch die Kinetik der mIPSC signifikant beeinflusste, könnte es als nützliches *Hilfsmittel* für die quantale und kinetische Analyse von Verbindungen fungieren, welche unter Ruhebedingungen eine niedrige Rate spontaner synaptischer Aktivität aufweisen.

4.4. Tonisch aktivierte, präsynaptisch lokalisierte GABA_B-Rezeptoren kontrollieren die Freisetzungswahrscheinlichkeit (Kirmse & Kirischuk, *J Neurosci.*, 2006)

Vorgenannte Experimente ergaben den ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an der präsynaptischen GABA-Freisetzung. Zur Klärung der Frage, inwiefern GABA_B-Rezeptoren (GABA_BR) die Aktivität des unreifen Netzwerkes beeinflussen, applizierten wir CGP55845 (1 μM), einen spezifischen GABA_BR-Antagonisten. CGP55845 erhöhte deutlich die Frequenz sowohl der GABAergen sIPSC als auch der spontanen, GABA_AR-abhängigen, intrazellulären Calciumtransienten. In Übereinstimmung mit einer früheren Studie³⁹ konnten wir keine

Expression funktioneller GABA_BR durch CR-Zellen nachweisen. Als Hinweis auf einen präsynaptischen Mechanismus führte die GABA_BR-Blockade zu einer Erhöhung der mIPSC-Frequenz, deren Amplituden (i. e. die quantale Größe) und Kinetik blieben hingegen ungeändert. Zur Untermauerung dieser Ergebnisse studierten wir evozierte IPSC (eIPSC): CGP55845 induzierte eine Zunahme der eIPSC-Amplitude, welche zudem mit einer signifikanten Abnahme der Fehlerrate assoziiert war. Die unter Kontrollbedingungen beobachtete Paarpulsfazilitation konvertierte CGP55845 in eine Paarpulsdepression. Darüber hinaus entbehrte CGP55845 eines signifikanten Effektes auf den *readily releasable pool* (RRP). Bei konstantem RRP bedeutet die Zunahme der eIPSC₁-Amplitude eine Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit p_r : In der Tat steigerte CGP55845 p_r von $\approx 10\%$ auf $\approx 30\%$. Qualitativ gleiche Effekte erzielte CGP55845 bei physiologischen Temperaturen. Durch sequentielle Applikation des GABA_BR-Agonisten Baclofen (10 μ M) sowie des GABA_BR-Antagonisten CGP55845, welche die Freisetzungswahrscheinlichkeit weiter auf $\approx 5\%$ reduzierten bzw. erneut auf $\approx 30\%$ steigerten, gelang uns der Nachweis, dass GABA_BR unter Kontrollbedingungen *nur partiell* durch extrazelluläre GABA aktiviert sind. Folglich können Änderungen der extrazellulären GABA-Konzentration die Stärke der GABAergen Verbindungen *dynamisch* regulieren.

Nach Blockade der Glutamatdecarboxylase (GAD), des GABA-synthetisierenden Enzyms, mittels 3-Mercaptopropionsäure (3-MP) verfehlte CGP55845 eine Änderung der o. g. Parameter. Dies belegt die Notwendigkeit der intrazellulären GABA-Synthese für die Aufrechterhaltung der GABA_BR-vermittelten tonischen Inhibition – mit anderen Worten: Die extrazelluläre GABA-Konzentration ist von der intrazellulären GABA-Syntheserate abhängig. 3-MP erhöhte die vesikuläre GABA-Freisetzung (bei konstanter mIPSC-Amplitude und -Kinetik stieg die mIPSC-Frequenz). Wäre die vesikuläre, i. e. synaptische, Freisetzung die Hauptdeterminante der extrazellulären GABA-Konzentration, erwartete man eine stärkere GABA_BR-vermittelte Inhibition. Dies war nicht der Fall, da CGP55845 in Gegenwart von 3-MP keine Änderung der eIPSC-Amplitude und des PPQ bewirkte. Vesikulär freigesetzte GABA bestimmt folglich nicht maßgeblich den durch GABA_BR vermittelten Tonus.

4.5. GABA-Transporter-2/3 setzen GABA in den Extrazellulärraum frei (Kirmse & Kirischuk, *J Neurosci.*, 2006)

Von GABA-Transporter-3, welche nicht mit GABAergen synaptischen Endigungen kolokalisiert sind ⁴⁰, wird angenommen, dass sie eine wesentliche Funktion bei der Kontrolle der extrazellulären GABA-Konzentration innehaben. Zur Klärung einer möglichen Involvierung von GABA-Transporter-2/3 (GAT-2/3) in die GABAerge Transmission auf CR-Zellen nutzten wir SNAP-5114, einen spezifischen GAT-2/3-Antagonisten. SNAP-5114 (40 μ M) steigerte signifikant die Frequenz der mIPSC; die mIPSC-Amplituden (i. e. die quantale Größe) wie auch die mIPSC-Kinetik blieben jedoch unbeeinflusst. Ferner erhöhte SNAP-5114 die Amplitude der eIPSC und verminderte den PPQ. Somit entsprachen die SNAP-5114-Wirkungen qualitativ denen des GABA_BR-Antagonisten CGP55845. In Gegenwart von SNAP-5114 induzierte CGP55845 einen weiteren Anstieg der eIPSC-Amplitude und eine weitere Verminderung des PPQ. Diese Daten belegen einerseits, dass GAT-2/3 GABA nach extrazellulär freisetzen, andererseits, dass die GABA_BR-vermittelte tonische Inhibition nur zum Teil durch die Aktivität von GAT-2/3 aufrechterhalten wird. Bestätigung erfuhren die Ergebnisse dadurch, dass SNAP-5114 nach Blockade der GABA_BR mit CGP55845 ineffektiv wurde.

4.6. GABA-Transporter-1 partizipieren an der GABA-Clearance des synaptischen Spaltes (Kirmse & Kirischuk, *J Neurosci.*, 2006)

GABA-Transporter-1 (GAT-1) werden – wie auch GAT-2/3 – bereits pränatal in der kortikalen Marginalzone exprimiert, finden sich jedoch – im Gegensatz zu GAT-2/3 – reichlich auch in GABAergen synaptischen Endigungen ^{41,42}. NO-711 (10 μ M), ein spezifischer GAT-1-Blocker, verlängerte die eIPSC-Abklingzeit (*decay time*), verminderte die mIPSC-Frequenz und reduzierte die Amplituden der eIPSC. Diese Daten legen nahe, dass synaptisch lokalisierte GAT-1 im Aufnahmemodus arbeiten und an der Terminierung der GABA-Wirkung (durch *Clearance* des synaptischen Spaltes) mitwirken. Folglich sind von einer Blockade der GAT-1 ein Anstieg der extrazellulären GABA-Konzentration, eine stärkere Aktivierung präsynaptischer GABA_BR und eine *Minderung der GABA-Freisetzung* zu erwarten. In Diskrepanz dazu verminderte NO-711 den PPQ, was auf eine *Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit* hinweist. Der Mechanismus dieser scheinbar widersprüchlichen NO-711-Wirkungen bleibt unklar,

jedoch berichten wir, dass der Effekt auf den PPQ durch CGP55845 und 3-MP aufgehoben werden kann, i. e. von GABA_BR, welche durch extrazelluläre GABA aktiviert werden, abhängig ist.

Zudem induzierte NO-711 eine Verminderung der quantalen Amplitude, welche sich als von GABA_BR unabhängig erwies. Wenngleich ein postsynaptischer Ursprung (bspw. durch Desensitisierung postsynaptischer GABA_AR) dieses Effektes nicht sicher ausgeschlossen werden kann, favorisieren unsere – hier nicht im Detail wiedergegebenen – Daten die alternative Hypothese, dass GAT-1 GABA in die präsynaptische Endigung aufnehmen und ihre Blockade eine reduzierte Füllung präsynaptischer Vesikel mit GABA zur Folge hat.

5. Diskussion

5.1. Eigenschaften exzitatorischer GABAerger Synapsen auf Cajal-Retzius-Zellen

In Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen berichten wir in der vorliegenden Arbeit eine außerordentlich niedrige Frequenz spontaner postsynaptischer Ströme (meist $\ll 0,1$ Hz). Es bieten sich dafür mehrere Erklärungsmöglichkeiten an: 1) Die Zahl der Synapsen ist niedrig, 2) die präsynaptischen Vesikel sind nicht freisetzungsbereit, 3) wegen dendritischer Filterung sind IPSC nicht detektierbar, 4) die Freisetzungswahrscheinlichkeit der präsynaptischen Vesikel ist gering. Ad 1) Jüngere elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben eine beachtliche Zahl GABA-immunoreaktiver synaptischer Kontakte auf CR-Zellen²⁹. Ad 2) Normalisiert auf die quantale Amplitude, beträgt die hier ermittelte Größe des *readily releasable pool* 13 ± 4 Quanta (Vesikel). Dies ist vergleichbar mit der mittleren RRP-Größe anderer GABAerger Synapsen, z. B. im Colliculus superior (24⁴³) oder im Cerebellum (10 – 15⁴⁴). Ad 3) GABAerge Synapsen auf CR-Zellen sind vorzugsweise somatisch oder proximal-dendritisch lokalisiert²⁹. Zudem ist der Membranwiderstand von CR-Zellen vergleichsweise hoch (im Mittel 760 M Ω). Die Varianten 1) – 3) erscheinen daher als maßgebliche kausale Faktoren unwahrscheinlich. Ad 4) In der Tat beobachteten wir eine ausgesprochen niedrige basale Freisetzungswahrscheinlichkeit p_r GABAerger Verbindungen ($\approx 0,1$); p_r war somit kleiner als bei anderen GABAergen Synapsen