

**Zellspezifische Deletion des Kalium-Chlorid-
Kotransporters Kcc2 im Cerebellum:
Auswirkung auf neuronale Signaltransduktion und Lernen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Patricia Seja

aus Ravensburg

Berlin 2012

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) und Leibniz-
Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin
angefertigt.

01.02.2008 – 15.05.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Jentsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist

Tag der Disputation: 17.08.2012

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ZUSAMMENFASSUNG.....	X
ABSTRACT	XII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Kationen-Chlorid-Kotransporter.....	1
1.1.1. Struktur und molekulare Diversität der Kationen-Chlorid-Kotransporter	3
1.1.2. Expressionsmuster der neuronalen Kationen-Chlorid-Kotransporter.....	4
1.1.2.1. Kalium-Chlorid-Kotransporter 2 (Kcc2).....	4
1.1.2.2. Kalium-Chlorid-Kotransporter 3 (Kcc3).....	5
1.1.2.3. Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter 1 (Nkcc1).....	6
1.1.3. Der Einfluss von Kcc2 auf die Morphologie von Neuronen.....	7
1.1.4. CCCs und die Polarität der GABA _A -Rezeptorströme.....	8
1.1.4.1. Die Polarität der GABA-Antwort.....	9
1.1.4.2. Intraneuronale Cl ⁻ -Gradienten	10
1.2. GABAerge und glycinerge Neurotransmission	11
1.2.1. Glycin- und GABA-Rezeptoren.....	11
1.2.1.1. GABA _A -Rezeptoren.....	11
1.2.1.2. Glycinrezeptoren	12
1.2.2. GABAerge Inhibition.....	12
1.2.2.1. Klassische Hyperpolarisations-Inhibition.....	12
1.2.2.2. Shunting Inhibition.....	13
1.2.2.3. Tonische Inhibition	13
1.2.3. GABAerge Exzitation	14
1.2.3.1. Exzitatorisches GABA.....	14
1.2.3.2. Neuronale Maturation durch depolarisierendes GABA	15
1.3. Cerebellum.....	16
1.3.1. Neuronales Netzwerk des Cerebellums.....	16
1.3.2. Vorwärtshemmung und negative Rückkopplung.....	18
1.3.3. Kompensatorische Augenbewegungen	20
1.3.3.1. Vestibulo-okulärer Reflex.....	20
1.3.3.2. Adaption des vestibulo-okulären Reflexes.....	21

2. FRAGESTELLUNG.....	23
3. ERGEBNISSE.....	24
3.1. Kalium-Chlorid-Kotransporter 2.....	24
3.1.1. Konditionaler Knockout von Kcc2 in Körnerzellen und Purkinjezellen.....	24
3.1.1.1. Verwendete Cre-Linien.....	24
3.1.1.1.1. Analyse der L7/pcp-2:Cre-Maus	25
3.1.1.1.2. Analyse der $\Delta\alpha6$ Cre-Maus	25
3.1.1.2. Verifizierung des zellspezifischen Knockouts von Kcc2.....	26
3.1.1.2.1. Verpaarung der konditionalen Kcc2 ^{lox/lox} - und L7-Cre- Mäusen	27
3.1.1.2.2. Zeitverlauf von Kcc2 Expression und Deletion in PC- Δ Kcc2-Mäusen.....	28
3.1.1.2.3. Verpaarung der konditionalen Kcc2 ^{lox/lox} - und $\Delta\alpha6$ Cre- Mäusen	29
3.1.1.2.4. Zeitverlauf von Kcc2 Expression und Deletion in GC- Δ Kcc2-Mäusen	30
3.1.1.2.5. Verpaarung der konditionalen Kcc2 ^{lox/lox} -Mäuse mit L7-Cre/ $\Delta\alpha6$ Cre- Mäusen.....	31
3.1.1.2.6. Muster der Deletion von Kcc2 in PC- Δ Kcc2- und GC- Δ Kcc2- Mäusen	31
3.1.2. Der Einfluss von Kcc2 auf die Ausbildung von Synapsen	33
3.1.2.1. Histologische Untersuchung des Cerebellums.....	33
3.1.2.2. Untersuchung dendritischer Spines von Purkinjezellen	34
3.1.2.3. Immunohistochemische Quantifizierung exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen im cerebellären Kortex.....	35
3.1.2.4. Ultrastrukturelle Untersuchung der Synapsen im cerebellären Kortex.....	36
3.1.2.5. Elektrophysiologische Untersuchung inhibitorischer und exzitatorischer Postsynapsen von Purkinjezellen	37
3.1.3. Elektrophysiologische Untersuchung von PC- Δ Kcc2-Mäusen.....	39
3.1.3.1. Ruhemembranpotential im Purkinjezellen und GABAerge Ströme	39
3.1.3.2. Determination von E _{GABA} in Purkinjezellen	40
3.1.3.3. Chloridextrusion nach akuter Erhöhung von [Cl ⁻] _i	42
3.1.4. Elektrophysiologische Untersuchung von GC- Δ Kcc2 Mäusen.....	43
3.1.4.1. Einzelkanalmessungen von GABA _A Rs zur Bestimmung von DF _{GABA}	43
3.1.4.2. Die Bestimmung des Ruhemembranpotentials von Körnerzellen	45
3.1.4.3. Cl ⁻ -Konzentration und Permeabilität beeinflussen das Ruhemembranpotential von Körnerzellen	46
3.1.4.4. Nkcc1 in adulten Körnerzellen	48
3.1.4.5. Die Aktivierung von GABA _A Rs führt zu Shunting Inhibition	49
3.1.5. Auswirkungen des konditionalen Kcc2-Knockouts auf das Netzwerk des Cerebellums.....	50
3.1.5.1. Spontane postsynaptische Ströme von Purkinjezellen in GC- Δ Kcc2 Mäusen	50
3.1.5.2. Spontanaktivität von Purkinjezellen.....	52
3.1.5.3. Vestibulo-okulärer Reflex.....	54

3.1.5.3.1. Funktionsprüfung der okulären Reflexe.....	54
3.1.5.3.2. Kurzfristige Adaption des vestibulo-okulären Reflexes	55
3.1.5.3.3. Langzeitadaption des vestibulo-okulären Reflexes	56
3.2. Kalium-Chlorid-Kotransporter 3.....	57
3.2.1. Konditionaler Knockout von Kcc3 in Purkinjezellen	57
3.2.2. Verifizierung des zellspezifischen Knockouts von Kcc3.....	58
3.2.3. Ruhemembranpotential im Purkinjezellen und GABAerge Ströme.....	59
3.2.4. Die Beteiligung von Kcc3 an Chloridextrusion nach akuter Erhöhung von $[Cl^-]_i$	60
4. DISKUSSION.....	61
4.1. Kcc2 und Synapsenmaturation im Cerebellum	61
4.2. Kcc2 ist der dominierende Cl^--Extruder von Purkinje- und Körnerzellen.....	62
4.2.1. Kcc2 senkt $[Cl^-]_i$ von Purkinjezellen	63
4.2.2. $[Cl^-]_i$ beeinflusst das Membranpotential von Körnerzellen.....	66
4.3. Signaltransduktion im cerebellären Kortex	68
4.3.1. Eine erhöhte neuronale $[Cl^-]_i$ hat verschiedene Konsequenzen für Purkinjezellen und Körnerzellen	68
4.3.2. Die Auswirkungen der zellspezifischen Deletion von Kcc2 auf das neuronale Netzwerk des Cerebellums.....	69
4.4. Die Adaption des vestibulo-okulären Reflexes ist durch zellspezifische Deletion von Kcc2 beeinträchtigt.....	71
5. MATERIAL UND METHODEN	73
5.1. Material	73
5.1.1. Chemikalien und Enzyme	73
5.1.2. Filmmaterialien und bildgebende Verfahren.....	73
5.1.3. Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	73
5.1.4. Bakterienstämme.....	76
5.1.5. Vektoren.....	76
5.1.6. Oligonukleotide	76
5.1.6.1. Genotypisierung	76
5.1.6.2. Sequenzierung	77
5.1.6.3. Sonden für <i>In-situ</i> Hybridisierungen.....	77
5.1.7. Antikörper	78
5.1.8. Mauslinien.....	78
5.2. Methoden.....	79
5.2.1. Mikrobiologische Methoden	79
5.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	79

5.2.1.2.	Transformation von Bakterien	79
5.2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	79
5.2.2.1.	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	79
5.2.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	80
5.2.2.3.	Präparation von Plasmid DNA aus 2 ml-Kulturen (Miniprep)	80
5.2.2.4.	Präparation von Plasmid-DNA aus 100 ml-Kulturen (Midiprep).....	81
5.2.2.5.	Sequenzierung von DNA	81
5.2.2.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	81
5.2.2.7.	Restriktion von DNA	81
5.2.2.8.	DNA-Gelelektrophorese	82
5.2.2.9.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	82
5.2.2.10.	Ligation von DNA-Fragmenten	82
5.2.2.11.	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	82
5.2.2.12.	<i>In vitro</i> -Transkription der Digitoxin-markierten RNA Sonden	82
5.2.2.13.	Aufreinigung von RNA-Sonden.....	83
5.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	83
5.2.3.1.	Herstellung von Gewebeextrakten für Western Blot.....	83
5.2.3.2.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot.....	83
5.2.3.3.	Aufreinigung polyklonaler Antiseren.....	84
5.2.4.	Histologische Methoden.....	84
5.2.4.1.	Gelatinierung von Objektträgern	84
5.2.4.2.	Perfusion von Mäusen	84
5.2.4.3.	Kryotomschnitte	85
5.2.4.4.	Frei schwimmende Schnitte	85
5.2.4.5.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	85
5.2.4.6.	X-Gal Färbung.....	85
5.2.4.7.	Alkalische Phosphatase (AP) Färbung.....	86
5.2.4.8.	Immunofluoreszenzfärbung von frei schwimmenden Schnitten.....	86
5.2.4.9.	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Gehirnschnitten.....	86
5.2.4.10.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	87
5.2.5.	Elektrophysiologische Methoden.....	87
5.2.5.1.	Geräte	87
5.2.5.2.	Akute Schnittpräparation für Elektrophysiologie	88
5.2.5.3.	Patch clamp Messungen im akuten Gewebeschnitt	88
5.2.5.4.	Gramicidin Perforated-Patch.....	89
5.2.5.5.	Korrektur des Grenzflächenpotentials (Liquid junction potential).....	90
5.2.5.6.	Befüllung von Neuronen mit Biocytin.....	91
5.2.5.7.	Messung GABAerger Miniaturströme	92

5.2.5.8.	Messung glutamaterger Miniaturströme.....	92
5.2.5.9.	Messung spontaner IPSCs (sIPSCs).....	92
5.2.5.10.	Messung spontaner EPSCs (sEPSCs)	93
5.2.5.11.	Bestimmung des Ruhemembranpotentials im Perforated-Patch	93
5.2.5.12.	Bestimmung des GABA-Umkehr Potentials.....	93
5.2.5.13.	Messung der Chloridextrusion nach akuter Cl ⁻ Beladung.....	93
5.2.5.14.	Einzelkanalmessungen von GABA _A -Rezeptoren	94
5.2.5.15.	<i>Cell attached</i> Messung des Membranpotentials	95
5.2.5.16.	Bestimmung von [Cl ⁻] _i	96
5.2.5.17.	Spontane Aktivität von Purkinjezellen.....	96
5.2.6.	Verhalten	97
5.2.6.1.	Aufnahme von Augenbewegungen.....	97
5.2.6.2.	Optokinetischer Reflex (OKR)	98
5.2.6.3.	Vestibulo-okulärer Reflex (VOR)	98
5.2.6.4.	Lernparadigma	98
6.	REFERENZEN	100
7.	PUBLIKATION.....	110
8.	DANKSAGUNGEN	111

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Die Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter (SLC12).....	2
Abbildung 2 Membrantopologie der Kccs und Nkccs.....	3
Abbildung 3 Ionentransportmechanismus der neuronalen CCCs.....	4
Abbildung 4 Kcc2 lokalisiert auf dendritischen Spines.....	8
Abbildung 5 Chloridgradienten in einem Neuron.....	10
Abbildung 6 Synergistische Wirkung von GABA _A -Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren in unreifen Neuronen.....	15
Abbildung 7 Aufbau des cerebellären Kortex.....	17
Abbildung 8 Vorwärtshemmung und negative Rückkopplung im cerebellären Kortex.....	19
Abbildung 9 Intra- und extracerebelläre Verschaltung des VOR.....	20
Abbildung 10 Cre-vermittelte Rekombination im Cerebellum.....	25
Abbildung 11 Die inserierten loxP-Sequenzen beeinträchtigen die Expression von Kcc2 nicht.....	26
Abbildung 12 Zellspezifische Deletion von Kcc2 in Purkinjezellen.....	28
Abbildung 13 Zeitverlauf der Expression von Kcc2 in Purkinjezellen.....	29
Abbildung 14 Zellspezifische Deletion von Kcc2 in Körnerzellen.....	30
Abbildung 15 Zellspezifische Deletion von Kcc2 in Körner- und Purkinjezellen.....	31
Abbildung 16 Muster der Cre-vermittelten Deletion von Kcc2.....	32
Abbildung 17 Normale Morphologie des Cerebellums nach zellspezifischer Kcc2-Deletion.....	33
Abbildung 18 Die Deletion von Kcc2 hat keinen Einfluss auf die Länge dendritischer Spines von Purkinjezellen.....	34
Abbildung 19 Die Anzahl GABAerger und glutamaterger Synapsen im cerebellären Kortex ist unverändert.....	35
Abbildung 20 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des cerebellären Kortex.....	37
Abbildung 21 Postsynaptische Miniaturströme von Purkinjezellen.....	38
Abbildung 22 Der Einfluss von Kcc2 auf [Cl ⁻] _i von Purkinjezellen.....	41
Abbildung 23 Chloridextrusion nach akuter Erhöhung von [Cl ⁻] _i	42
Abbildung 24 Einzelkanalmessungen von GABA _A Rs auf Körnerzellen.....	44
Abbildung 25 Die Bestimmung des Ruhemembranpotentials von Körnerzellen.....	46
Abbildung 26 Membranpotential von Körnerzellen während der Blockade von GABA _A - und Glycinrezeptoren.....	47
Abbildung 27 Die Blockade von Nkcc1 führt zur Hyperpolarisation von Körnerzellen.....	48
Abbildung 28 Muscimol vermittelt eine Shunting Inhibition auf Körnerzellen.....	50
Abbildung 29 Spontane postsynaptische Ströme von Purkinjezellen.....	51

Abbildung 30 Spontanaktivität von Purkinjezellen in PC- Δ Kcc2- und GC- Δ Kcc2-Mäusen.	53
Abbildung 31 Kompensatorische Augenbewegungen von Mäusen.	54
Abbildung 32 Kurzfristige Anpassung des VOR durch „Gain down“-Training.	55
Abbildung 33 Phasenumkehr des VOR.	56
Abbildung 34 Konditioneller Knockout von Kcc3 in Purkinjezellen des Cerebellums.	58
Abbildung 35 Kcc3 ist nicht an der Regulation von $[Cl^-]_i$ von adulten Purkinjezellen beteiligt.	59
Abbildung 36 Protokoll des Chloridextrusions-Experimentes.	94

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 CCCs, Ionentransport und Expressionsmuster	2
Tabelle 2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	74
Tabelle 3 Primer zum Genotypisieren der verwendeten Mauslinien	76
Tabelle 4 Primer zum Sequenzieren von DNA-Fragmenten im pGEM [®] -T Easy -Vektor	77
Tabelle 5 Primer zum Amplifizieren der DNA-Vorlagen für <i>in situ</i> Hybridisierungssonden	77
Tabelle 6 Liste der verwendeten Primäantikörper.	78
Tabelle 7 Verwendete Mauslinien	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$[X]_a$	Extrazelluläre Konzentration der Ionensorte X
$[X]_i$	Intrazelluläre Konzentration der Ionensorte X
ACSF	Artifizielle Cerebro-Spinale Flüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Ca^{2+}	Calciumion(en)
CCC	Kationen-Chlorid-Kotransporter
Cl ⁻	Chloridion(en)
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
Cre	Cre-Rekombinase
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
DF_X	Elektrochemische Triebkraft für Ionensorte X
DF_{GABA}	Elektrochemische Triebkraft für Ionen, die von GABA _A Rs geleitet werden
DMSO	Dimethylsulfoxid
E X	Embryonaltag X
E_{Cl^-}	Umkehrpotential für Chlorid

E_{GABA}	Umkehrpotential für GABAerge Ströme
$E_{\text{HCO}_3^-}$	Umkehrpotential für Bikarbonat
E_{K^+}	Umkehrpotential für Kalium
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A R	γ -Aminobuttersäurerezeptor Typ A (GABA _A -Rezeptor)
GDP	großes depolarisierendes Potential
H ₂ O	Wasser
HCO_3^-	Bikarbonation(en)
I	Strom
I_h	Haltestrom
ISI	Interspikeintervall
ISI CV	Variationskoeffizient der Interspikeintervalle
ISI CV ₂	ISI CV von benachbarten Intervallen
K^+	Kaliumion(en)
Kcc	Kalium-Chlorid-Kotransporter
K_V Kanäle	spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
L7-Cre	L7/pcp-2:Cre
lacZ	Bakterielles Gen für β -Galaktosidase
LJP	Grenzflächenpotential
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
mEPSC	Kleiner exzitatorischer postsynaptischer Strom
Mg^{2+}	Magnesiumion(en)
mIPSC	Kleiner inhibitorischer postsynaptischer Strom
mRNA	Boten-RNA
Na/K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
Na^+	Natriumion(en)
Ncc	Natrium-Chlorid-Kotransporter
Nkcc	Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Amino-Terminus
OKR	Optokinetischer Reflex
P X	Postnataltag X
Pcp-2	Purkinjezell-Protein 2
R	Universelle Gaskonstante
R_a	Zugangswiderstand
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler
sEPSCS	Spontaner exzitatorischer postsynaptischer Strom
sIPSCs	Spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
Slc	Solute carrier
T	Absolute Temperatur (in Kelvin)

TTX	Tetrodotoxin
U	Spannung
VGAT	vesikulärer GABA Transporter
VGLUT	vesikulärer Glutamat Transporter
V_h	Haltepotential
V_M	Ruhemembranpotential
V_{Membran}	Membranpotential
VOR	Vestibulo-okulärer Reflex
V_p	Pipettenpotential
V_{Patch}	Potential über den Patch
V_{pf}	Perforated-Patch Potential
VVOR	Visuo-vestibulo-okulärer Reflex
z	Äquivalentzahl
ZNS	Zentrales Nervensystem

SI Einheiten und SI Einheitenzeichen wurden gemäß dem Internationalen Einheitensystem verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Cerebellum kontrolliert Bewegungen sowie das Erlernen motorischer Fähigkeiten. Alle Informationen, die im Cerebellum verarbeitet werden, durchlaufen das sehr gleichförmig aufgebaute neuronale Netzwerk des cerebellären Kortex. Hier konvergieren alle Signale auf Purkinjezellen, den einzigen Neuronen, deren Axone aus dem cerebellären Kortex heraus projizieren. Glutamatergen Input erhalten Purkinjezellen von Kletterfasern und Körnerzellen. Der Informationsfluss durch den cerebellären Kortex bis zu Purkinjezellen wird mittels Vorwärtshemmung und negativer Rückkopplung durch Interneuronen moduliert. Allerdings ist die Relevanz dieser inhibitorischen neuronalen Schaltkreise für motorisches Lernen und dessen Konsolidierung nicht aufgeklärt.

Die schnelle Komponente der GABAergen Inhibition wird durch GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Da GABA_A-Rezeptoren ligandenaktivierte Anionenkanäle sind, hängt der von ihnen vermittelte Strom von der Verteilung der leitbaren Anionen, vor allem Chlorid, über die Membran ab. Um die schnelle Inhibition zu vermitteln, ist daher eine niedrige intraneuronale Cl⁻-Konzentration essentiell. Es besteht Konsens, dass der neuronenspezifische Kalium-Chlorid-Kotransporter Kcc2 die intrazelluläre Chloridkonzentration unter das elektrochemische Chloridgleichgewichtspotential absenkt, und so für eine hyperpolarisierende GABA-Antwort sorgt. Aufgrund der Interaktion des C-Terminus von Kcc2 mit einem Zytoskelett-assoziierten Protein, wurde Kcc2 ausserdem eine Schlüsselrolle in der Maturation dendritischer Spines zugeschrieben. Diese Interaktion beeinflusst ausserdem die Aggregation von AMPA-Rezeptoren in dendritischen Spines von adulten Neuronen, und dadurch die Effizienz glutamaterger Neurotransmission.

Um die physiologische Funktion spezifischer inhibitorischer Signalwege im cerebellären Netzwerk zu untersuchen, wurde Kcc2 spezifisch in cerebellären Purkinjezellen und Körnerzellen deletiert. In diesen Mausmodellen war weder die Morphologie der dendritischen Spines, noch die Dichte der Synapsen oder die glutamaterge Transmission messbar verändert. Die Deletion von Kcc2 führte in beiden Zelltypen zu einer Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration um den Faktor zwei. In Purkinjezellen wurde hierdurch die GABAerge Inhibition zwar nicht vollständig unterbunden, aber immerhin drastisch reduziert. In Körnerzellen war zwar die elektrische Antwort auf GABA unverändert, doch die Verdopplung der intrazellulären Chloridkonzentration führte zu einer konstanten Depolarisation des Membranpotentials.

Die Reduktion der GABAergen Inhibition von Purkinjezellen führte zu einer beeinträchtigten Feinabstimmung der Motorik an veränderte Bedingungen. Die reduzierten Anpassungen, die in diesen Mäusen noch stattfanden, wurden zudem nicht konsolidiert. Dies wurde am Beispiel der kompensatorischen Augenbewegungen beim vestibulo-okulären Reflex untersucht. Sowohl das die Amplitude von kompensatorischen Augenbewegungen, als auch die

zeitliche Feinabstimmung war reduziert. Dies legt eine fundamentale Rolle der Vorwärtshemmung von Purkinjezellen bei der Induktion von neuronaler Plastizität nahe.

Die Deletion von *Kcc2* in Körnerzellen hatte keinen Effekt auf die Adaption von kompensatorischen Augenbewegungen. Einzig die Übernacht-Konsolidierung von zeitlichen Abstimmungen des vestibulo-okulären Reflexes war drastisch eingeschränkt. Die GABAerge Inhibition war durch Deletion von *Kcc2* nicht verändert. Daher liegt nahe, dass die Erregbarkeit von Körnerzellen eine sehr spezifische Rolle in der Konsolidierung von zeitlicher Feinabstimmung, nicht jedoch der Amplitude der kompensatorischen Augenbewegungen spielt.

ABSTRACT

The cerebellum controls movement and learning of motor skills through a uniformly patterned neuronal circuitry, where all information converges onto a single type of neuron, the Purkinje cell. Purkinje cells receive glutamatergic input from climbing fibers and granule cells. Interneurons modulate information flow through the cerebellar cortex by feedforward and feedback inhibition. Their contribution to motor learning and consolidation is not fully understood.

For fast inhibitory action of GABA, mediated by the GABA_A receptor anion channels, low intracellular Cl⁻ concentration is required. The neuron-specific KCl cotransporter Kcc2 is thought to lower the intracellular Cl⁻ concentration below its electrochemical equilibrium potential and thereby rendering GABA hyperpolarizing. Additionally, Kcc2 was described as a key factor in the maturation of dendritic spines owed to interaction of its C-terminus with a cytoskeleton-associated protein. Furthermore it was reported that Kcc2 affects AMPA receptor aggregation in dendritic spines of adult neurons and thereby influences glutamatergic transmission.

To investigate the functional roles of specific inhibitory pathways in cerebellar circuits, we specifically disrupted Kcc2 in cerebellar Purkinje cells and granule cells. We neither found abnormalities in dendritic spine morphology, nor in synapse density or glutamatergic transmission in these mouse models. The disruption of Kcc2 increased the intracellular Cl⁻ concentration roughly twofold in both cell types. This drastically reduced, but not abolished, GABAergic inhibition on Purkinje cells. In granule cells it led to a constitutive depolarized membrane potential.

Decreasing GABAergic inhibition on Purkinje cells in mice affected their ability to adjust their eye movements during vestibulo-ocular mismatch training. Furthermore, the consolidation of learned gain and phase adaptations was strongly compromised. This suggests a fundamental role of feedforward inhibition onto Purkinje cells in the induction of plasticity.

In contrast to this, Kcc2 ablation in granule cells specifically impaired overnight consolidation of phase learning of the vestibulo-ocular reflex, while gain modulation and short term adaptation of gain and phase remained intact. As GABAergic inhibition on Granule cells was unchanged in these mice, this suggests that Granule cell excitability plays a specific role in the consolidation of phase learning.

1. EINLEITUNG

Biologische Membranen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, in die verschiedene Membranproteine eingebettet sind. Biomembranen sind aufgrund ihrer amphipatischen Eigenschaften für Ionen und große, geladene Moleküle impermeabel, wohingegen kleine, unpolare Moleküle bedingt passieren können. Membranen stellen somit eine Trennschicht zwischen dem Zytosol und verschiedenen Zellkompartimenten (Organellen), sowie vom Extrazellulärraum dar. So umschließt zum Beispiel die Plasmamembran die Zelle, und ermöglicht auf diese Weise, Konzentrationen von löslichen Substanzen im Zytosol aufrechtzuerhalten, die von denen der Extrazellulärflüssigkeit abweichen.

Um trotzdem Informations- und Nährstoffaustausch zwischen Zellen und Zellkompartimenten zu ermöglichen, sind in die Membran eingelagerte Proteine nötig, die selektiven Durchfluss oder Transport verschiedener Moleküle gewähren. Die Aufgaben dieser Transmembranproteine reichen von Stoffaustausch und Signalweiterleitung bis hin zur Aufrechterhaltung von Konzentrations- und Spannungsgradienten über die Membran. Jede Zelle besitzt eine an ihre spezifische Funktion angepasste Ausstattung solcher Membranproteine.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen aktivem und passivem Transport von Molekülen über Membranen. Bei passivem Transport fließen Moleküle ohne Zuführung von Energie entlang ihres Konzentrations- oder Potentialgefälles durch Ionenkanäle oder Carrier. Beim aktiven Transport können Moleküle entgegen ihres elektrochemischen Gradienten transportiert und somit auf einer Seite der Membran angereichert werden. Beim primär aktiven Transport nutzen sogenannte Pumpen, wie z.B. Na^+/K^+ -ATPasen, Energie in Form von ATP, um Ionen oder Moleküle gegen ihren elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Die in diesem elektrochemischen Gradienten gespeicherte Energie kann wiederum die Triebkraft sekundär aktiver Transportmechanismen mittels Kotransportern oder Antiportern sein.

1.1. Kationen-Chlorid-Kotransporter

Eine Klasse der Transportproteinen stellen die SLC-Gene dar (Solute carrier), die für Uniporter, Antiporter und Kotransporter kodieren. Bisher wurden im humanen Genom 51 SLC-Familien mit insgesamt 378 Genen identifiziert (Hediger *et al*, 2004). Eine davon (SLC-12) umfasst alle bekannten Gene, die für elektroneutrale Kationen-Chlorid-Kotransporter kodieren (Gamba, 2005). Die humane SLC12 Familie besteht aus 9 Genen (Tabelle 1).

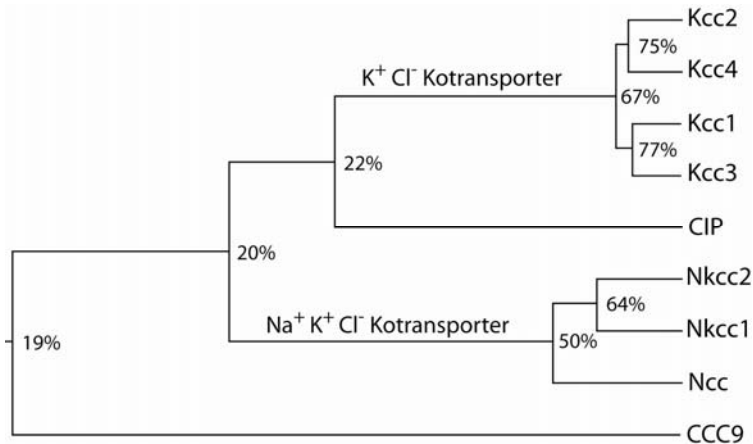


Abbildung 1 | Die Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter (SLC12).

Phylogenetischer Baum der humanen SLC12 Familie, kalkuliert mit dem ClustalW-Algorithmus. Die Proteinsequenzidentität ist an den Gabelungen angegeben.

Der phylogenetische Baum dieser Genfamilie gliedert sich in zwei prominente Untergruppen (Abb. 1). Eine davon umfasst Kotransporter, die K^+ und Cl^- transportieren (Kalium-Chlorid-Kotransporter). Die andere Gruppe repräsentiert Kotransporter, die Na^+ , mit oder ohne K^+ , zusammen mit Cl^- transportieren (Natrium-(Kalium)-Chlorid-Kotransporter). Die physiologische Bedeutung der übrigen beiden SLC12s ist unbekannt, wobei für SLC12A8 eine Funktion im Polyamin- und Aminosäuretransport beschrieben wurde (Daigle *et al*, 2009).

Tabelle 1 | CCCs, Ionentransport und Expressionsmuster

SLC12 - Familie der Elektroneutralen Kationen - Chlorid - Kotransporter			
Protein	Gen (human)	Vorwiegend transportierte Ionen	Expressionsmuster
Nkcc2 / BSC1	SLC12A1	$Na^+ / K^+ / 2Cl^-$	Niere, apikal
Nkcc1 / BSC2	SLC12A2	$Na^+ / K^+ / 2Cl^-$	ubiquitär, basolateral
Ncc / TSC	SLC12A3	Na^+ / Cl^-	Niere
Kcc1	SLC12A4	K^+ / Cl^-	ubiquitär
Kcc2	SLC12A5	K^+ / Cl^-	Neuronen-spezifisch
Kcc3	SLC12A6	K^+ / Cl^-	weitverbreitet, Kcc3a prädominant im ZNS, Kcc3b prädominant in der Niere
Kcc4	SLC12A7	K^+ / Cl^-	weitverbreitet
CCC9	SLC12A8	Polyamine / Aminosäuren	weitverbreitet
CCC8/CIP	SLC12A9	unbekannt	weitverbreitet

1.1.1. Struktur und molekulare Diversität der Kationen-Chlorid-Kotransporter

Die bisher beschriebenen Kationen-Chlorid-Kotransporter (CCCs, cation chloride cotransporters) sind transmembrane Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 120-200 kDa. Basierend auf Hydrophibizitätsprofilen der Proteinsequenzen haben alle Kationen-Chlorid-Kotransporter einen ähnlichen Aufbau, der bisher jedoch nur für Nkcc1 bestätigt wurde (Gerelsaikhani & Turner, 2000; Warmuth *et al*, 2009). Demnach haben die CCCs eine zentrale Domäne mit 12 hydrophoben Transmembrandomänen sowie einem intrazellulären N- und C-Terminus (Abb. 2). Es gibt einen strukturellen Unterschied zwischen den zwei Untergruppen: während die Kalium-Chlorid-Kotransporter und CIP1 einen langen extrazellulären Bereich mit mehreren N-Glykosylierungsstellen zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne besitzen, haben Natrium-gekoppelte Kotransporter eine ähnliche Schleife zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne (Mercado *et al*, 2004). In der Sequenz von SLC12A8 wurde zwar keine extrazelluläre Schleife, jedoch eine extrazelluläre, glykosilierbare Stelle vorhergesagt (Mercado *et al*, 2004).

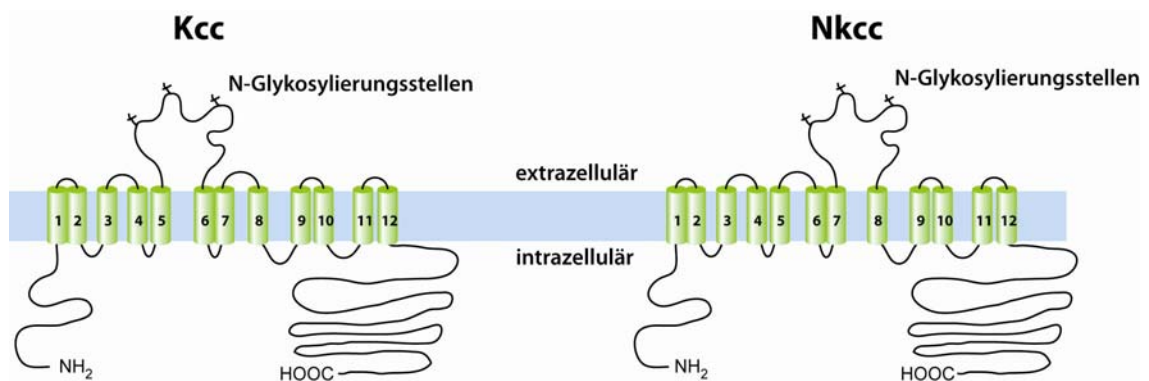


Abbildung 2 | Membrantopologie der Kccs und Nkccs.

CCCs haben 12 Transmembrandomänen und einen intrazellulären N- und C-Terminus. Während Kccs eine lange extrazelluläre Schleife zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne besitzen findet sich bei den Nkccs ein ähnlicher Bereich zwischen der siebten und achten Transmembrandomäne.

Die primäre Funktion von Kationen-Chlorid-Kotransportern ist der Transport von Chloridionen (gekoppelt an den Transport von Kationen) über Membranen. Da die Stöchiometrie dieses Transports $1K^+ : 1Cl^-$, $1Na^+ : 1Cl^-$ oder $1Na^+ : 1K^+ : 2Cl^-$ ist, findet keine Nettobewegung von Ladungen über die Membran statt, somit ist der Prozess elektroneutral. CCCs sind sekundär aktive Transporter, d.h. die Energie, die für den Transport von Cl^- gegen den Gradienten nötig ist, stammt vom Kotransport der entsprechenden Kationen entlang deren Gradienten. Die Kationengradienten über die Plasmamembran determinieren auch die Transportrichtung der jeweiligen CCCs. Prinzipiell sind die CCCs bidirektionale Transporter, die abhängig von der

Ionenverteilung Einwärts- oder Auswärtstransport vermitteln. Ncc und die Nkccs verwenden den Gradienten von Na^+ , somit ist der Transport der Ionen einwärts gerichtet. Kccs hingegen nutzen den auswärtsgerichteten elektrochemischen Gradienten von K^+ , um Cl^- aus der Zelle heraus zu transportieren (Abb. 3). Da die physiologischen Konzentrationen von Na^+ und K^+ über die Na^+/K^+ -ATPase schnell wieder eingestellt werden, ist der Nettoeffekt der CCCs Cl^- -Transport in die Zelle hinein (Ncc und Nkcc), oder Cl^- -Transport aus der Zelle hinaus (Kcc).

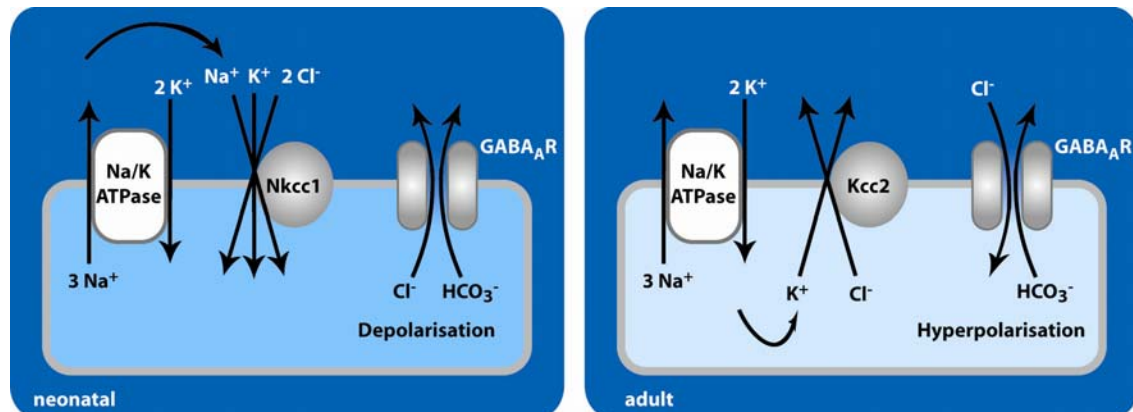


Abbildung 3 | Ionen-Transportmechanismus der neuronalen CCCs.

Nkcc1 vermittelt in jungen Neuronen die Aufnahme von Chlorid (links), während Kcc2 in adulten Neuronen Chlorid exportiert (rechts). Die Na/K-ATPase generiert starke Kationengradienten über die Membran, die wiederum den Transport der CCCs antreiben. Da der Ionentransport über die CCCs elektroneutral verläuft kann die veränderte Chloridkonzentration z.B. über GABA_A -Rezeptoren gemessen werden. (Adaptiert von (Blaesse *et al*, 2009)).

Der elektroneutrale Ionentransport der CCCs erschwert die direkte elektrophysiologische Untersuchung ihrer Transportkapazität. Neben der Verwendung von markiertem Rubidium (^{86}Rb , anstelle von K^+) und Cl^- -sensitiven Farbstoffen zum Darstellen des Ionentransports, wird elektrophysiologisch zumeist die intrazelluläre Chloridkonzentration gemessen (Berglund & Kuner, 2009; Payne, 1997). Dabei werden Anionenkanäle, wie GABA_A -Rezeptoren oder Glycinrezeptoren als „Ausleser“ verwendet, um z.B. das Umkehrpotential für Cl^- zu bestimmen.

1.1.2. Expressionsmuster der neuronalen Kationen-Chlorid-Kotransporter

1.1.2.1. Kalium-Chlorid-Kotransporter 2 (Kcc2)

Die Expression von Kcc2 ist strikt auf zentrale Neuronen beschränkt. In fast allen Neuronen des adulten ZNS findet man Kcc2 mRNA. In nicht-neuronalen Zellen, neuronalen Vorläuferzellen sowie Neuronen der peripheren Nervensystems sind Kcc2-Transkripte jedoch nicht nachweisbar (Payne *et al*, 1996; Rivera *et al*, 1999). Durch alternatives Spleißen wird die Komplexität des

Proteoms immens erhöht. In Säugern sind zwei Isoformen als Produkt des *Slc12a5* Gens, welches für *Kcc2* kodiert, bekannt. Sie unterscheiden sich nur in ihrem ersten Exon (intrazellulärer N-Terminus) (Uvarov *et al*, 2007). Im neonatalen Mausgehirn sind die mRNAs beider Isoformen etwa gleich stark vertreten. Während die Expression der längeren Isoform *Kcc2a* in etwa konstant bleibt, steigt die Expression von *Kcc2b* während der postnatalen Entwicklung stark an (Uvarov *et al*, 2007). Im embryonalen ZNS wird *Kcc2* zuerst in den „älteren“ Bereichen (Rückenmark und Hirnstamm) exprimiert. Im Neokortex hingegen ist das adulte Expressionsniveau erst ca. nach der zweiten postnatalen Woche erreicht (Hübner *et al*, 2001b; Stein *et al*, 2004; Rivera *et al*, 1999).

Parallel zum Anstieg der *Kcc2b*-Expression sinkt die Cl⁻-Konzentration in zentralen Neuronen, was auf eine zentrale Rolle dieser Isoform bei der Regulation des intraneuronalen Chlorids hindeutet (Zhu *et al*, 2005). Zusätzlich zur transkriptionellen Regulation wird auch die Aktivität von *Kcc2* posttranslational durch Phosphorylierung und Oligomerisierung reguliert (Rinehart *et al*, 2009; Blaesse *et al*, 2006; Khirug *et al*, 2005).

Kcc2 lokalisiert in der Plasmamembran von Soma und Dendriten, jedoch nicht im Axon (Szabadics *et al*, 2006). Ein besonders starkes *Kcc2*-Signal wurde in dendritischen Spines, vor allem in den Spine-Köpfen, von Pyramidal- und Interneuronen beschrieben (Gulyás *et al*, 2001). Während GABAerge Synapsen hauptsächlich auf dem Soma und der Oberfläche des Dendritenbaums lokalisieren, sind glutamaterge Synapsen hauptsächlich auf den Köpfen der dendritischen Spines zu finden. Es wurde beschrieben, dass *Kcc2* durch Interaktion mit dem Zytoskelett die Morphologie der Spines sowie die Dichte von AMPA-Rezeptoren beeinflusst (Gauvain *et al*, 2011; Li *et al*, 2007).

Bisher wurde kein selektiver Antagonist von *Kcc2* beschrieben. Das Diuretikum Furosemid blockiert zwar *Kcc2*, doch auch die Transportaktivität von *Nkcc1* wird bei gleicher Konzentration inhibiert (Payne *et al*, 1996). Ausserdem wurde eine inhibitorische Wirkung von Furosemid auf bestimmte GABA_A-Rezeptoren beschrieben (Korpi & Lüddens, 1997). Die physiologische Funktion von *Kcc2* wurde daher erstmals in Knockoutmäusen beschrieben. *Kcc2*-defiziente Mäuse zeigen einen erhöhten Muskeltonus und sind nicht in der Lage zu atmen. Daher sterben sie kurz nach der Geburt (Hübner *et al*, 2001b). Hypomorphe Mäuse, die nur noch ~5 % *Kcc2* exprimieren, haben ab dem ersten postnatalen Tag Krampfanfälle und sterben innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen (Woo *et al*, 2002).

1.1.2.2. Kalium-Chlorid-Kotransporter 3 (Kcc3)

Kcc3 ist ein schwellungsaktivierter Kalium-Chlorid-Kotransporter, der in vielen Geweben, wie z.B. Niere, Herz, Lunge, aber auch im Gehirn von Säugern exprimiert wird (Boettger *et al*, 2003;

Hiki *et al*, 1999). Durch alternatives Spleißen entstehen drei verschiedene Isoformen mit spezifischen Expressionsmustern. Während Kcc3b nur in Pankreas und Niere exprimiert wird, wurden Kcc3a und Kcc3c auch im Gehirn detektiert (Le Rouzic *et al*, 2006). Die kürzeste Isoform Kcc3c scheint Neuronen-spezifisch exprimiert zu werden. Astrozyten und Glia hingegen exprimieren Kcc3a (Le Rouzic *et al*, 2006). Eine hohe Expression von Kcc3 wurde in der weißen Substanz von Gehirn und dorsalem Rückenmark, zeitlich korreliert mit der Bildung des Myelins, beschrieben (Pearson *et al*, 2001).

Mutationen in dem Gen *Slc12a6*, das für Kcc3 kodiert, führen beim Menschen zu einer peripheren Neuropathie assoziiert mit einer vollständigen oder partiellen Agenesie des *Corpus callosum*, dem Anderman-Syndrom (Howard *et al*, 2002). Kcc3-Knockoutmäuse zeigten ähnliche Symptome, wie unter anderem Veränderungen des Myelins sowie progressive Neurodegeneration (Boettger *et al*, 2003).

1.1.2.3. Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter 1 (Nkcc1)

Das Gen *Slc12a2* kodiert für den Na⁺-gekoppelten Cl⁻-Transporter Nkcc1 (auch BSC2, für Bumetanide-Sensitive Cotransporter 2). In Säugern wurden zwei funktionelle Spleißvarianten des Proteins beschrieben, Nkcc1a und Nkcc1b (Randall *et al*, 1997; Vibat *et al*, 2001). Diese Isoformen unterscheiden sich durch 16 Aminosäuren mit einer putativen PKA-Phosphorylierungsstelle im C-Terminus von Nkcc1a, die von Exon 21 kodiert werden. Beide Isoformen werden ubiquitär exprimiert, doch im adulten Gehirn ist die relative Expression von Nkcc1b höher (Vibat *et al*, 2001). In Epithelzellen lokalisiert Nkcc1 in der basolateralen Membran und spielt eine entscheidende Rolle in der Aufnahme von Cl⁻, das über die apikale Membran sezerniert wird (Evans *et al*, 2000; Bachmann *et al*, 2003). Im Nervensystem hingegen ist der Nkcc1-vermittelte Cl⁻-Influx ein wichtiger Faktor in Regulation und Kontrolle neuronaler Erregbarkeit (Sung *et al*, 2000; Yamada *et al*, 2004; Dzhala *et al*, 2005; Pfeffer *et al*, 2009). Nkcc1 mRNA wurde sowohl in neuronalen, als auch in nicht-neuronalen Zellen detektiert (Kanaka *et al*, 2001). Die neuronale Expression von Nkcc1 während der Entwicklung ist recht kontrovers diskutiert. Neben einigen Studien, die postnatal eine Abnahme der Nkcc1-Expression beschrieben (Hübner *et al*, 2001a; Yamada *et al*, 2004; Plotkin *et al*, 1997), berichten andere Publikationen von einer Zunahme der Expression im Gehirn von Nagern während der postnatalen Entwicklung (Clayton *et al*, 1998; Mikawa *et al*, 2002; Wang *et al*, 2002; Yan *et al*, 2001). Im Gegensatz zu Kcc2 lokalisiert Nkcc1 auch in der Membran des Axons von adulten Neuronen (Jang *et al*, 2001; Khirug *et al*, 2008).

Bisher wurde noch keine humane Krankheit mit Mutationen in *Slc12a2* korreliert. *Nkcc1*-Knockoutmäuse haben jedoch, konsistent mit der beinahe ubiquitären Expression,

Beeinträchtigungen in verschiedenen Geweben (Delpire *et al*, 1999; Flagella *et al*, 1999; Pace *et al*, 2000; Dixon *et al*, 1999). Neben vollständiger Taubheit, Gleichgewichtsstörungen, reduziertem Blutdruck und beeinträchtigtem Wachstum wurden unter anderem auch Defekte in der Speichelproduktion und Spermatogenese beschrieben.

1.1.3. Der Einfluss von Kcc2 auf die Morphologie von Neuronen

Neben der beschriebenen Ionentransportfunktion wurde auch eine strukturelle Rolle von Kcc2 beschrieben (Li *et al*, 2007). Überexpression von Kcc2 führt in jungen hippocampalen Schnittkulturen zu mehr GABAergen Synapsen, wohingegen deren Anzahl in hypomorphen Kcc2-Mäusen reduziert ist (Chudotvorova *et al*, 2005; Riecki *et al*, 2008). Im Gegensatz dazu beschrieben Khalilov *et al*. eine höhere Dichte GABAerger und glutamaterger Synapsen in embryonischen Hippocampi von Kcc2-defizienten Mäusen, also zu einem Zeitpunkt, an dem Kcc2 noch nicht funktionell ist (Khalilov *et al*, 2011). Eine Studie von Li *et al*. zeigte hingegen, dass ausschließlich glutamaterge Synapsen durch den Knockout von Kcc2 beeinflusst werden (Li *et al*, 2007). In kultivierten kortikalen Neuronen von Kcc2-defizienten Mäusen, sowie akuten Gehirnschnitten von hypomorphen Kcc2-Mäusen war die Anzahl funktioneller glutamaterger Synapsen drastisch reduziert, während GABAerge Synapsen nicht betroffen waren (Li *et al*, 2007). Des Weiteren war die Morphologie der dendritischen Spines von Kcc2-defizienten Neuronen drastisch verändert. Li *et al*. (2007) berichteten, dass dendritischen Protrusionen in Kcc2 Knockoutneuronen im Durchschnitt 2,5x länger sind als bei Kontrollneuronen, während die Anzahl der Protrusionen unverändert ist. Kortikale dendritische Spines tragen hauptsächlich glutamaterge Synapsen, und auch Kcc2 ist dort hoch exprimiert (Gulyás *et al*, 2001). Die beschriebenen Effekte waren unabhängig von der Ionentransportfunktion von Kcc2. Sowohl Anzahl der glutamatergen Synapsen, als auch Morphologie der dendritischen Spines konnte durch Expression mit einem Kcc2-Konstrukt ohne Ionentransportfunktion wiederhergestellt werden. Die morphogene Rolle von Kcc2 wurde auf die Interaktion des C-Terminus mit dem Zytoskelett-assoziierten Protein 4.1N zurückgeführt (Abb. 4). Eine weitere Studie an adulten hippocampalen Neuronen zeigte hingegen, dass der Knockdown von Kcc2 *in vitro* die Morphologie von dendritischen Spines nicht verändert. Statt dessen war die Dichte von AMPA-Rezeptoren am Kopf der Spines, und somit die Effizienz der glutamatergen Synapsen, reduziert (Gauvain *et al*, 2011). Auch dieser Effekt wurde auf die Interaktion zwischen Kcc2 und dem Zytoskelett, und nicht auf den Ionentransport, zurückgeführt. Interessanterweise führt Neuron-spezifische Überexpression von Kcc2 in Mausembryonen zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, was wiederum neuronale Differenzierung und Migration beeinträchtigt (Horn *et al*, 2010).

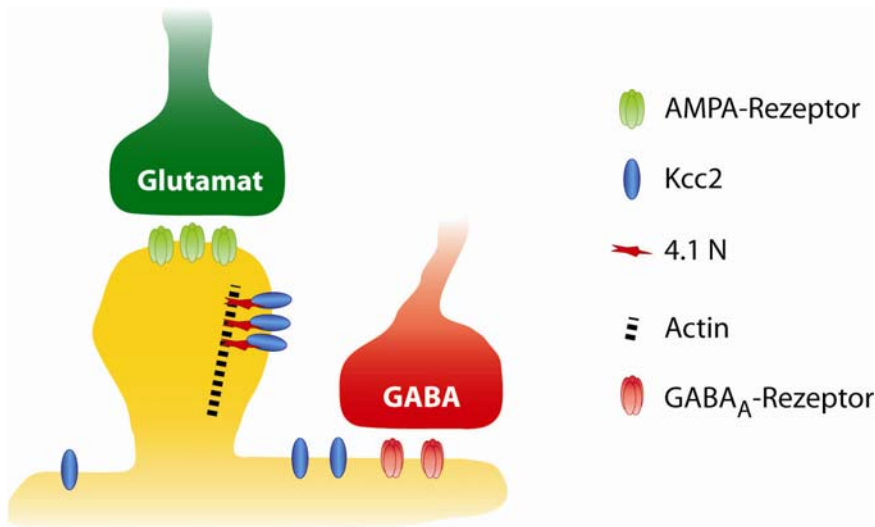


Abbildung 4 | Kcc2 lokalisiert auf dendritischen Spines.

Über die Interaktion mit dem zytoskelett-assoziierten Protein 4.1N reguliert Kcc2 die Effizienz von exzitatorische Synapsen. Es wurde postuliert, dass die Anwesenheit von Kcc2 AMPA-Rezeptoren auf die Spitze der Spines beschränkt (Gauvain *et al*, 2011). GABAerge Synapsen lokalisieren nicht auf Spines, sondern auf dem Dendriten. Hier ist die Ionentransportfunktion für die Polarität der GABAergen Ströme essentiell. (Adaptiert von (Chamma *et al*, 2012))

Somit ist Kcc2 nicht nur für die Einstellung der niedrigen intrazellulären Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$), und somit der qualitativen neuronalen Antwort auf GABA und Glycin, essentiell, sondern hat auch eine strukturelle Rolle in Neuronen.

1.1.4. CCCs und die Polarität der GABA_A-Rezeptorströme

Neben Bikarbonat (HCO_3^-) ist Chlorid das häufigste freie Anion in tierischen Zellen. Da Chlorid bei vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, ist die Cl^- -Konzentration des Zytosols streng reguliert. Die intrazelluläre Cl^- -Konzentration von Neuronen weicht oft von der des Extrazellulärraums ab, so dass ein elektrochemischer Gradient über die Plasmamembran existiert. Dem Abbau dieses Cl^- -Gradienten durch passiven Cl^- -Flux über Cl^- -Kanäle wirken, neben Anionenaustauschern, Chloridtransporter wie die CCCs entgegen. Unter den Anionenaustauschern vermitteln Natrium-unabhängige Cl^-/HCO_3^- -Austauscher (AE, für anion exchanger) die Aufnahme von Cl^- , während Natrium-abhängige Anionenaustauscher (NDAE, für Na^+ -dependent anion exchanger) die intraneuronale Cl^- -Konzentration absenken (Payne, 2003; Gonzalez-Islas *et al*, 2009; Bellemer *et al*, 2011; Gulácsi *et al*, 2003). In Neuronen des ZNS spielen unter denn CCCs vor allem Kcc2, als Cl^- -Exporter, und Nkcc1, als Cl^- -Importer, die entscheidende Rolle in der Regulation von $[Cl^-]_i$.

1.1.4.1. Die Polarität der GABA-Antwort

Die intraneuronale Chloridkonzentration ist bei der schnellen Komponente der Antwort auf den Neurotransmitter GABA von zentraler Bedeutung. Diese wird durch Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren vermittelt, die ligandengesteuerte, relativ unselektive Anionenkanäle sind. Die Polarität von GABA_A-Rezeptor-vermittelten Strömen hängt von den elektrochemischen Gradienten der permeierenden Anionen ab. Physiologisch relevant sind Cl⁻ und HCO₃⁻, wobei die Cl⁻-Leitfähigkeit von GABA_A-Rezeptoren um etwa 5-mal höher ist als die für HCO₃⁻ (Kaila & Voipio, 1987). Das Umkehrpotential GABA_A-Rezeptor-vermittelter Ströme (E_{GABA}) ist also eine Mischung aus den Gleichgewichtspotentialen von Cl⁻ (E_{Cl}) und HCO₃⁻ (E_{HCO_3}), wobei der Anteil von E_{Cl} zumeist dominiert. In den meisten pränatalen Neuronen führt die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zu einer Depolarisation des Membranpotentials, während dies bei der Mehrheit adulter Neuronen zur Hyperpolarisation führt (Ben-ari *et al*, 2007). Daher ist GABA in frühem Entwicklungsstadium ein exzitatorischer Transmitter, der durch die Depolarisation sogar Aktionspotentiale auslösen kann (Tyzio *et al*, 2007). Die Depolarisation von unreifen Neuronen ist zum Teil auch auf HCO₃⁻-Efflux zurück zu führen (Kulik *et al*, 2000). Neuronales E_{HCO_3} liegt in etwa bei -10 mV, und ist somit deutlich positiver als das Ruhemembranpotential (Kaila, 1994). Ein wichtiger Faktor bei der GABAergen Depolarisation ist aber auch die hohe [Cl⁻]_i von unreifen Neuronen, die bedingt, dass auch E_{Cl} über dem Ruhemembranpotential liegt (Abb.3). Die Aufnahme von Cl⁻ wird vor allem durch Nkcc1 vermittelt (Delpire, 2000; Dzhalal *et al*, 2005; Pfeffer *et al*, 2009; Yamada *et al*, 2004). Gerade in unreifen Neuronen wurde eine hohe Expression dieses CCCs beschrieben (Li *et al*, 2002; Mikawa *et al*, 2002; Wang *et al*, 2002; Plotkin *et al*, 1997). Nkcc1 koppelt den Transport von Cl⁻ und K⁺ and den Na⁺-Transport, und da der chemische Gradient für Na⁺ stark einwärtsgerichtet ist, führt dies zur Akkumulation von Cl⁻ im Zytosol. Im ZNS liegt die [Cl⁻]_i von unreifen Neuronen typischerweise zwischen 25 - 40 mM (Yamada *et al*, 2004; Balakrishnan *et al*, 2003).

Die Expression von Kcc2 korreliert zeitlich und räumlich mit der Abnahme von [Cl⁻]_i in adulten Neuronen (Rivera *et al*, 1999; Wang *et al*, 2002; Khirug *et al*, 2005; Luhmann & Prince, 1991). Kcc2 transportiert Cl⁻ zusammen mit K⁺ aus Neuronen heraus, da der auswärtsgerichtete elektrochemische Gradient von K⁺ die Triebkraft dieses Transportprozesses ist. In den meisten Neuronen des adulten ZNS ist E_{Cl} daher negativer als das Ruhemembranpotential. Das Öffnen von Cl⁻-Kanälen, wie z.B. GABA_A-Rezeptoren, führt daher zur Hyperpolarisation des Membranpotentials, und somit zu einer Inhibition des Neurons.

Es besteht Konsensus, dass Kcc2 der wichtigste Cl⁻-Exporter von Neuronen des adulten ZNS ist. Allerdings wurde ebenfalls für Kcc3 eine ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Funktion beschrieben (Boettger *et al*, 2003). Prinzipiell ist, wie bereits erwähnt, eine Cl⁻-Extrusion aber auch über andere Cl⁻-Transporter, wie z.B. Anionenaustauscher, möglich.

1.1.4.2. Intraneuronale Cl⁻-Gradienten

In einigen adulten Neuronen wurde gezeigt, dass Kcc2 und Nkcc1 koexprimiert werden. (Szabadics *et al*, 2006; Duebel *et al*, 2006; Gavrikov *et al*, 2003; Khirug *et al*, 2008; Martina *et al*, 2001; Marty & Llano, 2005). Dabei ist jedoch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden CCCs zu bedenken. Nkcc1 lokalisiert in Axon und Axoninitialsegment von adulten Neuronen. Kcc2 ist dagegen in der Membran von Soma und Dendriten vorzufinden, im Axon jedoch nicht nachzuweisen. Durch die räumlich verschiedene Expression der beiden CCCs kann ein stabiler Cl⁻-Gradient innerhalb eines Neurons geschaffen werden (Abb.5). Diese Cl⁻-Gradienten können zu E_{GABA}-Unterschieden von ~ 20 mV zwischen Axon und Dendritenbaum führen (Szabadics *et al*, 2006). So kann z.B. in dendritischen Spines ein anderes E_{GABA} als im Axon eingestellt werden, wodurch GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme innerhalb eines Neurons verschiedene Polaritäten und Effekte haben können (Duebel *et al*, 2006; Price & Trussell, 2006; Szabadics *et al*, 2006).

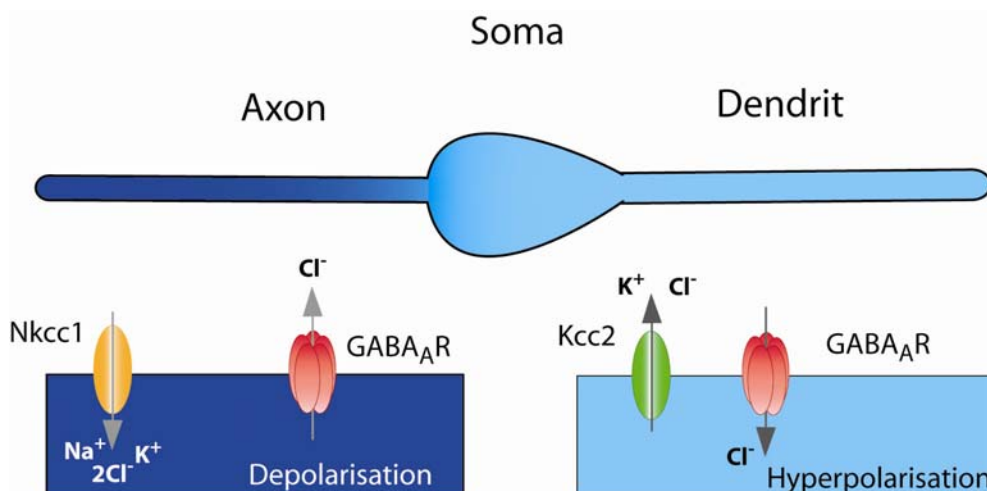


Abbildung 5 | Chloridgradienten in einem Neuron.

Die subzelluläre Lokalisation von Kcc2 und Nkcc1 in deinem Neuron kann zu Chloridgradienten zwischen Axon und Dendrit führen. Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren kann so, je nach [Cl⁻]_i, zu Depolarisation oder Hyperpolarisation führen.

Dies ist vor allem deshalb von Interesse, da Populationen von Interneuronen in vielen Bereichen des Gehirns nur definierte Kompartimente ihrer postsynaptischen Neuronen kontaktieren. Im Cerebellum zum Beispiel bilden Sternzellen GABAerge Synapsen mit dem distalen Dendritenbaum einer Purkinjezelle, während die GABAergen Synapsen von Korbzellen vor allem an Soma und Axoninitialsegment der Purkinjezellen lokalisiert sind.

1.2. GABAerge und glycinerge Neurotransmission

1.2.1. Glycin- und GABA-Rezeptoren

Die einfache Unterteilung synaptischer Transmission in depolarisierende Exzitation sowie hyperpolarisierende Inhibition durch GABA ist eine starke Vereinfachung. γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Die physiologischen Effekte von GABA werden durch die Aktivierung von GABA-Rezeptoren vermittelt, die in jedem Neuron des Gehirns exprimiert werden. Es gibt metabotrope GABA_B-Rezeptoren, die über eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade agieren. Die andere Familie von GABA-Rezeptoren (GABA_A-Rezeptoren) besitzen einen intrinsischen Anionenkanal. Die GABA_A-Rezeptor-vermittelten Effekte hängen von der Verteilung der von ihnen geleiteten Anionen ab, und können sowohl inhibitorischer, als auch exzitatorischer Natur sein.

Ionotrope GABA_A- und Glycinrezeptoren gehören zur Superfamilie der Cys-Loop-Rezeptoren (Lester *et al*, 2004). Die Mitglieder dieser Familie haben sind Pentamere, die bei Bindung von spezifischen Liganden ihren intrinsischer Ionenkanal öffnen. Jede Untereinheit ist aus vier Transmembrandomänen (TM1-TM4) aufgebaut. Die zentrale Porenregion mit dem Ionenselektivitätsfilter wird von den TM2-Segmenten der fünf Untereinheiten gebildet. Während nikotinsche Acetylcholinrezeptoren und Serotoninrezeptoren Kationen leiten, sind Glyzinrezeptoren und GABA_A-Rezeptoren permeabel für Anionen (Bowery & Smart, 2006; Moss & Smart, 2001; Sine & Engel, 2006; Lester *et al*, 2004). Allerdings gibt es in Invertebraten auch einen GABA_A-Rezeptor, der statt Anionen Kationen leitet und exzitatorische Neurotransmission vermittelt (Beg & Jorgensen, 2003).

Der am besten charakterisierte Cys-Loop-Rezeptor ist der nikotinsche Acetylcholinrezeptor (nAChR). Die veröffentlichten Kristallstrukturen vom Acetylcholin-bindenden Protein aus Mollusken (homolog zur Ligandenbindestelle im Aminoterminus des nAChRs), sowie dem prokaryotischen nAChR haben zum Verständnis der Ionenpermeation und des Schließverhaltens der ganzen Cys-Loop-Rezeptorenfamilie beigetragen (Brejc *et al*, 2001; Hilf & Dutzler, 2008).

1.2.1.1. GABA_A-Rezeptoren

GABA_A-Rezeptoren (GABA_ARs) sind heteropentamere Transmembranproteine. Die Untereinheiten besitzen einen langen extrazellulären Aminoterminus, von dem angenommen wird, dass er die Interaktion zwischen dem Ligand und dem intrinsischen Kanal vermittelt. Ausserdem hat jede Untereinheit vier Transmembrandomänen mit einer langen intrazellulären Domäne zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne (Smith & Olsen, 1995). Die Familie der

GABA_A-Rezeptoruntereinheiten von Säugern besteht aus 19 Genen. Diese Familie umfasst sowohl die 16 Untereinheiten, aus denen GABA_ARs aufgebaut sind (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , und π), als auch drei ρ -Untereinheiten (ρ 1-3) (Simon *et al*, 2004). Diese ρ -Untereinheiten assemblieren nicht mit den 16 anderen Untereinheiten, sondern bilden homopentamerische ionotrope GABA-Rezeptoren, die insensitiv gegenüber den typischen GABA_AR-Antagonisten sind (Olsen & Sieghart, 2008).

Die meisten GABA_ARs im ZNS sind aus zwei α -, zwei β - und einer anderen Untereinheit (γ , δ , ϵ , θ , oder π) aufgebaut. Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt das pharmakologische Profil des Rezeptors, die Einzelkanalkinetik sowie die Lokalisation des Rezeptors innerhalb eines Neurons (Fisher, 2004; Fritschy *et al*, 2006).

1.2.1.2. Glycinrezeptoren

Wie bei GABA_ARs hängen die physiologischen Effekte der Aktivierung von Glycinrezeptoren (GlyRs) von der Verteilung der von ihnen geleiteten Anionen ab. GlyRs sind ebenfalls ligandenaktivierte Anionenkanäle, die aus fünf Untereinheiten aufgebaut sind (Lynch, 2004). In Säugern gibt es vier Gene, die für α -Untereinheiten kodieren (α 1-4), aber nur ein Gen, welches für die β -Untereinheit kodiert. Es wird vermutet, dass die Mehrzahl der Rezeptoren in adulten Neuronen in der 2(α 1)/3 β Stöchiometrie vorliegen (Yevenes & Zeilhofer, 2011). In der Abwesenheit von β -Untereinheiten können α - Untereinheiten jedoch auch funktionelle Homopentamere bilden. Auch bei GlyRs werden die Eigenschaften des Rezeptors durch die Zusammensetzung aus den Untereinheiten bestimmt (Hernandes & Troncone, 2009).

1.2.2. GABAerge Inhibition

1.2.2.1. Klassische Hyperpolarisations-Inhibition

Im adulten zentralen Nervensystem können die Neurotransmitter GABA und Glycin eine Hyperpolarisation des Neurons verursachen, indem sie durch Öffnen von Cl⁻-Kanälen Cl⁻-Influx aus dem Extrazellulärraum ermöglichen. Dies stellt die Grundlage der schnellen Inhibition dar, da die Wahrscheinlichkeit der Auslösung von Aktionspotentialen durch die Hyperpolarisation verringert wird. Diese Art der Inhibition ist strikt an die elektrochemischen Gradienten von vor allem Cl⁻, aber auch von HCO₃⁻ gekoppelt. Voraussetzung für die Hyperpolarisation der Membran ist, dass das Gleichgewichtspotential der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Ströme, also E_{GABA} (bedingt durch E_{Cl^-} , und eingeschränkt auch durch $E_{HCO_3^-}$), negativer ist als das Ruhemembranpotential des Neurons.

GABA bindet aber auch an metabotrope GABA_B-Rezeptoren, die keinen intrinsischen Anionenkanal besitzen. Die inhibitorische Wirkung von GABA_B-Rezeptoren wird durch die Freisetzung von Gβγ-Untereinheiten vermittelt, die wiederum K⁺-Kanäle aktivieren. Dies führt zum Ausstrom von K⁺, und daher ebenfalls zu einer Hyperpolarisation der Membran. GABA_B-Rezeptoren lokalisieren aber auch in der präsynaptischen Membran. Hier führt ihre Aktivierung zur Inaktivierung von Ca²⁺-Kanälen durch die Gβγ-Untereinheiten, was wiederum eine Reduktion der Transmitterfreisetzung zur Folge hat (Chalifoux & Carter, 2011).

1.2.2.2. Shunting Inhibition

Neben der „klassischen“ Inhibition durch Hyperpolarisation vermittelt GABA in manchen Neuronen auch eine Inhibition durch „Shunting“. Werden GABA_A-Rezeptoren aktiviert, steigt die Leitfähigkeit der Membran rapide an. Diese Leitfähigkeit führt dazu, dass glutamaterge (depolarisierende) Eingänge das Membranpotential nicht bis zur Aktionspotentialschwelle depolarisieren können. Somit spricht man hier von Inhibition durch Kurzschluss (Shunting) (Mitchell & Silver, 2003). Shunting Inhibition kann die Wahrscheinlichkeit von Aktionspotentialen unabhängig von der Polarität des GABA_A-Rezeptorstroms herabsetzen, daher kann leicht depolarisierendes GABA funktionell inhibierend sein (Staley & Mody, 1992).

Andererseits kann die Depolarisation des Membranpotentials auch länger anhalten als die effiziente Shunting Inhibition. Am Höhepunkt des GABAergen Stroms ist der Membranwiderstand so gering, dass exzitatorische Ströme inhibiert werden. Doch während der Abklingphase des GABAergen Stroms ist die Zelle noch depolarisiert, während der Membranwiderstand zunimmt. Das Auslösen eines Aktionspotentials durch in dieser Phase erfolgende glutamaterge Transmission wird hierdurch erleichtert. In diesem Fall spricht man von „dualer Wirkung“ von GABA, also zunächst Inhibition, gefolgt von Faszilitation (Gao *et al*, 1998).

1.2.2.3. Tonische Inhibition

Tonische Inhibition wurde erstmals in Körnerzellen des Cerebellums beschrieben (Kaneda *et al*, 1995). Inzwischen wurde dies aber auch für andere Neuronen, wie unter anderem Interneuronen oder Körnerzellen des Gyrus dentatus, berichtet (Stell & Mody, 2002; Glykys *et al*, 2008). Die Identität von GABA_A-Rezeptoren, welche die tonische Inhibition vermitteln, wurde für verschiedene neuronale Populationen gut beschrieben. Die δ-Untereinheit scheint von zentraler Bedeutung zu sein, denn sie lokalisiert ausschließlich peri- und extrasynaptisch (Farrant & Nusser, 2005). Diese extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren mit δ, α5 oder α6 Untereinheiten sind

besonders affin gegenüber GABA. Des Weiteren desensibilisieren sie kaum, und werden daher tonisch durch geringe Konzentrationen von ambientem GABA aktiviert (Brickley *et al*, 1996; Glykys & Mody, 2007; Farrant & Kaila, 2007). Die dauerhaft erhöhte Leitfähigkeit der Membran dämpft Spannungsänderungen durch synaptische Eingänge, und limitiert so räumliche und zeitliche Signalintegration. Es ist also mehr Exzitation nötig, um das Membranpotential bis zur Aktionspotentialschwelle zu depolarisieren.

Die Herkunft von ambientem GABA im extrazellulären Raum wird kontrovers diskutiert. Eine Studie zeigte, dass Bergmannglia im Cerebellum GABA durch den Anionenkanal Bestrophin-1 freisetzen (Lee *et al*, 2010b). Dies konnte von einer weiteren Gruppe jedoch nicht reproduziert werden, so dass diese Art der GABA-Freisetzung womöglich nur unter bestimmten Bedingungen auftritt (Diaz *et al*, 2011). Andere Publikationen beschreiben ein „Überschwappen“ von GABA aus dem synaptischen Spalt nach Vesikelfreisetzung (Mapelli *et al*, 2009; Glykys & Mody, 2007). Durch variierende Freisetzung oder Wiederaufnahme von GABA kann es zu Fluktuationen in der ambienten GABA-Konzentration, und damit auch der tonischen Inhibition kommen (Scimemi *et al*, 2005).

1.2.3. GABAerge Exzitation

1.2.3.1. Exzitatorisches GABA

In unreifen Neuronen wirkt depolarisierendes GABA oft exzitatorisch, dass heisst durch Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren werden Aktionspotentiale ausgelöst (Ben-ari *et al*, 2007). Dies geschieht, wenn die GABAerge Depolarisation selbst die Aktionspotentialschwelle erreicht, oder indirekt über die Aktivierung spannungsgesteuerter Kationenkanäle. In fast allen unreifen Neuronen führt die GABAerge Depolarisation zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (Obrietan & Van Den Pol, 1995; Leinekugel *et al*, 1997). Zum einen werden spannungsgesteuerte Calciumkanäle direkt durch die Depolarisation der Membran aktiviert. Des Weiteren wird der spannungsabhängige Mg²⁺-Block von NMDA-Rezeptoren durch die GABAerge Depolarisation stark reduziert (Abb. 6). Somit werden diese leichter aktivierbar, und Ca²⁺ kann auch durch NMDA-Rezeptoren einströmen (Ben-ari *et al*, 1997; Durand *et al*, 1996; Liao & Malinow, 1996). Die Bedeutung GABAerger Exzitation in unreifen neuronalen Netzwerken wird durch die Tatsache bekräftigt, dass GABAerge Synapsen schon vor der Entstehung glutamaterger Synapsen vorhanden sind (Ben-ari *et al*, 1997; Durand *et al*, 1996). Funktionelle GABA_A-Rezeptoren werden schon während der embryonalen Entwicklung in Neuronen exprimiert, während frühe glutamaterge Synapsen zunächst keine funktionellen AMPA-Rezeptoren besitzen (Laurie & Wisden, 1992; Laurie *et al*, 1992; Liu *et al*, 1997; Isaac *et al*, 1997).

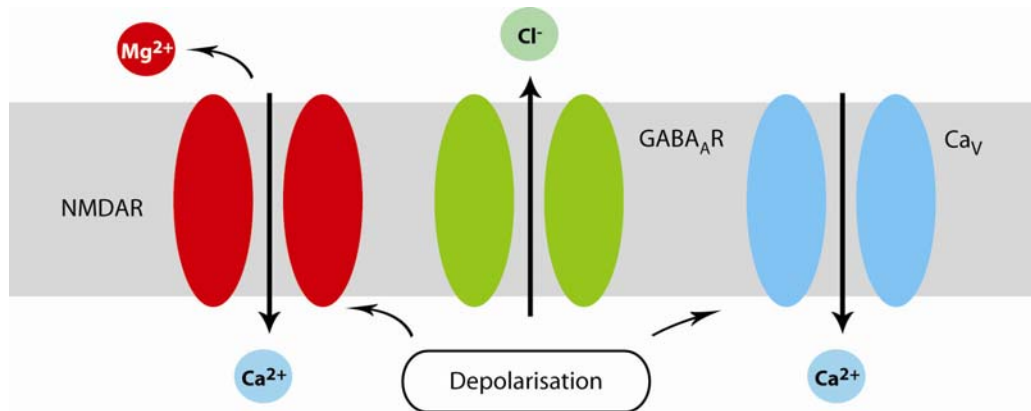


Abbildung 6 | Synergistische Wirkung von GABA_A-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren in unreifen Neuronen.

In Abwesenheit von AMPA-Rezeptoren kann Depolarisation über GABA_ARs ausreichen, um den spannungsabhängigen Mg²⁺-Block von NMDA-Rezeptoren zu reduzieren, und diese somit aktivierbar zu machen. Desweiteren werden spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle (Ca_v) durch die GABA_AR-vermittelte Depolarisation aktiviert. (Adaptiert von (Ben-ari *et al*, 2007)).

Zwar sind NMDA-Rezeptoren in unreifen Neuronen schon vorhanden, sie werden jedoch durch Mg²⁺ blockiert. Daher sind diese frühen glutamaterge Synapsen beim Ruhemembranpotential „still“ (Durand *et al*, 1996; Ben-ari *et al*, 1997; Isaac *et al*, 1997). Bevor glutamaterge Synapsen entstehen, bzw. funktionelle AMPA-Rezeptoren besitzen, ist GABAerge Depolarisation also ein möglicher Mechanismus der neuronalen Exzitation und für NMDA-Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Einströme.

1.2.3.2. Neuronale Maturation durch depolarisierendes GABA

Eine besondere Eigenschaft von unreifen neuronalen Netzwerken des ZNS ist die spontane und rhythmische Aktivität der Neuronen. Im Hippocampus nennt man diese Ereignisse, die z.B. bei Ratten in den ersten zwei postnatalen Wochen vorkommen, „große depolarisierende Potentiale“ (oder GDPs, für *giant depolarizing potentials*) (Cherubini *et al*, 2011; Ben-ari *et al*, 2007; Leinekugel *et al*, 1997). Der Generierung von GDPs liegen verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise elektronische Kopplung durch *Gap junctions*, oder Neurotransmission, zugrunde (Ben-Ari *et al*, 1989; Strata *et al*, 1997). Depolarisierendes GABA scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen, obwohl auch glutamaterge Synapsen beteiligt sind. GDPs kommen jedoch nur dann vor, wenn GABA auf die beteiligten Neuronen depolarisierend wirkt. Die pharmakologische Blockade von GABA_A-Rezeptoren unterbindet GDPs (Ben-Ari *et al*, 1989; Ben-Ari, 2002).

GDPs und GABAerge Depolarisation in unreifen neuronalen Netzwerken beeinflussen unter anderem Proliferation, Differenzierung und Migration von Neuronen sowie die Reifung von Synapsen (Owens & Kriegstein, 2002). Die trophischen Effekte von depolarisierendem GABA auf

verschiedene Neuronen des ZNS sind seit langem bekannt (Liu *et al*, 1997; Cherubini *et al*, 1991; Cancedda *et al*, 2007). So stimuliert z.B. ambientes GABA, solange es depolarisierend ist, die Motilität von migrierenden Interneuronen. Mit dem Anstieg der Expression von *Kcc2*, also dem Übergang zu GABAerger Hyperpolarisation, inhibiert GABA die Migration der Interneuronen und wirkt daher als Stop-Signal (Bortone & Polleux, 2009).

1.3. Cerebellum

Das Kleinhirn (lateinisch: Cerebellum) ist der Teil des Gehirns, der eine wichtige Bedeutung für die Kontrolle von Motorik hat. Die Bewegungen selbst werden nicht hier, sondern im Motorkortex initiiert. Doch das Cerebellum beeinflusst ihre Feinabstimmung und zeitliche Genauigkeit, so dass flüssige Bewegungen ermöglicht werden. Eine weitere Funktion des Cerebellums ist das implizite Erlernen von motorischen Fähigkeiten. Automatisierte und trainierte Bewegungsabläufe, wie z.B. die Fingerbewegungen beim Klavierspielen, werden im Kleinhirn abgespeichert.

Von vielen Teilen des ZNS projizieren Afferenzen zum Cerebellum, wo die verschiedenen Informationen im cerebellären Kortex integriert werden. Die hier verarbeiteten Informationen verlassen das Cerebellum über Efferenzen, die in den tiefen cerebellären Kernen verschaltet werden und zum Motorkortex und Hirnstamm projizieren. Im Cerebellum treffen also Informationen zusammen, die einerseits eine geplante Bewegung (z.B. das Anheben des Arms) widerspiegeln, andererseits aber sensorische Informationen (z.B. visuell, sowie Propriozeption aus dem anzuhebenden Arm) involvieren. So kann abgeglichen werden, ob die ausgeführte Bewegung dem Vorhaben entspricht, oder ob weitere Feinabstimmung nötig ist.

1.3.1. Neuronales Netzwerk des Cerebellums

Das folgende Kapitel basiert, wenn nicht anders angegeben, auf den Arbeiten von James S. Albus und Masao Ito (Albus, 1971; Ito, 2002).

Die neuronale Architektur und Verschaltung der verschiedenen Neuronen des Cerebellums ist relativ gut beschrieben (Voogd & Glickstein, 1998). Die Rinde des Cerebellums ist aus drei Schichten aufgebaut: der Molekularschicht (lateinisch: *Stratum moleculare*), der Purkinjellschicht (*Stratum purkinjense*) und der Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) (Abb.7). Innen liegt die Körnerzellschicht, in der die Somata der Körnerzellen dicht gepackt vorliegen. Körnerzellen sind die einzigen glutamatergen Neurone der Kleinhirnrinde. Sie haben im Durchschnitt vier kurze Dendriten, die alle in verschiedenen Glomeruli enden. Ein Glomerulus ist eine gliaumhüllte

Struktur, in deren Zentrum die Dendriten von Körnerzellen mit Axonen von Golgizellen Synapsen bilden. Das Axon einer Körnerzelle verläuft in die Molekularschicht, wo es sich in zwei lange Kollateralen (Parallelfasern) aufspaltet. Diese Axone stellen das Parallelfasersystem der Kleinhirnrinde dar, welches glutamaterge Synapsen mit Purkinjezellen und Interneuronen bildet.

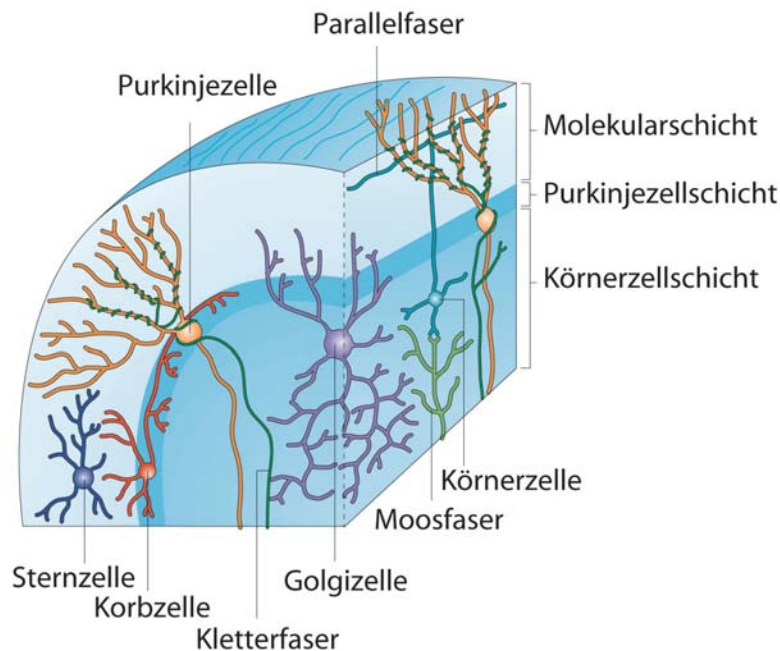


Abbildung 7 | Aufbau des cerebellären Kortex.

Zwei glutamaterge Afferenzen erreichen den cerebellären Kortex: Moosfasern terminieren in der Körnerzellschicht und bilden dort exzitatorische Synapsen mit Körnerzellen und Golgizellen, während Kletterfasern Purkinjezellen direkt innervieren. Die Axone von Körnerzellen verlaufen bis in die Molekularschicht, wo sie sich T-förmig aufspalten und das Parallelfasersystem bilden. Parallelfasern bilden exzitatorische Synapsen mit Purkinjezellen und Interneuronen (Sternzellen, Korbzellen und Golgizellen). Körnerzellen sind die einzigen exzitatorischen Neuronen des cerebellären Kortex. (Adaptiert von (Apps & Garwicz, 2005)).

Der zweite Neuronentyp in der Körnerzellschicht sind GABAerge Golgizellen. Ihre Anzahl ist um ein Vielfaches kleiner als die der Körnerzellen. Die Axone von Golgizellen sind sehr stark verzweigt und terminieren ebenfalls in den Glomeruli. Eine Golgizelle kann ca. 100.000 Körnerzellen in ihrer Umgebung kontaktieren. Die großen und weitverzweigten Dendritenbäume der Golgizellen erstrecken sich in sowohl die Molekular-, als auch die Körnerzellschicht. Apikal zur Körnerzellschicht befindet sich die Purkinjezellschicht. Sie besteht aus einer Monoschicht von Purkinjezellsomata. GABAerge Purkinjezellen haben einen besonders großen, stark verzweigten apikalen Dendritenbaum, der sich fächerförmig in die Molekularschicht erstreckt. Die Dendritenbäume der Purkinjezellen überlappen sich nicht gegenseitig, und sie sind perpendicular zu den Parallelfasern ausgerichtet. Ca. 200.000 Parallelfasern laufen durch den Dendritenbaum

einer einzigen Purkinjezelle, und bilden dabei auf ihr glutamaterge Synapsen. Purkinjezellen sind die einzigen Neuronen, die aus der Kleinhirnrinde herausprojizieren. Ihre basalen Axone verlaufen bis zu den cerebellären Nuklei, wo sie GABAerge Synapsen mit Neuronen der tiefen cerebellären Kerne bilden.

In der Molekularschicht befinden sich die Zellkörper von Sternzellen und Korbzellen. Beide Neuronentypen sind GABAerge Interneuronen, die sowohl Purkinjezellen, als auch andere Interneurone inhibieren. Doch während Sternzellen im apikalen Bereich liegen und hauptsächlich den Dendritenbaum von in der Nähe liegenden Purkinjezellen kontaktieren, sind die Somata von Korbzellen basaler angeordnet. GABAerge Synapsen von Korbzellen befinden sich eher am Soma und dem Axoninitialsegment von Purkinjezellen.

Es gibt zwei glutamaterge Fasersysteme, die in den cerebellären Kortex projizieren. Moosfasern gehen vom Rückenmark und den Kernen des Hirnstamms aus, und vermitteln Informationen von verschiedenen Regionen, wie z.B. dem vestibulären System oder sensorischen Rezeptoren der Haut, an das Cerebellum. Moosfasern verzweigen sich vielfach und terminieren schließlich in der Körnerzellschicht. Hier bilden sie mit ihren fein verzweigten Endigungen Synapsen mit Körnerzellen und Golgizellen in den Glomeruli.

Den zweiten Informationsweg in das Kleinhirn stellen Kletterfasern dar, die aus dem Olivenkomplex entstammen und mit Purkinjezellen glutamaterge Synapsen bilden. Jede Purkinjezelle wird von genau einer Kletterfaser innerviert, die sich um den Dendritenbaum wickelt und bis zu 26.000 Synapsen auf den dendritischen Spines bildet.

1.3.2. Vorwärtshemmung und negative Rückkopplung

Die Hauptmechanismen der neuronalen synaptischen Inhibition sind Vorwärtshemmung (feedforward inhibition) und negative Rückkopplung (feedback inhibition). Auch wenn beide grundsätzlich auf dem selben Mechanismus beruhen, sind die Funktionen, die sie in neuronalen Netzwerken erfüllen, grundverschieden. Bei der Vorwärtshemmung wird neben dem Hauptneuron auch ein inhibitorisches Neuron erregt, welches durch Freisetzung des Neurotransmitters (zumeist GABA) wiederum das Hauptneuron zeitlich verzögert inhibiert. Die Aktivität des postsynaptischen Neurons wird dadurch so lange reduziert, wie inhibitorische Transmitter vom Interneuron abgegeben werden, oder die Rezeptoren des postsynaptischen Neurons desensibilisieren und dadurch inaktivieren (Pouille & Scanziani, 2001). Dies kann die zeitliche Präzision der Aktivität eines Neurons immens erhöhen, denn die durch einen exzitatorischen Input verursachte Depolarisation wird schnell durch die folgende Inhibition

reduziert. Somit wird das Zeitfenster, in dem depolarisierende Potentiale aufsummiert werden können, stark verkürzt (Mittmann *et al*, 2005).

Bei der negativen Rückkopplung ist das Hauptneuron selbst der exzitatorische Input des Interneurons. Wenn das Hauptneuron also aktiviert wird erregt es ein Interneuron, welches wiederum das Hauptneuron inhibiert und dessen Aktivierbarkeit einschränkt. Diese Art der Inhibition dient dazu, die Dauer und Ausbreitung der Aktivität einer stimulierten Bahn zu begrenzen (Watanabe *et al*, 1998).

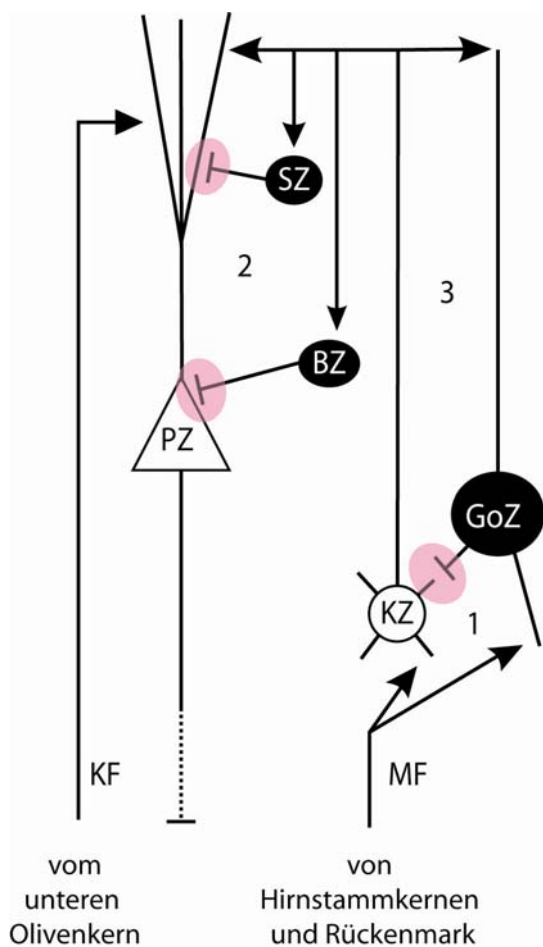


Abbildung 8 | Vorwärtshemmung und negative Rückkopplung im cerebellären Kortex.

Moosfasern bilden exzitatorische Synapsen mit Körnerzellen, aber auch mit Golgizellen. Diese Golgizellen üben eine Vorwärtshemmung auf Körnerzellen aus (1). Körnerzellen hingegen bilden exzitatorische Synapsen mit Purkinjezellen und Interneuronen. Hier kommt es zu Vorwärtshemmung auf Purkinjezellen (2) und negativer Rückkopplung auf Körnerzellen (3). Die inhibitorischen Synapsen des cerebellären Kortex sind rosafarben hinterlegt. Abkürzungen: KF (Kletterfasern), MF (Moosfasern), PZ (Purkinjezelle), BZ (Korbzelle), SZ (Sternzelle), GoZ (Golgizelle), KZ (Körnerzelle).

Korbzellen und Sternzellen des Cerebellums werden durch Körnerzellen aktiviert, und üben somit eine Vorwärtshemmung auf Purkinjezellen aus (Abb.8) (Mittmann *et al*, 2005). Golgizellen werden zum einen von Moosfasern, zum anderen aber auch von Parallelfasern der Körnerzellen aktiviert. Somit kommt es zu einer Vorwärtshemmung der Körnerzellen über den Moosfasereingang, aber auch zu negativer Rückkopplung über das Parallelfasersystem (Gabbiani *et al*, 1994). Die physiologische Bedeutung der verschiedenen inhibitorischen Bahnen ist bisher nur teilweise aufgeklärt (Wulff *et al*, 2009).

1.3.3. Kompensatorische Augenbewegungen

Kompensatorische Augenbewegungen dienen dazu, das Verrutschen von Bildern auf der Retina, und damit ein unscharfes Bild, zu verhindern. Um eine hohe Auflösung in der Fovea zu erreichen muss die Geschwindigkeit der retinalen Bewegung (retinal slip) minimiert werden. In Mäusen gibt es zwei wichtige Reflexe, die die Bewegungen des Kopfes kompensieren: den Vestibulo-okulären Reflex (VOR) und den optokinetischen Reflex (OKR). Der OKR basiert allein auf der retinalen Bewegung und ist daher ein negatives Rückkopplungssystem. Beim VOR hingegen wird die Bewegung des Kopfes durch das Vestibularorgan wahrgenommen.

Beide Reflexe sorgen zusammen dafür, dass die retinale Bewegung durch Augenbewegung minimiert wird, und scharfes Sehen auch während Bewegungen möglich ist (Van Alphen *et al*, 2001).

1.3.3.1. Vestibulo-okulärer Reflex

Die drei Bogengänge des Vestibularorgans detektieren die Drehbeschleunigung des Kopfes im Raum (Abb.9).

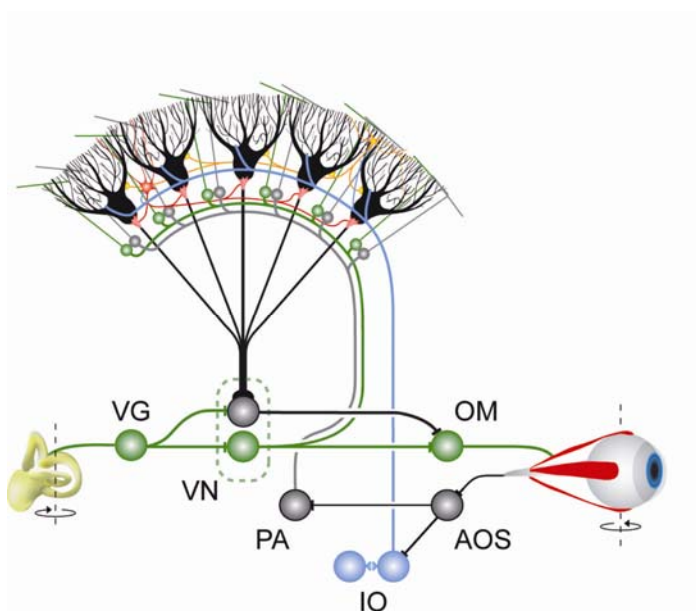


Abbildung 9 | Intra- und extracerebelläre Verschaltung des VOR.

Purkinjezellen (schwarz) des Flocculus konvergieren auf Neuronen der vestibulären Nuklei, die dieses Signal wiederum über okulomotorische Neuronen und die Augenmuskulatur weitergeben. Purkinjezellen erhalten Informationen über zwei Signalwege: Moosfasern leiten Informationen über Bewegung des Kopfes (Vestibularorgan, gelb) und der Augenmuskeln (Signalwege hier in grün und grau dargestellt). Kletterfasern stammen aus dem unteren Olivenkern und leiten Informationen über Verschiebung des visuellen Bildes auf der Retina (blau). Abkürzungen: VG (vestibuläre Ganglionzellen), AOS (akzessorisches optisches System), PA (Pontine Bereiche), VN (vestibuläre Nuklei), OM (okulomotorische Neuronen), IO (unterer Olivenkern). Adaptiert aus (Wulff *et al*, 2009).

Die Bogengänge sind mit Endolymphe gefüllt, die sich aufgrund ihrer Trägheit bei Kopfbewegungen relativ zu den Bogengängen verschiebt. Dadurch werden die Zilien der Haarsinneshaarzellen gebogen, die die Bewegung in ein elektrisches Signal umwandeln. Dieses Signal wird über den vestibulären Nerv zum Hirnstamm, und von dort zu verschiedenen vestibulären Nuklei weiter gegeben. Die kompensatorische Augenbewegung resultiert schließlich aus der Aktivität von extraokulären Augenmuskeln, die von Neuronen der vestibulären Nuklei innerviert werden. Diese Neuronen übermitteln sowohl vestibuläre, als auch visuelle Informationen. Zusätzlich wird ihre Aktivität vom cerebellären Flocculus reguliert, dem Bereich des Cerebellums, der OKR, VOR und die Adaption des VORs kontrolliert.

Die Efferenzen des Flocculus sind auf cerebelläre und vestibuläre Nuklei beschränkt. Afferenzen hingegen kommen unter anderem aus dem Olivenkomplex sowie vestibulären und pontinen Nuklei. Die Neuronen des unteren Olivenkerns (Nucleus olivaris inferior) bilden das Kletterfasernetzwerk, welches Purkinjezellen direkt innerviert. Alle anderen Afferenzen laufen über Moosfasern zu Körnerzellen. Diese vermitteln die Signale an Purkinjezellen weiter. Der Informationsfluss durch dieses neuronale Netzwerk wird mittels Vorwärtshemmung und negativer Rückkopplung durch cerebelläre Interneuronen moduliert. Schließlich werden alle Informationen in Purkinjezellen integriert. Die Axone von Purkinjezellen sind der einzige Ausgang des cerebellären Kortex. Sie projizieren zu einigen cerebellären und vestibulären Nuklei, von denen das Signal an okulomotorische Neuronen weitergegeben wird (Sato *et al*, 1988).

1.3.3.2. Adaption des vestibulo-okulären Reflexes

Das sensorische Signal, welches den vestibulo-okulären Reflex induziert, stammt ausschließlich aus dem vestibulären Organ. Dadurch kann die Bewegung der Augen sehr schnell an die Geschwindigkeit und Beschleunigung der Kopfbewegung angepasst werden. Doch dieses System alleine liefert keine Rückmeldung darüber, ob die Augenbewegung akkurat angepasst ist. Die sensorischen und motorischen Eigenschaften können sich ständig ändern. Daher es ist nötig, den Reflex den aktuellen Bedingungen anpassen zu können. So kann zum Beispiel die Amplitude der Augenbewegung relativ zur Bewegung des Kopfes (Gain) erhöht oder reduziert werden. Eine weitere Anpassung ist die zeitliche Abstimmung der Augenbewegung mit der Kopfbewegung (Phase). Diese Rekalibrierung des Reflexes ist eine einfache Form des motorischen Lernens, die schon seit Jahrzehnten studiert wird (Kawato & Gomi, 1992; Broussard *et al*, 2011).

Zur Anpassung des vestibulo-okulären Reflexes muss neben dem vestibulären auch ein visuelles Signal vorliegen. Wenn der VOR nicht perfekt an die Bedingungen angepasst ist kommt es zu Verschiebungen des Bildes auf der Retina. Diese Information wird an den vestibulären

Nukleus und dem Flocculus über Moos- und Kletterfasern weiter gegeben. Über das Moosfasersystem kommen Informationen über die Geschwindigkeit des Kopfes und der Augen, sowie die retinale Bewegung, indirekt zu den Purkinjellen des Flocculus. Die Geschwindigkeit der retinalen Bewegung wird über das Kletterfasersystem direkt an Purkinjellen vermittelt. Sie ist das Fehlersignal, welches für die Adaption von VOR und OKR essentiell ist (Kawato & Gomi, 1992).

Um die Adaption des VOR zu induzieren, muss also die Bewegung des Kopfes mit einem visuellen Fehlersignal gepaart vorliegen. Da der vestibulo-okuläre Reflex selbst nicht auf einem visuellen Signal beruht, besteht die Adaption der Augenbewegungen auch bei Dunkelheit fort.

2. FRAGESTELLUNG

Ziel der Arbeit war es, GABAerge Inhibition im cerebellären Kortex zu untersuchen. Die physiologische Relevanz von Vorwärtshemmung und negativer Rückkopplung im Cerebellum ist bisher nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Um GABAerge Inhibition auf Purkinjezellen und Körnerzellen selektiv zu unterbinden, sollte Kcc2 spezifisch in diesen Neuronen deletiert werden. Dies sollte zu einer Erhöhung der intraneuronalen Chloridkonzentration, und damit einer Reduktion der elektrochemischen Triebkraft GABAerger Ströme führen. Da der konstitutive Knockout von Kcc2 letal ist, konnte in adulten Mäusen bisher nicht überprüft werden, ob in allen zentralen Neuronen Kcc2 der Chloridexporter ist, der für die niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration, die die Hyperpolarisations-vermittelte Inhibition bedingt, verantwortlich ist. Des Weiteren wurde mit *in vitro* Versuchen gezeigt, dass Kcc2 die Morphologie von exzitatorischen Synapsen beeinflusst. Ob diese Effekte auch *in vivo* und in allen zentralen Neuronen auftreten ist, aufgrund der Letalität der Knockoutmaus, bislang ungeklärt. Neben Kcc2 wurde auch Kcc3 eine Rolle in der Chloridextrusion von Neuronen zugeschrieben.

In unserem Labor wurden Mäuse generiert, die je zwei loxP-Sequenzen in *Slc12a5* und *Slc12a6*, den Genen, die für Kcc2 und Kcc3 kodieren, besitzen. Diese „gefloxten“ Mäusen wurden mit Purkinje- bzw. Körnerzellspezifischen Cre-Rekombinase-Mauslinien verpaart, um die zellspezifische Deletion von Kcc2 und Kcc3 zu induzieren. Mit diesen konditionalen Knockoutmäusen sollte zunächst überprüft werden, ob die Deletion von Kcc2 einen Einfluss auf die Morphologie von Synapsen hat. Ausserdem sollte die intrazelluläre Chloridkonzentration der Neuronen mit elektrophysiologischen Methoden bestimmt werden. Wenn Kcc2 und Kcc3 entscheidend in der Chloridextrusion von Purkinje- und Körnerzellen sind, so sollte $[Cl^-]_i$ in den Knockoutmäusen deutlich erhöht sein. Im Anschluss wurde untersucht, welche Effekte die zellspezifische Deletion von Kcc2 auf das neuronale Netzwerk des Cerebellums hat. Hier sollte zunächst die Signaltransduktion auf Zellebene in akuten Gehirnschnitten elektrophysiologisch untersucht werden. Um jedoch Rückschlüsse auf die Relevanz von Vorwärtshemmung und negativer Rückkopplung im Cerebellum im lebenden Tier zu ziehen, müssen Verhaltensversuche durchgeführt werden. Im Rahmen einer Kollaboration mit dem Labor von Chris I. De Zeeuw sollte die Adaption von kompensatorischen Augenbewegungen untersucht werden.

3. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde durch Verpaarung der geflochten *Kcc2* Mäuse mit L7-Cre- bzw. $\alpha 6$ -Cre-Mäusen die Deletion von *Kcc2* in cerebellären Purkinjezellen, bzw. Körnerzellen herbeigeführt (Aller *et al*, 2003; Barski *et al*, 2000). Dieser zellspezifische *Kcc2*-Knockout wurde zunächst durch immunohistochemische Methoden verifiziert. Anschliessend wurden dessen Auswirkungen auf histologischer und elektrophysiologischer Basis analysiert. Die Verhaltensanalyse und Elektronenmikroskopie wurde von im Rahmen einer Kollaboration im Labor von Chris I. De Zeeuw in Rotterdam ausgeführt.

3.1. Kalium-Chlorid-Kotransporter 2

3.1.1. Konditionaler Knockout von *Kcc2* in Körnerzellen und Purkinjezellen

Unter den Kalium-Chlorid-Kotransportern wurde für *Kcc2* eine strikt neuronale Expression beschrieben (Payne *et al*, 1996). Mäuse, bei denen konstitutiv das Gen für *Kcc2* unterbrochen ist, sterben innerhalb von 15 Minuten nach der Geburt aufgrund schwerer motorischer Defizite, die auch das Atmen verhindern (Hübner *et al*, 2001b). Aus diesem Grund wurden in unserem Labor „geflochte“ *Kcc2*-Mäuse generiert, bei denen die Exone 2-5 von loxP-Sequenzen flankiert sind (*Kcc2*^{lox/lox}).

Die Konstruktion des Zielvektors, sowie die Generierung der geflochtenen *Kcc2* Maus wurde von Dr. Christian A. Hübner und Ilse Klein durchgeführt.

3.1.1.1. Verwendete Cre-Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien, die Cre-Rekombinase in selektierten Zellpopulationen exprimieren, wurden zunächst mit Mäusen der Z/AP-Reportermauslinie (Lobe *et al*, 1999) gekreuzt. Diese Z/AP-Mäuse exprimieren ein modifiziertes β -Galactosidasegen (*lacZ*), welches von loxP-Sequenzen flankiert ist, gefolgt von dem Gen für humane alkalische Phosphatase (hPALP). In Abwesenheit von Cre-Rekombinase wird das *lacZ*-Gen exprimiert, was sich im *lacZ*-Nachweis durch eine blaue Färbung der Zelle zeigt. In Anwesenheit von Cre-Rekombinase wird das *lacZ*-Gen deletiert und statt dessen das Gen für hPALP exprimiert.

Bei der Nachweisreaktion für alkalische Phosphatase (AP) sind alle Zellen gefärbt, die Cre-Rekombinase exprimieren. Ein positives Signal in der *lacZ*-Färbung hingegen zeigt, dass in diesen Zellen keine Cre-Rekombinase vorhanden war.

3.1.1.1.1. Analyse der L7/pcp-2:Cre-Maus

L7/Pcp-2 (Purkinje cell protein 2) ist ein Purkinjezell-spezifisches Protein, welches die Bindung von GDP an die α -Untereinheiten von G-Proteinen moduliert (Zhang *et al*, 2002). Die L7/pcp-2:Cre-Maus (kurz: L7-Cre-Maus) (Barski *et al*, 2000) wurde ebenfalls mit Mäusen der Z/AP-Reportermaulinie gekreuzt, und die Cre-Expression der Nachkommen mittels hPALP-Nachweis und X-Gal-Färbung überprüft (Abb. 10). Cre-vermittelte Rekombination wurde ausschließlich in den cerebellären Purkinjezellen detektiert. Allerdings fiel auf, dass es am 6. und 10. Lobus der cerebellären Vermis Bereiche gab, in denen keine Rekombination stattfand. Dies ließ sich sowohl im positiven (hPALP-Nachweis), wie auch im negativen Nachweis (lacZ-Färbung) beobachten. In den übrigen Bereichen der cerebellären Vermis schien die Rekombination in Purkinjezellen vollständig.

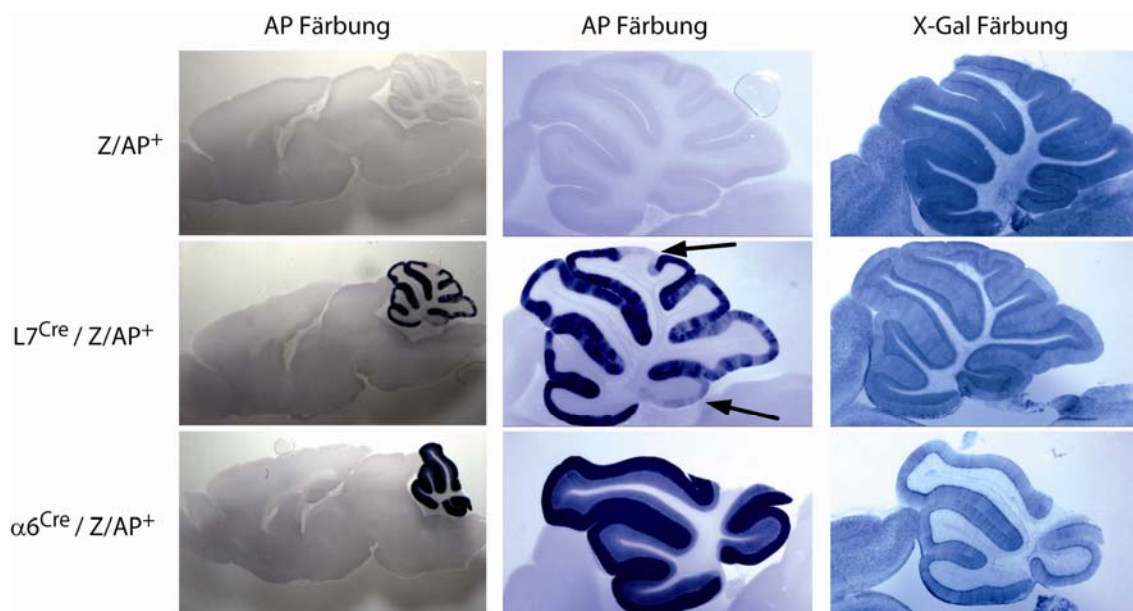


Abbildung 10 | Cre-vermittelte Rekombination im Cerebellum.

In der L7-Cre-Maus ist die Cre-Expression im Gehirn auf Purkinjezellen des Cerebellums beschränkt. In begrenzten Bereichen in den 6. und 10. Loben des cerebellären Vermis war jedoch keine Cre-vermittelte Rekombination zu beobachten (Pfeile). Verpaarung mit der $\alpha 6$ -Cre-Linie führt zur Deletion von „gefloxten“ Zielgenen in den Körnerzellen des Cerebellums. In beiden Cre-Linien wurde keine Cre-Expression in Gehirnbereichen ausserhalb des Cerebellums detektiert.

3.1.1.1.2. Analyse der $\Delta\alpha 6$ Cre-Maus

Bei der $\Delta\alpha 6$ Cre -Mauslinie wird Cre-Rekombinase unter dem Promotor des Gens für die $\alpha 6$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors exprimiert (Aller *et al*, 2003).

Die $\Delta\alpha6\text{Cre}$ -Mauslinie (Aller *et al*, 2003) wurde zunächst hinsichtlich der Cre-Expression im Gehirn untersucht. Dazu wurden Gehirnschnitte von $Z/\text{AP}^+;\Delta\alpha6\text{Cre}^+$ -Mäusen mit denen von Kontroll-Geschwistertieren ($Z/\text{AP}^+;\Delta\alpha6\text{Cre}^-$ -Mäusen) mittels hPALP-Nachweis und X-Gal-Färbung verglichen (Abb. 10). Die Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion in $Z/\text{AP}^+;\Delta\alpha6\text{Cre}^+$ -Mäusen fand hochspezifisch in den Körnerzellen des Cerebellums statt, wie anhand der dunklen Färbung der Körnerzellschicht im hPALP-Nachweis zu erkennen ist. Die Färbung der Molekularschicht stammt von hPALP-positiven Körnerzellaxonen, und nicht von Cre-positiven Purkinjezellen. Dies wird in der lacZ-Nachweisreaktion deutlich, bei der am positiven Farbsignal zu sehen ist, dass in den Purkinjezellen keine Deletion stattgefunden hat, während in der Körnerzellschicht nur noch vereinzelte, blau angefärbte Zellen zu finden waren. Bei diesen Zellen handelte es sich aufgrund ihrer Größe, Lokalisation und Anzahl sehr wahrscheinlich um Golgizellen.

3.1.1.2. Verifizierung des zellspezifischen Knockouts von *Kcc2*

Cre-Rekombinase führt zu einer Rekombination zwischen den in loxP-Stellen, was im Fall des geflochtenen *Kcc2*-Allels wiederum zur Exzision der Exone 2-5 führt (Abb. 11).

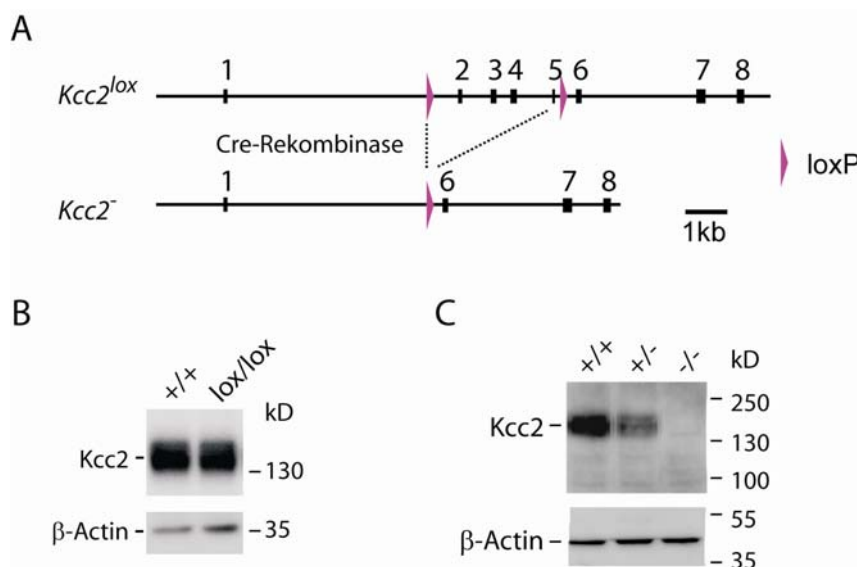


Abbildung 11 | Die inserierten loxP-Sequenzen beeinträchtigen die Expression von *Kcc2* nicht.

(A) Genstruktur des „geflochtenen“ *Kcc2*-Allels $Kcc2^{lox}$. Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination zwischen den loxP-Sequenzen führt zur Exzision der Exone 2-5. Exone sind als schwarze Boxen dargestellt. (B) Die Western Blot Analyse von einer Membranpräparation (adultes Cerebellum) zeigt, dass $Kcc2^{lox/lox}$ -Mäuse Wildtyp-Level von *Kcc2* exprimieren. (C) Western Blot auf einer Membranpräparation (E 14.5, Hirnstamm) von Wildtyp- und $Kcc2^{-/-}$ -Mäusen zeigt die Spezifität des verwendeten *Kcc2*-Antikörpers (J21). Ladekontrolle: β -Actin.

Da jedoch kein Stopkodon in der rekombinierten Sequenz entsteht, kann es zu einem trunkeierten Protein kommen, in dem nur diese Exone fehlen. Um zu verifizieren, dass der zellspezifische Knockout von *Kcc2* erfolgreich war wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus verwendet. Dieser Antikörper aus Kaninchen (J21) wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt und mittels Western Blot auf seine Spezifität hin überprüft.

3.1.1.2.1. Verpaarung der konditionalen *Kcc2*^{lox/lox}- und L7-Cre-Mäusen

Kcc2^{lox/lox}-Mäuse wurden mit L7-Cre-Mäusen verpaart, um schließlich Mäuse mit dem Genotyp *Kcc2*^{lox/lox};*L7Cre*⁺ zu erhalten. *Kcc2*^{lox/lox};*L7Cre*⁺ Mäuse wurden im Bl6-Hintergrund gehalten, und waren lebensfähig und fertil. Genotypisierung der jungen Mäuse ergab eine Mendelsche Verteilung der Genotypen *Kcc2*^{lox/lox};*L7Cre*⁺ und *Kcc2*^{lox/lox};*L7Cre*⁻.

Äusserlich unterschieden sich die konditionalen Knockout-Mäuse nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern. Es waren keine offensichtlichen Unterschiede in Verhalten und Motorik zu erkennen.

Mit dem Antikörper gegen den C-Terminus von *Kcc2* wurde die Expression von *Kcc2* in Mäusen untersucht, die sowohl homozygot für das gefloxtete *Kcc2* Allel sind, als auch Cre-Rekombinase unter dem L7/*pcp-2*-Promotor exprimieren (Abb. 12). Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde gezeigt, dass bei *Kcc2*^{lox/lox};*L7-Cre*⁺ Mäusen kein *Kcc2* Signal in Plasmamembran und Dendriten von Purkinjezellen detektierbar war, während das Signal in Körnerzellen und Interneuronen nicht verändert war. Der Einfachheit halber werden die *Kcc2*^{lox/lox};*L7-Cre*⁺-Mäuse im Folgenden PC-Δ*Kcc2* genannt.

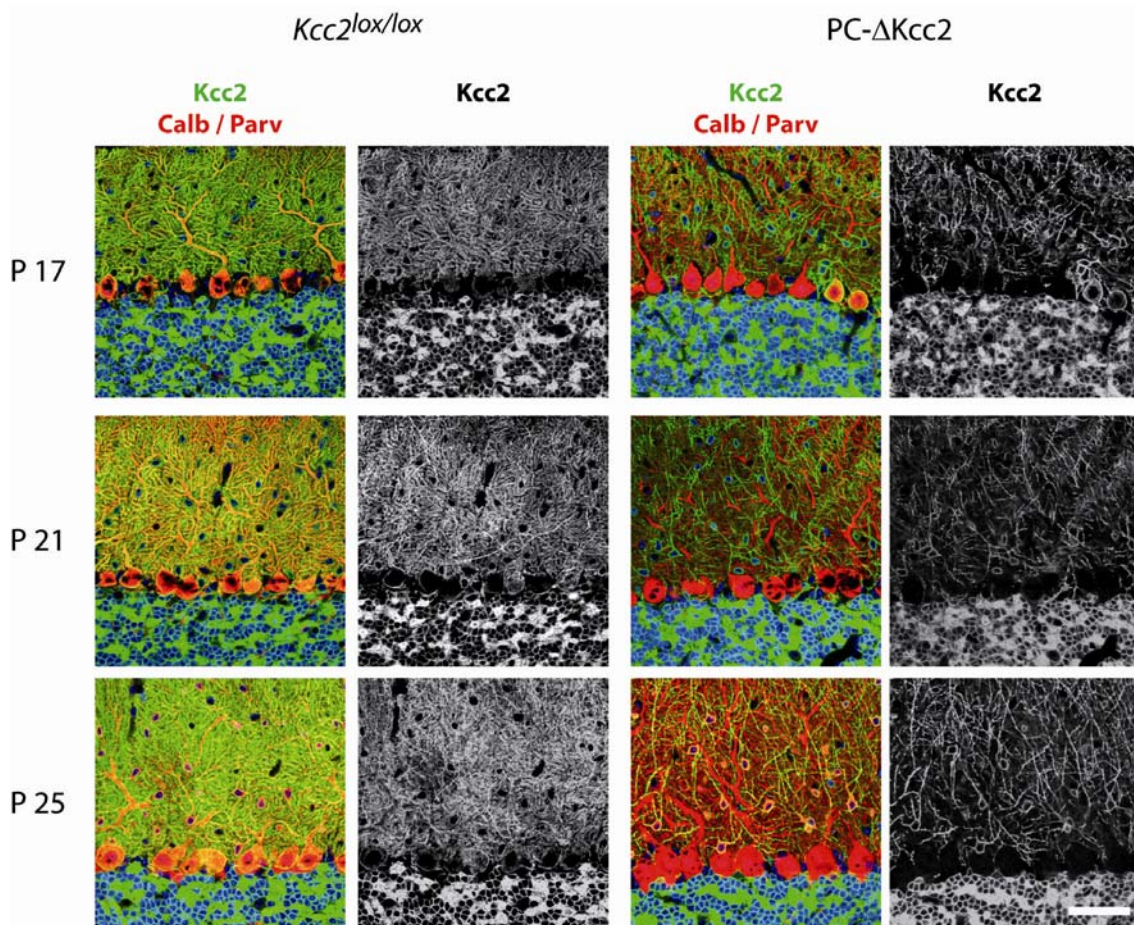


Abbildung 12 | Zellspezifische Deletion von Kcc2 in Purkinjezellen.

Immunofluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Kcc2 (grün) zeigen, dass bei $Kcc2^{lox/lox};L7-Cre^+$ -Mäusen im Alter von 17 Tagen nur vereinzelte Purkinjezellen Kcc2-positiv sind. In Sagittalschnitten von P 25 PC- $\Delta Kcc2$ -Mäusen ($Kcc2^{lox/lox};L7-Cre^+$) hingegen war Kcc2 in der Plasmamembran von Purkinjezellen nicht mehr nachweisbar, während Purkinjezellen aus „geflochten“ Kontrollgeschwistertieren ein robustes Kcc2-Signal in Plasmamembran und Dendritenbaum auswiesen. Gegenfärbung: TOPRO (DNA, blau), und Parvalbumin (Parv) oder Calbindin (Calb) in rot. Maßstab: 50 μ m.

3.1.1.2.2. Zeitverlauf von Kcc2 Expression und Deletion in PC- $\Delta Kcc2$ -Mäusen

Die Präsenz von Kcc2 in Purkinjezellen der Vermis wurde schon prenatal (E 15.5) beschrieben, jedoch variiert die Expression zwischen den verschiedenen Windungen des Cerebellums (Stein *et al*, 2004; Takayama & Inoue, 2007). Mit der vollständigen Entwicklung von Dendritenbäumen nimmt auch die Expression von Kcc2 zu.

Mäuse der L7Cre-Linie exprimieren etwa ab P 6 Cre-Rekombinase in Purkinjezellen, und 2-3 Wochen nach der Geburt ist die Cre-Expression in praktisch allen Purkinjezellen etabliert (Barski *et al*, 2000). Auch von Mäusen der PC- $\Delta Kcc2$ Linie wurde daher mittels Immunohistochemie

überprüft, zu welchem Zeitpunkt die Deletion von *Kcc2* in der cerebellären Vermis vollständig ist (Abb. 13).

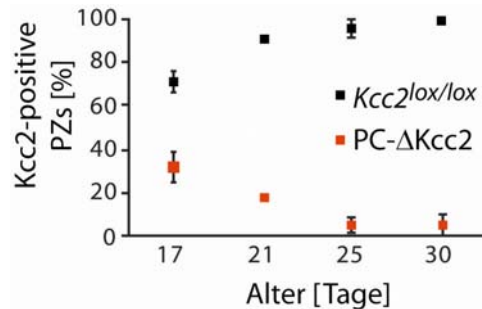


Abbildung 13 | Zeitverlauf der Expression von *Kcc2* in Purkinjezellen.

Die Expression von *Kcc2* in der cerebellären Vermis war ab P25 in nahezu allen Purkinjezellen von *Kcc2^{lox/lox}*-Mäusen etabliert. In PC- Δ *Kcc2*-Mäusen war ab dem gleichen Alter in nahezu allen Purkinjezellen kein *Kcc2*-Protein detektierbar. Gemittelt über alle Regionen der cerebellären Vermis. Abkürzung: PZs (Purkinjezellen).

Zwischen P 17 und P 30 nahm die Anzahl der *Kcc2*-positiven Purkinjezellen in der Vermis von Kontrolltieren zu, während sie in PC- Δ *Kcc2* Mäusen stetig abnahm. Ab P 25 war *Kcc2* fast in allen Purkinjezellen der Vermis deletiert.

3.1.1.2.3. Verpaarung der konditionalen *Kcc2^{lox/lox}*- und Δ *a6Cre*- Mäusen

Kcc2^{lox/lox}-Mäuse wurden mit Δ *a6Cre* -Mäusen verpaart, um schließlich Mäuse mit dem Genotyp *Kcc2^{lox/lox};a6Cre⁺* zu erhalten. Die Mäuse wurden im Bl6-Hintergrund gehalten, und waren lebensfähig und fertil. Genotypisierung der jungen Mäuse ergab eine Mendelsche Verteilung der Genotypen *Kcc2^{lox/lox};a6Cre⁺* und *Kcc2^{lox/lox};a6Cre⁻*. Äusserlich war kein Unterschied zwischen konditionalen Knockout-Mäuse und ihren Wildtyp-Geschwistern zu erkennen. Es gab auch keine offensichtlichen Unterschiede in Verhalten und Motorik.

Auf Gefrierschnitten von *a6-Cre-Kcc2^{lox/lox}*-Mäusen (P 25) war mittels Immunofluoreszenzfärbungen kein *Kcc2*-Signal in der Plasmamembran der Körnerzellen detektierbar, während die Lokalisation und Intensität des Signals in Interneuronen und Purkinjezellen nicht beeinträchtigt war (Abb. 14).

Im Folgenden werden die *Kcc2^{lox/lox};a6Cre⁺*-Mäuse GC- Δ *Kcc2* genannt.

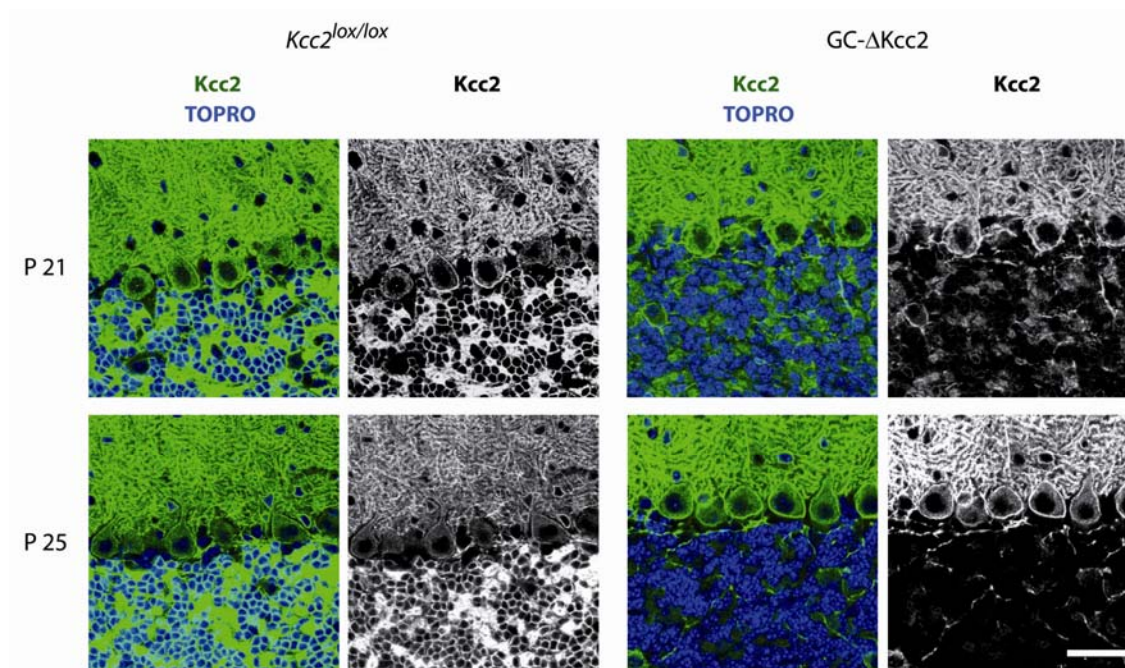


Abbildung 14 | Zellspezifische Deletion von Kcc2 in Körnerzellen.

Mit einem Antikörper gegen Kcc2 (grün) wurde in Immunohistochemische Fluoreszenzfärbungen auf Sagittalschnitten von $Kcc2^{lox/lox}$ -Mäusen (P 21) ein robustes Signal in der Plasmamembran und den Glomeruli detektiert. In 21 Tage alten GC- $\Delta Kcc2$ -Mäusen ($Kcc2^{lox/lox}; \alpha 6 Cre^+$) wurde ein reduziertes Kcc2-Signal in den Glomeruli detektiert. Die Plasmamembran um das Soma war nur bei vereinzelt Körnerzellen Kcc2-positiv. Bei Schnitten aus 25 Tage alten GC- $\Delta Kcc2$ -Mäusen wurde kein Kcc2-Protein in Körnerzellen und Dendriten (Glomeruli) entdeckt. Kofärbung TOPRO (DNA, blau). Maßstab: 40 μ m.

3.1.1.2.4. Zeitverlauf von Kcc2 Expression und Deletion in GC- $\Delta Kcc2$ -Mäusen

Kcc2 wird in cerebellären Körnerzellen etwa ab P 5 in Dendriten detektiert (Takayama & Inoue, 2006). Mit der entwicklungsbedingten Migration der Körnerzellen von der äusseren zur inneren Körnerschicht hin nimmt die Zahl der Kcc2-positiven Körnerzellen zu. Mit P 21 exprimieren schließlich alle Körnerzellen Kcc2 (Takayama & Inoue, 2006).

Die Cre-Expression in der $\Delta \alpha 6$ -Cre-Line findet ebenfalls in postmigrativen Körnerzellen, also ab dem Ende der ersten postnatalen Woche, statt (Aller *et al*, 2003). Um zu bestimmen, ab welchem Alter alle Körnerzellen in Kontrolltieren Kcc2 exprimieren, während in Körnerzellen von GC- $\Delta Kcc2$ Mäusen kein Kcc2-Protein mehr detektierbar ist, wurden immunohistochemische Färbungen auf Gefrierschnitten von Tieren ab P 21 durchgeführt. Dabei war zu erkennen, dass in Körnerzellen von GC- $\Delta Kcc2$ Mäusen schon im Alter von 21 Tagen weniger Kcc2 detektiert wird als bei Kontrolltieren des selben Alters. Allerdings sind besonders die synaptischen Strukturen (Glomeruli), jedoch auch Plasmamembranen von einzelnen Körnerzellen noch Kcc2-positiv. Ab P 25 scheint die Deletion in GC- $\Delta Kcc2$ Tieren vollständig zu sein (Abb. 14).

3.1.1.2.5. **Verpaarung der konditionalen $Kcc2^{lox/lox}$ -Mäuse mit $L7-Cre/\Delta a6Cre$ - Mäusen**

Die Kombination beider Cre-Linien mit den geflochten $Kcc2$ -Mäusen führte zu einem $Kcc2$ -Knockout in Purkinje- und Körnerzellen. Das intensive $Kcc2$ -Signal in der Membran von Korbzellen, Sternzellen und Golgizellen war in Schnitten aus diesen Tieren jedoch nicht reduziert (Abb. 15).

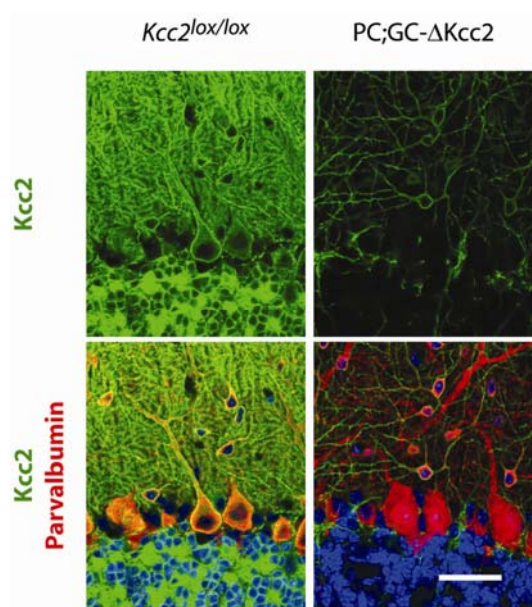


Abbildung 15 | Zellspezifische Deletion von $Kcc2$ in Körner- und Purkinjenzellen.

In Sagittalschnitten von adulten $PC;GC-\Delta Kcc2$ -Mäusen ($Kcc2^{lox/lox}; a6Cre^+; L7Cre^+$) ist mit einem Antikörper gegen $Kcc2$ (grün) weder in Körnerzellen, noch in Purkinjenzellen $Kcc2$ ein Signal detektierbar. Interneuronen hingegen weisen ein robustes $Kcc2$ -Signal in der Plasmamembran und Dendriten auf. Kofärbung: Parvalbumin (rot), TOPRO (DNA, blau). Maßstab: 40 μm .

Auch $Kcc2^{lox/lox}; a6Cre^+; L7Cre^+$ -Mäuse waren nicht von ihren Wildtyp-Geschwistertieren zu unterscheiden. Nach Genotypisierung der jungen Mäuse ergab sich eine Mendelsche Verteilung aller möglichen Genotypen, was wiederum auf normale Vitalität hindeutet. $Kcc2^{lox/lox}; a6Cre^+; L7Cre^+$ -Mäuse werden im Folgenden $PC;GC-\Delta Kcc2$ genannt.

3.1.1.2.6. **Muster der Deletion von $Kcc2$ in $PC-\Delta Kcc2$ - und $GC-\Delta Kcc2$ - Mäusen**

Eine Beobachtung in beiden verwendeten Cre-Linien war die unterschiedliche Deletion von $Kcc2$ in den verschiedenen Windungen des Cerebellums. Wie schon bei der Charakterisierung der Cre-Mauslinien mit Hilfe von Z/AP-Reportermausen, gab es auch bei der Deletion von $Kcc2$ Bereiche der cerebellären Vermis, in denen selbst im adulten Tier keine Rekombination stattfand. Um dies zu überprüfen, wurden Gefrierschnitte von adulten (24 Wochen alten) Tieren immunohistochemisch auf $Kcc2$ -Expression untersucht (Abb. 16). Die Resultate bestätigten, dass die Cre-vermittelte Deletion in $PC-\Delta Kcc2$ Tieren nicht alle Purkinjenzellen der cerebellären Vermis umfasste, sondern Purkinjenzellen in Teilen des 6. und im 10. Lobus weiterhin $Kcc2$ exprimierten. Bei $GC-\Delta Kcc2$ Tieren wurde lediglich eine residuale $Kcc2$ -Expression im 10. Lobus gefunden.

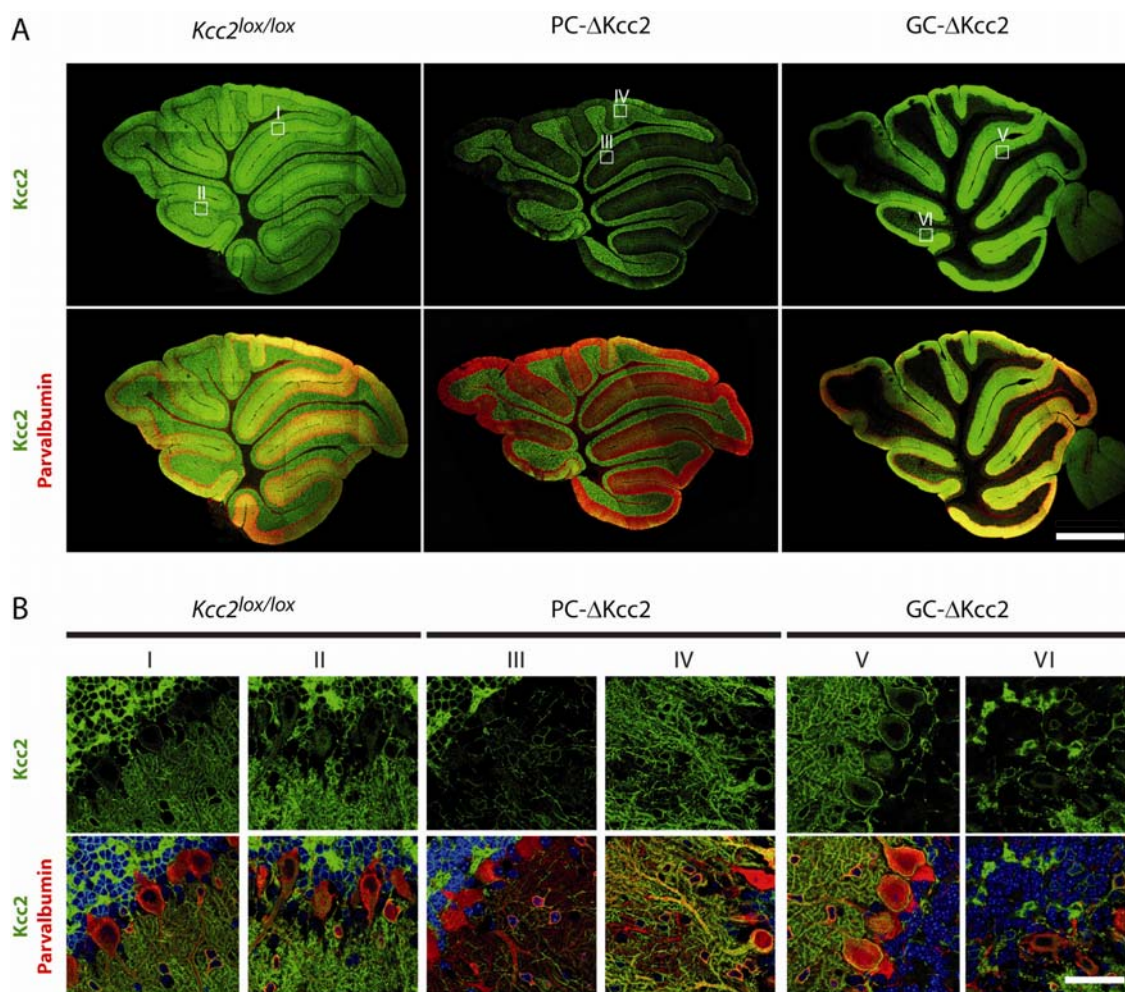


Abbildung 16 | Muster der Cre-vermittelten Deletion von *Kcc2*.

(A) Mittels Immunofluoreszenzfärbung auf sagittalen Gehirnschnitten der cerebellären Vermis von *PC-ΔKcc2*-Mäusen wurde residuale *Kcc2*-Expression (grün) in Purkinjezellen der Loben 6. und 10. detektiert. Bei *GC-ΔKcc2*-Mäusen wurde *Kcc2* in Glomeruli und kleinen, Parvalbumin-negativen Neuronen des 2. Lobus detektiert. Aufgrund von Größe und Lage könnte es sich dabei um Körnerzellen handeln. (B) Vergrößerungen der markierten Ausschnitte aus (A). Kofärbung: Parvalbumin (rot), TOPRO (blau). Maßstab: 1 mm (A), 40 μm (B).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden sämtliche elektrophysiologischen Versuche an Sagittalschnitten der cerebellären Vermis in den 3.-5. Loben durchgeführt, da die Deletion in diesen Bereichen ab dem Alter P 25 vollständig ist.

3.1.2. Der Einfluss von *Kcc2* auf die Ausbildung von Synapsen

3.1.2.1. Histologische Untersuchung des Cerebellums

Vor der Bildung von glutamatergen Synapsen ist GABA der exzitatorische Neurotransmitter in noch nicht voll entwickelten Gehirnen von neonatalen Mäusen (Cherubini *et al*, 1991). Es wird angenommen, dass diese exzitatorische Wirkung von GABA ein wichtiger Faktor in der frühen Entwicklung von neuronalen Netzwerken ist (Ben-Ari, 2002). So wurde beschrieben, dass GABAerge Depolarisation neuronale Migration, Wachstum und die Ausbildung von Synapsen fördert (Bortone & Polleux, 2009; Li *et al*, 2007).

In den hier verwendeten konditionalen Knockoutmauslinien beginnt die Deletion von *Kcc2* erst in den ersten zwei postnatalen Wochen, so dass eine veränderte Morphologie des Cerebellums nicht zu erwarten ist. Nichtsdestotrotz wurde die Morphologie von Sagittalschnitten adulter Mäuse mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht (Abb. 17).

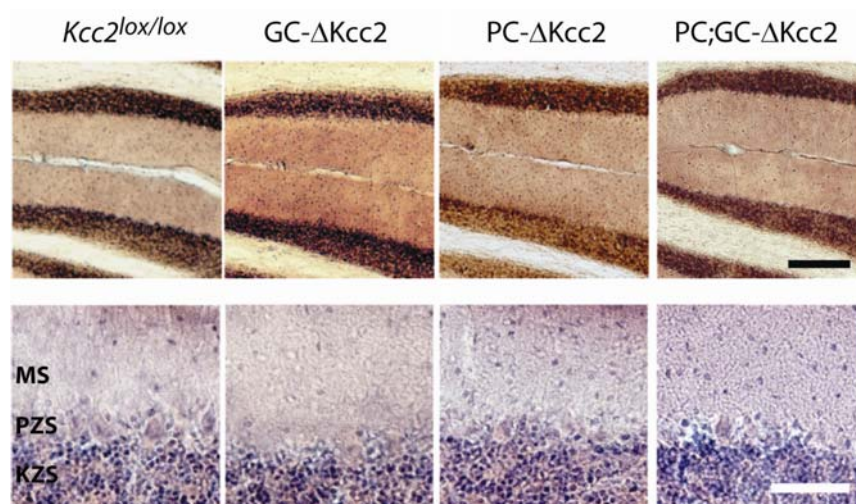


Abbildung 17 | Normale Morphologie des Cerebellums nach zellspezifischer *Kcc2*-Deletion.

Der Vergleich von HE-gefärbten Sagittalschnitten zeigt, dass die Deletion den Aufbau und die Breite der Zellschichten im Cerebellum nicht beeinflusst. In allen untersuchten konditionalen *Kcc2*-Knockoutlinien war hier kein Unterschied im Vergleich zu *Kcc2*^{lox/lox}-Mäusen feststellbar. Abkürzungen: MS (Molekularschicht), PZS (Purkinjellschicht), KZS (Körnerzellschicht). Alter der Mäuse: 24 Wochen. Maßstab: 200 µm (oben), 50 µm (unten).

Die zellspezifische Deletion von *Kcc2* hatte keine veränderte Morphologie des adulten Cerebellums zur Folge. Der grobe Aufbau der cerebellären Windungen (*Folia cerebelli*) war in PC- Δ *Kcc2*, GC- Δ *Kcc2* und PC,GC- Δ *Kcc2* Mäusen, verglichen mit Kontrolltieren (*Kcc2*^{lox/lox}), normal. Auch Breite, Aufbau und Zelldichte der einzelnen kortikalen Schichten (Molekularschicht, Purkinjellschicht und Körnerzellschicht) des Cerebellums entsprachen denen von Kontrolltieren.

3.1.2.2. Untersuchung dendritischer Spines von Purkinjezellen

Ziel dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen intraneuronaler Chloridkonzentration, der daraus resultierenden beeinträchtigten GABAergen Inhibition, und eventuellen Verhaltensphänotypen der konditionalen *Kcc2* Knockoutmäuse zu untersuchen. Wie in der Einleitung beschrieben, erfüllt *Kcc2* neben der Regulation von $[Cl^-]_i$ auch eine strukturelle Funktion bei der Entwicklung glutamaterger Synapsen und dendritischen Spines. Zunächst mussten also die Morphologie von dendritischen Spines untersucht werden. In den hier verwendeten konditionalen *Kcc2* Knockoutmäusen findet die Deletion erst nach dem Einsetzen der *Kcc2*-Expression statt. In den verwendeten Mausmodellen ist *Kcc2* in einer begrenzten Neuronenpopulation deletiert, während z.B. die Interneuronen der untersuchten Region vom Knockout nicht betroffen sind.

Es wurden PC;GC- Δ *Kcc2* Mäuse mit geflochten Geschwistertieren (Alter: 12-13 Wochen) verglichen. Der mögliche Effekt auf die Morphologie sollte hier am deutlichsten sein, da sowohl Körnerzellen, als auch Purkinjezellen kein *Kcc2* exprimieren.

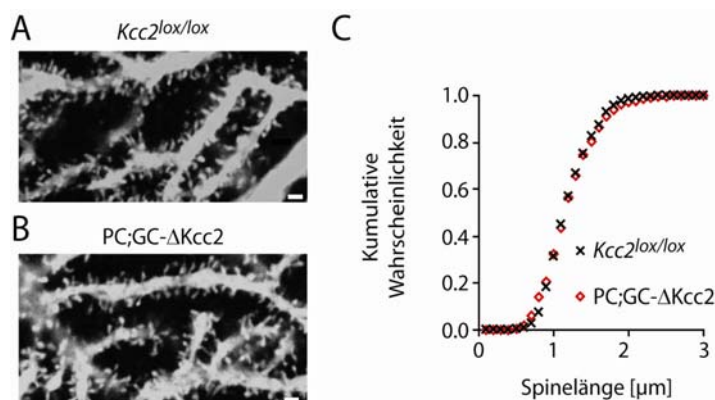


Abbildung 18 | Die Deletion von *Kcc2* hat keinen Einfluss auf die Länge dendritischer Spines von Purkinjezellen.

Dendritenbaum einer Biocytin-gefüllten Purkinjezelle von einer (A) *Kcc2*^{lox/lox} bzw. (B) PC;GC- Δ *Kcc2*-Maus. Maßstab (in A und B): 2 μm . (C) Kumulatives Wahrscheinlichkeitsdiagramm der Spinelängen von *Kcc2*^{lox/lox}- und PC;GC- Δ *Kcc2*-Mäusen.

Um die dendritischen Spines von Purkinjezellen in Gewebeschnitten sichtbar zu machen wurden einzelne Purkinjezellen mit Biocytin befüllt, so dass Bilder von einzelnen Dendriten mitsamt Spines am konfokalen Mikroskop aufgenommen werden konnten (Abb. 18). Mit dem Program *NeuronJ* wurde die Länge individueller Spines von Purkinjezellen gemessen. Die durchschnittliche Spinelänge von PC;GC- Δ *Kcc2* Mäusen lag bei $1.2 \pm 0.01 \mu\text{m}$ (2 Tiere, 908 Spines) und unterschied sich somit nicht vom Kontrolltier mit $1.19 \pm 0.01 \mu\text{m}$ (1 Tier, 520 Spines) ($p = 0.8$, T-Test).

3.1.2.3. Immunohistochemische Quantifizierung exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen im cerebellären Kortex

Um die Anzahl exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen in den konditionalen *Kcc2* Knockout Mausmodellen dieser Arbeit zu überprüfen wurden immunohistochemische Färbungen gegen VGAT, VGLUT1 und VGLUT2 auf Gehirnschnitten von adulten Tieren durchgeführt (Abb. 19). VGAT (vesikulärer GABA Transporter) ist für die Beladung synaptischer Vesikel des zentralen Nervensystems mit GABA verantwortlich und ist ein Marker für GABAerge Nervenendigungen und GABAerge Synapsen. VGLUT 1 und 2 (vesikulärer Glutamat Transporter 1 und 2) sind verantwortlich für die Glutamataufnahme in synaptische Vesikel und können zur Markierung glutamaterger Synapsen und Nervenendigungen verwendet werden.

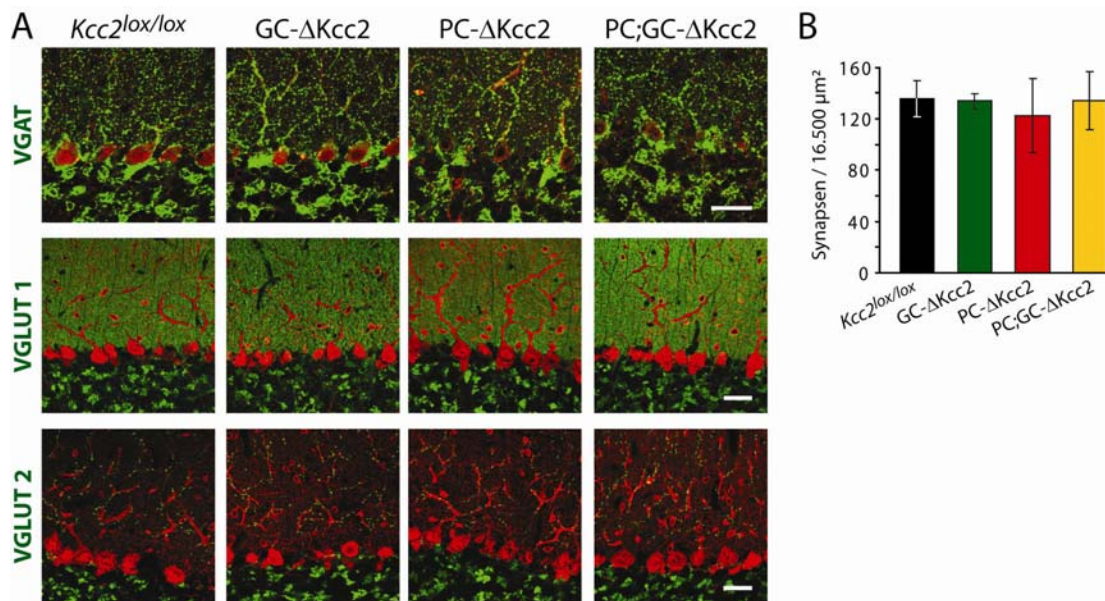


Abbildung 19 | Die Anzahl GABAerge und glutamaterger Synapsen im cerebellären Kortex ist unverändert.

(A) Immunofluoreszenzfärbungen gegen VGAT (als Marker für GABAerge Synapsen) und VGLUT 1 und 2 (als Marker für glutamaterge Synapsen) ergaben keinen Unterschied in der Anzahl inhibitorischer und exzitatorischer Synapsen im cerebellären Kortex der verschiedenen Mauslinien. Kofärbung: Parvalbumin (rot). (B) Quantifizierung VGLUT 2-positiver Synapsen (Kletterfaser-Purkinjenzellsynapsen) in der Molekularschicht. Für jeden Genotyp: n = 4. Fehlerbalken zeigen SEM.

Während VGLUT1 die Synapsen von Moosfasern, sowie die Boutons der Parallelfasern markiert, befindet sich VGLUT2 in den Synapsen von Moosfasern und Kletterfasern. Bei allen untersuchten Genotypen (*Kcc2^{lox/lox}*, *PC-ΔKcc2*, *GC-ΔKcc2* und *PC;GC-ΔKcc2*) wurde nach Färbung gegen VGAT ein intensives Signal in den Glomeruli der Körnerzellschicht, den Termini der Korbzellen, sowie eine punktuelle Färbung auf Soma und Dendritenbaum der Purkinjenzellen

gefunden. Dabei waren keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Kontrolle und Kcc2 Knockout zu erkennen.

Bei der Färbung gegen VGLUT1 wurden die Glomeruli markiert. Ausserdem war eine fein punktuerte Färbung der Molekularschicht zu erkennen, die den Boutons der Parallelfasern zuzuordnen ist. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen den Genotypen.

VGLUT2 wurde in den Glomeruli, sowie in separierten Synapsen entlang des Dendritenbaums von Purkinjezellen detektiert. Die VGLUT2-positiven Punkte in der Molekularschicht entsprechen den Termini der Kletterfasern, die den Dendritenbaum einer Purkinjezelle umwickeln und dabei viele glutamaterge Synapsen bilden. Um die Zahl der exzitatorischen Synapsen zu quantifizieren, wurde die Anzahl der Kletterfaser-Purkinjezellsynapsen zwischen den Genotypen verglichen. Die Auswertung ergab, dass die Anzahl der VGLUT2 positiven Synapsen in den konditionellen Kcc2 Knockoutmäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren, nicht reduziert war.

3.1.2.4. Ultrastrukturelle Untersuchung der Synapsen im cerebellären Kortex

Um die Dichte von verschiedenen Synapsen im cerebellären Kortex, sowie die Breite der dendritischen Spines von Purkinjezellen zu untersuchen, wurden im Labor von Chris De Zeeuw elektronenmikroskopische Aufnahmen aus Körnerzellschicht und Molekularschicht hergestellt (Abb. 20). Die Anzahl von inhibitorischen Synapsen war in PC- Δ Kcc2, GC- Δ Kcc2, PC;GC- Δ Kcc2 und Kontrolltieren ($Kcc2^{lox/lox}$) vergleichbar. Auch die Dichte von glutamatergen Parallelfaser-Synapsen war in keiner der untersuchten Mauslinien signifikant verändert. Nachdem die Länge dendritischer Spines durch das Fehlen von Kcc2 nicht beeinträchtigt war, wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nun die Breite der Spinehalse gemessen. Auch hier unterschieden sich PC- Δ Kcc2, GC- Δ Kcc2, PC;GC- Δ Kcc2 nicht signifikant von Kontrolltieren (alle $p > 0.09$).

Somit können morphologische Veränderungen in den hier untersuchten konditionalen Kcc2-Knockoutlinien ausgeschlossen werden.

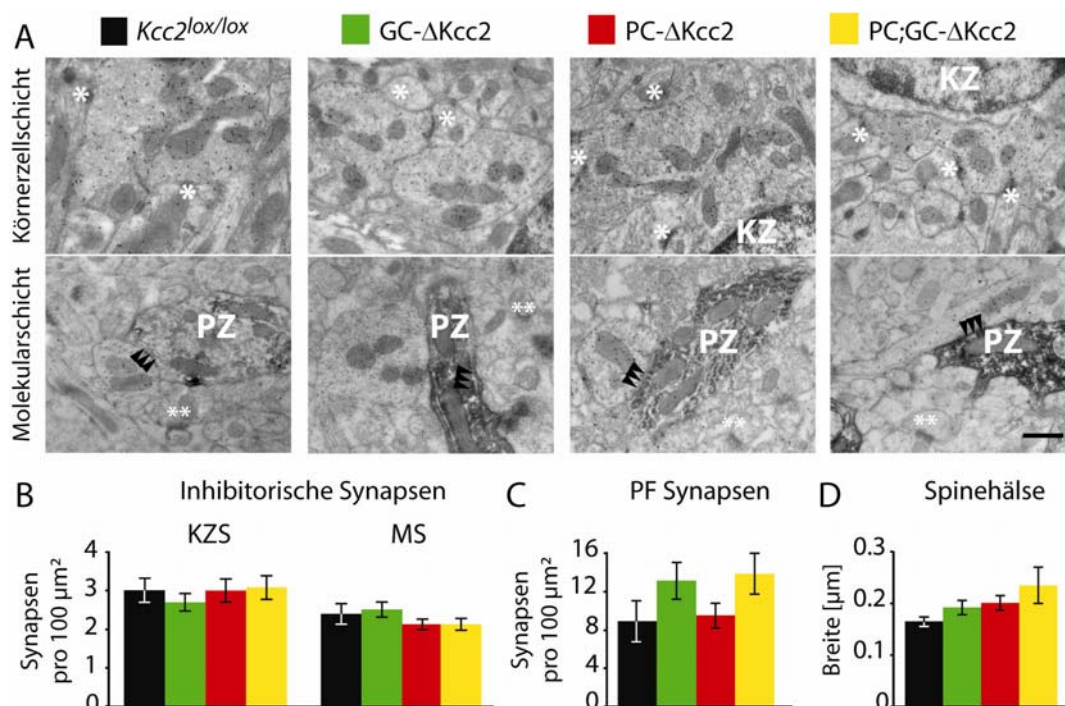


Abbildung 20 | Elektronenmikroskopische Aufnahmen des cerebellären Kortex.

Die Ultrastruktur von Synapsen und dendritischen Spines ist durch die Deletion von *Kcc2* nicht beeinträchtigt. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der Körnerzellschicht (oben) und Molekularschicht (unten) von den konditionellen *Kcc2*-Knockoutlinien. Symmetrische Synapsen sind durch Pfeile gekennzeichnet, Sterne markieren Synapsen in Glomeruli (Körnerzellschicht) und asymmetrische Synapsen (Molekularschicht). Maßstab: 500 nm. (B) Die Dichte inhibitorischer Synapsen in Körnerzellschicht und Molekularschicht war zwischen den Genotypen ähnlich hoch. (C) Auch die Anzahl von Parallelfaser-Purkinjellsynapsen (bezogen auf die Fläche) von den konditionellen *Kcc2*-Knockoutmäusen war von den Kontrolltieren nicht zu unterscheiden. (D) Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Breite der dendritischen Spines (gemessen an der Basis) zwischen Kontrolltieren und *GC-ΔKcc2*, *PC-ΔKcc2* oder *PC;GC-ΔKcc2*- Mäusen. Abkürzungen: KZ (Körnerzelle), PZ (Purkinjelle), KZS (Körnerzellschicht), MS (Molekularschicht), PF (Parallelfaser). (B-D) n = 4 für alle Genotypen. Fehlerbalken zeigen SEM.

3.1.2.5. Elektrophysiologische Untersuchung inhibitorischer und exzitatorischer Postsynapsen von Purkinjellen

Postsynaptische Miniaturströme („Minis“) sind Ströme, die durch die Freisetzung der Neurotransmitter von nur einem synaptischen Vesikel im postsynaptischen Neuron evoziert werden. Man unterscheidet, je nach Neurotransmitter und postsynaptischer Antwort, zwischen inhibitorischen Miniaturströmen (mIPSCs, miniature inhibitory postsynaptic currents) und exzitatorischen Miniaturströmen (mEPSCs, miniature excitatory postsynaptic currents). Die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung steigt mit einem Aktionspotential enorm, doch Miniaturströme können selbst dann beobachtet werden, wenn im präsynaptischen Neuron kein Aktionspotential ausgelöst wurde, denn gelegentlich fusionieren Transmittervesikel spontan mit

der präsynaptischen Membran. Die Häufigkeit dieser zufälligen Ereignisse kann als grober Hinweis auf die Anzahl von Postsynapsen eines Neurons dienen.

Um die Ergebnisse der immunohistochemischen Färbungen gegen VGAT und VGLUT1/2 auf elektrophysiologischer Ebene zu bestätigen wurden mIPSCs und mEPSCs in Purkinjezellen von PC- Δ Kcc2 Mäusen mit denen von Kontrollgeschwistern verglichen (Abb. 21). Um bei Messungen von Miniaturströmen Ereignisse auszuschliessen, die durch spontane Aktivität präsynaptischer Neuronen ausgelöst wurden, werden Aktionspotentiale durch Tetrodotoxin blockiert. Es wurden junge Tiere (Alter: 4 Wochen) verwendet, da die Häufigkeit von spontanen mEPSCs und mIPSCs mit steigendem Alter stark abnimmt.

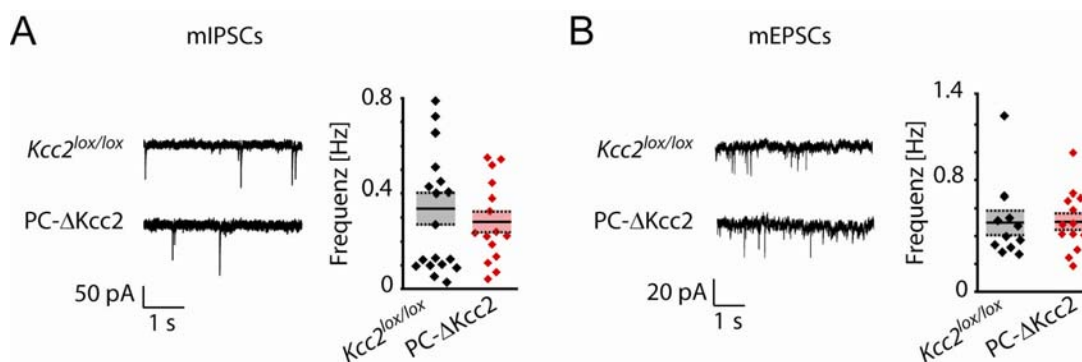


Abbildung 21 | Postsynaptische Miniaturströme von Purkinjezellen.

mIPSCs und mEPSCs, gemessen an Purkinjezellen, unterschieden sich weder in Frequenz, noch in Amplitude zwischen $Kcc2^{lox/lox}$ und PC- Δ Kcc2-Mäusen. Repräsentative Aufnahmen (links) von (A) mIPSCs bzw. (B) mEPSCs, und ein Diagramm mit den zusammengefassten Frequenzen der gemessenen Ereignisse (rechts). Dargestellt sind die gemittelte Frequenz jeder einzelnen Zelle (Symbole), sowie Mittelwert aller Messungen (schwarzer Balken) und SEM (Box).

Im Einklang mit den Färbungen gegen VGAT unterschied sich die Frequenz der mIPSCs zwischen Kontrollmäusen (0.34 ± 0.1 Hz, $n=19$) und PC- Δ Kcc2 Mäusen (0.28 ± 0.1 Hz, $n=15$) nicht signifikant (t-Test, $p=0.4$). Auch die Frequenz der mEPSCs war zwischen Kontrollmäusen (0.49 ± 0.1 Hz, $n=11$) und PC- Δ Kcc2 Mäusen (0.5 ± 0.1 Hz, $n=14$) nicht signifikant unterschiedlich (T-Test, $p=0.9$).

Die Amplituden von mEPSCs und mIPSCs waren in PC- Δ Kcc2 Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren, nicht verändert ($p = 0.7$ und $p = 0.2$).

Es gab also, wie auch in den Färbungen gegen VGLUT1/2 und VGAT, keinen Hinweis auf eine Reduktion der exzitatorischen oder inhibitorischen Synapsen als Folge des Kcc2 Knockouts.

3.1.3. Elektrophysiologische Untersuchung von PC- Δ Kcc2-Mäusen

3.1.3.1. Ruhemembranpotential im Purkinjezellen und GABAerge Ströme

In adulten Neuronen des zentralen Nervensystems liegt die Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$) mit ca. 2-7 mM teilweise deutlich unter der von embryonalen und früh postnatalen (unreifen) Neuronen (mit ~20 mM) (Ben-Ari, 2002). Nimmt man eine extrazelluläre Chloridkonzentration ($[Cl^-]_o$) von 126.5 mM, sowie ein Ruhemembranpotential von -65 mV an, so resultiert daraus eine passive Gleichgewichtskonzentration von ~11 mM Chlorid im Neuron. Die davon abweichenden intrazellulären Chloridkonzentrationen in adulten, sowie unreifen Neuronen weisen also auf Mechanismen zur Chloridextrusion bzw. Akkumulation hin. Wenn Kcc2 also der wichtigste Cl- Exporter von adulten Neuronen ist, sollte die Deletion von Kcc2 in Purkinjezellen zu einer erhöhten intrazellulären Cl-Konzentration führen.

Eine Methode, mit der die intrazelluläre Chloridkonzentration von Neuronen bestimmt werden kann, besteht in der Messung des Umkehrpotentials GABAerger Ströme. GABA_A-Rezeptoren sind hauptsächlich für Chlorid permeabel, und das Potential, bei dem ihre Ströme die Polarität ändern ist, unter Vernachlässigung der HCO₃⁻ Leitfähigkeit von GABA_A-Rezeptoren, eine gute Annäherung an das Chloridumkehrpotential (E_{Cl^-}). Aus E_{Cl^-} und der extrazellulären Chloridkonzentration lässt sich mit der Nernst-Gleichung $[Cl^-]_i$ berechnen.

Um die intrazelluläre Chloridkonzentration von Purkinjezellen zu untersuchen, wurden Gramicidin Perforated-Patch Messungen in akuten Gehirnschnitten durchgeführt. Im Stromklemmen-Modus (*current clamp*, I=0) wurde das Membranpotential V_M der gepatchten Zelle direkt ausgelesen. Mit dieser Methode wurde auch die GABA-Antwort von Purkinjezellen in Gegenwart von TTX bei Mäusen ab einem Alter von P 25 gemessen (Abb. 22).

Das Ruhemembranpotential von PC- Δ Kcc2 Mäusen lag bei -65.9 ± 0.9 mV (n=30), während bei Kontrollgeschwistertieren -66.2 ± 0.6 mV (n=23) gemessen wurde. In Gegenwart von 50 μ M Muscimol (oder 100 μ M GABA) hyperpolarisierten Purkinjezellen aus Kontrolltieren signifikant stärker als dies bei PC- Δ Kcc2 Tieren der Fall war ($\Delta V = -20.1 \pm 1$ mV (n= 23) und -8.4 ± 1.3 mV (n=30)). Die Druckapplikation von ACSF (mit 0.05% DMSO) alleine, oder Applikation von Muscimol oder GABA in Anwesenheit von GABA_A-Rezeptorantagonisten (100 μ M Bicucullin oder 50 μ M Gabazin) führte zu keiner Änderung des Membranpotentials. Die Hyperpolarisation der Purkinjezellen ist also auf das Öffnen von GABA_A-Rezeptoren, bzw. die daraus resultierenden Ströme zurück zu führen.

Auch wenn die Antwort auf GABA, im Vergleich zu Kontrolltieren, deutlich reduziert war, wurden Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc2 Tieren durch GABA hyperpolarisiert. Dies bedeutet, dass das elektrochemische Gleichgewichtspotential von Chlorid negativer war als das

Ruhemembranpotential. Dieser Zustand ist nicht durch passive Diffusion von Chlorid aus der Zelle zu erklären. Auch HCO_3^- -Ströme können die Hyperpolarisation nicht erklären, denn $E_{\text{HCO}_3^-}$ liegt bei ca. -10 mV. Es muss also in Purkinjezellen neben Kcc2 einen weiteren Mechanismus geben, der Chlorid gegen seinen elektrochemischen Gradienten exportiert.

Weder Chloridkonzentration, noch E_{Cl^-} (oder auch Umkehrpotential GABAerger Ströme (E_{GABA})) können allerdings mit dieser Methode bestimmt werden, da die GABAergen Ströme von der Anzahl aktivierter GABA_A -Rezeptoren abhängt dies zwischen den gemessenen Zellen variiert. Vor allem aber fließt zu keiner Zeit der Messung Strom ausschliesslich Strom durch GABA_A -Rezeptoren. Dies bedeutet, dass auch während des Spitzenwertes der Hyperpolarisation andere Ionenkanäle beteiligt sind, und man also nicht das Umkehrpotential GABAerger Ströme misst, auch wenn dieser Anteil vielleicht dominiert.

3.1.3.2. Determination von E_{GABA} in Purkinjezellen

Um das Umkehrpotential GABAerger Ströme (E_{GABA}) zu bestimmen, muss man die GABAergen Ströme isoliert betrachten. Ausserdem sollte die Messmethode möglichst unabhängig von der Anzahl der aktivierten GABA_A -Rezeptoren sein.

Auch diese Experimente wurden in der Gramicidin Perforated-Patch Konfiguration durchgeführt, allerdings im *Voltage clamp* Modus. Purkinjezellen (aus Mäusen > P 25) wurde für je 10 Sekunden auf verschiedene Potentiale zwischen -130 mV und 0 mV geklemmt. Dabei fließen bereits Ströme über die Membran, die jedoch während des Spannungspulses konstant bleiben.

Während diesen Spannungsschritten wurde 100 μM GABA (oder 50 μM Muscimol) mithilfe einer Applikationspipette direkt auf das Soma der gepatchten Zelle gegeben, um GABA_A -Rezeptoren zu aktivieren. Je nach Potential sieht man einen Einwärts- oder Auswärtsstrom, den GABAergen Strom, der nach der Applikation schnell wieder inaktiviert. Die verschiedenen Spannungswerte wurden entsprechen des Zugangswiderstandes nachträglich korrigiert.

Das Potential, bei dem der GABAerge Strom die Polarität ändert, nennt man E_{GABA} , und es entspricht in guter Annäherung E_{Cl^-} . Für Kontrollpurkinjezellen wurde so ein E_{GABA} von -97.3 ± 1 mV ($n=16$) ermittelt (Abb. 22). Dieser Wert ist ca. 31 mV negativer als das zuvor bestimmte Ruhemembranpotential. In Purkinjezellen von PC- ΔKcc2 Mäusen wurde ein E_{GABA} von -77.9 ± 3 mV ($n=13$) gemessen. Dieser Wert war nur um ca. 10 mV negativer als das Ruhepotential der Zellen. Die Chloridkonzentration in den Purkinjezellen wurde nach der Nernst-Gleichung

$$E_{\text{Cl}^-} = 25.43 \text{ mV} \times \ln \frac{[\text{Cl}^-]_i}{[\text{Cl}^-]_a}$$

aus E_{GABA} und der Chloridkonzentration der Extrazellulärlösung ($[Cl^-]_a=126.5$ mM, 22°C) in Annäherung berechnet. In Purkinjenzellen von PC- $\Delta Kcc2$ Mäusen war $[Cl^-]_i$ mit ~ 6 mM ungefähr doppelt so hoch wie bei ihren Kontrollgeschwistertieren (~ 3 mM). Dies zeigt, dass die Chloridextrusion in Purkinjenzellen adulter Mäuse hauptsächlich durch $Kcc2$ vermittelt wird. Allerdings gibt es auch noch einen weiteren Mechanismus zur Chloridextrusion, da auch in $Kcc2^{-/-}$ Purkinjenzellen $[Cl^-]_i$ unter der passiven Gleichgewichtskonzentration von ~ 11 mM liegt.

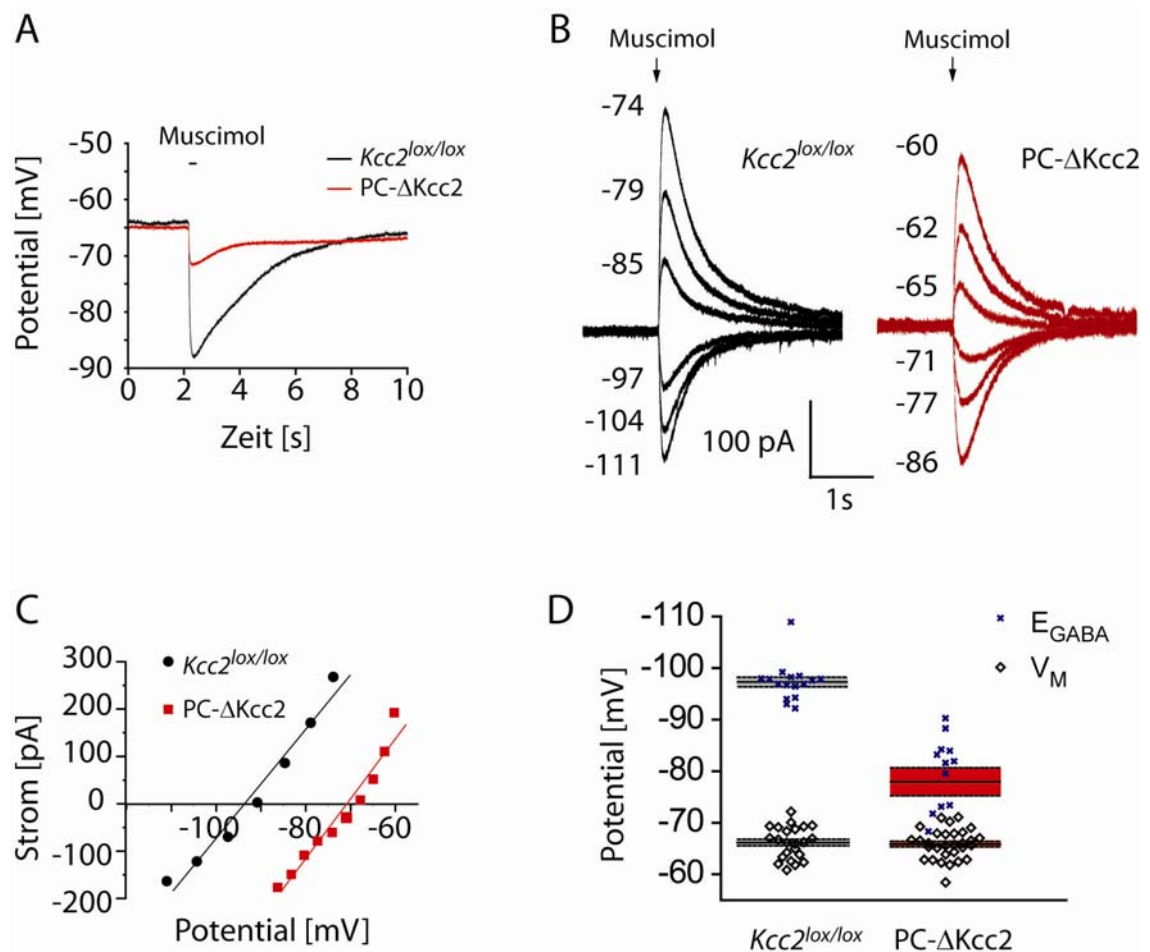


Abbildung 22 | Der Einfluss von $Kcc2$ auf $[Cl^-]_i$ von Purkinjenzellen.

(A) Die Applikation von Muscimol hyperpolarisiert sowohl in $Kcc2^{lox/lox}$ - als auch in $PC-\Delta Kcc2$ Purkinjenzellen. Die Amplitude der Hyperpolarisation ist in $PC-\Delta Kcc2$ -Purkinjenzellen aber deutlich reduziert. (B) GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme von $Kcc2^{lox/lox}$ - und $PC-\Delta Kcc2$ -Purkinjenzellen bei verschiedenen Haltepotentialen (links neben den Stromspuren angegeben, in mV). (C) Ermittlung von E_{GABA} durch auftragen der GABAergen Ströme aus (B) gegen das Haltepotential. Der Schnittpunkt mit der X-Achse ergibt E_{GABA} . (D) Zusammenfassung von V_M und E_{GABA} .

3.1.3.3. Chloridextrusion nach akuter Erhöhung von $[Cl^-]_i$

Die vorausgegangene Messung von E_{GABA} spiegelt den Ruhezustand von $[Cl^-]_i$ wider, da die neuronale Aktivität aller Neuronen im Gehirnschnitt durch Tetrodotoxin in der Badlösung blockiert wurde. Durch intensive, repetitive $GABA_A$ -Rezeptor-Aktivierung, also bei intensiver neuronaler Aktivität, kann es allerdings zu einer Beladung eines Neurons mit Chlorid kommen (Jin *et al*, 2005). Um diese akut erhöhte $[Cl^-]_i$ schnell wieder auf das Ruheniveau zu senken, ist aktiver Chloridexport aus dem Neuron nötig. Diese Funktion wurde in anderen Gehirnregionen bereits *Kcc2*, *Kcc3*, und zum Teil auch *ClC-2*, zugeschrieben (Zhu *et al*, 2005; Rinke *et al*, 2010; Jin *et al*, 2005; Boettger *et al*, 2003). Im Purkinjezellspezifischen Knockout von *Kcc2* war E_{GABA} negativer als das Ruhemembranpotential. Allerdings war die Differenz zwischen E_{GABA} und dem Ruhemembranpotential im Vergleich zu Kontrolltieren im Ruhezustand drastisch reduziert.

Um den Chloridexport bei akut erhöhter $[Cl^-]_i$ zu untersuchen, wurden Purkinjezellen mit Chlorid beladen, und die Rückkehr zum Ruhezustand beobachtet (Abb. 23). Auch diese Messungen fanden in der Gramicidin Perforated-Patch Konfiguration in der *Voltage clamp* Konfiguration statt. Aus E_{GABA} wurde nach der Nernst-Gleichung $[Cl^-]_i$ ermittelt.

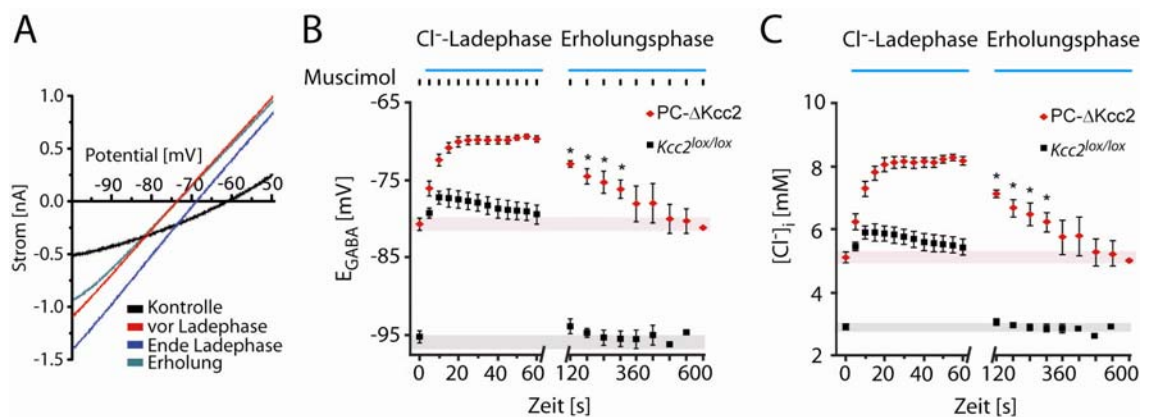


Abbildung 23 | Chloridextrusion nach akuter Erhöhung von $[Cl^-]_i$.

(A) Durch Spannungsrampen hervorgerufene Ströme während des Extrusionsexperimentes. Aus dem Schnittpunkt der Ströme mit der Kontrollstromspur (schwarz) wurde E_{GABA} determiniert. (B) Darstellung der ermittelten E_{GABA} -Werte zu verschiedenen Zeitpunkten von Purkinjezellen aus *Kcc2^{lox/lox}* (n=5) und PC- Δ Kcc2 (n=7). (C) Aus (B) estimierte $[Cl^-]_i$ während des Experiments. Fehlerbalken zeigen SEM.

In Purkinjezellen aus Kontrolltieren stieg $[Cl^-]_i$ während der ersten zwei Ladepulse um ca. 3 mM an. Während den folgenden 10 Ladepulsen war keine weitere Beladung festzustellen, stattdessen sank die $[Cl^-]_i$ sogar wieder leicht ab (~0.5 mM). Nach der 1-minütigen Waschphase hatten Kontrollpurkinjezellen ihre initiale $[Cl^-]_i$ bereits wieder hergestellt. Der Anstieg von $[Cl^-]_i$ während der Ladephase war in Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc2 Tieren vergleichbar mit der Situation

in Kontrolltieren (~3 mM). Allerdings fiel auf, dass $[Cl^-]_i$ über die gesamte Ladephase anstieg, ohne ein Plateau zu erreichen. In der Erholungsphase wurde der Unterschied noch deutlicher. Purkinjezellen, denen Kcc2 fehlte, hatten die initiale $[Cl^-]_i$ erst nach 5 Minuten erreicht. Somit waren Kcc2-Knockoutzellen bezüglich des Chloridexports stark beeinträchtigt. Trotzdem ist zu bemerken, dass auch diese Zellen prinzipiell in der Lage waren, Chlorid gegen den elektrochemischen Gradienten zu exportieren.

3.1.4. Elektrophysiologische Untersuchung von GC- Δ Kcc2 Mäusen

Um die Rolle von Kcc2 in Körnerzellen des Cerebellums zu bestimmen, wurden ebenfalls akute, sagittale Gehirnschnitte mittels Patch clamp untersucht. Um in der Gramicidin Perforated-Patch Konfiguration einen guten Zugangswiderstand (<30 M Ω) zu erreichen, benötigt man entweder einen leicht perforierten, dafür aber großen Membranfleck (den Patch), oder einen kleineren Membranfleck, der wiederum stark perforiert ist. Körnerzellen sind jedoch, im Vergleich zu Purkinjezellen, sehr klein. Ihr durchschnittlicher Durchmesser liegt etwa bei 7 μ m. Dementsprechend sollten verwendete Patchpipetten ebenfalls einen kleinen Öffnungsdurchmesser haben. Es dauerte mit diesen kleinen Patchpipetten relativ lange, bis der Zugangswiderstand abnahm, und mit dieser Methode wurden keine Werte < 50 M Ω erreicht bevor die Zellen starben. Somit war diese Methode nicht geeignet, um für Körnerzellen E_{GABA} zu bestimmen.

Stattdessen wurden verschiedene Protokolle in der *Cell attached* Konfiguration benutzt, um $[Cl^-]_i$ von Körnerzellen aus GC- Δ Kcc2 Mäusen, sowie Kontrolltieren zu ermitteln.

3.1.4.1. Einzelkanalmessungen von GABA_ARs zur Bestimmung von DF_{GABA}

Statt E_{GABA} direkt zu messen, wie im Fall von Purkinjezellen, wurde für Körnerzellen zunächst die elektrochemische Triebkraft für GABAerge Ströme bestimmt. Als elektrochemische Triebkraft (DF, von *driving force*) bezeichnet man die Differenz zwischen Membranpotential und Gleichgewichtspotential einer Ionenspezies, also

$$DF_X = V_{Membran} - E_X$$

für eine Ionenart X. Die elektrochemische Triebkraft für Ströme über GABA_A-Rezeptoren wird im Folgenden DF_{GABA} genannt. Ein positiver Wert für DF_{GABA} bedeutet, das auf Öffnen eines GABA_A-Rezeptors zu einem Nettoauswärtsstrom von Chlorid führen würde, und die Zelle damit

depolarisiert. Ein negativer DF_{GABA} -Wert hingegen würde dazu führen, dass Chloridionen durch den $GABA_A$ -Rezeptor in die Zelle fließen und sie hyperpolarisieren.

Um DF_{GABA} in Körnerzellen zu bestimmen wurden Ströme über den $GABA_A$ -Rezeptor bei verschiedenen Potentialen von intakten Zellen gemessen.

In ca. 80% der gemessenen Patches aus sowohl $GC-\Delta Kcc2$ Mäusen, als auch Kontrollgeschwistertieren, wurden Einzelkanalströme beobachtet wenn sich GABA oder Muscimol in der Pipettenlösung befanden (Abb. 24). Die durchschnittliche Leitfähigkeit über alle gemessenen Potentiale (-80 bis +90 mV) lag bei beiden Genotypen bei ca. 18 pS. Die Leitfähigkeit der gemessenen Kanäle deutet auf extrasynaptische $GABA_A$ Rs hin, die ausschliesslich aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind. $GABA_A$ Rs, die ausserdem eine γ - oder δ -Untereinheit besitzen weisen normalerweise höhere Leitfähigkeiten (~28 pS) auf (Mortensen & Smart, 2006; Brickley *et al*, 1999).

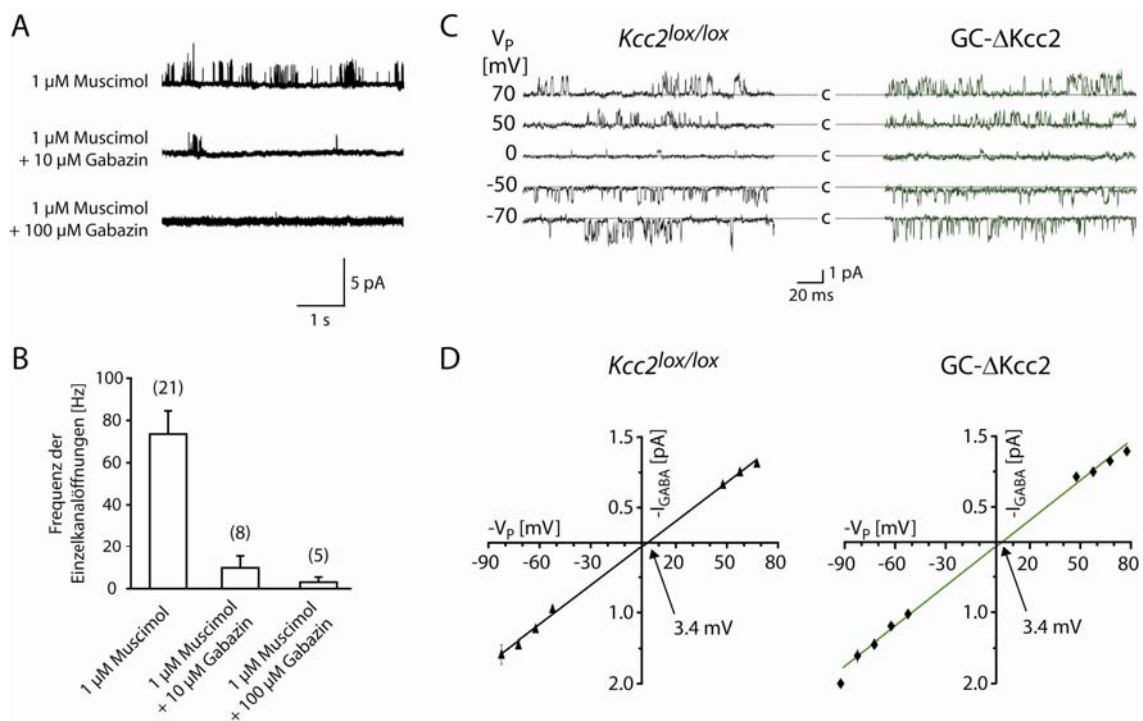


Abbildung 24 | Einzelkanalmessungen von $GABA_A$ Rs auf Körnerzellen.

(A) Einzelkanalöffnungen bei +80 mV Pipettenpotential mit verschiedenen Gabazin-Konzentrationen in der Patchpipette. (B) Die Frequenz der Einzelkanalöffnungen nimmt mit steigender Gabazin-Konzentration ab. n ist in Klammern über den Balken angegeben. Fehlerbalken zeigen SEM. (C) Typische Aufnahme einer $Kcc2^{lox/lox}$ und $GC-\Delta Kcc2$ Körnerzelle bei verschiedenen Pipettenpotentialen (V_p). (D) Strom-Spannungsdiagramm der Einzelkanalstromamplituden gegen V_p . DF_{GABA} wurde als Schnittpunkt der linearen Regression mit der X-Achse ermittelt.

Diese Ströme bei positiven wie negativen Potentialen waren auch dann zu beobachten, wenn die Pipettenlösung Natrium-frei war (eigene nicht gezeigte Daten). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Natriumströme handelt. Wenn zusätzlich zu Agonisten auch Antagonisten von GABA_A-Rezeptoren (Picrotoxin, Bicucullin, Gabazin oder Furosemid) in die Pipettenlösung integriert wurden, war die Frequenz der gemessenen Einzelkanalöffnungen stark reduziert. Zusammengenommen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um Ströme über GABA_A-Rezeptoren handelt.

Bei jeder gepatchten Zelle wurden nun mindestens sechs verschiedene Pipettenpotentiale zwischen -80 und +90 mV für je ~2 Minuten angelegt. Generell wurden für jede Zelle pro Pipettenpotential >200 Einzelkanalöffnungen ausgewertet. Die Amplituden der Einzelkanalströme bei einem Potential waren normalverteilt. Für jedes Potential wurde die mittlere Stromamplitude gegen die Pipettenspannung aufgetragen. Das Strom-Spannungsverhältnis war bei beiden Genotypen linear. Nach Regression ergab sich für Kcc2 Knockout-Körnerzellen ein DF_{GABA} von 3.4 mV (n=15), was sich nicht von dem Wert aus Kontrolltieren (3.4 mV, n=12) unterschied. Dies bedeutet, dass die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren in beiden Genotypen einen leicht depolarisierenden Chloridauswärtsstrom zur Folge hat. Wichtiger noch ist, dass die Deletion von Kcc2 in Körnerzellen keinen Einfluss auf die Magnitude von DF_{GABA} hat.

3.1.4.2. Die Bestimmung des Ruhemembranpotentials von Körnerzellen

Um das Membranpotential V_M von Körnerzellen mittels *Cell attached* Patch clamp zu messen wurde eine Methode verwendet, die sich auf spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (K_V Kanäle) stützt (Verheugen *et al*, 1999). In diesem Experiment liegt in der Patchpipette die gleiche K^+ -Konzentration, wie im Zytosol der Zelle vor. Daher liegt das Umkehrpotential für K^+ (E_{K^+}) über dem Patch bei 0 mV. Aus diesem Grund fließt genau dann kein Strom über K^+ -Kanäle, wenn das Pipettenpotential V_P dem Membranpotential der Zelle (V_M) entspricht, also die Potentialdifferenz über den Patch ebenfalls 0 mV ist.

Während bei Körnerzellen aus Kontrolltieren (P 30-62) ein durchschnittliches V_M von -90.6 ± 2.2 mV (n=22) gemessen wurde, war das Ruhemembranpotential von Körnerzellen aus ihren GC- Δ Kcc2 Geschwistertieren mit -75.6 ± 1.9 mV (n=39) deutlich depolarisierter (p<0.001) (Abb. 25).

Zusätzlich wurden Patch clamp Messungen in der Gramicidin Perforated-Patch Konfiguration durchgeführt (Abb. 25). Da für Körnerzellen Patchpipetten mit sehr kleiner Öffnung verwendet wurden, konnten Zugangswiderstände zwischen 40 - 100 M Ω erreicht werden. Durch diesen recht hohen Widerstand kann die Zelle im Voltage clamp nicht zuverlässig auf

verschiedene Potentiale geklemmt werden. Im Current clamp ($I=0$) Modus ist dies jedoch nicht so problematisch. Mit dieser Methode wurden die Werte von V_M aus den vorherigen Messungen für beide Genotypen bestätigt. Auch hier waren Körnerzellen aus GC- $\Delta Kcc2$ Mäusen im Vergleich zur Kontrolle deutlich depolarisiert. Des Weiteren zeigte sich auch hier, dass die Aktivierung der GABA_ARs durch Muscimol zu einer Depolarisation der Körnerzellen von sowohl GC- $\Delta Kcc2$, als auch den Kontrollgeschwistertieren führte. Das Ausmaß der GABAergen Depolarisation war in beiden Genotypen vergleichbar, so dass auch mit dieser Methode kein Unterschied im DF_{GABA} festgestellt wurde.

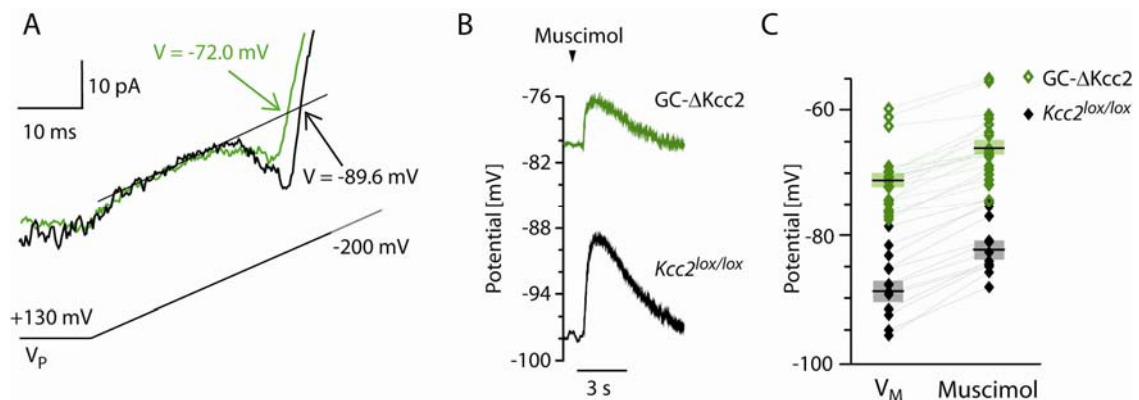


Abbildung 25 | Die Bestimmung des Ruhemembranpotentials von Körnerzellen.

(A) Cell attached Messung einer $Kcc2^{lox/lox}$ (schwarz) und GC- $\Delta Kcc2$ (grün) Körnerzelle. V_M wird aus dem Schnittpunkt des Kaliumstroms mit dem Leckstrom ermittelt. Unten: Spannungsprotokoll. (B) Current clamp Messung in der Perforated-Patch Konfiguration von einer $Kcc2^{lox/lox}$ (schwarz) und GC- $\Delta Kcc2$ (grün) Körnerzelle. Die Applikation von Muscimol (50 μ M, 30 ms) führt in beiden Fällen zur Depolarisation der Körnerzelle. (C) Zusammenfassung von V_M sowie dem Potential während der Muscimolapplikation (Muscimol) von $Kcc2^{lox/lox}$ (schwarz, $n=29$) und GC- $\Delta Kcc2$ (grün, $n=24$). Mittelwert und SEM werden durch eine Box mit schwarzem Balken dargestellt.

3.1.4.3. Cl⁻-Konzentration und Permeabilität beeinflussen das Ruhemembranpotential von Körnerzellen

Die Tatsache, dass in Körnerzellen eine erhöhte $[Cl^-]_i$ einen starken Einfluss auf V_M hat lässt darauf schliessen, dass die Zellmembran von Körnerzellen auch im Ruhezustand eine große Leitfähigkeit für Chlorid aufweist. Im Cerebellum sind Körnerzellen einer tonischen Inhibition durch ambientes GABA ausgesetzt (Brickley *et al*, 2001). Dieses könnte zum einen von Bergmanngliazellen kommen, die GABA über den Anionenkanal Bestrophin-1 abgeben (Lee *et al*, 2010b), zum anderen durch „Überschwappen“ aus GABAergen Synapsen von Golgizellen (Brickley *et al*, 1996; Diaz *et al*, 2011) innerhalb eines Glomerulus. Ausserdem exprimieren Körnerzellen spezielle GABA_A-Rezeptoren, die δ und $\alpha 6$ Untereinheiten beinhalten und dadurch

hochaffin gegenüber GABA sind, und zudem nicht desensibilisieren (Tia *et al*, 1996; Farrant & Nusser, 2005).

Aus diesem Grund wurde die Beteiligung von GABA_A-Rezeptoren am Ruhemembranpotential von Körnerzellen untersucht (Abb. 26). Dazu wurden die GABA_A-Rezeptoren blockiert, während V_M gemessen wurde. Die GABA_A-Rezeptorantagonisten Picrotoxin und Gabazin beeinflussten V_M von Kontrolltieren nicht signifikant (-93.5 ± 2.4 mV, $n=12$, $p=0.4$), doch in Körnerzellen aus GC- Δ Kcc2 Mäusen wurde V_M stark hyperpolarisiert (-87.9 ± 2.7 mV, $n=19$, $p<0.001$).

Neben GABA_A-Rezeptoren wurde auch die Anwesenheit von Glycinrezeptoren in Körnerzellen gezeigt (Kaneda *et al*, 1995). Wenn zusätzlich zu GABA_A-Rezeptoren auch Glycinrezeptoren durch Strychnin blockiert wurden, waren Körnerzellen aus Kontrolltieren zu einem V_M von -99.9 ± 0.7 mV ($n=9$) hyperpolarisiert, da die tonische Depolarisierung auch über diese ionotropen Rezeptoren unterbunden war. Kcc2^{-/-} Körnerzellen wurden zu ähnlichen Werten von $V_M = -96.4 \pm 1.5$ mV hyperpolarisiert (Kontrolle vs. Kcc2^{-/-}; $p>0.06$). Dass auch Kontrollkörnerzellen deutlich hyperpolarisiert waren, wenn GABA_A- und Glycinrezeptoren gleichzeitig blockiert wurden, bestätigt erstens, dass E_{Cl^-} selbst dann positiver als V_M ist, wenn Kcc2 vorhanden ist. Zweitens wurde gezeigt, dass GABA nicht deshalb depolarisierend auf Körnerzellen wirkt weil Kcc2 inaktiv wäre. Dass dies nicht der Fall ist, wird auch an dem stark depolarisierten V_M von Körnerzellen aus GC- Δ Kcc2 Mäusen deutlich.

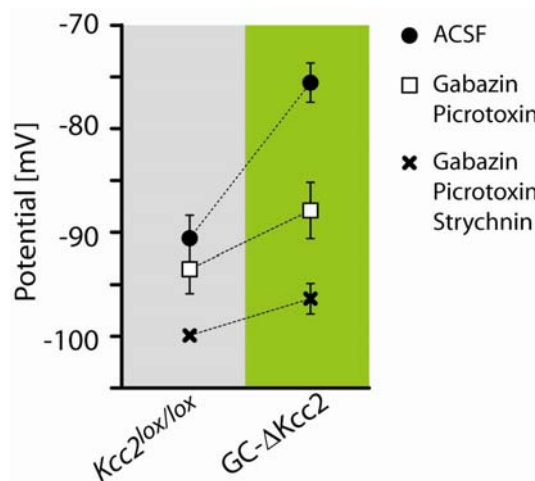


Abbildung 26 | Membranpotential von Körnerzellen während der Blockade von GABA_A- und Glycinrezeptoren.

Mittelwerte des Membranpotentials von Kcc2^{lox/lox} und GC- Δ Kcc2 Körnerzellen unter verschiedenen Bedingungen. Eingesetzte Konzentrationen: Gabazin und Picrotoxin: je 100 μ M, Strychnin: 1 μ M. Fehlerbalken: SEM.

3.1.4.4. Nkcc1 in adulten Körnerzellen

Die Tatsache, dass $[Cl^-]_i$ über der passiven Gleichgewichtskonzentration liegt, bedeutet, dass Körnerzellen aktiv mit Cl^- beladen werden. In unreifen Neuronen ist hauptsächlich Nkcc1 für den Import von Cl^- gegen den Gradienten verantwortlich. In den meisten Neuronen wird die Nkcc1-Expression jedoch mit fortschreitender Entwicklung und der Expression von Kcc2 herunterreguliert. Es wurde jedoch bereits beschrieben, dass cerebelläre Körnerzellen auch in adulten Nagern weiterhin ausgeprägte Nkcc1-Expression aufweisen (Mikawa *et al*, 2002). Um dies zu verifizieren, wurde *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen Nkcc1 auf sagittalen Schnitten des Cerebellums von adulten (9 Wochen) Kontrollmäusen durchgeführt. Hier zeigte sich ein robustes Signal in der Körnerzellschicht, während keine Nkcc1 Transkripte in Purkinjezellen detektiert wurden (Abb. 27). Als Positivkontrolle diente der *Plexus choroideus*, in dessen Zellen die Expression von Nkcc1 bekannt ist (Mikawa *et al*, 2002; Kanaka *et al*, 2001).

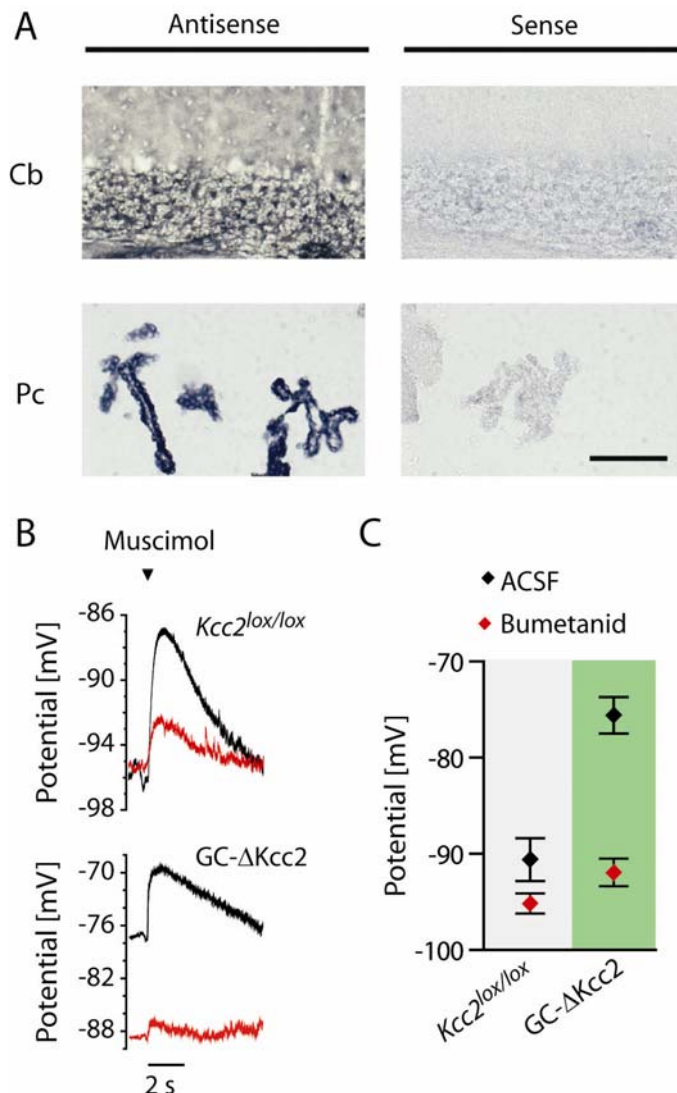


Abbildung 27 | Die Blockade von Nkcc1 führt zur Hyperpolarisation von Körnerzellen.

(A) *In situ* Hybridisierung von Nkcc1 mRNA (Exone 15-19) auf Sagittalschnitten des cerebellären Kortex (Cb) von adulten Wildtypmäusen. In Körnerzellen und dem *Plexus choroideus* (Pc) wurde nur mit der Antisense-Sonde ein robustes Signal detektiert. Maßstab: 100 μ m. (B) Current clamp Messung in der Perforated-Patch Konfiguration von einer Kcc2^{lox/lox} (links) und GC-ΔKcc2 (rechts) Körnerzelle. Badapplikation von Bumetanid (10 μ M, 2 Minuten, rot) führt in beiden Fällen zur Hyperpolarisation der Körnerzelle. Die Muscimol-induzierte Depolarisation war mit Bumetanid im Bad (rot) reduziert. (C) Bumetanid hyperpolarisiert V_M von GC-ΔKcc2 Körnerzellen auf Kontrollwerte (Kcc2^{lox/lox}). Mittelwert, SEM.

Um den Beitrag von Nkcc1 zur Chloridregulation in Körnerzellen elektrophysiologisch zu untersuchen, wurde V_M von GC- Δ Kcc2 Mäusen und ihren Kontrollgeschwistern in Anwesenheit von 10 μ m Bumetanid in der Badlösung gemessen. Bumetanid ist ein relativ spezifischer Antagonist der Nkccs, von denen nur Nkcc1 in Körnerzellen vorhanden ist. In hohen Konzentrationen kann Bumetanid auch einige Typen von GABA_A-Rezeptoren antagonisieren (Sung *et al*, 2000). Dies scheint jedoch mit der Zusammensetzung des Rezeptors aus verschiedenen Untereinheiten zusammen zu hängen, denn GABA_A-Rezeptoren cerebellärer Körnerzellen sind gegenüber Bumetanid insensitive (Hamann *et al*, 2002; Korpi *et al*, 1995; Korpi & Lüddens, 1997).

In GC- Δ Kcc2 Körnerzellen führte die Blockierung von Nkcc1 zu einer deutlichen Hyperpolarisierung (auf -91.9 ± 1.4 mV, n=26) von V_M (Abb. 27). Dieser Wert unterschied sich nicht von Kontrollzellen, deren V_M nur leicht negativer wurde (auf -95.1 ± 1 mV, n=26). Dies deutet darauf hin, dass $[Cl^-]_i$ bei Blockierung von Nkcc1 auch in Abwesenheit von Kcc2 abnimmt. Durch offene GABA_A-Rezeptoren kann es also zu einem Cl⁻-Ausstrom kommen, der dazu führt, dass $[Cl^-]_i$ sich der passiven Gleichgewichtskonzentration annähert. Dies führt dazu, dass das Ruhemembranpotential von K⁺-Strömen, und daher vom Gleichgewichtspotential von K⁺ (E_{K^+}) dominiert wird.

Auch die Antwort auf Muscimolapplikation war in beiden Genotypen um etwa 50% reduziert, wenn die Schnitte für 2 Minuten Bumetanid ausgesetzt waren (Kontrolle: von 7.2 mV auf 3.8 mV, n=3 und GC- Δ Kcc2 von 6.5 auf 3 mV, n=5).

3.1.4.5. Die Aktivierung von GABA_ARs führt zu Shunting Inhibition

GABAerge Inhibition von Golgizellen auf Körnerzellen ist in der Literatur gut belegt und beschrieben (Rossi *et al*, 2003; Hamann *et al*, 2002; Brickley *et al*, 1996). Allerdings gab es bereits Hinweise, dass nicht die Hyperpolarisation der Körnerzellen, sondern eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit (Shunting inhibition) zur Inhibition der Körnerzellen führt (Brickley *et al*, 1996).

Die leicht depolarisierende Antwort auf Muscimol löste weder in Kontroll- noch in GC- Δ Kcc2 Körnerzellen Aktionspotentiale aus. Die Injektion von depolarisierenden Strömen in der Perforated-Patch Konfiguration führte in beiden Genotypen zu Aktionspotentialen, sobald ein Membranpotential von ~ -50 mV erreicht wurde (Abb. 28). Im Einklang mit dem depolarisierten V_M von GC- Δ Kcc2 Körnerzellen war bei ihnen dafür eine kleinere Stromamplitude nötig als bei Kontrollzellen (Kontrolle: 33.6 ± 6 pA (n=7) und GC- Δ Kcc2: 16.4 ± 2 pA (n=9)). Bei simultaner Muscimolapplikation mussten bei beiden Genotypen höhere Stromamplituden injiziert werden,

um die Zelle auf ein Membranpotential von -50 mV zu depolarisieren und ein Aktionspotential auszulösen.

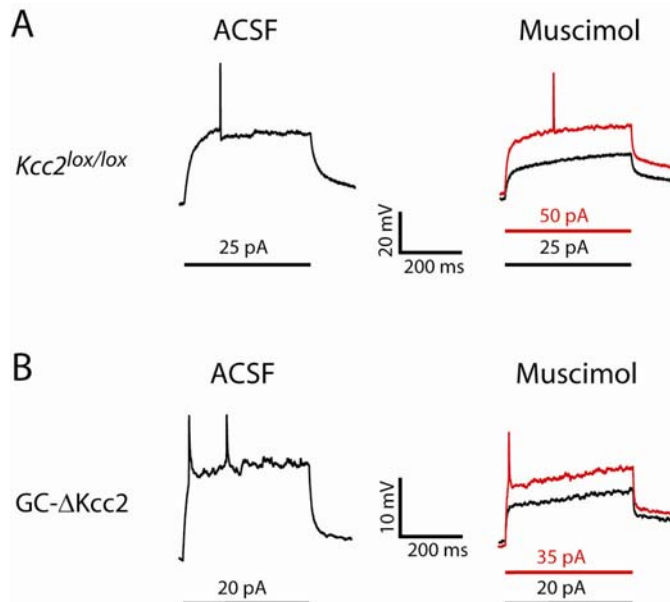


Abbildung 28 | Muscimol vermittelt eine Shunting Inhibition auf Körnerzellen.

Strominjektion in der Perforated-Patch Konfiguration (Zugangswiderstand $\sim 70 \text{ M}\Omega$) führt in (A) $Kcc2^{lox/lox}$ und (B) $GC-\Delta Kcc2$ Körnerzellen zu Aktionspotentialen (*links*). Wurde gleichzeitig Muscimol ($50 \mu\text{M}$) appliziert war bei beiden Genotypen eine höhere Stromamplitude nötig, um Aktionspotentiale auszulösen (*rechts*).

Dies zeigt, dass die Aktivierung von GABA_A -Rezeptoren tatsächlich zu einer Shunting Inhibition führt. Der Eingangswiderstand der Körnerzelle nimmt ab, was nach dem Ohm'schen Gesetz zur Folge hat, dass exzitatorische Ströme (EPSCs) „kurzgeschlossen“ werden, und daher eine kleinere Potentialänderung hervorrufen.

3.1.5. Auswirkungen des konditionalen $Kcc2$ -Knockouts auf das Netzwerk des Cerebellums

3.1.5.1. Spontane postsynaptische Ströme von Purkinjezellen in $GC-\Delta Kcc2$ Mäusen

Purkinjezellen sind der einzige „neuronale Ausgang“ aus der Kleinhirnrinde. Alle Informationen, die in den cerebellären Kortex gelangen, laufen durch das neuronale Netzwerk, und werden schliesslich in den Purkinjezellen integriert. Somit sind gerade diese Zellen von besonderem Interesse.

Purkinjezellen bekommen glutamatergen Input von Kletterfasern und Körnerzellen, sowie GABAerge Signale von verschiedenen Interneuronen. Über GABAerge Inhibition werden hier

vorwärtshemmende und negative Rückkopplungs-Schleifen gebildet, die wiederum die exzitatorischen Signale begrenzen.

Das depolarisierte V_M von GC- $\Delta Kcc2$ Körnerzellen legt nahe, dass sie erregbarer sind als Kontrollkörnerzellen. Dies würde in der Maus zu erhöhter synaptischer Transmission auf postsynaptische Neuronen, also Interneuronen und Purkinjezellen führen. Körnerzellen kontaktieren Purkinjezellen über glutamaterge Synapsen, d.h. Aktivität von Körnerzellen führt zu exzitatorischen postsynaptischen Strömen in Purkinjezellen, die sich als exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) messen lassen. Des Weiteren aktivieren Körnerzellen Interneurone der Molekularschicht, die wiederum GABAerge Synapsen auf Purkinjezellen bilden. Die Aktivierung dieser GABAergen Synapsen führt zu inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs) in Purkinjezellen.

Die Frequenz dieser spontanen EPSCs und IPSCs (sEPSCs und sIPSCs) zeigt, wieviel synaptische Transmission ein postsynaptisches Neuron erhält. Wenn nun Körnerzellen in diesem Netzwerk erregbarer sind, wird sich das in der Frequenz dieser Ereignisse widerspiegeln.

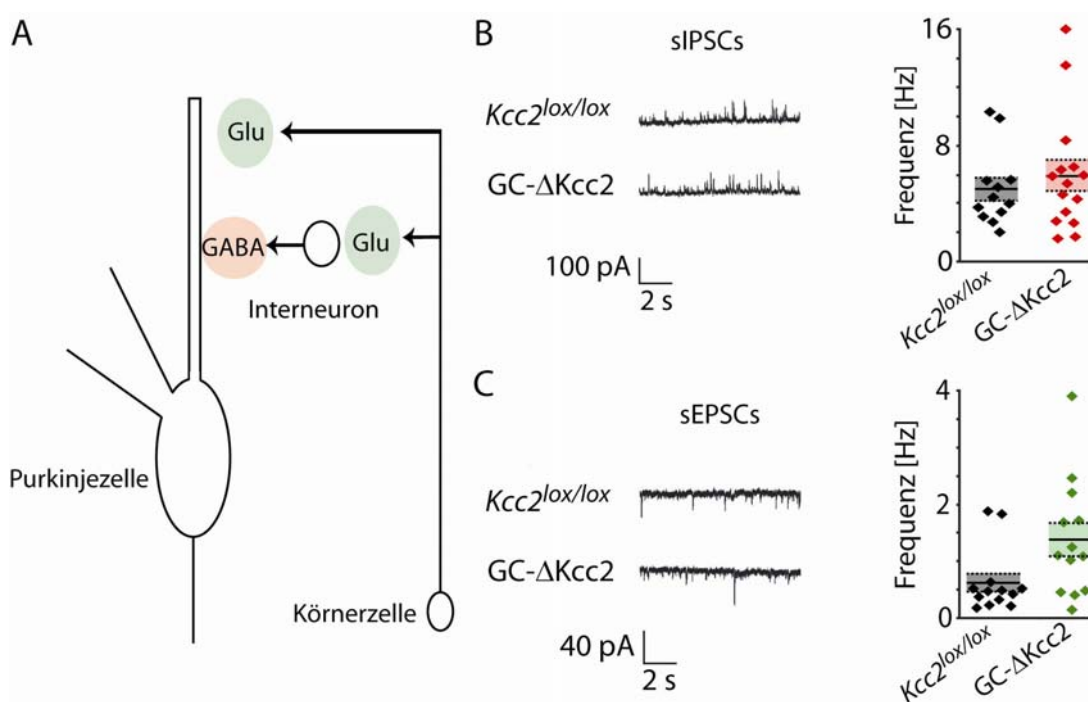


Abbildung 29 | Spontane postsynaptische Ströme von Purkinjezellen.

(A) Schematische Darstellung der Messkonfiguration (Ganzzelleableitung) und des neuronalen Netzwerkes. (B) Exemplarische Aufnahmen von sIPSCs und (C) sEPSCs von Purkinjezellen aus $Kcc2^{lox/lox}$ - und $GC-\Delta Kcc2$ -Mäusen (links), und ein Diagramm mit den zusammengefassten Frequenzen der gemessenen Ereignisse (rechts). Dargestellt sind die gemittelte Frequenz jeder einzelnen Zelle (Symbole), sowie Mittelwert aller Messungen (schwarzer Balken) und SEM (Box).

Um dies in Gehirnschnitten elektrophysiologisch zu untersuchen wurden Ganzzelleableitungen von Purkinjezellen gemacht (Abb. 29). Da es sich bei spontanen PSCs um Ereignisse handelt, die durch Aktionspotentiale des präsynaptischen Neurons verursacht werden, wurden keine Blocker wie z.B. Tetrodotoxin verwendet. Um EPSCs und IPSCs voneinander zu trennen wurde eine Pipettenlösung verwendet, mit der E_{Cl^-} bei ~ -74 mV lag. sEPSCs wurden bei einem Haltepotential von -75 mV gemessen, so dass die Triebkraft für Cl^- -Flux über die Membran bei Null lag. sIPSCs wurden bei $+20$ mV als Auswärtsströme aufgenommen.

Die Frequenz der sIPSCs beider Genotypen unterschied sich nicht voneinander (Kontrolle: 5.0 ± 0.8 Hz ($n=12$), GC- $\Delta Kcc2$: 5.9 ± 1.1 Hz ($n = 15$); $p = 0.5$). Dagegen war die Frequenz der sEPSCs von Purkinjezellen in GC- $\Delta Kcc2$ Mäusen, gegenüber Kontrollgeschwistertieren signifikant erhöht (Kontrolle: 0.62 ± 0.2 Hz ($n= 13$), GC- $\Delta Kcc2$: 1.4 ± 0.3 Hz ($n=13$); $p = 0.03$). Dies deutet darauf hin, dass Körnerzellen in GC- $\Delta Kcc2$ Mäusen höhere Aktivität aufweisen als in Kontrolltieren.

3.1.5.2. Spontanaktivität von Purkinjezellen

Ein Charakteristikum von Purkinjezellen ist ihre intrinsische Spontanaktivität (einfache Spikes). Die Frequenz variiert ungefähr zwischen 0-400 Hz (De Schutter & Steuber, 2009), wobei die durchschnittliche Aktionspotentialfrequenz bei 50 Hz liegt (Shin *et al*, 2007). Es wurde beobachtet, dass die Frequenzen innerhalb der Spikeabfolgen einer Purkinjezellen höchst variabel sind. Allgemein wird angenommen, dass Purkinjezellen Informationen, die den cerebellären Kortex verlassen, durch diese Spikeabfolgen kodieren (De Schutter & Steuber, 2009). Verschiedene Antagonisten von exzitatorischer und inhibitorischer synaptische Transmissionen lassen Spikeabfolgen regelmässiger werden, ohne dass die Frequenz stark beeinflusst wird (Kessler *et al*, 2008).

Zunächst wurde die Spontanaktivität der Purkinjezellen von adulten (>11 Wochen) PC- $\Delta Kcc2$ Mäusen und ihren Kontrollgeschwistertieren gemessen (Abb. 30). In PC- $\Delta Kcc2$ Mäusen ist die GABAerge Inhibition auf Purkinjezellen durch die verringerte elektrochemische Triebkraft für Chlorid beeinträchtigt. Es ergab sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die Regelmässigkeit und Frequenz der spontanen Spikes hat. Die durchschnittliche Frequenz war bei beiden Genotypen ähnlich (PC- $\Delta Kcc2$: 20.6 ± 1.2 Hz ($n=33$) vs. Kontrolle: 16.1 ± 1.2 Hz ($n=22$), $p=0.2$; t-Test). Die Spikes in PC- $\Delta Kcc2$ Mäusen waren jedoch signifikant regelmäßiger als die von Kontrollgeschwistertieren, was sich in einem niedrigeren Variationskoeffizienten der Interspikeintervalle (ISI CV) widerspiegelte (0.09 ± 0.01 ($n=33$) vs. 0.15 ± 0.02 ($n=24$), $p=0.01$; t-Test). Der ISI CV reflektiert die generelle Varianz von Interspikeintervallen über den gesamten gemessenen Zeitraum. Einige besonders lange oder kurze Pausen zwischen den Spikes können diesen Wert jedoch beträchtlich verfälschen. Deshalb wurde ausserdem der CV_2 -Wert, bei dem nur die Varianz von unmittelbar

benachbarten Interspikeintervallen verglichen wird, analysiert. Mit dem CV_2 -Wert wird die Regelmässigkeit von Spikes innerhalb kleiner Zeitintervalle erfasst.

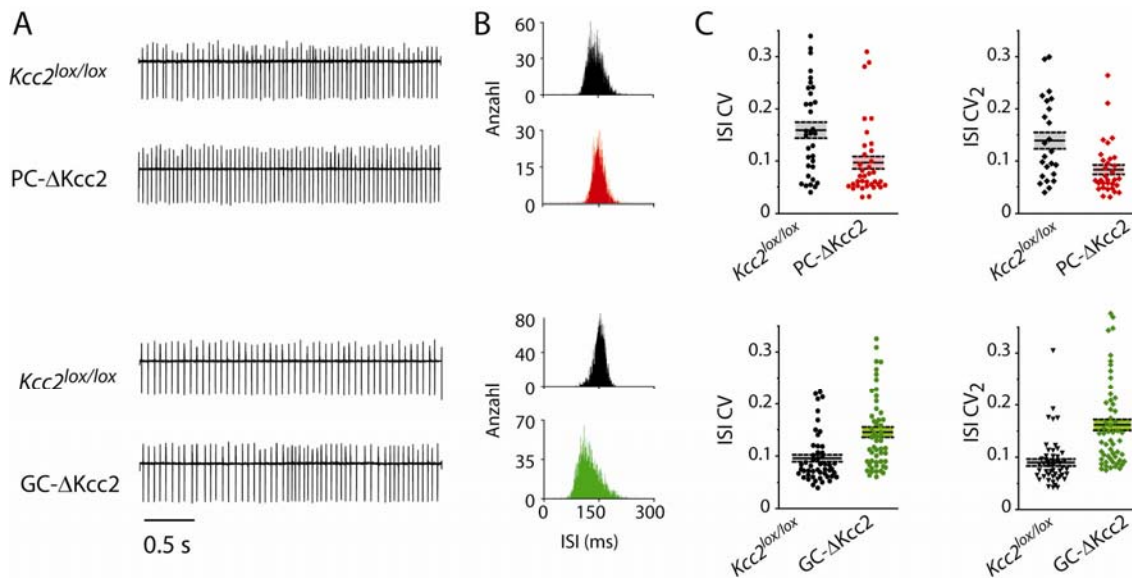


Abbildung 30 | Spontanaktivität von Purkinjellen in PC- Δ Kcc2- und GC- Δ Kcc2-Mäusen.

(A) Repräsentative Aufnahmen (links) von Purkinjellen aus PC- Δ Kcc2-Mäusen (oben) und GC- Δ Kcc2-Mäusen (unten) mit jeweiligen Kontrollgeschwistertieren ($Kcc2^{lox/lox}$). (B) Dazugehörige Histogramme der Interspikeintervalle. (C) Der Variationskoeffizient der Interspikeintervalle (ISI CV) und die ISI CV_2 -Werte von PC- Δ Kcc2-Mäusen ($n=36$, Mittelwert ISI CV = 0.097 ± 0.01 ; ISI $CV_2 = 0.083 \pm 0.01$), GC- Δ Kcc2 mice ($n=55$, 0.145 ± 0.01 ; 0.161 ± 0.01) und ihren jeweiligen Kontrollgeschwistertieren ($n=33$, 0.159 ± 0.02 ; 0.14 ± 0.02 und $n=50$, 0.096 ± 0.01 ; 0.089 ± 0.01). Das Diagramm zeigt Mittelwerte (schwarze Linien), SEM (Boxen) und individuelle Messungen.

Auch auf kleiner Zeitskala betrachtet war die Aktivität von PC- Δ Kcc2 Purkinjellen regelmässiger (CV_2 : 0.09 ± 0.01 ($n=33$) vs. 0.14 ± 0.02 ($n=24$), $p=0.04$; t-Test).

Wie bereits in Abschnitt 3.1.5.1 gezeigt, scheint die Aktivität von Körnerzellen in GC- Δ Kcc2 Mäusen erhöht zu sein. Dies führt dazu, dass Purkinjellen mehr glutamaterge Signale erhalten, was wiederum die Regelmässigkeit ihrer spontanen Aktivität modulieren könnte. In der Tat waren sowohl ISI CV, als auch ISI CV_2 von Purkinjellen in GC- Δ Kcc2 Mäusen signifikant erhöht (jeweils $p < 0.0001$). Die durchschnittlichen Frequenzen unterschieden sich jedoch nicht voneinander (GC- Δ Kcc2: 14.4 ± 1.2 Hz ($n=57$) vs. Kontrolle: 12.7 ± 1.2 Hz ($n=50$); $p=0.4$)

Die Unterschiede der ISI CV Werte von den Kontrollgruppen könnte am genetischen Hintergrund der Mäuse liegen. Aus diesem Grund wurden ausschließlich Geschwistertiere miteinander verglichen.

3.1.5.3. Vestibulo-okulärer Reflex

Adulte GC- Δ Kcc2 (n=8), PC- Δ Kcc2 (n=8) und PC;GC- Δ Kcc2 (n=10) Mäuse zeigten keine offensichtlichen Anzeichen für motorische Defizite. Um ihre motorische Leistungsfähigkeit genauer zu untersuchen, wurden kompensatorische Augenbewegungen während Rotationen untersucht, und mit denen von Kontrollgeschwistertieren (n=8) verglichen. Es wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 12-30 Wochen verwendet.

3.1.5.3.1. Funktionsprüfung der okulären Reflexe

Zunächst wurde der optokinetische Reflex (OKR) bei verschiedenen Frequenzen getestet (Abb. 31). Die Augenbewegungen von GC- Δ Kcc2 Mäuse unterschieden sich über alle Frequenzen weder in Amplitude (p=1) noch in Phase (p=0.85) von denen der Kontrollgeschwister. Dagegen war die Amplitude der Augenbewegung von PC- Δ Kcc2 und PC;GC- Δ Kcc2 Mäusen ab 0.4 Hz leicht reduziert (p=0.015 und p=0.035).

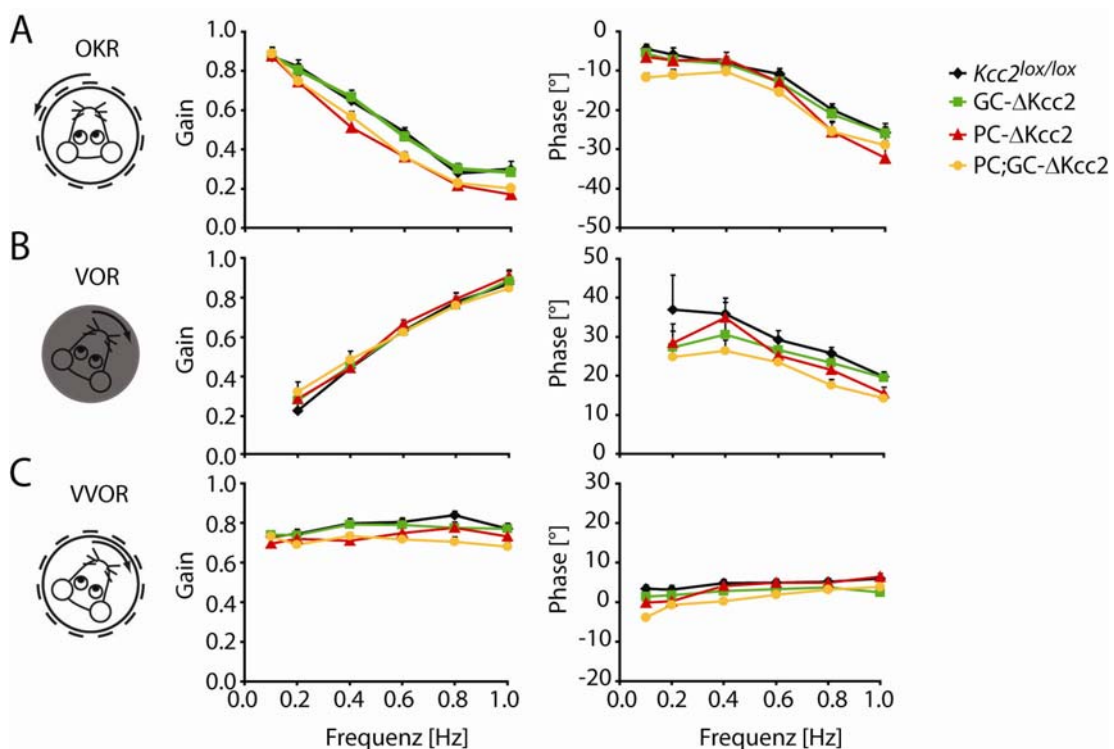


Abbildung 31 | Kompensatorische Augenbewegungen von Mäusen.

Adulte Kontrolltiere (n=8), GC- Δ Kcc2-Mäuse (n=8), PC- Δ Kcc2-Mäuse (n=8), und PC;GC- Δ Kcc2-Mäuse (n=10) erhielten (A) visuelle oder (B) vestibuläre Stimuli (Rotation) mit verschiedenen Frequenzen, bzw. (C) eine Kombination von Beidem. Dabei wurden die kompensatorischen Augenbewegungen aufgenommen. Gain (Verhältnis von Geschwindigkeit der Augen zur Stimulisgeschwindigkeit) und Phase (Abweichung in °) wurde gegen die Frequenz aufgetragen.

Beim vestibulo-okulären Reflex im Dunklen (VOR) sowie bei Licht (VVOR) unterschieden sich PC- Δ Kcc2 und GC- Δ Kcc2 Mäuse nicht von der Kontrollgruppe. In PC;GC- Δ Kcc2 Mäusen war jedoch bei OKR, VOR und VVOR eine signifikante Phasenverschiebung zu beobachten ($p=0.002$, 0.006 und 0.001).

3.1.5.3.2. Kurzfristige Adaption des vestibulo-okulären Reflexes

Nachdem der vestibulo-okuläre Reflex bei allen Mauslinien prinzipiell funktionierte, wurde untersucht, ob die Anpassung an veränderte Bedingungen gelernt und konsolidiert werden kann. Hierzu wurden das vestibuläre Signal (induziert durch Rotation der Maus) mit einem gleichzeitigen visuellen Fehlsignal (Rotation des visuellen Feldes) präsentiert (Abb. 32). Um scharf sehen zu können muss die reflexhafte Augenbewegung bei Rotation also dem neuen visuellen Signal angepasst (d.h. gelernt) werden. Dieses kurzfristige Lernen wurde im Anschluss an das Training überprüft, indem die Maus im Dunklen rotiert und gleichzeitig die Augenbewegung aufgenommen wurde.

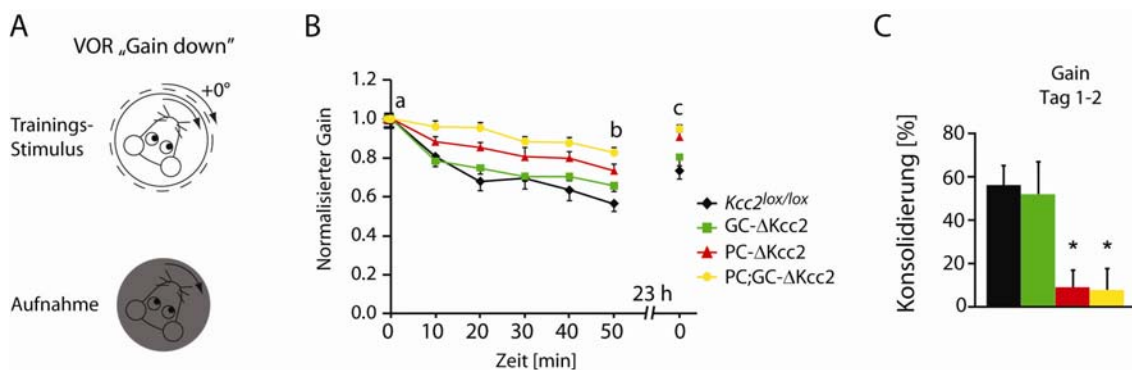


Abbildung 32 | Kurzfristige Anpassung des VOR durch „Gain down“-Training.

(A) Piktogramm der Messdurchführung. Die Rotation der Maus wurde mit einer parallelen Rotation des visuellen Feldes gepaart. Die Aufnahme des VOR erfolgte bei Dunkelheit ohne visuellen Stimulus. (B) Normalisierter Gain am ersten Tag des Trainings und am Anfang des nächsten Tages. (C) Darstellung der konsolidierten Gain-Anpassung von Tag 1 nach Tag 2 (von b bis c in (B)). Sowohl PC- Δ Kcc2-Mäuse, als auch PC;GC- Δ Kcc2-Mäuse konnten nur ca. 10% der Adaption über Nacht konsolidieren. Fehlerbalken: SEM.

Am ersten Tag wurden die Maus und das visuelle Feld „in Phase“ mit einer Frequenz von 0.6 Hz um 5° rotiert. Dieses „Gain-down“ Training bewirkt, dass die Augen bei Rotation keine Gegenbewegung mehr machen sollten, um das Bild stabil fixieren zu können. GC- Δ Kcc2 Mäuse waren im gleichen Ausmaß wie Kontrolltiere in der Lage, die Amplitude ihrer Augenbewegungen während des Trainings zu modifizieren. PC- Δ Kcc2 und PC;GC- Δ Kcc2 Mäuse konnten die Augenbewegung zwar auch den neuen Bedingungen anpassen, doch sie taten dies deutlich

weniger gut als Kontrolltiere. Und auch die Konsolidierung über Nacht war bei ihnen stark beeinträchtigt, während GC- Δ Kcc2 Mäuse wie Kontrolltiere abschnitten.

3.1.5.3.3. Langzeitadaption des vestibulo-okulären Reflexes

Um die zeitliche Koordination der Augenbewegungen (Phase) auf langfristige Adaption zu untersuchen wurde Phasen-Umkehr-Training des VOR über 5 Tage durchgeführt (Abb. 33). Am ersten Tag dieses Experiments wird das oben beschriebene „Gain down“ Training mit Rotationen um 5° bei 0.6 Hz durchgeführt. Am nächsten Tag wird die Maus wieder um 5° rotiert, während das visuelle Feld sich gleichzeitig um 7.5° , bzw. an den Tagen 3-5 um 10° , dreht. Durch dieses Training lernt die Maus, die Augen bei Rotation nicht mehr in die Gegenrichtung, sondern gleichgerichtet zu bewegen. Zunächst muss also die Amplitude der Augenbewegung adaptiert, und schließlich die Phase langfristig angepasst werden.

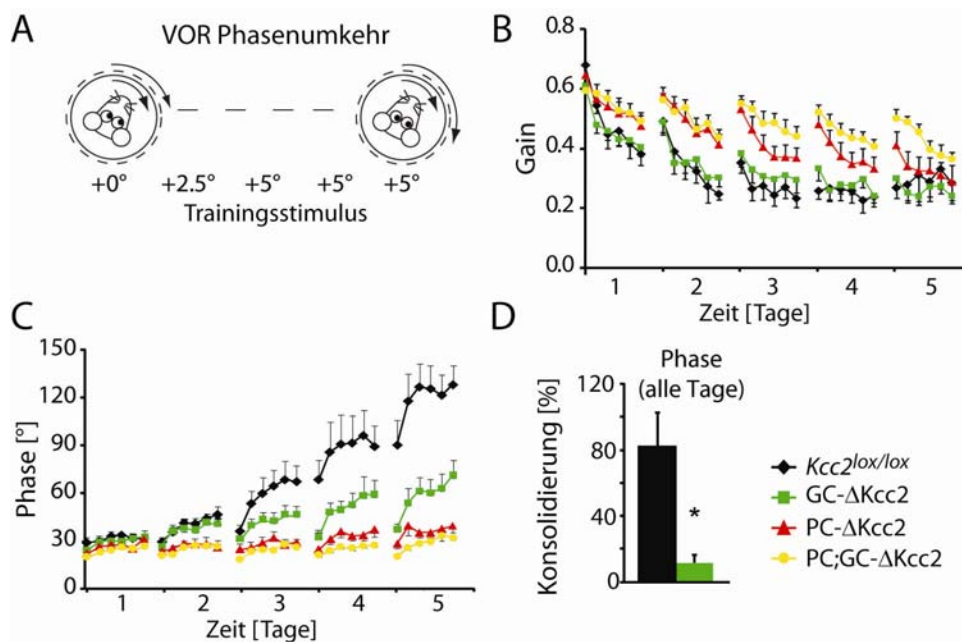


Abbildung 33 | Phasenumkehr des VOR.

(A) Schema des Lernstimulus. (B) Gain während der fünf Tage der Phasenumkehr-Adaption. (C) Phase (Abweichung der Augenbewegung vom Stimulus in $^\circ$), im Anschluss an die Trainingseinheiten gemessen. Während PC- Δ Kcc2- und PC;GC- Δ Kcc2-Mäuse die Phase der Augenbewegung nicht umkehren konnten, waren GC- Δ Kcc2-Mäuse dazu durchaus, vergleichbar mit Kontrolltieren, in der Lage. Doch diese Adaption wurde nicht über Nacht konsolidiert. (D) Quantifizierung der Konsolidierung der Phasenumkehr von GC- Δ Kcc2-Mäusen und Kontrollgeschwistern ($Kcc2^{lox/lox}$), gemittelt über Tag 2-5.

Wie schon im vorhergegangenen Experiment konnten PC- Δ Kcc2 und PC;GC- Δ Kcc2 Mäuse zwar an jedem Tag die Amplitude der Augenbewegungen modulieren, doch diese Anpassung

wurde kaum über Nacht konsolidiert. Entsprechend konnten sie auch die zeitliche Abstimmung der Augenbewegungen nicht den neuen Bedingungen anpassen.

GC- Δ Kcc2 Mäuse konnten die Amplitude der Augenbewegungen, genau wie Kontrollmäuse, an jedem Tag anpassen. Diese Adaption wurde auch über Nacht, im gleichen Ausmaß wie bei Kontrolltieren, konsolidiert. Was jedoch ab dem 3. Tag auffiel, war, dass die Phasenumkehr in GC- Δ Kcc2 Mäusen stark beeinträchtigt war. GC- Δ Kcc2 Mäuse konnten ihre VOR Phase zwar während des Trainings an jedem Tag signifikant modifizieren, doch das Erlernete wurde über Nacht kaum (z.B. von Tag 3 auf Tag 4 : 6%) konsolidiert, so dass sie am nächsten Tag wieder vorne beginnen mussten. Kontrolltiere konnten die erlernte Phasenumkehr über Nacht konsolidieren (z.B. von Tag 3 auf Tag 4 : 94%), und im Training am nächsten Tag auf dem bereits Gelernten aufbauen.

3.2. Kalium-Chlorid-Kotransporter 3

3.2.1. Konditionaler Knockout von Kcc3 in Purkinjellen

Auch für Kcc3 wurde eine Beteiligung an neuronaler Chloridhomeostase beschrieben (Boettger *et al*, 2003). Es stellte sich die Frage, ob die leicht hyperpolarisierende GABA-Antwort von Purkinjellen in PC- Δ Kcc2 Mäusen auf Kcc3-vermittelte Chloridextrusion zurückzuführen ist. Immunhistochemische Färbungen des Cerebellums zeigten Kcc3 Expression in der weißen Substanz sowie in Purkinjellen (Pearson *et al*, 2001). Da konstitutive Kcc3 Knockoutmäuse progressive Neurodegeneration des zentralen und peripheren Nervensystems aufwiesen, wurden in unserem Labor „geflochte“ Kcc3-Mäuse generiert, bei denen die Exone 5-6 von loxP Sequenzen flankiert sind ($Kcc3^{lox/lox}$) (Abb. 34A).

Die Generierung der $Kcc3^{lox/lox}$ Maus wurde von Dr. York Rudhard durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde durch Verpaarung der $Kcc3^{lox/lox}$ Mäuse mit L7-Cre- bzw. $\alpha 6$ -Cre-Mäusen, sowie $Kcc2^{lox/lox}$ Mäusen die Deletion von Kcc3/Kcc2 in cerebellären Purkinjellen (PC- Δ Kcc3, bzw. PC- Δ (Kcc2;Kcc3), bzw. Körnerzellen (GC- Δ Kcc3) herbeigeführt (Aller *et al*, 2003; Barski *et al*, 2000). Dieser zellspezifische Kcc3-Knockout wurde zunächst durch *in situ* Hybridisierung verifiziert. Anschliessend wurden dessen Auswirkungen auf [Cl⁻]_i elektrophysiologisch analysiert. Die Mauslinien wurden in gemischtem genetischen Hintergrund gehalten.

3.2.2. Verifizierung des zellspezifischen Knockouts von *Kcc3*

Die Einführung von loxP Sequenzen hatte keine Veränderung der *Kcc3* Proteinexpression zur Folge (Abb. 34B). Durch Cre-vermittelte Rekombination der loxP Sequenzen kommt es zu einer Leserasterverschiebung und einem Stop-Kodon in Exon 7, was wiederum zum Abbruch der Proteintranslation noch vor der ersten Transmembrandomäne führt. Wie im Western Blot zu sehen ist, führte die Verpaarung mit Cre-Deleter-Mäusen zu einer vollständigen Deletion von *Kcc3* Protein in der Membranfraktion.

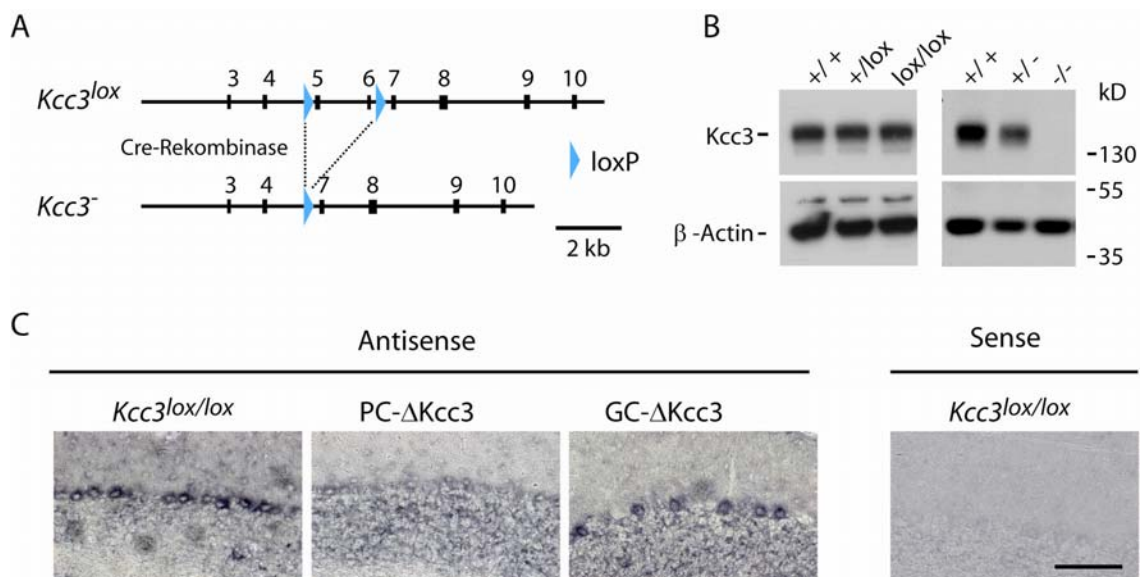


Abbildung 34 | Konditioneller Knockout von *Kcc3* in Purkinjezellen des Cerebellums.

(A) Genstruktur des „gefloxten“ *Kcc3*-Allels *Kcc3^{lox}*. Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination zwischen den loxP-Sequenzen führt zur Exzision des fünften und sechsten Exons. Zusätzlich entsteht durch eine Verschiebung des Leserasters ein Stopkodon. (B) Die Western Blot Analyse von einer Membranpräparation (adultes Gehirn) zeigt, dass *Kcc3^{lox/lox}*-Mäuse Wildtyp-Level von *Kcc3* exprimieren (*links*). Die Verpaarung der *Kcc3^{lox/lox}*-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen führt zu einem konstitutiven Knockout von *Kcc3* (*rechts*) (C) *In situ* Hybridisierung von *Kcc3* mRNA auf Sagittalschnitten des Cerebellums von adulten *Kcc3^{lox/lox}*-, PC- Δ *Kcc3*- und GC- Δ *Kcc3*-Mäusen. Mit der Antisense-Sonde wurde ein deutliches Signal in Purkinjezellen detektiert. In Körnerzellen wurde keine *Kcc3* mRNA nachgewiesen. Maßstab: 100 μ m.

Um die zellspezifische Deletion von *Kcc3* zu untersuchen wurden *Kcc3*-Transkripte mittels *in situ* Hybridisierung detektiert (Abb. 34C). Hierzu wurde eine Digoxigenin-UTP-markierte Riboprobe gegen die Nukleotide 146-1056 muriner *Kcc3* cDNA verwendet. In sagittalen Cerebellum-Schnitten von Kontrolltieren (*Kcc3^{lox/lox}*) zeigten nur Purkinjezellen ein robustes Signal für *Kcc3* Transkripte. In Purkinjezellen von adulten PC- Δ *Kcc3* Mäusen wurde hingegen keine *Kcc3* mRNA detektiert. In Körnerzellen wurde keine *Kcc3* Expression auf mRNA Ebene festgestellt.

3.2.3. Ruhemembranpotential im Purkinjezellen und GABAerge Ströme

Analog zu den Messungen von Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc2 Mäusen wurden V_M und E_{GABA} in PC- Δ Kcc3 Mäusen in der Gramicidin Perforated-Patch Konfiguration bestimmt. Die Deletion von Kcc3 hatte keinen Einfluss auf V_M von Purkinjezellen (PC- Δ Kcc3: -61.3 ± 1.3 mV (n=11) vs. Kontrolle: -61.0 ± 1.7 mV (n=15); p = 0.9).

Boettger et al beschrieben eine leicht erhöhte $[Cl^-]_i$ in Purkinjezellen von 12-14 Tage alten Kcc3 Knockoutmäusen (Boettger *et al*, 2003). In Purkinjezellen aus älteren Mäusen (P 28-43) konnte ich keine Beteiligung von Kcc3 an der Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration feststellen. E_{GABA} von Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc3 Mäusen unterschied sich mit -90.0 ± 2.2 mV (n=11) nicht von Kontrolltieren (-91.1 ± 1.6 mV (n=11); p=0.9) (Abb. 35A).

Die Beteiligung von Kcc3 war auch nicht durch Kcc2 „maskiert“, wie Messungen an Purkinjezellen von PC- Δ (Kcc2;Kcc3) Mäusen zeigten (Abb. 35A). Während sich V_M von PC- Δ (Kcc2;Kcc3) ($V_M = -58.1 \pm 1$ mV, n = 14) nicht von Kontrolltieren ($V_M = -60.5 \pm 2$ mV, n = 7; p = 0.3) unterschied, war ihr E_{GABA} deutlich depolarisierter (-77.9 ± 2.6 mV (n = 20) vs. -90.4 ± 1.3 mV (n = 7); p <0.001). Dieser Wert unterschied sich nicht vom ermittelten E_{GABA} von PC- Δ Kcc2 Mäusen (-77.9 ± 3 mV, n = 13). Allerdings war das Ruhemembranpotential von Purkinjezellen aus Tieren der PC- Δ (Kcc2;Kcc3) Linie, im Vergleich mit Mäusen der PC- Δ Kcc2 Linie, leicht depolarisiert. Da dies auch bei Kontrollmäusen der Fall war, liegt es wahrscheinlich an den unterschiedlichen genetischen Hintergründen der Linien.

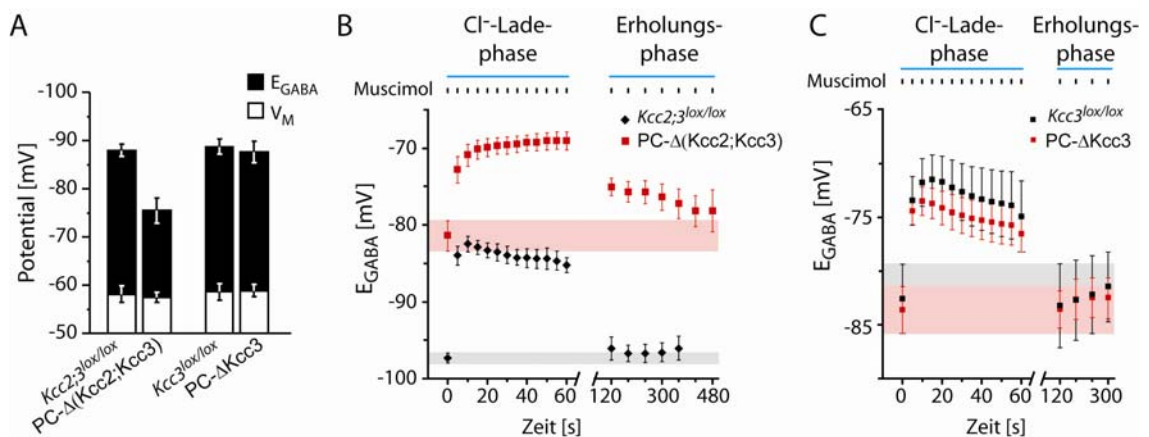


Abbildung 35 | Kcc3 ist nicht an der Regulation von $[Cl^-]_i$ von adulten Purkinjezellen beteiligt.

(A) Zusammenstellung von E_{GABA} und V_M von Purkinjezellen aus PC- Δ (Kcc2;Kcc3)- und PC- Δ Kcc3-Mäusen, gemessen in der Perforated-Patch Konfiguration. Fehlerbalken: SEM. (B) E_{GABA} während des Chloridextrusionsexperimentes von PC- Δ (Kcc2;Kcc3)-Mäusen und (C) PC- Δ Kcc3-Mäusen.

3.2.4. Die Beteiligung von Kcc3 an Chloridextrusion nach akuter Erhöhung von $[Cl^-]_i$

In den vorhergehenden Messungen von E_{GABA} wurde nur der der Ruhezustand des Neurons gemessen. Während intensiver synaptischer Transmission kann es jedoch zu transienter und lokaler Erhöhung von $[Cl^-]_i$ kommen. In Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc2 Mäusen war der Cl^- Export stark beeinträchtigt, jedoch nicht vollkommen unterbunden. Um herauszufinden, ob Kcc3 während akut erhöhtem $[Cl^-]_i$ an der Cl^- Extrusion beteiligt ist wurden Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc3 und PC- Δ (Kcc2;Kcc3) Mäusen in der Perforated-Patch Konfiguration mit Cl^- beladen und die Rückkehr zum initialen E_{GABA} gemessen (Abb. 35B-C).

Purkinjezellen aus PC- Δ Kcc3 Mäusen unterschieden sich weder im initialen E_{GABA} , noch während Lade- und Erholungs-Phase von ihren Kontrollgeschwistern (an jedem Messpunkt $p > 0.4$, $n= 8$ und 5).

Ein möglicher Einfluss von Kcc3 auf E_{GABA} während und nach akuter Cl^- -Beladung wurde auch in Abwesenheit von Kcc2 nicht festgestellt. Purkinjezellen aus PC- Δ (Kcc2;Kcc3) Mäusen unterschieden sich über die ganze Messung nicht von PC- Δ Kcc2 Purkinjezellen.

Somit wurde gezeigt, dass Kcc3 keinen Einfluss auf E_{GABA} von Purkinjezellen aus über 25 Tage alten Mäusen hat.

4. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war, die Funktion GABAerger Inhibition auf ausgesuchte Populationen von cerebellären Neuronen zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte die elektrochemische Triebkraft von Chlorid, dem Hauption GABAerger Ströme, in diesen Neuronen gezielt reduziert werden. Dies verhindert die Hyperpolarisations-vermittelte Inhibition über GABA_A-Rezeptoren und Glycinrezeptoren.

Um die intraneuronale Chloridkonzentration zu erhöhen wurde der neuronale Kalium-Chlorid-Kotransporter Kcc2 in Purkinje- und Körnerzellen deletiert. In dieser Arbeit wurden die Folgen dieser Manipulation auf zellulärer Ebene, sowie auf bestimmte Aspekte des motorischen Lernens untersucht.

4.1. Kcc2 und Synapsenmaturation im Cerebellum

Kcc2 lokalisiert in der Plasmamembran des Somas, doch ein besonders starkes Immunofluoreszenzsignal wurde auch im Dendritenbaum, sowie in dendritischen Spines detektiert. Auf diesen Spines befinden sich jedoch hauptsächlich glutamaterge Synapsen, für deren Funktion der Chloridgradient keine besondere Rolle spielt. Neben der gut dokumentierten Ionentransportfunktion wurde beschrieben, dass Kcc2 auch eine strukturelle Rolle in Neuronen ausübt (Li *et al*, 2007). Der C-Terminus von Kcc2 interagiert direkt mit dem neuron-spezifischen Protein 4.1 N. Dieses Protein besitzt eine Spektrin/Aktin-Interaktionsdomäne, und vermittelt so vermutlich eine indirekte Interaktion zwischen Kcc2 und dem Zytoskelett. Für eine solche Interaktion sind verschiedene Funktionen denkbar. Zum Beispiel kann die Lokalisation und Stabilität von Kcc2 auf diese Art reguliert werden (Chamma *et al*, 2012). Andererseits kann Kcc2 aber auch an der korrekten Architektur des Aktin-Zytoskeletts, sowie die Verteilung anderer Membranproteine beteiligt sein (Gauvain *et al*, 2011; Li *et al*, 2007). Verfrühte Expression von Kcc2 führt, unabhängig von der Ionentransportfunktion, zu Defekten in neuronaler Differenzierung und Migration (Horn *et al*, 2010). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Dichte der dendritischen Spines stark zunimmt, wenn Kcc2 in embryonalen Neuronen überexprimiert wird (Fiumelli *et al*, 2012). Wird hingegen die Expression von Kcc2 in Neuronen unterdrückt, führt dies zu abnormal langen dendritischen Spines (Li *et al*, 2007), bzw. zu einer veränderten Lokalisation von AMPA-Rezeptoren an glutamatergen Synapsen (Gauvain *et al*, 2011). All diese Effekte scheinen aus der Interaktion mit dem Zytoskelett zu resultieren.

Auch im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Purkinjezellen und Körnerzellen war das in den immunohistochemischen Untersuchungen detektierte Kcc2-Signal in den Dendriten

besonders ausgeprägt. Grobe strukturelle Veränderungen durch beeinträchtigte Migration und Proliferation waren in den hier untersuchten Mausmodellen nicht zu erwarten. Die Deletion von *Kcc2* fand postnatal, und auch nach Einsetzen der endogenen *Kcc2*-Expression und Synaptogenese statt. Erwartungsgemäß war der makroskopische Aufbau des Cerebellums in den hier beschriebenen, konditionalen *Kcc2*-Knockoutmäusen unauffällig.

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Studien wurden hier jedoch auch keine Abnormalitäten in den glutamatergen Synapsen gefunden. Alle immunohistochemischen Färbungen, sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gaben keine Hinweise auf morphologische Veränderungen. Die postnatale Deletion von *Kcc2* in Körner- und Purkinjezellen hatte keine Auswirkung auf die Anzahl von GABAergen und glutamatergen Synapsen, oder die Morphologie der dendritischen Spines. Auch in den elektrophysiologischen Messungen gab es keine Hinweise auf eine reduzierte oder erhöhte Anzahl von funktionellen Synapsen. Gauvain et al beschrieben, dass die Deletion von *Kcc2* nach Etablierung der glutamatergen Synapsen (28 Tage *in vitro*) nicht die Anzahl und Morphologie der dendritischen Spines beeinflusst. Stattdessen sei jedoch die Anzahl und Lokalisierung der AMPA-Rezeptoren an den Synapsen verändert, da *Kcc2* deren laterale Diffusion verhindert (Gauvain et al, 2011). Dies ließ sich in den hier durchgeführten Immunofluoreszenzfärbungen schwer überprüfen. Allerdings sollte ein reduzierter AMPA-Rezeptorgehalt in den mEPSC-Messungen nachweisbar sein. Die Amplituden der mEPSCs von Purkinjezellen aus PC- Δ *Kcc2* Mäusen waren jedoch nicht reduziert, was gegen diese Hypothese spricht.

Die oben diskutierten Studien fanden an Neuronen des Kortex und des Hippocampus statt, während in dieser Arbeit Purkinjezellen im Cerebellum untersucht wurden. Ein wichtiger Unterschied ist auch, dass die vorher beschriebenen Studien in Zellkultur stattfanden. Offensichtlich macht es auch einen großen Unterschied, ob die Expression von *Kcc2* nach zwei oder vier Wochen *in vitro* unterdrückt wird. Während die eine Studie abnormal lange dendritische Spines und eine reduzierte Anzahl glutamaterger Synapsen beschreibt, war in der anderen Studie nur die Lokalisation der AMPA-Rezeptoren verändert.

Es bleibt somit unklar, ob die in anderen Studien beschriebenen Effekte nur *in vitro* auftreten, oder sie spezifisch für bestimmte Neuronen bzw. den Zeitpunkt der Deletion sind.

4.2. *Kcc2* ist der dominierende Cl⁻-Extruder von Purkinje- und Körnerzellen

Die Intention der Arbeit war, durch die Deletion von *Kcc2* GABAerge Inhibition in den untersuchten Neuronen zu unterbinden.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist GABA im adulten Gehirn der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter. Während der frühen neuronalen Entwicklung hingegen ist GABA depolarisierend und wirkt exzitatorisch auf Neuronen des zentralen Nervensystems. Die intraneuronale Chloridkonzentration ist ein entscheidender Faktor für die Frage, ob GABA exzitatorischer oder inhibitorisch auf ein Neuron wirkt. Die zytosolische Chloridkonzentration sinkt von ~20 mM in unreifen Neuronen auf ~2-7 mM in adulten Neuronen (Ben-ari *et al*, 2007). Zeitlich parallel dazu erhöht sich die Expression von Kcc2 in zentralen Neuronen (Ludwig *et al*, 2011; Rivera *et al*, 1999; Stein *et al*, 2004). Während Nkcc1 bei der Einstellung der hohen Chloridkonzentration junger Neuronen involviert ist, besteht daher Konsens, dass der neuronale Kcc2 für die Absenkung von $[Cl^-]_i$ in adulten Neuronen essentiell ist (Rivera *et al*, 1999; Stein *et al*, 2004; Hübner *et al*, 2001b). Zwar wurde beschrieben, dass auch Kcc3 und ClC-2 die neuronale $[Cl^-]_i$ absenken, doch bisher sind die Belege dafür nicht überzeugend (Boettger *et al*, 2003; Rinke *et al*, 2010). Wenn ClC-2 in Hinterwurzelganglienneuronen überexprimiert wird resultiert dies zwar in einer deutlichen Verschiebung von E_{Cl^-} , doch da ClC-2 ein Ionenkanal ist handelt es sich um eine passive Äquilibration mit dem Membranpotential (Staley *et al*, 1996).

In dieser Arbeit wurde etabliert, dass in adulten cerebellären Purkinjezellen und Körnerzellen Kcc2 der wichtigste Chloridexporter ist, während Kcc3 an der $[Cl^-]_i$ -Regulation von Purkinjezellen nicht beteiligt ist.

4.2.1. Kcc2 senkt $[Cl^-]_i$ von Purkinjezellen

In cerebellären Purkinjezellen ist die Expression von Kcc2 schon embryonal (E 15) detektierbar (Takayama & Inoue, 2007). Allerdings bedeutet die Präsenz von Kcc2 noch nicht, dass auch Ionentransport stattfinden kann. Es wird vermutet, dass Kcc2 in vielen embryonalen Neuronen inaktiv ist. Die funktionelle Aktivierung wird offensichtlich über die Lokalisation, Oligomerisierung und der Phosphorylierungsstatus von Kcc2 reguliert. Monomere sind schon zu frühen Entwicklungsstadien in der Plasmamembran von Neuronen des ZNS vorhanden, doch sie scheinen kein Chlorid zu transportieren. Mit fortschreitender Entwicklung, und parallel zum Absenken von $[Cl^-]_i$, werden vermehrt Homo-Oligomere, die aktive Form von Kcc2, gebildet (Blaesse *et al*, 2006).

Die Aktivität von Kcc2 korreliert auch mit dem Phosphorylierungsstatus von einigen Aminosäuren. So sind z.B. die carboxyterminalen Threonine T906 und T1006 neonatal (P 0) phosphoryliert, wohingegen sie im adulten Tier (P 20) nicht phosphoryliert sind. In Kcc3 sind die dazu homologen Stellen an der Regulation der Ionentransportaktivität beteiligt (Rinehart *et al*, 2009). Im Falle von Kcc2 könnten diese beiden Threonine also eine Rolle in der Inaktivierung von

Kcc2 in jungen pre- und postnatalen Neuronen spielen (Rinehart *et al*, 2011). Zu diesem Zeitpunkt scheint Kcc2 eine ausschließlich strukturelle Rolle zu erfüllen, und GABA wirkt noch exzitatorisch.

Es gibt weitere phosphorylierbare Positionen in Kcc2, deren Zustand jedoch nicht mit der Entwicklung korreliert ist. Sie scheinen eher für die kurzfristige Modulation der Kcc2-Aktivität wichtig zu sein. Die Phosphorylierung von Serin S940 steigert die Aktivität von Kcc2. Zusätzlich erhöht dies die Stabilität von Kcc2 in der Membran, indem die Internalisierung inhibiert wird (Lee *et al*, 2007). Wenn jedoch die Tyrosine Y903 und Y1087 phosphoryliert sind hat das den gegenteiligen Effekt. Die Plasmamembranlokalisation von Kcc2 nimmt in diesem Fall ab, da lysosomale Degradation gesteigert wird (Lee *et al*, 2010a). Diese Form der Modulation kommt nach intensiver neuronaler Aktivität, wie z.B. bei Epilepsie, vor.

Insgesamt kann man vom alleinigen Vorhandensein von Kcc2 also noch nicht auf eine niedrige neuronale $[Cl^-]_i$ schließen. In Purkinjezellen aus Ratten findet der Übergang von depolarisierendem zu hyperpolarisierendem GABA am Ende der ersten postnatalen Woche statt (Eilers *et al*, 2001). Bei Purkinjezellen von Mäusen lag E_{GABA} in der zweiten postnatalen Woche (P 10) bei ca. -70 mV (eigene nicht gezeigte Daten). Dies ist also leicht hyperpolarisierend, aber noch deutlich positiver als der hier ermittelte Wert von adulten Purkinjezellen ($E_{GABA} = -94$ mV). Insgesamt scheint der zeitliche Verlauf der Verminderung von $[Cl^-]_i$ in Purkinjezellen ähnlich bei Ratte und Maus.

Mit den Immunfluoreszenzfärbungen habe ich bei P 17 in etwa 70% der Purkinjezellen Kcc2 detektiert, so dass die E_{GABA} Werte bei in diesem Alter vermutlich noch stark zwischen den Neuronen variieren. Ab P 25 jedoch exprimierten alle Purkinjezellen Kcc2, und konsistent damit war E_{GABA} deutlich negativer als das Ruhemembranpotential. Überraschenderweise führte die Deletion von Kcc2 jedoch nicht dazu, dass sich $[Cl^-]_i$ von Purkinjezellen auf das passive Gleichgewicht einstellte. Das von mir gemessene E_{GABA} war zwar deutlich positiver als bei Kontrolltieren, jedoch negativer als das Ruhemembranpotential, so dass die Aktivierung von $GABA_A$ Rs die Purkinjezellen immer noch deutlich hyperpolarisierte. Somit muss es einen anderen Mechanismus geben, der Chlorid entgegen seinem elektrochemischen Gradienten aus der Zelle heraus transportiert. Der wahrscheinlichste Kandidat war Kcc3, denn Purkinjezellen exprimieren auch diesen Kalium-Chlorid-Kotransporter. Mit *in situ* Hybridisierungen gegen die mRNA von Kcc3 habe ich ein robustes Signal in adulten Purkinjezellen, jedoch nicht in Körnerzellen detektiert. In Purkinjezellen aus adulten PC- Δ Kcc3 Mäusen waren dagegen keine Kcc3-Transkripte nachzuweisen. Da für Immunfluoreszenzfärbungen kein zuverlässiger Antikörper verfügbar war, konnte die Expression und Lokalisation jedoch nicht auf Proteinebene verifiziert werden. Es wurde beschrieben, dass Kcc3 in Purkinjezellen von jungen Mäusen (P 12-14), also einem Alter in dem die Kcc2-Expression noch nicht voll etabliert ist, an der Chloridextrusion beteiligt ist (Boettger *et al*,

2003). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit kein Hinweis auf die Beteiligung von Kcc3 an der $[Cl^-]_i$ -Regulation in adulten Purkinjezellen ($>P 25$) gefunden. Weder im Ruhezustand, noch nach akuter Chloridbelastung schien Kcc3 die $[Cl^-]_i$ von Purkinjezellen zu beeinflussen. Im Unterschied zu Boettger et al. wurden in dieser Arbeit konditionelle Kcc3-Knockoutmäuse untersucht, die älter als P 25 waren. In diesem Alter ist Kcc2 der wichtigste Chloridextruder von Purkinjezellen, welcher wiederum den von Kcc3 vermittelten Ionentransport überdecken könnte. Doch auch in Abwesenheit von Kcc2 konnte ich keine Beteiligung von Kcc3 an der Einstellung von $[Cl^-]_i$ messen. Vielleicht ist Kcc3 in Purkinjezellen dieses Alters nur unter bestimmten Umständen, wie hypotonischem Stress, aktiv. Es wurde gezeigt, dass dieser Transporter, im Gegensatz zu Kcc2, durch Zellschwellung aktiviert wird und an der Volumenregulation von Neuronen und Epithelzellen beteiligt ist (Boettger et al, 2003; Mercado et al, 2005). Daher könnte sein, dass Kcc3 unter den hier gewählten Bedingungen kaum aktiv ist. Ausserdem konnte ich die subzelluläre Lokalisation von Kcc3 nicht überprüfen. Es ist denkbar, dass Kcc3 in diesem Alter nicht mehr in der Plasmamembran des Somas vorkommt. In dieser Arbeit wurden jedoch alle Messungen am Soma der Purkinjezellen vorgenommen. Da aber in Neuronen große Unterschiede in $[Cl^-]_i$ zwischen z.B. Soma und distalem Dendritenbaum vorliegen können ist eine Rolle von Kcc3 beim Absenken von $[Cl^-]_i$ unter Ruhebedingungen nicht grundsätzlich auszuschließen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen aber deutlich, dass Kcc3 nicht für die hyperpolarisierende GABA-Antwort in PC- Δ Kcc2 Purkinjezellen verantwortlich ist.

Somit kann in dieser Arbeit nicht abschliessend erklärt werden, warum $[Cl^-]_i$ in Purkinjezellen auch dann noch unter der passiven Gleichgewichtskonzentration liegt, wenn Kcc2 fehlt. Der hyperpolarisationsaktivierte Chloridkanal CIC-2 spielt eine geringfügige Rolle in der Chloridäquilibration nach akuter erhöhter $[Cl^-]_i$ in hippocampalen Pyramidenzellen (Rinke et al, 2010). In adulten Purkinjezellen wird dieser Ionenkanal ebenfalls exprimiert (Mladinić et al, 1999). Allerdings ist der Ionenflux durch einen Kanal passiv, so dass E_{Cl^-} nur mit dem Membranpotential äquilibriert werden kann. Um ein E_{GABA} zu erreichen, welches negativer ist als das Ruhemembranpotential muss aktiver Chloridtransport entgegen dem elektrochemischen Gradienten stattfinden. Es kann also durchaus sein, dass CIC-2 an der Chloridextrusion nach der Cl^- -Beladung von Purkinjezellen beteiligt ist. Doch die hier gemessene Wiedereinstellung des hyperpolarisierten E_{GABA} kann nicht durch CIC-2 erklärt werden.

Im Gegensatz zu CIC-2 ist der Na^+ -gekoppelte Cl^-/HCO_3^- -Austauscher Ncbe (*Slc4a10*) ein wahrscheinlicherer Kandidat für den unbekanntenen Chloridexporter in Purkinjezellen (Wang et al, 2000; Jacobs et al, 2008). Ncbe (für Na^+ -driven chloride/bicarbonate exchanger) transportiert Na^+ und HCO_3^- , im Austausch gegen Cl^- und H^+ , in die Zelle hinein und spielt damit eine wichtige Rolle in der Alkalinisierung des Zytoplasmas. Hier findet also ein Export von Chlorid statt, dessen

Antriebskraft der einwärtsgerichtete Gradient von Natrium ist. Adulte Purkinjezellen weisen eine robuste Expression von Ncbe auf. Somit kann es durchaus sein, dass Ncbe, in Abwesenheit von Kcc2, der Transporter ist, der $[Cl^-]_i$ von Purkinjezellen absenkt, so dass E_{GABA} damit weiter hyperpolarisierend ist. Dies könnte auch erklären, warum PC- Δ Kcc2 Purkinjezellen nach akuter Beladung mit Chlorid in der Lage waren, innerhalb von fünf Minuten zu ihrer initialen $[Cl^-]_i$ zurück zu kehren. Dies dauerte zwar relativ lange, doch insgesamt war der Chloridexport entgegen des elektrochemischen Gradienten möglich. Um diese Frage zu klären müsste man Kcc2 und Ncbe gleichzeitig in Purkinjezellen deletieren. Die Exporteffizienz von Kcc2 ist so hoch, dass andere Transporter, die zur Regulation von $[Cl^-]_i$ beitragen, verdeckt würden. Die Deletion von Ncbe geht bei Mäusen mit einer hohen Letalität einher, so dass auch hier ein zellspezifischer Knockout angedacht wäre (Jacobs *et al*, 2008). Allerdings darf man nicht vernachlässigen, dass Ncbe eine wichtige Funktion in der neuronalen pH-Regulation hat, was wiederum die Interpretation von Messergebnissen erschweren könnte.

4.2.2. $[Cl^-]_i$ beeinflusst das Membranpotential von Körnerzellen

In den ersten drei postnatalen Wochen proliferieren Körnerzellvorläufer in der äusseren Körnerzellschicht und migrieren an den Fortsätzen der Bergmannglia entlang durch die Molekularschicht in die innere Körnerzellschicht (Burgoyne & Cambray-Deakin, 1988). Die Maturation der Synapsen beginnt, sobald die Körnerzellschicht erreicht ist (Nakanishi & Okazawa, 2006). Während der Proliferation und Migration weisen Körnerzellen eine hohe Expression von Nkcc1 auf, während Kcc2 Transkripte nicht detektierbar sind. Sobald sie in der Körnerzellschicht angekommen sind, exprimieren sie jedoch neben Nkcc1 auch Kcc2 (Mikawa *et al*, 2002).

In den Parallelfasern, also den Axonen der Körnerzellen, wurde Kcc2 mittels Immunofluoreszenzfärbungen in dieser Arbeit nicht detektiert. Pugh und Jahr zeigten, dass die Aktivierung von axonalen GABA_A-Rezeptoren bei Körnerzellen zu einer Depolarisation führt, die sogar Aktionspotentialen auslösen kann (Pugh & Jahr, 2011). In der Plasmamembran des Somas und der Dendriten hingegen habe ich ein starkes Immunofluoreszenzsignal für Kcc2 detektiert. Die Inhibition von Körnerzellen durch Golgizellen des Cerebellums ist in der Literatur gut belegt (Santhakumar *et al*, 2006; Crowley *et al*, 2009; D'Angelo, 2008). Bisherige elektrophysiologische Untersuchungen wurden jedoch meist in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt, so dass man bisher von einer Inhibition durch Hyperpolarisation ausging. In dieser Arbeit war es daher umso überraschender, dass Körnerzellen durch Applikation von GABA auf das Soma leicht depolarisierten. Unerwartet war auch, dass die Triebkraft der GABAergen Ströme in GC- Δ Kcc2 Körnerzellen, im Vergleich zu Kontrolltieren, unverändert war. Die leichte Depolarisierung bei

Applikation von GABA vermittelte jedoch in beiden Mauslinien Inhibition durch Shunting, also durch eine erhöhte Leitfähigkeit der Membran.

Die GABAerge Depolarisation war in allen gemessenen Körnerzellen zu gering um die Aktionspotentialschwelle zu erreichen. Der Grund hierfür lag in dem sehr negativen Ruhemembranpotential der Körnerzellen. Die meisten Studien, die Körnerzellen elektrophysiologisch untersuchen, führen Ganzzelleableitungen durch, und berichten von Ruhemembranpotentialen um -60 mV (Armano *et al*, 2000; Hamann *et al*, 2002; D'Angelo *et al*, 1995). Das Volumen dieser Zellen ist jedoch sehr klein, so dass das Zytosol sehr schnell mit der Pipettenlösung dialysiert wird. Das Ruhemembranpotential einer Zelle hängt von Ionenkonzentration und Permeabilität der Membran ab. Ganzzellmessungen können, je nach Zusammensetzung der Pipettenlösung, beide Parameter beeinflussen. Es kann schließlich nicht ausgeschlossen werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit verschiedener Kanäle durch die Ein- oder Auswaschen von Ionen und anderen Biomolekülen verändert wird. Um derartige Probleme zu vermeiden eignen sich daher nicht- oder minimalinvasive elektrophysiologische Methoden. In anderen Studien wurde die Gramicidin Perforated-Patch Konfiguration verwendet, um Körnerzellen von Ratten zu analysieren (Watkins & Mathie, 1996; Brickley *et al*, 1996). Sie berichteten, dass das Ruhemembranpotential von Körnerzellen innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen negativer wird. Bei P 21 waren ähnlich negative Werte, wie sie in dieser Arbeit bei Mäusen > P 25 gemessen wurden, erreicht (Brickley *et al*, 1996). Wir haben die Ergebnisse aus den Perforated-Patch Experimenten schließlich noch mit nichtinvasiven *Cell attached* Messungen verifiziert.

Bisher wurde angenommen, dass K^+ Leckströme für das hyperpolarisierte Membranpotential im Bereich von E_K^+ verantwortlich sind (Watkins & Mathie, 1996; Aller *et al*, 2005). Tandemporenkaliumkanäle (K_2P), von denen sechs Isoformen robust in cerebellären Körnerzellen exprimiert werden, vermitteln diese K^+ -Ströme (Yoo *et al*, 2009; Mathie *et al*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass auch Chloridströme bei dem hyperpolarisierten Membranpotential von Körnerzellen eine entscheidende Rolle spielen. Tonische $GABA_A$ R-Ströme in cerebellären Körnerzellen sind in der Literatur gut belegt (Kaneda *et al*, 1995; Brickley *et al*, 1996; Hamann *et al*, 2002). Körnerzellen exprimieren sechs bis neun verschiedene $GABA_A$ R-Untereinheiten, doch die tonische Inhibition wird von den ausschließlich extrasynaptischen $\alpha 6\beta\delta$ - $GABA_A$ Rs vermittelt (Brickley & Mody, 2012). Die δ -Untereinheit kommt nur in Rezeptoren vor, die auch $\alpha 6$ -Untereinheiten enthalten. Die Deletion von $\alpha 6$ führt zum vollständigen Verlust von δ -Untereinheiten sowie der tonischen Inhibition (Jones *et al*, 1997; Nusser *et al*, 1999). Aufgrund der konstitutiven Aktivität dieser $GABA_A$ Rs ist es nicht verwunderlich, dass auch Chloridströme am Ruhemembranpotential von cerebellären Körnerzellen beteiligt sind.

Der Zusammenhang zwischen V_M und Chlorid wurde in dieser Arbeit mithilfe der GC- Δ Kcc2 Mäusen aufgeklärt. Die Deletion von Kcc2 führte zu einer erhöhten $[Cl^-]_i$, und als Folge davon zu einem deutlich depolarisierten Ruhemembranpotential. Sowohl die Blockade von GABA_ARs, als auch das Absenken von $[Cl^-]_i$ durch Blockade von Nkcc1 führte dazu, dass V_M von GC- Δ Kcc2 Körnerzellen hyperpolarisierte. Auch Glycinrezeptoren scheinen einen kleinen Anteil des tonischen Chloridstroms zu vermitteln. Die Anwesenheit von Glycinrezeptoren in der Membran von Körnerzellen wurde bereits beschrieben (Kaneda *et al*, 1995). Für Glycin wurde ebenfalls eine nicht-synaptische Freisetzung aus Bergmannglia beschrieben (Huang *et al*, 2004). Des Weiteren verwenden ~65% der Golgizellen sowohl GABA als auch Glycin als Neurotransmitter (Simat *et al*, 2007). In meinen Messungen scheint der glycinerge Anteil des tonischen Chloridstroms neben dem GABAergen Strom insgesamt jedoch recht klein zu sein. Trotz allem wurde hier gezeigt, dass tonische Ströme über GABA_A-Rezeptoren und Glycinrezeptoren zum Ruhemembranpotential von Körnerzellen beitragen, und ihre Erregbarkeit wirksam kontrollieren.

4.3. Signaltransduktion im cerebellären Kortex

4.3.1. Eine erhöhte neuronale $[Cl^-]_i$ hat verschiedene Konsequenzen für Purkinjezellen und Körnerzellen

Die Vorwärtshemmung von Interneuronen der Molekularschicht auf Purkinjezellen moduliert die Signalintegration in Purkinjezellen. Exzitatorische Signale können nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters aufsummiert werden. Dies versetzt Purkinjezellen in die Lage, die Koinzidenz verschiedener Parallelfasersynapsen zu erkennen und diese Information weiter zu geben (Mittmann *et al*, 2005). Dieses System funktioniert nur in Anwesenheit von GABAerger Inhibition durch Interneuronen.

In Purkinjezellen führte die Deletion von Kcc2 zu einer dramatischen Reduktion der GABAergen Hyperpolarisation. Es ist wahrscheinlich, dass die leichte GABAerge Hyperpolarisation in PC- Δ Kcc2 Purkinjezellen, zusammen mit einer Abnahme des Membranwiderstandes, funktionelle Inhibition durch Shunting bewirken kann. Nach intensiver, repetitiver GABA_A-Rezeptor-Aktivierung, also bei intensiver neuronaler Aktivität, kann es jedoch zu einer Beladung eines Neurons mit Chlorid kommen (Jin *et al*, 2005). PC- Δ Kcc2 Purkinjezellen haben ein ausgeprägtes Defizit in der Chloridextrusion. Daher ist vorstellbar, dass die GABAerge Transmission in bestimmten Situationen nicht mehr inhibierend wirkt. Dafür spricht auch, dass der PC- Δ Kcc2 Phänotyp dem der PC- Δ γ 2-Maus, in welcher GABA_ARs spezifisch von Purkinjezellen deletiert wurden, sehr ähnlich ist. In der PC- Δ γ 2-Maus ist die GABAerge Transmission auf diese Neuronen vollständig unterbunden (Wulff *et al*, 2009).

In Körnerzellen führte die Deletion von *Kcc2* zu einer Erhöhung von $[Cl^-]_i$, wodurch V_M konstitutiv depolarisiert war. Unverändert hingegen war die elektrochemische Triebkraft der GABAergen Ströme, sowie die dadurch vermittelte Shunting Inhibition. Somit wurde die GABAerge Inhibition auf Körnerzellen in GC- $\Delta Kcc2$ Mäusen zwar nicht unterbunden, doch die Erregbarkeit der Körnerzellen selbst war erhöht. Interessanterweise führt hochfrequente Moosfaseraktivierung ebenfalls zur Potenzierung der intrinsischen Erregbarkeit von Körnerzellen (Armano *et al*, 2000). Das depolarisierte Membranpotential der Körnerzellen hat zur Folge, dass zum Auslösen eines Aktionspotentials weniger glutamaterge Transmission nötig ist. Eine weitere denkbare Konsequenz wäre, dass der Mg^{2+} -Block der NMDA-Rezeptoren durch das depolarisierte Membranpotential teilweise aufgehoben ist. Körnerzellen besitzen NMDA-Rezeptoren, die schon ab -60 mV beträchtliche Ströme vermitteln und deren Sensitivität gegenüber Mg^{2+} relativ gering ist (Monyer *et al*, 1994; D'Angelo *et al*, 1995). Ca^{2+} -Einstrom über NMDA-Rezeptoren ist mit der Langzeitpotenzierung (LTP) von Synapsen assoziiert. Wenn eine Postsynapse depolarisiert, entfernt dies den Mg^{2+} -Block von NMDA-Rezeptoren, so dass diese durch Bindung von Glutamat aktiviert werden können. NMDA-Rezeptoren haben eine hohe Ca^{2+} -Permeabilität. So kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom und der Aktivierung intrazellulärer Ca^{2+} -abhängiger Prozesse. Im Fall der Langzeitpotenzierung von Moosfaser-Körnerzellsynapsen wird z.B. die Wahrscheinlichkeit der Transmittervesikel-Freisetzung erhöht (Sola *et al*, 2004) (D'Angelo *et al*, 1999). Ist dieser Prozess an ausgewählten Synapsen gestört kann es zu sehr spezifischen Ausfallerscheinungen kommen. Die Deletion der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2A verhindert Langzeitpotenzierung der Moosfaser-Körnerzellsynapse vollständig. Interessanterweise haben diese Mäuse den selben Phänotyp, wie die hier untersuchten GC- $\Delta Kcc2$ -Mäuse. In beiden Mauslinien war selektiv die Konsolidierung des Phasenumkehrlernens beeinträchtigt, während andere Lernformen des Vestibulo-okulären Reflexes nicht betroffen waren (Andreescu *et al*, 2011).

Im Fall der GC- $\Delta Kcc2$ Körnerzellen ist es daher gut vorstellbar, dass ebenfalls die Langzeitpotenzierung der Moosfaser-Körnerzellsynapsen verändert ist. Da die Inhibition durch Golgizellen nicht beeinträchtigt war, ist wahrscheinlich das konstant depolarisierte Membranpotential der Körnerzellen für diesen Effekt verantwortlich.

4.3.2. Die Auswirkungen der zellspezifischen Deletion von *Kcc2* auf das neuronale Netzwerk des Cerebellums

Purkinjellen sind der einzige neuronale Ausgang aus dem cerebellären Kortex. Sämtliche Informationen die im cerebellären Kortex prozessiert wurden sind in ihrem Aktivitätsmuster kodiert. Purkinjellen weisen eine intrinsische Spontanaktivität mit Frequenzen bis zu 400 Hz auf

(De Schutter & Steuber, 2009). Synaptische Transmission hat keinen Einfluss auf die Frequenz dieser Spikeabfolgen. Stattdessen wird alleine die Regelmässigkeit der Aktionspotentiale durch die Aktivität GABAerger und glutamaterger Synapsen moduliert (Kessler *et al*, 2008). Dies wurde anhand von chemischer Blockade bzw. Deletion der GABA_A-Rezeptoren von Purkinjezellen demonstriert (Häusser & Clark, 1997; Wulff *et al*, 2009).

Die Vorwärtshemmung durch Interneuronen der Molekularschicht beeinflusst so also das Spikemuster von Purkinjezellen. In den in dieser Arbeit untersuchten PC- Δ Kcc2-Mäusen ist die Stärke dieser Inhibition jedoch drastisch reduziert. Dementsprechend waren die Spikes der Purkinjezellen signifikant regelmässiger als in Kontrollgeschwistertieren. Der Effekt war vergleichbar mit dem der PC- Δ γ 2-Maus, auch wenn die Zunahme der Regelmässigkeit weniger ausgeprägt war (Wulff *et al*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Spontanaktivität von Purkinjezellen ausschließlich in akuten Gehirnschnitten gemessen. Die Situation im sich bewegenden Tier kann sich davon sehr unterscheiden, da der cerebelläre Kortex in der Maus ständig Informationen über das Moosfasersystem erhält. Vergleicht man die Regelmässigkeit der spontanen Purkinjezellaktivität zwischen *in vitro* und *in vivo* gibt es deutliche Unterschiede. *In vivo* sind die Spikeabfolgen sehr viel unregelmässiger und korrelieren zudem mit den präsentierten Stimuli (Wulff *et al*, 2009). Dass die Effekte auf Verhaltensebene zwischen PC- Δ γ 2-Mäusen und den in dieser Arbeit untersuchten PC- Δ Kcc2-Mäusen vergleichbar war, weist darauf hin, dass die GABAerge Inhibition durch Deletion von *Kcc2 in vivo* praktisch unterbunden ist.

Die Regelmässigkeit der spontanen Aktivität von Purkinjezellen wird nicht nur von GABAerger Transmission moduliert. Die Blockade von Glutamaterezeptoren lässt die Spikeabfolgen ebenfalls regelmässiger werden (Kessler *et al*, 2008). In GC- Δ Kcc2-Mäusen ist die Neurotransmission auf Purkinjezellen wegen der neuronalen Verknüpfungen gleich zweifach betroffen. Zum einen ist zu erwarten, dass die depolarisierten Körnerzellen aktiver sind, und daher mehr glutamaterge Transmission die Purkinjezellen erreicht. Des Weiteren aktivieren Körnerzellen auch die Interneuronen der Molekularschicht. Diese sind zwar spontan aktiv, doch es ist vorstellbar, dass sie durch die Körnerzellen in GC- Δ Kcc2-Mäusen stärker erregt werden. Dies hätte zur Folge, dass die GABAerge Transmission auf Purkinjezellen hier ebenfalls erhöht ist. Die Frequenz der spontanen IPSCs war in GC- Δ Kcc2-Mäusen zwar nicht signifikant verändert, doch es zeigte sich eine Tendenz zu höheren Frequenzen.

Bemerkenswerterweise war die Spontanaktivität von Purkinjezellen aus GC- Δ Kcc2-Mäusen tatsächlich unregelmässiger. Ein ähnlicher Effekt ist zu beobachten, wenn man die Aktivität von AMPA-Rezeptoren pharmakologisch erhöht (Kessler *et al*, 2008). Auch in der *tottering* Maus wurden unregelmässige Spikemuster, allerdings begleitet von einer höheren Spikefrequenz, von Purkinjezellen beschrieben (Hoebeek *et al*, 2005; De Zeeuw *et al*, 2011). Diese Mäuse haben durch

eine Punktmutation in einem spannungsgesteuerten Calciumkanal, der auch in cerebellären Purkinjezellen und Körnerzellen robust exprimiert wird, neben Epilepsie auch eine ausgeprägte Ataxie (Saito *et al*, 2009). Es wurde beschrieben, dass die GABAerge Inhibition auf Purkinjezellen in *tottering* Mäusen länger anhält und damit stärker ist als in Kontrolltieren (Zhou *et al*, 2003). Somit kann es durchaus sein, dass auch in der GC- Δ Kcc2-Maus GABAerge Transmission zum unregelmässigen Spikemuster von Purkinjezellen beiträgt. Der Phänotyp der *tottering* Maus ist, was kompensatorische Augenbewegungen betrifft, jedoch sehr viel gravierender. Ausserdem sind die Symptome dieser Maus, wie oben erwähnt, vielfältiger. Im Gegensatz dazu ist die Beeinträchtigung der kompensatorischen Augenbewegungen in den hier verwendeten Kcc2-Knockoutmäusen sehr viel spezifischer.

Eine Körnerzelle hat bis zu sieben Dendriten, die alle in unterschiedlichen Glomeruli enden. Da jeder Glomerulus nur von genau einer Moosfaser innerviert wird, kann eine Körnerzelle die Aktivität von bis zu sieben Moosfasern integrieren. Mehrere Moosfasern müssen gleichzeitig aktiv sein, um eine Körnerzelle zu erregen. Es wird daher allgemein angenommen, dass jede Körnerzelle für die zeitgleiche Aktivität einer spezifischen Gruppe von Moosfasern kodiert (Albus, 1971). Körnerzellen weisen keine bis sehr wenig Spontanaktivität auf. Ihre Aktivität wird durch Inhibition von Golgizellen intensiv reguliert. Fällt diese Inhibition durch Ablation von Golgizellen weg, führt dies zu schwerer Ataxie in der Maus (Watanabe *et al*, 1998). In den von mir untersuchten GC- Δ Kcc2-Maus sind die Körnerzellen leichter erregbar. Daher könnte die beeinträchtigte Adaption der Augenbewegungen damit zusammen hängen, dass die Körnerzellkodierung in diesen Mäusen weniger stringent ist.

4.4. Die Adaption des vestibulo-okulären Reflexes ist durch zellspezifische Deletion von Kcc2 beeinträchtigt

In Purkinjezellen war die Wirkung der Inhibition durch Interneuronen der Molekularschicht aufgrund der Deletion von Kcc2 reduziert. Die Rolle der Vorwärtshemmung auf Purkinjezellen ist, genau wie die Plastizität dieser Inhibition, noch nicht vollständig aufgeklärt. In PC- Δ Kcc2-Mäusen haben wir festgestellt, dass neben der kurzfristigen Adaption vor allem auch die Konsolidierung des Gelernten beeinträchtigt war. Ein sehr ähnlicher Phänotyp tritt auch in Abwesenheit von synaptischen GABA_A-Rezeptoren in Purkinjezellen auf (Wulff *et al*, 2009). Es wird allgemein angenommen, dass das Erlernen von motorischen Fähigkeiten durch Langzeitdepression (LTD) der exzitatorischen Parallelfaser-Purkinjezellsynapsen realisiert wird. Die Induktion des LTD involviert eine synchrone Aktivierung von Kletterfasern und Parallelfasern (Ito & Kano, 1982). Eine weitere Studie zeigte allerdings, dass die Koaktivierung von Kletterfasern und Parallelfasern

zusätzlich LTD an inhibitorischen Synapsen induziert (Mittmann & Häusser, 2007). Insgesamt beruht diese Plastizität also auf einer Balance zwischen exzitatorischen Signalen und der Vorwärtshemmung auf Purkinjezellen. In den von uns untersuchten GC- Δ Kcc2-Mäusen war selektiv die Konsolidierung über Nacht von nur einem Aspekt, dem Lernen der Phasenumkehr, beeinträchtigt. Die Adaption und Konsolidierung des Gains war jedoch genauso effizient wie in Kontrolltieren. Dieses Defizit wurde in einer anderen Studie bereits mit der Langzeitpotenzierung von Moosfaser-Körnerzellsynapsen korreliert (Andreescu *et al*, 2011). Andererseits gibt es eine Studie, die nahelegt, dass das Kurzzeitlernen bei der VOR-Adaption im cerebellären Kortex geschieht, wohingegen dieses Gelernte während der Konsolidierung auch in andere, bisher unbekannte Bereiche übertragen und dort gespeichert wird (Kassardjian *et al*, 2005). Dazu muss diese Information in dem Aktivitätsmuster der Purkinjezellen gespeichert sein, denn ihre Axone sind der einzige neuronale Ausgang aus den cerebellären Kortex. Das Kurzzeitlernen ist jedenfalls unabhängig vom LTP der Moosfaser-Körnerzellsynapsen, und war auch in GC- Δ Kcc2-Mäusen nicht beeinträchtigt.

Die PC;GC- Δ Kcc2-Mäuse waren von den hier untersuchten konditionellen Kcc2-Knockoutmäusen die am stärksten betroffene Gruppe. Selbst die kurzfristige Adaption von kompensatorischen Augenbewegungen war bei diesen Tieren drastisch eingeschränkt. Dies ist nicht verwunderlich, da neben der weniger effizienten Inhibition von Purkinjezellen zusätzlich auch mehr exzitatorische Parallelfaseraktivität vorliegt. Wie zuvor beschrieben hängt Plastizität im Cerebellum von einem fein austarierten Gleichgewicht aus Exzitation und Inhibition ab. In PC;GC- Δ Kcc2-Mäusen waren diese beiden synaptischen Einflüsse auf Purkinjezellen diametral verändert. Man kann sich gut vorstellen, dass die Defizite der Anpassung von Augenbewegungen sich nicht nur aufsummieren, sondern gegenseitig potenzieren.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardchemikalien der Firmen Roche (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Gibco (Eggenstein), Riedel de Haen (Seelze), BioRad (Hercules, USA) und Sigma (München) in der Qualität „p.a.“ bzw. „reinst“ verwendet.

Enzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, USA), Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Eggenstein), Promega (Madison, USA) oder Roche (Mannheim) bezogen.

Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

5.1.2. Filmmaterialien und bildgebende Verfahren

Für die Chemilumineszenz kam das Kamerasystem ChemiSmart 5000/ChemiCapt (PeqLab) zum Einsatz. Agarosegele wurden mit einem Digital-Video-System (Intas, Göttingen) aufgenommen und auf Thermopapier (Mitsubishi Thermodrucker) ausgedruckt.

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurde ein Zeiss Axiophot mit 10x, 20x, 40x und 63x Vergrößerungsobjektiven benutzt. Bilder wurden mittels Kamera (Kappa DX 20 HC-FW) und der Kappa Imaging Software aufgenommen.

Für immunhistochemische Untersuchungen mit Fluoreszenz wurde ein konfokales Mikroskop mit 10x, 40x und 63x Vergrößerungsobjektiven benutzt (Leica TCS SP2). Bilder wurden mit der dazugehörigen Software aufgenommen und wenn nötig mit Adobe Photoshop (Adobe) nachbearbeitet.

5.1.3. Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Für alle Lösungen und Medien wurde über ein Milli-Q-System (Millipore, Eschborn) aufgereinigtes H₂O verwendet. Zur Sterilisation wurden Lösungen 20 Min bei 121°C autoklaviert, oder mittels einer Membran der Ausschlussgrenze 0.22 µm sterilfiltriert.

Tabelle 2 | Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer, Lösung und Medium	Zusammensetzung
ACSF (Artificial cerebrospinal fluid)	119 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,3 mM MgSO ₄ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ , 26,2 mM NaHCO ₃ , 2,5 mM CaCl ₂ und 11 mM Glukose, pH 7,4 bei Begasung mit Karbogen
ACSF mit wenig Ca ²⁺	119 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,3 mM MgSO ₄ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ , 26,2 mM NaHCO ₃ , 0,5 mM CaCl ₂ und 11 mM Glukose, pH 7,4 bei Begasung mit Karbogen
Blocklösung Immunohistochemie	5% NGS, 0,25% Triton-X in PBS
Chloralhydrat	6% Chloralhydrat in PBS, pH 7,4
DEPC-H ₂ O	H ₂ O mit 0,1% Diethylpyrocarbonat, über Nacht gerührt und durch Autoklavieren inaktiviert
DNA-Ladepuffer (10X)	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% (w/v) Glycerol
Eosin-G Lösung	0,2-0,5 g Eosin G, 10-12 Tropfen Eisessig, 200 ml H ₂ O
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4
Gelatinelösung	1,5 g Gelatine, 0,1 g Kaliumchromsulfat in 200 ml Reinstwasser
Gramicidin-Stocklösung	Gramicidin aus Bacillus aneurinolyticus (Mixtur aus Gramicidin A, B, C und D), 50 mg/ml in DMSO
Homogenisierungspuffer MP	140 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,4), 5 mM EDTA, 4 mM Pefabloc
Intra-Lösung I	140 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH 7,3
Intra-Lösung II	120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,1 mM CaCl ₂ , 10 mM MgCl ₂ , 20 mM TEA-Cl, 5 mM 4-AP, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH 7,4
Intra-Lösung III	120 mM NMDG-Cl, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 20 mM TEA-Cl, 5 mM 4-AP, 5 mM HEPES, pH 7,4
Intra-Lösung IV	120 mM KCl, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 20 mM Glukose, auf pH 7,25 mit 35 mM KOH (finale K ⁺ Konzentration: 155 mM)
Intra-Lösung V	135 mM CsCl, 10 mM HEPES, 0,2 mM EGTA, 2 mM ATP, 0,3 mM GTP, 10 mM Glukose
Intra-Lösung VI	130 mM Cs-Methansulfonat, 7 mM NaCl, 2 mM Mg-ATP und 10 mM HEPES pH 7,3

Karbogen	95% O ₂ und 5% CO ₂
LacZ Fixierlösung	270 µl 37% Formaldehyd; 80 µl 25% Glutaraldehyd, 0.2% NP-40, 0.1% Na-Desoxycholat in 10 ml PBS
Ladepuffer Proteine (3X)	150 mM Tris/HCl, 6% (w/v) SDS, 30% Glycerol, 0.3% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) b-Mercaptoethanol, pH 8
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.2
Levamisol-Stock	1 M Levamisol in ultrapurem H ₂ O
Lysispuffer Hot Shot	100 mM Tris/Cl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, pH 8.5
Lysispuffer Membranprep	50 mM Tris (pH 6.8), 5 mM EDTA, 2% SDS, 4 mM Pefabloc
NTM	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 9.5
PBS	0.14 M NaCl, 3.2 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.7 mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
PBST	0.14 M NaCl, 3.2 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.7 mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ , 0.25% Triton-X pH 7.4
Ponceau rot (10X)	2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure, auf 100 ml H ₂ O
Saccharoselösung	30% Saccharose in PBS, pH 7.4
SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 20 mM Glukose, 2.5 mM KCl, 0.01 M MgCl ₂ in 1 L H ₂ O, steril, pH 7.0
SSC	150 mM NaCl, 15 mM Natrium-Citrat, pH 7.2
Western Blot Stripping Puffer	15 g Glycerin, 1 g SDS, 10 ml Tween-20 auf 1l mit ultrareinem Wasser, pH 2.2
TAE	10 mM Natriumazetat, 1 mM Na ₂ EDTA, 40 mM Tris/HCl, pH 8.0
TB	10 mM PIPES, 15 mM CaCl ₂ , 55 mM MnCl ₂ , pH 6.7
TBST	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris, 1% Tween, auf pH 7.4 mit HCl
TN	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5
Transferpuffer	20% Methanol in Lämmli-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1%SDS, pH 8.3)
Western Blocklösung	TBST mit 5% Milchpulver
X-Gal Färbelösung	2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₃ FeCN ₆ , 5 mM K ₄ FeCN ₆ , 1 mg/ml 5-Br-4-Cl-3-Indolyl-b-D-Galaktose, 0.2% NP-40, 0.1% Na-Desoxycholat

5.1.4. Bakterienstämme

Es wurden *Escherichia coli* Abkömmlinge des K12-Stammes XL1-Blue verwendet.

5.1.5. Vektoren

pGEM[®]-T Easy (Promega), Klonierungsvektor mit Replikationsursprung zu Replikation in *E. Coli*, Ampicillinresistenz, T7- und SP6-Promotoren für die RNA-Synthese, LacZ-Gen zum Durchmustern von Transformanten nach dem Blau /Weiß-Kriterium.

5.1.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

5.1.6.1. Genotypisierung

Zum Genotypisieren der verwendeten Mauslinien wurden die im Folgenden aufgelisteten Primerpaare verwendet.

Tabelle 3 | Primer zum Genotypisieren der verwendeten Mauslinien

Gen	Primer	Sequenz	Länge der PCR-Produkte [bp]
$\alpha 6$ -Cre	neo Seq 13 s	TTC CTC GTG CTT TAC GGT ATC G	Cre-Allel ~ 240
	mGABRA6-Seq-4s	GCA ATG AAA GAT GAT CTT GGC TTC	Wildtyp-Allel ~ 500
	mGABRA6-Seq-3a	AAA GAC AAA AGC AAA GCA TAC AGC	
L7-Cre	L7-Seq-2a	TCT TTG TTG CTA GTG CCA AGT G	Cre-Allel ~ 800
	Cre-Seq-11s	CGT AAC CTG GAT AGT GAA ACA GG	
Kcc2 ^{lox}	CP85	TCT GCC TGG AAC ACT CTC CTG C	Wildtyp-Allel ~ 300
	CP86	CAA CCT GAA CTC CCA AGG ATA CCC	gefloxtes Allel ~ 500
Kcc3 ^{lox}	mKCC3-Seq-15a	GAGTATGGCTGAAATTC AAGCAC	Wildtyp-Allel ~ 180
	mKCC3-Seq-16s	GTCAGTGAGTAATCACTGTGG	gefloxtes Allel ~ 290
	mKCC3-Seq-11s	CTGGTAAAGTATTTTGTGCTG	

5.1.6.2. Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmidkonstrukten, die als Vorlage zur Synthese von *in situ* Hybridisierungssonden dienten, wurden die aufgelisteten Primer verwendet. Beide Primer binden im Plasmid (in den Promotorregionen für die RNA-Polymerasen SP6 und T7), und waren daher optimal geeignet, um ein dazwischen inseriertes DNA-Fragment zu amplifizieren.

Tabelle 4 | Primer zum Sequenzieren von DNA-Fragmenten im pGEM®-T Easy -Vektor

Primer	Sequenz
T7	AATACGACTCACTATAGG
sp6L	ATTTAGGTGACACTATAGAAT

5.1.6.3. Sonden für *In-situ* Hybridisierungen

Um die DNA-Vorlagen für die Synthese von *in situ* Hybridisierungssonden zu amplifizieren wurden die hier aufgelisteten Primerpaare verwendet. Die Vorlagen zur Amplifizierung der Fragmente waren ein Plasmid mit muriner Kcc3 cDNA, bzw. eine cDNA-Bibliothek, die von Matthias Heidenreich zur Verfügung gestellt wurde (Nkcc1). Diese cDNA-Bibliothek wurde aus neonatalem Gehirnlisat (P 0) synthetisiert.

Tabelle 5 | Primer zum Amplifizieren der DNA-Vorlagen für *in situ* Hybridisierungssonden

Gen	Primer	Sequenz	Länge der Sonde [bp]
Kcc3	mKCC3-Seq-26s	GCCATAAAAAAGCCCCGAAATG	525
	mKCC3-Seq-7a	ACATGGCTGCTGCAAATGTGG	
Nkcc1	nkcc12r	CCAGTCCTTCCTCAGGCG	516
	Nkcc1f_Bamh1	ATGTGAACTGGGGATCCTCCAC	

5.1.7. Antikörper

Tabelle 6 | Liste der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
β-Actin	Maus	1:10.000	Sigma
Calbindin 28kD	Maus	1:1000	Swant
Calbindin D9k	Kaninchen	1:500	Swant
Kcc2 (J21) C-Terminus	Kaninchen	1:250	Jentsch Lab
Kcc3	Kaninchen	1:500	Jentsch Lab
Parvalbumin	Maus	1:1000	Swant
VGAT	Maus	1:200	Synaptic Systems
VGLUT1	Meerschwein	1:100	Synaptic Systems
VGLUT2	Kaninchen	1:250	Synaptic Systems

Die Sekundärantikörper zur Detektion waren für Western Blots mit Meerrettich-peroxidase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), für Anwendungen in der Immunfluoreszenz mit Alexa Fluor-Farbstoffen (Molecular Probes, Leiden/ Niederlande) gekoppelt.

5.1.8. Mauslinien

Die Mäuse wurden bei einem Licht/Dunkelzyklus mit Licht von 07:00 bis 19:00 Uhr und Dunkelheit von 19:00 bis 07:00 Uhr gehalten. Sie wurden mit Wasser und Qualitätsfutter *ad libitum* gefüttert. Alle Mauslinien wurden in gemischtem genetischen Hintergrund gehalten. Für Experimente wurden daher nur Geschwistertiere miteinander verglichen.

Tabelle 7 | Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
α6-Cre	Aller et al. (2003)
Kcc2 ^{lox}	AG Jentsch, Christian Hübner und Ilse Klein
Kcc3 ^{lox}	AG Jentsch, York Rudhardt
L7-Cre	Barski et al. (2000)
Z/AP-Reportermaus	Lobe et al. (1999)

5.2. Methoden

5.2.1. Mikrobiologische Methoden

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden *E. coli* Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden zunächst chemisch kompetent gemacht, das heißt in die Lage versetzt, DNA-Moleküle aufzunehmen. Anschliessend wurden diese Bakterien mit Plasmid-DNA transformiert und über Nacht in Selektionsmedium kultiviert. Die Plasmid-DNA konnte schließlich aus den Bakterien aufgereinigt werden.

5.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes in SOC-Medium wurde in 250 ml frisches SOC-Medium überimpft. Sobald die Kultur eine optische Dichte (OD 600) von 0.5 - 0.6 erreicht hatte, wurden die Zellen in vorgekühlten Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Anschliessend wurden die Zellen durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm (4°C) sedimentiert und in eiskaltem TB resuspendiert. Nach 10 minütiger Kühlung auf Eis wurden die Zellen bei 3500 rpm (4°C) sedimentiert und in 18.5 ml eiskaltem TB resuspendiert. Nach tröpfchenweiser Zugabe von 1.5 ml DMSO wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.1.2. Transformation von Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 125 - 200 µl Zellsuspension wurde mit 2 µl Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgten 45 Sekunden bei 42°C. Anschliessend wurden die Zellen mit 600 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C mit leichtem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden durch kurzes Zentrifugieren konzentriert, 500 µl des Überstandes verworfen. Die übrigbleibende Zellsuspension wurde auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Um die Mäuse zu genotypisieren, wurde diesen, je nach Alter unter Äthernarkose, eine Schwanzbiopsie entnommen. Zur vereinfachten und beschleunigten Gewinnung genomischer DNA wurde eine modifizierte „Hot Shot“ Methode verwendet. Hierbei wurden die

Schwanzbiopsien mit 40 µl Hot-Shot Lysispuffer und 10 µl Proteinase K Stocklösung (20mg/ml) für 2 Stunden bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Anschliessend wurde die Mischung für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Durch Zugabe von 250 µl H₂O wurde die Probe verdünnt und bei 4°C gelagert. Es wurden 0.5-2 µl der Probe pro Genotypisierung eingesetzt.

5.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Wenn nicht anders angegeben wurde für alle PCR-Anwendungen die thermostabile Taq-Polymerase (Invitrogen oder OptiTaq) verwendet. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 5.1.6 aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurde folgender Ansatz (50µl) verwendet: 20 pmol von beiden Primern, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 2 µl 50 mM MgCl₂, 5 µl 10xPCR buffer, 50-100 ng DNA und 1.5 U Taq-Polymerase (Invitrogen). Je nach Amplifikationsprodukt und Primerpaar wurde das folgende Programm modifiziert:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	5 Min	
Denaturierung	95	30 s	30-35 x
Anlagerung der Primer	55-65	30 s	
Elongation	72	1 Min/kb	
Finale Elongation	72	5 Min	
Aufbewahrung	10		

Die PCR-Reaktionen wurden in PCR-Maschinen der Firma Biometra (Professional Thermocycler) durchgeführt.

5.2.2.3. Präparation von Plasmid DNA aus 2 ml-Kulturen (Miniprep)

Ausgehend von einer Einzelkolonie auf einer LB-Amp-Platte wurden 2 ml Glukose-haltiges LB-Amp-Medium mit transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei

37°C herangezogenen. Zur Präparation von Plasmid DNA aus 2 ml-Kulturen wurde das EZNA Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab Biotechnologie) nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip der Plasmid-Aufreinigung basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, bei der die Plasmid-DNA nicht zerstört wird.

5.2.2.4. Präparation von Plasmid-DNA aus 100 ml-Kulturen (Midiprep)

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus 100 ml-Kulturen wurde das PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) verwendet, mit dem 100-200 µg Plasmid-DNA isoliert werden können. Die Präparation erfolgte wie vom Hersteller beschrieben, wobei der Aufschluss der Bakterien auch hier durch alkalische Lyse stattfindet.

5.2.2.5. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach dem Thermozyklusverfahren mit Taq-Polymerase und mit einem fluoreszenz-markierten Primer bzw. Terminatoren (Applied Biosystems). Die Gelelektrophorese und Detektion wurde mit einem ABI 377 Sequenzierer durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit der DNA-Star Software (Lasergene) analysiert.

5.2.2.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit einem Photometer GeneQuant II (Pharmacia) oder einem Spektrophotometer ND-1000 (NanoDrop). Dabei entspricht eine OD von 1 gemessen bei 260 nm 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40µg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA und 33µg/ml Oligonukleotid. Als Indikator für die Reinheit wurde der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} herangezogen. Er sollte für reine Desoxyribonukleinsäurelösungen bei 1.8 liegen, für reine Ribonukleinsäurelösungen bei 2.0.

5.2.2.7. Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte nach Standardmethoden. Enzymmenge, Puffer und Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Herstellerangaben eingestellt. Die verdaute DNA wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, und wie unter 5.2.2.9 isoliert.

5.2.2.8. DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurde 0,7 — 2,0% (w/v) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE eingesetzt. Bei der Herstellung der Gele wurde der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandard diente die 100 bp–Leiter von Fermentas. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern. Die Proben wurden mit DNA–Ladepuffer versetzt und bei ca. 10 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV–Transilluminator bei 312 nm mit einem Video-Dokumentationssystem fotografiert.

5.2.2.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Herstellerangaben.

5.2.2.10. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA–Fragmente wurden mit T4–DNA–Ligase gemäß Herstellerangaben ligiert. Die Fragmente wurden in der Regel im molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor/Fragment) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte mit einer Inkubationsdauer von 1 bis 24 Stunden bei 14°C bis 25°C.

5.2.2.11. Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Zum Aufreinigen von DNA durch Phenol/Chloroformextraktion wurde gelöste DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roti) versetzt und gründlich gevortext. Die Emulsion wurde für 2 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert, wodurch sich zwei Phasen bildeten. Die wässrige Phase enthielt die DNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt bis sämtliche Proteine entfernt waren. Die wässrige Phase wurde im Verhältnis von 10:1 mit LiCl (8M) und im Verhältnis 1:1 mit Isopropanol versetzt und für ca. 30 Minuten gemischt, um die DNA zu fällen. Anschließend wurde die präzipitierte DNA durch Zentrifugation sedimentiert, und mit Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde die DNA in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

5.2.2.12. *In vitro*-Transkription der Digitoxin-markierten RNA Sonden

Die Herstellung Digitoxin-markierter, strangspezifischer „sense“- oder „antisense“-Sonden für die *in situ* Hybridisierung erfolgte *in vitro* mit dem Dig-RNA labeling Mix (Roche) nach Herstellerinformation. Dabei wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigte,

linearisierte Plasmid-DNA mit der T7- oder SP6-RNA-Polymerase in Anwesenheit von DIG-11-UTP *in vitro* transkribiert. Anschließend wurde ein DNase I-Verdau (1 Einheit/Ansatz, 15 Min bei 37 °C) durchgeführt, um die eingesetzte DNA zu entfernen.

5.2.2.13. Aufreinigung von RNA-Sonden

Markierte RNA-Sonden wurden mit dem Rneasy Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in nukleasefreiem Wasser eluiert. Die RNA wurde anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.2.3. Proteinbiochemische Methoden

5.2.3.1. Herstellung von Gewebeerextrakten für Western Blot

Das Gewebe wurde nach Entnahme in eiskaltem PBS gespült und sofort in eiskaltem Homogenisierungspuffer überführt. Mit Hilfe des Ultra Turrax-T25 und einem Glashomogenisator wurde das Gewebe mechanisch aufgeschlossen. Gewebereste wurden 2 mal für 10 Min bei 1000 g (4°C) abzentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Zur Anreicherung membranständiger Proteine wurde das Homogenat für 30 Min bei 50.000 rpm (4°C) ultrazentrifugiert. Der Überstand enthält überwiegend zytoplasmatische Proteine und wurde abgenommen. Das Pellet wurde mit Homogenisierungspuffer gewaschen und mittels Ultraschall in 100-300 µl Lysispuffer resuspendiert. Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt. Als Standardreihe wurden BSA-Verdünnungen in den jeweils benutzten Pufferlösungen verwendet. Die Gewebekomogenate wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.2.3.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot

Es wurden 5-15%ige SDS-Polyacrylamidgele (modifiziert nach Laemmli, UK; Nature 1970) hergestellt. Proben mit vergleichbaren Proteinmengen wurden in die Geltaschen geladen und die Proteine bei 90-180 V aufgetrennt. Vorgefärbte Proteinstandards wurden zur Größenabschätzung mit aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran (PVDF) transferiert. Zur Immunodetektion wurden die Western Blots zunächst für 60 Min in Blocklösung inkubiert. Die verwendeten Antikörper wurden in Blocklösung verdünnt und für 2 h bei RT oder bei 4°C ü.N. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Membranen mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern in Blocklösung inkubiert (1 – 2h bei RT). Spezifisch gebundene

Antikörper wurden durch eine folgende Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe des Kamerasystems ChemiSmart 5000/ChemiCapt (PeqLab) sichtbar gemacht.

5.2.3.3. Aufreinigung polyklonaler Antiseren

Antiseren, die in Western Blot Experimenten Proteine der erwarteten Größe erkannten, wurden affinitätschromatographisch gereinigt. Dazu wurden die zur Immunisierung verwendeten Peptide über die Cysteinreste an eine aktivierte Agarose-Matrix (SulfoLink, Pierce) gekoppelt. Dies erfolgt nach Angaben des Herstellers. Das Serum wurde anschließend in TBS 1:1 verdünnt und auf die zuvor in TBS äquilibrierte Säule gegeben. Dort wurde das Antiserum 2h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurde die Säule mit HS-PBS, zweimal mit PBS und mit 0,1x PBS gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte durch Zugabe von 100 mM Glycin, pH 2,5. Die Fraktionen wurden sofort mit Puffer auf pH 8 eingestellt. Für längere Lagerung bei -80°C wurden sie mit BSA (Endkonzentration 0,1 mg/ml) und NaN (Endkonzentration 5 mM) versetzt.

5.2.4. Histologische Methoden

5.2.4.1. Gelatinierung von Objektträgern

Unbehandelte gewaschene Objektträger wurden für 10 Min in H₂O eingelegt. Danach wurden sie für ca. 30 s in die Gelatinelösung getaucht. Die überschüssige Lösung wurde von den Objektträgern ablaufen gelassen und die Objektträger für 24 h bei RT getrocknet. Die Objektträger wurden trocken gelagert.

5.2.4.2. Perfusion von Mäusen

Die Perfusion der Organe mit Fixativ über den Blutkreislauf des Tieres führt zu einer Auswaschung von Blutzellen und zu einer verbesserten Erhaltung der Gewebestrukturen. Die Mäuse wurden durch eine Injektion mit 6%-igem Chloralhydrat (100 µl / 10 g Körpergewicht) betäubt und anschließend der Brustkorb geöffnet. Das Herz wurde freigelegt und eine Kanüle wurde in die linke Herzkammer eingeführt und mit einer Klemme festgesteckt. Durch die Kanüle wurde PBS mit einem Druck von ca. 180 mm Hg in den Blutkreislauf der Maus gepumpt. Durch einen Schnitt in den rechten Vorhof konnte das Blut nach Passage des großen Körperkreislaufs vollständig abfließen. Direkt nach Perfusion mit PBS wurde eine 4%ige Paraformaldehydlösung in PBS als Fixativ an die Pumpe angeschlossen. Adulte Mäuse wurden mit ca. 100ml Fixativ, jüngere

mit entsprechend weniger Volumen perfundiert. Das so fixierte Gewebe wurde präpariert und in 4% Paraformaldehyd / PBS auf Eis nachfixiert.

5.2.4.3. Kryotomschnitte

Nach erfolgter Nachfixation in 4% PFA/PBS aus Eis wurde das Gewebe mehrere Male mit PBS gewaschen und durch Inkubation in 30%iger Saccharoselösung (in PBS) über Nacht entwässert. Anschließend wurde das Gewebe in Einbettmedium (Tissue Tek, Miles, USA) auf Trockeneis eingefroren und im tiefgefrorenen Zustand am Kryostat (Jung CM 3000, Leica) zu 8–14 µm dünnen Schnitten verarbeitet und auf die beschichteten Glasobjektträger (Superfrost Plus, Menzel) aufgezogen. Kryotomschnitte für *in situ* Hybridisierung wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und bei -80°C gelagert.

5.2.4.4. Frei schwimmende Schnitte

Das Gehirn wurde wie unter 5.2.4.3 beschrieben entwässert. Danach wurde das Gehirn an einem Schlittenmikrotom (Leica) auf Trockeneis geschnitten und die 50 µm dicken Schnitte in 0.1 M PB / 0.02% Natriumazid bis zur Verarbeitung bei 4°C gelagert.

5.2.4.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die gewässerten (frei schwimmende) Gewebeschnitte wurden 2 Min in 20 %iger Hämalaulösung inkubiert und in H₂O gebläut. Dann wurden die Schnitte für 4 Min in 0,3 %iger Eosin-Lösung gefärbt und die Färbung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90% und 96% Ethanol) differenziert, dehydriert und in Rotihistol eingedeckelt. Bei dieser Färbung erscheinen die Kerne blau-violett und das Zytoplasma rosa abgestuft.

5.2.4.6. X-Gal Färbung

Bei der X-Gal Färbung nutzt man die Enzymaktivität der β-Galaktosidase zur Umsetzung des gelben X-Gal Farbstoffes in ein blaues unlösliches Präzipitat. Die fixierten (frei schwimmenden) Schnitte wurden 3x mit PBS gewaschen. Die X-Gal-Färbelösung wurde bei 37°C über Nacht oder unter visueller Kontrolle über mehrere Stunden inkubiert. Nach der Färbung wurden die Schnitte mehrmals in PBS gewaschen, anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und letztlich mit Fluoromount eingedeckelt.

5.2.4.7. Alkalische Phosphatase (AP) Färbung

Die AP-Färbung nutzt die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase zur Umsetzung von farblosem BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat) mit NBT (Nitro blue tetrazolium Chlorid) als Oxidant zu einem blauen unlöslichen Präzipitat. Die fixierten (frei schwimmenden) Schnitte wurden 3x mit NTMT gewaschen. Die Färbung mit NBT/BCIP (Roche) erfolgte bei RT kontrolliert über Tag. Nach der Färbung wurden die Schnitte mehrmals in PBS gewaschen und anschließend mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

5.2.4.8. Immunfluoreszenzfärbung von frei schwimmenden Schnitten

Frei schwimmende Schnitte (50µm) wurden in 24 Well Platten in 300 µl Blocklösung überführt und 1-2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte in Blocklösung über 1-3 Tage bei 4°C auf einem Schüttler. Die Schnitte wurden anschließend 3x mit PBST (PBS mit 0.25% Triton-X) gewaschen und mit Alexa-Fluor gekoppelten Sekundärantikörpern (1:1000) und TOPRO3 (1:2000) in Blocklösung bei RT für 2-3 h inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBST wurden die Schnitte mit Pinseln auf gelatinisierte Objektträger gebracht und mit Fluoromount eingedeckelt. Die eingedeckelten Schnitte wurden nach kurzer Trocknungszeit (1-2h) mit durchsichtigem Nagellack am Rand versiegelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

5.2.4.9. *In situ* Hybridisierung auf Gehirnschnitten

Alle Lösungen, die bis zum Hybridisierungsschritt verwendet wurden, sind mit DEPC-H₂O angesetzt worden.

Kryoschnitte wurden bei RT aufgetaut und in PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Schnitte mit Proteinase K (in 10 mM Tris, pH 7.5) permeabilisiert, in PBS gewaschen und mit 2% PFA (in PBS) nachfixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 33 mM Triethanolamin equilibriert und anschliessend für 5 Min bei RT azetyliert. Darauf folgten 2 Waschschrte in 5x SSC und schließlich Equilibrierung in Vorhybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC) bei 65°C. Nach 1 h wurde der Vorhybridisierungspuffer durch den Hybridisierungsmix ersetzt (50% Formamid, 5x SSC, 400 ng/µl Dig-markierte Sonde, 100 µg/ml DNA aus Lachssperma) und über Nacht bei 60-63°C hybridisiert.

Ungebundene Sonde wurde am nächsten Tag durch 30 Min waschen in 2x SSC (bei RT), gefolgt von zwei Waschschrten in 2x SSC und 0.1x SSC (jeweils 1 h bei 65°C) entfernt. Die Schnitte wurden anschliessend in TN-Puffer equilibriert und 2 h bei RT mit anti-Dig-AP Antikörper

(1:1000 in 0,5% Roche Block) inkubiert. Es folgte viermaliges Waschen in TN-Puffer, sowie 2x für 10 Min Equilibrieren in NTM-Puffer. Die Färbung (NBT/BCIP, Levamisole, in NTM, pH 9.5) erfolgte bei 4°C in Dunkelheit. Die fertigen Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

5.2.4.10. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Zur Herstellung von ultradünnen Gehirnschnitten für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden adulte Mäuse mit 4% Paraformaldehyde (PFA) und 2.5% Glutaraldehyde (vol/vol) in PB perfundiert. Das Gewebe wurde über Nacht nachfixiert, und wie von De Zeeuw et al beschrieben, geschnitten (De Zeeuw *et al*, 1989). Die ultradünnen Schnitte des Cerebellums wurden mit DAB-Calbindin (Pre-Immuno) und Goldfärbung (GABA, Post-Immuno) markiert (De Zeeuw *et al*, 1989).

Von jeder Maus wurden 16 elektronenmikroskopische Bilder (zufällig ausgewählte Bereiche aus Körnerzellschicht und Molekularschicht) mit 19.000-facher Vergrößerung aufgenommen. Ausgewertet wurden die Morphologie und die Dichte GABAerger Synapsen, Parallelfaser-Purkinjezell-Synapsen, sowie die Morphologie dendritischer Spines von Purkinjezellen.

5.2.5. Elektrophysiologische Methoden

5.2.5.1. Geräte

Akute Schnitte wurden mittels Leica VT 1200S Vibratom hergestellt.

Elektrophysiologische Messungen wurden an einem aufrechten Mikroskop (Olympus BX50WI) mit DIC-Optik (Differential Interference Contrast) bei einer 4fachen oder 40fachen Vergrößerung durchgeführt. Zur optischen Kontrolle wurde eine Videokamera (Sensicam, PCO) eingesetzt. Die Temperatur der Messkammer wurde, wenn angegeben, über einen Temperaturregler (Temperaturcontroller III, Luigs & Neumann) eingestellt.

Pipetten wurden mit Hilfe des Zeitz DMZ-Universal Pipettenpuller gezogen. Zur Herstellung der Patchpipetten wurden Glaskapillaren aus Borosilicatglas der Firma Hilgenberg (Aussendurchmesser 1.5 mm; Wandstärke 0.241 mm, mit Filament) verwendet. Die Pipettenspitzen wurden mit Hilfe eines List Medical L/M-CPZ-101 Polierers an einem inversen Zeiss Mikroskop geglättet. Patchpipetten für Einzelkanalmessungen wurden aus Glaskapillaren von World Precision Instruments (Schott #8250-Glas, Aussendurchmesser 1.5 mm, Innendurchmesser 1.0 mm, ohne Filament) gezogen, und anschliessend mit Sylgard (World Precision Instruments)

beschichtet. Für die Manipulation der Applikations- und Patchpipetten wurden elektrische Mikromanipulatoren verwendet (SM I, Luigs & Neumann).

Zur fokalen Druckapplikation von GABA oder Muscimol wurde das Pressure System Ile (Toohey Company) verwendet.

Als Signalverstärker wurde Multiclamp 700B (Axon) mit dem CV-7B Kopfaufsatz (Axon) verwendet. Signale wurden mit Hilfe des Digidata 1440A (Axon) digitalisiert. Die Messdaten wurden auf einem PC gespeichert und später mit Clampfit 10.2 (Axon) analysiert.

5.2.5.2. Akute Schnittpräparation für Elektrophysiologie

Die Mäuse wurden durch peritoneale Injektion von Chloralhydrat betäubt. Nach dem Dekapitieren wurde die Schädeldecke geöffnet, das Gehirn schnell mit Hilfe eines Spatels entnommen, in eiskaltes ACSF (niedrig Ca^{2+}) überführt und ca. 2 Min heruntergekühlt. Anschließend wurden das Cerebellum mit einem Skalpell vom restlichen Gehirn getrennt und mit Sekundenklebstoff sagittal auf die magnetische Metallhalterung des Vibratoms aufgeklebt. Hierbei wurde bereits die Schnitorientierung definiert (sagittal, falls nicht anders erwähnt).

Die magnetische Halterung wurde in die dafür vorgesehene Badkammer gespannt, welche mit eiskaltem ACSF (niedrig Ca^{2+}) gefüllt war. Es wurden Schnitte einer Dicke von 200 – 250 μm hergestellt. Anschließend wurden die Schnitte in ein mit einem Netz versehenes Becherglas mit ACSF (RT) überführt und für ca. 1-2 h äquilibriert.

5.2.5.3. Patch clamp Messungen im akuten Gewebeschnitt

Die Gehirnschnitte wurden auf einem mit Poly-D-Lysin beschichteten Coverslip in die Messkammer überführt und ständig mit Karbogen-begaster ACSF (falls nicht anders angegeben bei RT) umspült. Purkinjezellen und Körnerzellen wurden anhand von Größe, Form und Lage des Somas identifiziert.

Für die direkten Messungen an Zellen im akuten Gehirnschnitt wurde die sogenannte *blow and seal* Methode benutzt. Dabei wird ein leichter Überdruck an die Patchpipette angelegt, bevor sie unter Sichtkontrolle in den Gewebeschnitt geführt wird. Durch den Überdruck wird die Oberfläche der Neuronen, an denen gemessen werden soll, von dem umgebenden Gewebe befreit. Dann kann die Pipette an die Membran des Neurons bewegt werden. Durch Anlegen eines Unterdrucks verbindet sich die Zellmembran dicht mit der Öffnung der Patchpipette. Dabei entsteht zwischen Pipettenlösung und Badlösung ein elektrischer Widerstand im Gigaohm-Bereich (*Gigaseal*). Diese Konfiguration nennt sich *Cell attached*.

Durch weiteres Anlegen von Unterdruck kann der Membranpatch durchbrochen werden, ohne dass der Gigaseal aufgelöst wird. Dadurch entsteht ein elektrischer Zugang zur Zelle, und die Pipettenlösung diffundiert in die Zelle (Ganzzellkonfiguration). So kann die intrazelluläre Konzentration von Ionen kontrolliert, sowie Ströme über die ganze Zellmembran abgeleitet werden.

5.2.5.4. Gramicidin Perforated-Patch

Um die intrazelluläre Chloridkonzentration nicht zu beeinflussen wurde die Perforated-Patch Methode eingesetzt. Bei der Ganzzellkonfiguration verändert sich die Zusammensetzung des Zytosols durch Austausch mit der Pipettenlösung. Dies wird bei der Perforated-Patch Methode verhindert. Dabei wird ein Ionophor in die Pipettenlösung gegeben, welches in die Membran des Patches integriert und permeable Poren bildet. Somit wird ein elektrischer Zugang zur Zelle gewährleistet, während die Dialyse des Zytosols vermieden wird.

Häufig gebrauchten Ionophore, wie Amphotericin B und Nystatin, bilden chloridpermeable Poren. Im Gegensatz dazu bildet Gramicidin Poren, die ausschließlich für monovalente Kationen und kleine ungeladene Moleküle permeabel sind. Somit ist es möglich Patch clamp Messungen bei intakter intrazellulärer Chloridkonzentration durchzuführen. Da Gramicidin sich schlecht in Wasser löst, wurde zunächst eine Stocklösung in DMSO angefertigt (50mg/ml) und dann in Pipettenlösung (Intra I) verdünnt (50 µg/ml). Die gramicidinhaltige Pipettenlösung wurde auf Eis aufbewahrt und nach 2 h verworfen, da die Aktivität von Gramicidin in Lösung schnell nachlässt.

Um ein Austreten der gramicidinhaltigen Lösung in das Bad zu verhindern, wurde die Spitze der Patchpipette zunächst mit normaler Pipettenlösung vorgefüllt und dann mit gramicidinhaltiger Lösung von hinten aufgefüllt. Die fortschreitende Integration des Ionophors in die Membran konnte nach dem *Sealen* einer Zelle als Abnahme des Zugangswiderstandes beobachtet werden. Nach Ausbildung eines *seals* sank der Zugangswiderstand innerhalb von 10 bis 50 Minuten auf etwa 15-25 MΩ ab. Um zu gewährleisten, dass das Potential einer Zelle zuverlässig und ohne Spannungsverlust auf gewünschte Werte geklemmt wird, wurden nur Zellen ausgewertet, bei denen ein Zugangswiderstand <30MΩ erreicht, und auch stabil gehalten wurde. Messungen in denen der Widerstand nicht weit genug abgesunken war, wurden verworfen.

Da der verbleibende Zugangswiderstand (R_a) immer noch zu einem Spannungsverlust über den Patch führen kann, wurden die angelegten Membranpotentiale nach

$$V_m = V_h - I_h * R_a$$

(mit V_m =Membranpotential, V_h =Haltepotential, I_h =Strom bei Haltepotential (Zhang *et al*, 2006)) korrigiert.

5.2.5.5. Korrektur des Grenzflächenpotentials (Liquid junction potential)

An der Phasengrenze von zwei Lösungen mit unterschiedlichen ionischen Zusammensetzungen entsteht ein Grenzflächenpotential. Die Größe dieses Potentials hängt von Ladung, Konzentration und Beweglichkeit der beteiligten Ionen ab. So ist in elektrophysiologischen Patch clamp Experimenten die Patchpipettenlösung typischerweise anders zusammengesetzt als die Badlösung. Sobald die Pipette mit der Badlösung in Kontakt kommt, bewegen sich die Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten. Da große Ionen (z.B. Methansulfonat) dabei langsamer diffundieren als kleine (z.B. Chlorid oder Kalium), kommt es zu einer Nettopotentialdifferenz über die Phasengrenze, dem Grenzflächenpotential.

Vor einer Messung werden Potentiale zwischen Badelektrode und Messelektrode (bei bereits eingetauchter Patchpipette) auf Null gesetzt (Pipetten-Offset), so dass kein Strom durch die Pipette fließt. Ein Grenzflächenpotential zwischen Badlösung und Pipettenlösung wird bei diesem Vorgang ebenfalls ausbalanciert. Durch Herstellung eines Gigaseals mit einer Zelle verlieren Bad- und Pipettenlösung jedoch den Kontakt zueinander und das Grenzflächenpotential zwischen diesen beiden Lösungen existiert nicht mehr, so dass das Offsetpotential überkompensiert ist. Aufgrund dieser Überkompensation stimmen Kommandopotentiale während des Experiments nun nicht mehr mit dem tatsächlich vorliegenden Pipettenpotential überein. Daher ist es zur Auswertung der Stromspuren nötig, die Kommandospannungswerte um das Grenzflächenpotential zu korrigieren.

Im Fall der Ganzzelleableitungen zur Messung von postsynaptischen Strömen (PSCs) wurde die Korrektur vor dem Experiment vorgenommen.

Das Grenzflächenpotential zwischen zwei Lösungen lässt sich nach Neher (Neher, 1992) berechnen. Zur experimentellen Bestimmung wurde die Patchpipette und die Messkammer mit Extrazellulärlösung (ACSF) befüllt. Als Badelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht in einer mit 3 M KCl befüllten Patchpipette verwendet. Mit dem Pipetten-Offset wurde der Stromkreis auf Null gesetzt, um Ströme zwischen den Elektroden auszugleichen. Nun wurde die Lösung in der Messkammer durch eine Pipettenlösung ersetzt und die Spannung gemessen. Diese Spannung entspricht dem Grenzflächenpotential LJP (für Liquid junction potential) zwischen diesen beiden Lösungen (nach Konvention: Bad-Potential relativ zur Pipette).

Bei Ganzzelleableitungen equilibriert das Zytosol mit der Pipettenlösungen, so dass nur das Grenzflächenpotential (LJP) zwischen Badlösung und Pipettenlösung beachtet werden muss. Die Korrektur erfolgt nach

$$V_{\text{Membran}} = V_P - \text{LJP}.$$

In der Perforated-Patch Konfiguration gibt es keine vollständige Dialyse des Zytosols, da nur bestimmte Ionen permeieren können. Es kommt, nach Equilibrierung der permeablen Ionen, zu einer Donnan-Potentialdifferenz V_{pf} über den perforierten Patch. V_{Membran} ist in diesem Fall nach

$$V_{\text{Membran}} = V_P + V_{\text{pf}} - \text{LJP}$$

zu korrigieren. Bei Verwendung von Gramicidin permeieren jedoch keine Anionen, und da die Konzentration von K^+ auf beiden Seiten des Patches in etwa ausgewogen ist, kann ein Donnan-Potential in diesem Fall vernachlässigt werden ($V_{\text{pf}} \sim 0$).

In der *Cell attached* Konfiguration ist die Orientierung der Membran invertiert, also werden auch die Vorzeichen umgedreht, so dass die Korrektur nach

$$V_{\text{Membran}} = -V_P + \text{LJP} + V_M$$

erfolgt. Das Ruhemembranpotential (V_M) der Zelle ist eine unbekannte Größe in dieser Konfiguration.

5.2.5.6. Befüllung von Neuronen mit Biocytin

Um die dendritischen Spines von Purkinjezellen in Gewebeschnitten sichtbar zu machen wurden am Vibratom 200 μm dicke Sagittalschnitte des Cerebellums wie unter 5.2.5.2 beschrieben angefertigt. Die Schnitte wurden nach ca. 1.5 h Ruhezeit in mit Carbogen begastem ACSF in die Messkammer überführt, und dort konstant mit begastem ACSF umspült. Der Pipettenlösung (Intra I) wurde Biocytin (2,5mg/ml) zugesetzt. Einzelne Purkinjezellen wurden mit Pipetten (Widerstand: 2.5 - 3 $\text{M}\Omega$) auf dem Soma gesalt, und die Ganzzellkonfiguration wurde hergestellt, so dass der Zugangswiderstand unter 20 $\text{M}\Omega$ lag. Die Purkinjezelle wurde nun für ca. 10 Minuten bei -70 mV gehalten um die Diffusion von Biocytin in den Dendritenbaum zu ermöglichen. Anschliessend wurde die Patchpipette vorsichtig von der Zelle abgelöst, so dass sich das Loch in der Membran wieder verschliessen konnte. Pro Schnitt wurden 3-4 Purkinjezellen befüllt, die nach Möglichkeit

nicht in direkter Nachbarschaft lagen. Die Schnitte wurden anschliessend in 4% PFA (in PBS, pH 7.4) bei 4°C über Nacht fixiert.

Um die mit Biocytin gefärbten Zellen sichtbar zu machen, wurden die Gehirnschnitte für 2 Stunden bei RT mit 0.2 % Alexa 555-Streptavidin (Molecular Probes) in Blocklösung inkubiert, 3x in PBS gewaschen und mit Fluoromount eingedeckelt. Die Visualisierung der befüllten Neuronen erfolgte am konfokalen Lasermikroskop (Leica). Zur Auswertung der Länge von dendritischen Spines (von der Basis bis zum distalsten Teil) wurde die Software NeuronJ verwendet.

5.2.5.7. Messung GABAerger Miniaturströme

Postsynaptische GABAerge Miniaturströme wurden in der Ganzzellkonfiguration (Pipettenlösung Intra V) bei einem Haltepotential von -70 mV an Purkinjezellen gemessen (Zugangswiderstand <20 MΩ). Um Aktionspotential-vermittelte Transmission auszuschliessen, wurde der Extrazellulärlösung 2 μM Tetrodotoxin (TTX, Tocris) zugesetzt. Glutamaterge Neurotransmission wurde durch die Anwesenheit von 50 μM D(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (D-AP5, Tocris) und 10 μM 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, Tocris) blockiert. Pro Zelle wurden ~200 Ereignisse ausgewertet.

5.2.5.8. Messung glutamaterger Miniaturströme

Postsynaptische glutamaterge Miniaturströme von Purkinjezellen wurden bei einem Haltepotential von -70 mV in der Ganzzellkonfiguration (Pipettenlösung Intra V, Zugangswiderstand <20 MΩ) gemessen. Die Badlösung enthielt 2 μM TTX, sowie 10 μM Gabazine (SR-95531, Sigma) um Aktionspotential-vermittelte und GABAerge Transmission auszuschliessen. Pro Zelle wurden ~200 Ereignisse ausgewertet.

5.2.5.9. Messung spontaner IPSCs (sIPSCs)

Während der Messung spontaner IPSCs wurden der Badlösung keine Blocker beigegeben. Um IPSCs von EPSCs zu trennen wurde eine Pipettenlösung (Intra VI) verwendet, mit der das Cl⁻ Umkehrpotential bei etwa -75 mV lag. In der Ganzzellkonfiguration wurden sIPSCs bei einem Haltepotential von +20 mV gemessen, so dass Cl⁻ Ströme als Auswärtsströme zu beobachten waren. Zellen mit einem Zugangswiderstand >20 MΩ wurden verworfen. Es wurden ~200 Ereignisse pro Zelle ausgewertet.

5.2.5.10. Messung spontaner EPSCs (sEPSCs)

Um spontane exzitatorische Ströme (sEPSCs) von Purkinjezellen aufzunehmen wurde, wie bei Messungen von sIPSCs, keine Blocker eingesetzt. In der Ganzzellkonfiguration (Pipettenlösung Intra VI, Zugangswiderstand $<20 \text{ M}\Omega$) wurden bei einem Haltepotential von -75 mV , also dem Umkehrpotential von Cl^- Strömen, exzitatorische Ströme als Einwärtsströme gemessen. Es wurden ~ 200 Ereignisse pro Zelle ausgewertet.

5.2.5.11. Bestimmung des Ruhemembranpotentials im Perforated-Patch

Das Ruhemembranpotential von Purkinjezellen wurde in der Perforated-Patch Konfiguration bestimmt. Eine gesealtete Zelle mit einem Zugangswiderstand $<25 \text{ M}\Omega$ (Purkinjezelle) bzw. $<100 \text{ M}\Omega$ (Körnerzelle) wurde im *current clamp* Modus gemessen. Dabei wird das Haltepotential so eingestellt, dass kein Strom über die Membran fließt. Wenn keine Agonisten oder Antagonisten der Badlösung zugegeben werden, kann das Ruhemembranpotential der Zelle hierbei abgelesen werden.

Um die Antwort der Zelle auf eine Applikation von GABA zu messen wird eine Applikationspipette nah am Soma positioniert, und Muscimol oder GABA direkt auf die Zelle druckappliziert. Dabei wird kontinuierlich das Membranpotential der Zelle gemessen.

5.2.5.12. Bestimmung des GABA-Umkehr Potentials

Das Umkehrpotential GABAerger Ströme (E_{GABA}) wurde im Voltage clamp Modus gemessen. Um Aktionspotentiale zu verhindern wurde die ACSF mit $1 \mu\text{M}$ TTX versetzt. Eine Purkinjezelle wurde mit Gramicidin in der Pipette gesealt und es wurde gewartet, bis der Zugangswiderstand bei ca. $20 \text{ M}\Omega$ lag. Die Zelle wurde auf Potentiale zwischen -140 mV bis -40 mV geklemmt. Während dieser Spannungsschritte wurde für 30 ms Muscimol oder GABA direkt auf das Soma appliziert. Hierdurch wurden, je nach Haltepotential, Einwärts- oder Auswärts-Ströme evoziert (GABAerge Ströme). Nach Korrektur des Zugangswiderstandes für jedes Potential wurde das Umkehrpotential der GABAergen Ströme durch lineare Regression berechnet.

5.2.5.13. Messung der Chloridextrusion nach akuter Cl^- Beladung

Auch diese Messungen fanden im Gramicidin Perforated-Patch Modus in der *Voltage clamp* Konfiguration statt.

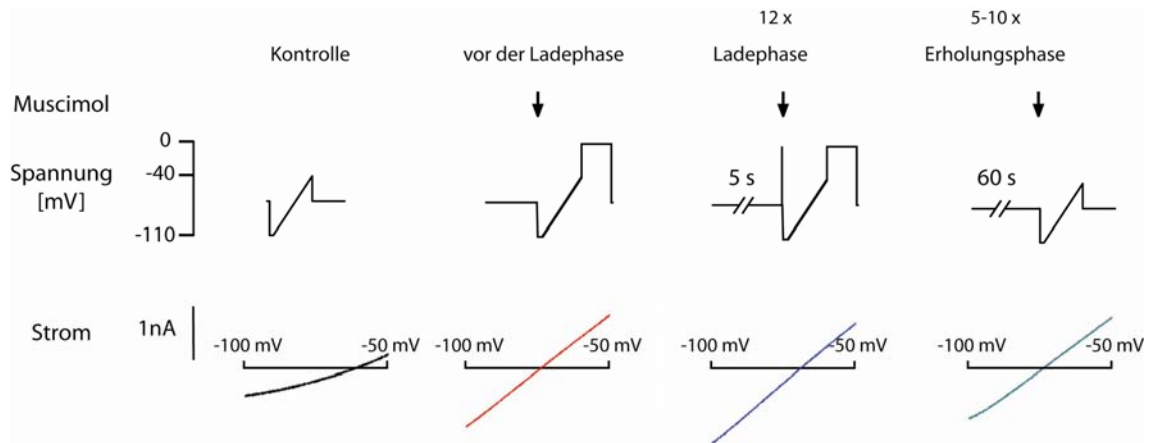


Abbildung 36 | Protokoll des Chloridextrusions-Experimentes.

Eine Spannungsrampe (500ms, von -110 bis -40 mV) in der Perforated-Patch Konfiguration angelegt (Kontrolle). Um E_{GABA} zu bestimmen wurde das Rampenprotokoll mit gleichzeitiger Applikation von Muscimol (50 mM für 50 ms) wiederholt (rot). Der Schnittpunkt mit dem Kontrollstrom ergibt E_{GABA} . Während der Ladephase wurde vor und nach dem Rampenprotokoll ein Spannungsschritt auf 0 mV durchgeführt, und während der Depolarisation vor dem Rampenprotokoll Muscimol appliziert. Die Erholungsphase startete 60 s nach der Ladephase. Hier wurde das Rampenprotokoll nicht mit depolarisierenden Spannungsschritten kombiniert.

Um eine Zelle mit Chlorid zu beladen müssen sowohl die Leitfähigkeit der Membran für Chlorid transient erhöht, als auch die elektrochemische Triebkraft für Chlorid-Influx vorhanden sein. Purkinjenzellen wurde daher auf depolarisierte Potentiale geklemmt, während gleichzeitig $GABA_A$ -Rezeptoren durch Applikation von GABA oder Muscimol aktiviert wurden (Abb. 36). Die Beladungsphase dauerte insgesamt 1 Minute. Um das Muscimol anschliessend vollständig zu entfernen, wurde der Gehirnschnitt nach der Beladungsphase für 1 Minute mit ACSF gespült (Waschphase), bevor E_{GABA} erneut gemessen wurde (Erholungsphase). E_{GABA} wurde während der Chloridbeladung, sowie während der Rückkehr zum Ruhezustand, durch Spannungsrampen mit gleichzeitiger Muscimolapplikation gemessen. Aus E_{GABA} konnte wiederum $[Cl^-]_i$ während des Experiments berechnet werden.

5.2.5.14. Einzelkanalmessungen von $GABA_A$ -Rezeptoren

Um die Triebkraft von Chlorid (DF_{Cl}) in Körnerzellen zu messen, wurden Einzelkanalmessungen über den $GABA_A$ -Rezeptor gemacht (Intra II). Körnerzellen haben sowohl synaptische, also auch extrasynaptische $GABA_A$ -Rezeptoren, die auch über die Plasmamembran des Somas verteilt sind. Dies hat den Vorteil, dass sich bei *Cell attached* Messungen am Soma von Körnerzellen meist einige $GABA_A$ -Rezeptoren im Membranfleck (Patch) in der Patchpipette befinden. Die Patchpipette wurde im *Cell attached* Modus auf verschiedene Potentiale geklemmt, und der Strom der Einzelkanalöffnungen im Membranpatch gemessen.

Die Filterung der Stromspuren wurden nach der Messung digital mit einem 1-2 kHz Filter durchgeführt. Für jede einzelne Messung wurden ein Basislevel („Kanal geschlossen“) und ein Öffnungslevel („ein Kanal geöffnet“) festgelegt. Lag ein Signal zwischen Basislevel und Öffnungslevel wurde nach dem 50% Kriterium (50% des Öffnungslevels) entschieden, ob es sich um Rauschen oder ein Signal handelte.

Die Zusammensetzung der Pipettenlösung ähnelt der Extrazellulärlösung, wobei außerdem Antagonisten verschiedener Kaliumkanäle, sowie GABA oder Muscimol als GABA_A-Rezeptoragonist enthalten sind. Das bedeutet, dass das Potentialgefälle über den Patch (V_{Patch}), wenn keine Pipettenspannung angelegt wird, dem Membranpotential der Zelle entspricht. Bei verschiedenen Pipettenpotentialen (V_P) verändert sich dieses lokale Potentialgefälle V_{Patch} nach

$$V_{Patch} = V_M - V_P$$

wobei V_M das Ruhemembranpotential der Körnerzelle ist. DF_{GABA} wurde als das Potential ermittelt, bei dem die Ströme über den GABA_A-Rezeptor die Polarität ändern. Es gilt die Formel

$$DF_{GABA} = -V_P$$

für das Pipettenpotential, bei dem kein Nettostrom über die GABA_A-Rezeptoren fließt. Um dieses Potential zu bestimmen, wurden verschiedene Pipettenpotentiale angelegt, und die dabei zu beobachteten Einzelkanalströme über einige Minuten gemessen. Die durchschnittliche Amplitude der Ströme über einzelne GABA_A-Rezeptoren wurden gegen $-V_P$ aufgetragen, und DF_{GABA} durch lineare Regression ermittelt.

5.2.5.15. *Cell attached* Messung des Membranpotentials

Über eine Membran, die nur für Kaliumionen permeabel ist, fließt bei symmetrischer K⁺-Konzentration genau dann kein Nettostrom, wenn die Potentialdifferenz gleich 0 ist. In der *Cell attached* Konfiguration gilt also, dass der Kaliumstrom genau dann die Polarität wechselt, wenn das Pipettenpotential dem Membranpotential der Zelle entspricht, und sie sich somit gegenseitig aufheben. K_v Kanäle sind in hoher Dichte in der somatischen Plasmamembran von Neuronen vorhanden. Im Ruhezustand des Neurons sind sie geschlossen, doch bei Depolarisation, wie bei einem Aktionspotential, öffnen sie. Um den Strom über K_v Kanäle vom Hintergrund (Leckstrom) zu isolieren, wurde ein Spannungsrampenprotokoll angewendet, bei dem K_v Kanäle zunächst geschlossen sind. Zwischen den Rampenprotokollen wurde das Pipettenpotential auf +60 mV gehalten um die spannungsabhängige Inaktivierung von K_v Kanälen zu vermeiden.

Zunächst wurde das Pipettenpotential für 100 ms auf +130 mV gehalten, somit ergab sich also eine hyperpolarisierte Potentialdifferenz über den Membranpatch von $V_{\text{patch}} = V_M - 130 \text{ mV}$. Anschließend folgte das Rampenprotokoll (50 ms) auf -200 mV (hier ist $V_{\text{patch}} = V_M - (-200 \text{ mV})$, also depolarisiert). Am Anfang des Rampenprotokolls sieht man einen linear ansteigenden Strom (Leckstrom) von dem angenommen wird, dass er über das ganze Protokoll linear bleibt. Wenn Kv Kanäle öffnen sieht man zunächst einen kleinen Einwärtsstrom (in Bezug auf die Pipette einen Auswärtsstrom), der bei fortschreitender Depolarisierung zu einem Auswärtsstrom wird (einwärts in Bezug auf die Pipette). Um das Umkehrpotential der K^+ Ströme zu bestimmen wird der Leckstrom durch lineare Extrapolation von den durch die Rampe evozierten Strömen abgezogen. Das Potential bei dem „Leckstrom“ und dem gemessenen K^+ Strom sich schneiden entspricht E_{K^+} . Da symmetrische K^+ Konzentrationen in Pipette und Zytosol vorliegen und dadurch E_{K^+} über dem Membranpatch bei 0 mV liegt, ist dies auch das Membranpotential der Zelle.

5.2.5.16. Bestimmung von $[Cl^-]_i$

Eine Methode, mit der die intrazelluläre Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$) von Neuronen bestimmt werden kann, besteht in der Messung des Umkehrpotentials GABA_A-erger Ströme. GABA_A-Rezeptoren sind hauptsächlich für Chlorid permeabel, und das Potential, bei dem ihre Ströme die Polarität ändern ist, unter Vernachlässigung der HCO_3^- Leitfähigkeit von GABA_A-Rezeptoren, eine gute Annäherung an das Chloridumkehrpotential (E_{Cl^-}). Durch Einsetzen von E_{Cl^-} und der extrazellulären Chloridkonzentration ($[Cl^-]_a = 126.5 \text{ mM}$) in die Nernstgleichung

$$E = \frac{RT}{zF} * \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_a}$$

wurde die intrazelluläre Chloridkonzentration in Annäherung berechnet.

5.2.5.17. Spontane Aktivität von Purkinjezellen

Für diese Messungen wurden 200 μm dicke, sagittale Schnitte der cerebellären Vermis verwendet, um die Dendritenbäume der Purkinjezellen möglichst unversehrt zu lassen. Aus demselben Grund wurden nur Purkinjezellen ausgewählt, die einige Zellschichten tief im Schnitt lagen. Diese Experimente wurden in der *Cell attached* Konfiguration im *Voltage clamp* durchgeführt.

Um die gepatchten Zellen möglichst wenig zu beeinflussen wurde normales ACSF ohne Blocker als Badlösung und in der Pipette verwendet. Das Haltepotential wurde vor der Messung im

Current clamp als das Potential ermittelt, bei dem kein Strom über die Membran floss. Es wurde über die Messung hinweg konstant gehalten. Als Maß für die Regelmässigkeit der Spikes wurde der Variationskoeffizient des Interspikeintervalls ($ISI CV = ISI \text{ Standardabweichung} / ISI \text{ Mittelwert}$) ausgewertet. Je regelmässiger die Spikeabfolgen waren, desto kleiner war der $ISI CV$.

Ein Maß für Regelmässigkeit auf kleiner Zeitskala, und robuster gegen Pausen in den Spikeabfolgen ist der CV_2 , bei dem nur direkt nebeneinanderliegende Interspikeintervalle miteinander verglichen werden. Der $ISI CV_2$ wird nach

$$ISI CV_2 = \text{Mittelwert von } 2 * \frac{|ISI_{n+1} - ISI_n|}{(ISI_{n+1} + ISI_n)}$$

für alle benachbarten Interspikeintervalle berechnet und gemittelt.

All diese Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei annähernd physiologischen Temperaturen von 34-35°C erhöhte sich nur die Frequenz, im Vergleich zu den Ergebnissen bei RT. Zwischen den jeweiligen Genotypen wurde der Unterschied von Frequenz und $ISI CV$ nicht deutlicher (nicht gezeigte Daten).

5.2.6. Verhalten

5.2.6.1. Aufnahme von Augenbewegungen

Adulten Mäusen (männlich, 12-30 Wochen alt) wurde unter Vollnarkose (Isofluran/O₂) ein Sockel mit zwei Muttern an den Stirn- und Scheitellappenknochen befestigt (mit Optibond (Kerr) und Charisma (Heraeus Kulzer)). Nach 3 Tagen Erholung wurde die Maus mit diesem Sockel in der Mitte eines Drehtellers fixiert. Dieser Drehteller war von einem zylindrischen Bildschirm mit zufälligem Punktmuster umgeben. Augenbewegungen (OKR und VOR) wurden durch Rotation des Bildschirms und/oder des Drehtellers mit verschiedenen Frequenzen induziert. Die Detektion der Augenbewegungen erfolgte mit einer Infrarotkamera (240 Hz, ISCAN Inc.), die ebenfalls auf der Drehscheibe besfestigt war (Stahl *et al*, 2000). Die Maus wurde vor den Experimenten durch ein einstündiges Training in der Apparatur habituiert. Anschliessend wurden Basismessungen und Trainingseinheiten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Die Berechnung und Auswertung der Pupillenposition während des Experiments erfolgte nach der Messung (Hoebeek *et al*, 2005; Stahl *et al*, 2000; Van Alphen *et al*, 2001). Schnelle Augenbewegungen (Sakkaden) wurden herausgefiltert, und die durchschnittliche Bewegung durch eine Sinuskurve angepasst.

Zwei Parameter wurden ausgewertet:

$$\text{Gain} = \frac{\text{Amplitude der Augenbewegung}}{\text{Amplitude des Stimulus}}$$

und

$$\text{Phase} = \text{Zeitdifferenz zwischen Augenbewegung und Stimulus (in Grad)}$$

5.2.6.2. Optokinetischer Reflex (OKR)

Um den optokinetischen Reflex zu induzieren wird der Bildschirm um die Maus gedreht, während der Drehteller nicht rotiert. Die sinusförmigen Drehungen mit einer Amplitude von 5° fanden bei verschiedenen Frequenzen (0.1-1 Hz) statt. Dabei wurden die Augenbewegungen der Maus aufgezeichnet und mit dem visuellen Stimulus verglichen.

5.2.6.3. Vestibulo-okulärer Reflex (VOR)

Der vestibulo-okuläre Reflex wird im Dunklen (ohne visuelles Signal) allein durch sinusförmige Rotation (0.2 - 1Hz, 5°) der Maus induziert. Wenn die Rotation der Maus bei Licht durchgeführt wird, spricht man vom visuo-vestibulo-okulären Reflex (VVOR), da die Maus sowohl visuelle, als auch vestibuläre Signale bekommt, um die Ausgleichsbewegung der Augen anzupassen.

5.2.6.4. Lernparadigma

Um eine Adaption der visuo-vestibulären Reflexe zu induzieren wurde die Rotation der Maus (an jedem Tag 0.6 Hz, 5°) mit einem gleichzeitigen visuellen Fehlsignal (ebenfalls mit 0.6 Hz), also einer Rotation des visuellen Feldes, gepaart. Am ersten Tag wurden Maus und Bildschirm in Phase mit gleicher Amplitude (5°) rotiert. Die Maus darf ihre Augen bei Rotation also nicht bewegen, um scharf zu sehen (Gain down training). Am zweiten Tag wurde die Amplitude der Bildschirmrotation auf 7.5°, und an den 3-5 Tagen auf 10° erhöht. Dies führt dazu, dass die Phase der Augenbewegung invertiert werden muss, um ein stabiles Bild zu sehen. Abgesehen von den Trainingseinheiten wurden die Mäuse ständig im Dunklen gehalten.

Nach den Trainingseinheiten wurde die Adaption des VOR getestet, indem die Augenbewegungen der Maus bei Rotation (5°, 0.6 Hz) im Dunklen aufgenommen wurden. Der

Gain wurde als das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Augenbewegung und Stimulus (Rotation der Maus) berechnet. Die Phase wurde als zeitliche Differenz zwischen Augenbewegung und Stimulus (in °) berechnet.

Die Konsolidierung ist der prozentuale Anteil des Gelernten, der am nächsten Tag noch vorliegt. Sie wurde als das Verhältnis zwischen dem Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 2, und der maximalen Änderung während des ersten Tages, also nach

$$Konsolidierung(\%) = 100 \times \frac{Tag1_{Anfang} - Tag2_{Anfang}}{Tag1_{Anfang} - Tag1_{Ende}}$$

berechnet.

6. REFERENZEN

- Albus S (1971) A Theory of Cerebellar Function. *Mathematical Biosciences* 10: 25-61
- Aller MI, Jones A, Merlo D, Paterlini M, Meyer a H, Amtmann U, Brickley SG, Jolin HE, McKenzie a NJ, Monyer H, Farrant M & Wisden W (2003) Cerebellar granule cell Cre recombinase expression. *Genesis* 36: 97-103
- Aller MI, Veale EL, Linden A-M, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W & Brickley SG (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience* 25: 11455-67
- Van Alphen AM, Stahl JS & De Zeeuw CI (2001) The dynamic characteristics of the mouse horizontal vestibulo-ocular and optokinetic response. *Brain research* 890: 296-305
- Andreescu CE, Prestori F, Brandalise F, D'Errico A, De Jeu MTG, Rossi P, Botta L, Kohr G, Perin P, D'Angelo E & De Zeeuw CI (2011) NR2A subunit of the N-methyl d-aspartate receptors are required for potentiation at the mossy fiber to granule cell synapse and vestibulo-cerebellar motor learning. *Neuroscience* 176: 274-283
- Apps R & Garwicz M (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 297-311
- Armano S, Rossi P, Taglietti V & D'Angelo E (2000) Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum. *The Journal of neuroscience* 20: 5208-16
- Bachmann O, Wüchner K, Rossmann H, Leipziger J, Osikowska B, Colledge WH, Ratcliff R, Evans MJ, Gregor M & Seidler U (2003) Expression and regulation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in the normal and CFTR-deficient murine colon. *The Journal of physiology* 549: 525-36
- Balakrishnan V, Becker M, Löhcke S, Nothwang HG, Güresir E & Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *The Journal of neuroscience* 23: 4134-45
- Barski JJ, Dethleffsen K & Meyer M (2000) Cre recombinase expression in cerebellar Purkinje cells. *Genesis* 28: 93-8
- Beg AA & Jorgensen EM (2003) EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nature neuroscience* 6: 1145-52
- 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*. *The EMBO journal* 30: 1852-1863
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 1059-1075
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R & Gaiarsa J-luc (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *Journal of Physiology* 5: 303-325
- Ben-ari Y, Gaiarsa J-luc, Tyzio R & Khazipov R (2007) GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiological Reviews* 87: 1215-1284
- Ben-ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O & Gaiarsa J-luc (1997) GABA A , NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated "ménage à trois." 20: 523-529
- Berglund K & Kuner T (2009) Imaging Synaptic Inhibition in Transgenic Mice Expressing the Chloride Indicator, Clomeleon. *Brain* 35: 207-228
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C & Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61: 820-38
- Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E & Nothwang HG (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *The Journal of neuroscience* 26: 10407-19

- Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeiffer CK, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Volkl H, Hubner CA & Jentsch TJ (2003) Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J* 22: 5422-5434
- Bortone D & Polleux F (2009) KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62: 53-71
- Bowery NG & Smart TG (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British journal of pharmacology* 147 Suppl : S109-19
- Brejck K, Dijk WJV, Klaassen RV, Schuurmans M, Oost JVD, Smit AB & Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411: 269-276
- 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. *The Journal of physiology* 497: 753-9
- Brickley SG, Cull-candy SG & Farrant M (1999) Single-Channel Properties of Synaptic and Extrasynaptic GABA A Receptors Suggest Differential Targeting of Receptor Subtypes. *Journal of Neuroscience* 19: 2960-2973
- Brickley SG & Mody I (2012) Extrasynaptic GABAA Receptors: Their Function in the CNS and Implications for Disease. *Neuron* 73: 23-34
- Brickley SG, Revilla V, Cull-candy SG, Wisden W & Farrant M (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409: 88-92
- Broussard DM, Titley HK, Antflick J & Hampson DR (2011) Motor learning in the VOR: the cerebellar component. *Experimental Brain Research* 210: 451-63
- Burgoyne RD & Cambray-Deakin MA (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Science* 13: 77- 101
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K & Poo M-ming (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *The Journal of neuroscience* 27: 5224-35
- Chalifoux JR & Carter AG (2011) GABAB receptor modulation of synaptic function. *Current opinion in neurobiology* 21: 339-44
- Chamma I, Chevy Q, Poncer JC & Lévi S (2012) Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6: 1-15
- Cherubini E, Gaiarsa JL & Ben-Ari Y (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in neurosciences* 14: 515-9
- Cherubini E, Griguoli M, Safiulina V & Lagostena L (2011) The Depolarizing Action of GABA Controls Early Network Activity in the Developing Hippocampus. *Molecular neurobiology* 43: 97-106
- Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hübner CA, Pellegrino C, Ben-Ari Y & Medina I (2005) Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. *The Journal of physiology* 566: 671-9
- Clayton GH, Owens GC, Wolff JS & Smith RL (1998) Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. *Brain research. Developmental brain research* 109: 281-92
- Crowley JJ, Fioravante D & Regehr WG (2009) Dynamics of fast and slow inhibition from cerebellar golgi cells allow flexible control of synaptic integration. *Neuron* 63: 843-53
- Daigle ND, Carpentier G a, Frenette-Cotton R, Simard MG, Lefoll M-H, Noël M, Caron L, Noël J & Isenring P (2009) Molecular characterization of a human cation-Cl⁻ cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. *Journal of cellular physiology* 220: 680-9
- Delpire E (2000) Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News in physiological sciences* 15: 309-312
- Delpire E, Lu J, England R, Dull C & Thorne T (1999) Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nature genetics* 22: 192-5

- Diaz MR, Wadleigh A, Hughes B a, Woodward JJ & Valenzuela CF (2011) Bestrophin1 Channels are Insensitive to Ethanol and Do not Mediate Tonic GABAergic Currents in Cerebellar Granule Cells. *Frontiers in neuroscience* 5: 148
- Dixon MJ, Gazzard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte B a & Steel KP (1999) Mutation of the Na-K-Cl cotransporter gene Slc12a2 results in deafness in mice. *Human molecular genetics* 8: 1579-84
- Duebel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng G, Augustine GJ, Kuner T & Euler T (2006) Two-photon imaging reveals somatodendritic chloride gradient in retinal ON-type bipolar cells expressing the biosensor Clomeleon. *Neuron* 49: 81-94
- Durand G, Kovalchuk Y & Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381: 71-75
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla D a, Brumback AC, Mathews GC, Benke T a, Delpire E, Jensen FE & Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature medicine* 11: 1205-13
- D'Angelo E (2008) The critical role of Golgi cells in regulating spatio-temporal integration and plasticity at the cerebellum input stage. *Frontiers in neuroscience* 2: 35-46
- D'Angelo E, De Filippi G, Rossi P & Taglietti V (1995) Synaptic excitation of individual rat cerebellar granule cells in situ: evidence for the role of NMDA receptors. *The Journal of physiology* 484: 397-413
- D'Angelo E, Rossi P, Armano S, Taglietti V, Giza J, Urbanski MJ, Prestori F, Bandyopadhyay B, Yam A, Friedrich V, Kelley K & Goldfarb M (1999) Evidence for NMDA and mGlu Receptor-Dependent Long-Term Potentiation of Mossy Fiber – Granule Cell Transmission in Rat Cerebellum. *Journal of Neurophysiology* 81: 277-287
- Eilers J, Plant TD, Marandi N & Konnerth A (2001) GABA-mediated Ca²⁺ signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones. *The Journal of physiology* 536: 429-37
- Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, Hand a R, Flagella M, Shull GE & Melvin JE (2000) Severe impairment of salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 275: 26720-6
- Farrant M & Kaila K (2007) The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Progress in brain research* 160: 59-87
- Farrant M & Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature reviews. Neuroscience* 6: 215-29
- Fisher JL (2004) The alpha 1 and alpha 6 subunit subtypes of the mammalian GABA(A) receptor confer distinct channel gating kinetics. *The Journal of physiology* 561: 433-48
- Fiumelli H, Briner A, Puskarjov M, Blaesse P, Belem BJ, Dayer AG, Kaila K, Martin J-L & Vutskits L (2012) An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spinogenesis In Vivo. *Cerebral cortex*: doi: 10.1093/cercor/bhs027
- Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella R a, Andringa a, Gawenis LR, Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell EL & Shull GE (1999) Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *The Journal of biological chemistry* 274: 26946-55
- Fritschy J-M, Panzanelli P, Kralic JE, Vogt KE & Sassoè-Pognetto M (2006) Differential dependence of axo-dendritic and axo-somatic GABAergic synapses on GABA receptors containing the alpha1 subunit in Purkinje cells. *The Journal of neuroscience* 26: 3245-55
- Gabbiani F, Midtgaard J & Knöpfel T (1994) Synaptic integration in a model of cerebellar granule cells. *Journal of neurophysiology* 72: 999-1009
- Gamba G (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiological reviews* 85: 423-93
- Gao X, Chen G & Van Den Pol AN (1998) GABA-Dependent Firing of Glutamate-Evoked Action Potentials at AMPA / Kainate Receptors in Developing Hypothalamic Neurons. *Journal of Neurophysiology* 79: 716-726

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 15474-9
- Gavrikov KE, Dmitriev AV, Keyser KT & Mangel SC (2003) Cation--chloride cotransporters mediate neural computation in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 16047-52
- Gerelsaikhon T & Turner RJ (2000) Transmembrane topology of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 studied by in vitro translation. *The Journal of biological chemistry* 275: 40471-7
- Glykys J, Mann EO & Mody I (2008) Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *The Journal of neuroscience* 28: 1421-6
- Glykys J & Mody I (2007) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *The Journal of physiology* 582: 1163-78
- Gonzalez-Islas C, Chub N & Wenner P (2009) NKCC1 and AE3 appear to accumulate chloride in embryonic motoneurons. *Journal of neurophysiology* 101: 507-18
- 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. *The European journal of neuroscience* 13: 2205-17
- Gulácsi A, Lee CR, Sík A, Viitanen T, Kaila K, Tepper JM & Freund TF (2003) Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA(A) receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *The Journal of neuroscience* 23: 8237-46
- Hamann M, Rossi DJ & Attwell D (2002) Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron* 33: 625-33
- Hediger M a, Romero MF, Peng J-B, Rolfs A, Takanaga H & Bruford E a (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflügers Archiv*: *European journal of physiology* 447: 465-8
- Hernandes MS & Troncone LRP (2009) Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria)*: 1996) 116: 1551-60
- Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland GR, Vadas M a & Gamble JR (1999) Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *The Journal of biological chemistry* 274: 10661-7
- Hilf RJC & Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452: 375-9
- Hoebek FE, Stahl JS, Van Alphen AM, Schonewille M, Luo C, Rutteman M, Van Den Maagdenberg AMJM, Molenaar PC, Goossens HJLM, Frens MA & De Zeeuw CI (2005) Increased noise level of purkinje cell activities minimizes impact of their modulation during sensorimotor control. *Neuron* 45: 953-65
- 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. *The European journal of neuroscience* 31: 2142-55
- Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, Fan X, Song L, Rivière J-B, Prévost C, Horst J, Simonati A, Lemcke B, Welch R, England R, Zhan FQ, Mercado A, Siesser WB, George AL, McDonald MP, et al (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nature genetics* 32: 384-92
- Huang H, Barakat L, Wang D & Bordey A (2004) Bergmann glial GlyT1 mediates glycine uptake and release in mouse cerebellar slices. *The Journal of physiology* 560: 721-36
- Häusser M & Clark B a (1997) Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19: 665-78
- Hübner CA, Lorke DE & Hermans-Borgmeyer I (2001a) Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. *Mechanisms of development* 102: 267-9

- Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K & Jentsch TJ (2001b) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30: 515-24
- Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA & Malenka RC (1997) Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18: 269-80
- Ito M (2002) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nature reviews. Neuroscience* 3: 896-902
- Ito M & Kano M (1982) Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neuroscience letters* 33: 253-258
- Jacobs S, Ruusuvuori E, Sipilä ST, Haapanen A, Damkier HH, Kurth I, Hentschke M, Schweizer M, Rudhard Y, Laatikainen LM, Tynnelä J, Praetorius J, Voipio J & Hübner CA (2008) Mice with targeted Slc4a10 gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 311-6
- Jang IS, Jeong HJ & Akaike N (2001) Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals. *The Journal of neuroscience* 21: 5962-72
- Jin X, Huguenard JR & Prince DA (2005) Impaired Cl⁻ extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex. *Journal of neurophysiology* 93: 2117-26
- Jones A, Korpi ER, Mckernan RM, Pelz R, Nusser Z, Ma R, Mellor JR & Pollard S (1997) Ligand-Gated Ion Channel Subunit Partnerships: GABA_A Receptor $\alpha 6$ Subunit Gene Inactivation Inhibits δ Subunit Expression. *The Journal of Neuroscience* 17: 1350-1362
- Kaila K (1994) Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 42: 489-537
- Kaila K & Voipio J (1987) Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330: 163-165
- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A & Sato K (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104: 933-46
- Kaneda M, Farrant M & Cull-candy SG (1995) Whole-cell and single-channel currents activated by GABA and glycine in granule cells of the rat cerebellum. *Journal of Physiology (London)* 485: 419-435
- Kassardjian CD, Tan Y-F, Chung J-YJ, Heskin R, Peterson MJ & Broussard DM (2005) The site of a motor memory shift with consolidation. *The Journal of neuroscience* 25: 7979-85
- Kawato M & Gomi H (1992) The cerebellum and VOR/OKR learning models. *Trends in neurosciences* 15: 445-53
- Kessler M, Kiliman B, Humes C & Arai AC (2008) Spontaneous activity in Purkinje cells: multi-electrode recording from organotypic cerebellar slice cultures. *Brain research* 1218: 54-69
- 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 J-L, Ben-Ari Y & Medina J (2011) Enhanced Synaptic Activity and Epileptiform Events in the Embryonic KCC2 Deficient Hippocampus. *Frontiers in cellular neuroscience* 5: 23
- Khiroug 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. *The European journal of neuroscience* 21: 899-904
- Khiroug 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. *The Journal of neuroscience* 28: 4635-9
- Korpi ER, Kuner T, Seeburg PH & Lüddens H (1995) selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gammaaminobutyric acid type A receptor. *Molecular pharmacology* 47: 283-289

- Korpi ER & Lüddens H (1997) Furosemide interactions with brain GABAA receptors. *British journal of pharmacology* 120: 741-8
- Kulik A, Nishimaru H & Ballanyi K (2000) Role of bicarbonate and chloride in GABA- and glycine-induced depolarization and $[Ca^{2+}]_i$ rise in fetal rat motoneurons in situ. *The Journal of neuroscience* 20: 7905-13
- Laurie DJ, Seeburg PH & Wisden W (1992) The distribution of thirteen GABA A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *Journal of Neuroscience* 12: 1063-1076
- Laurie DJ & Wisden W (1992) The Distribution of Thirteen GABA , Receptor Subunit Rat Brain . III . Embryonic and Postnatal Development mRNAs in the. *The Journal of neuroscience* 12: 4151-4172
- Lee HHC, Jurd R & Moss SJ (2010a) Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Molecular and cellular neurosciences* 45: 173-9
- Lee HHC, Walker J, Williams J, Goodier R, Payne J a & Moss S (2007) Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *J. Biol. Chem.* 282: 29777-29784
- Lee S, Yoon B-E, Berglund K, Oh S-J, Park H, Shin H-S, Augustine GJ & Lee CJ (2010b) Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science* 330: 790-796
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y & Khazipov R (1997) Ca^{2+} oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18: 243-55
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF & Dougherty DA (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends in neurosciences* 27: 329-36
- 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: 1019-33
- Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS & Rivera C (2002) Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *European Journal of Neuroscience* 16: 2358-2370
- Liao D & Malinow R (1996) Deficiency in induction but not expression of LTP in hippocampal slices from young rats. *Learning & memory* 3: 138-49
- Liu J, Morrow A L, Devaud L, Grayson DR & Lauder JM (1997) GABAA receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *The Journal of neuroscience* 17: 2420-8
- Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M & Nagy A (1999) Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Developmental biology* 208: 281-92
- Ludwig A, Uvarov P, Soni S, Thomas-Crusells J, Airaksinen MS & Rivera C (2011) Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *The Journal of neuroscience* 31: 644-9
- Luhmann HJ & Prince D a (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *Journal of neurophysiology* 65: 247-63
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews* 84: 1051-95
- Mapelli L, Rossi P, Nieus T & D'Angelo E (2009) Tonic activation of GABAB receptors reduces release probability at inhibitory connections in the cerebellar glomerulus. *Journal of neurophysiology* 101: 3089-99
- Martina M, Royer S, Paré D, Haam J, Popescu IR, Morton LA, Halmos KC, Teruyama R, Tasker JG, Kaufman MT, Churchland MM, Santhanam G, Yu BM, Afshar A, Ryu SI, Shenoy KV, Royer B & Pare D (2001) Cell-Type-Specific GABA Responses and Chloride Homeostasis in the Cortex and Amygdala. *Journal of Neurophysiology* 86: 2887-2895
- Marty A & Llano I (2005) Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends in neurosciences* 28: 284-9

- Mathie A, Clarke CE, Ranatunga KM & Veale EL (2003) What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *Cerebellum* 2: 11-25
- Mercado A, Mount DB & Gamba G (2004) Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochemical research* 29: 17-25
- Mercado A, Vázquez N, Song L, Cortés R, Enck AH, Welch R, Delpire E, Gamba G & Mount DB (2005) NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *American journal of physiology. Renal physiology* 289: 1246-61
- Mikawa S, Wang C, Shu F, Wang T, Fukuda A & Sato K (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. *Developmental Brain Research* 136: 93-100
- Mitchell SJ & Silver RA (2003) Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron* 38: 433-45
- Mittmann W & Häusser M (2007) Linking synaptic plasticity and spike output at excitatory and inhibitory synapses onto cerebellar Purkinje cells. *The Journal of neuroscience* 27: 5559-70
- Mittmann W, Koch U & Häusser M (2005) Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *The Journal of physiology* 563: 369-78
- Mladinić M, Becchetti a, Didelon F, Bradbury a & Cherubini E (1999) Low expression of the ClC-2 chloride channel during postnatal development: a mechanism for the paradoxical depolarizing action of GABA and glycine in the hippocampus. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 266: 1207-13
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B & Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-40
- Mortensen M & Smart TG (2006) Extrasynaptic alphabeta subunit GABA_A receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of physiology* 577: 841-56
- Moss SJ & Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature reviews. Neuroscience* 2: 240-50
- Nakanishi S & Okazawa M (2006) Membrane potential-regulated Ca²⁺ signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *The Journal of physiology* 575: 389-95
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods in enzymology* 207: 123-31
- Nusser Z, Ahmad Z, Tretter V, Fuchs K, Wisden W, Sieghart W & Somogyi P (1999) Alterations in the expression of GABA_A receptor subunits in cerebellar granule cells after the disruption of the alpha6 subunit gene. *European Journal of Neuroscience* 11: 1685-1697
- Obrietan K & Van Den Pol AN (1995) GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *The Journal of neuroscience* 15: 5065-77
- Olsen RW & Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. 60: 243-260
- Owens DF & Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature reviews. Neuroscience* 3: 715-27
- Pace A, Lee E, Athirakul K, Coffman TM, O'Brien D a & Koller BH (2000) Failure of spermatogenesis in mouse lines deficient in the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransporter. *The Journal of clinical investigation* 105: 441-50
- Payne JA (1997) Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺] o regulation. *American Journal Of Physiology* 273: 1516-1525
- Payne JA (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences* 26: 199-206
- Payne JA, Stevenson TJ & Donaldson LF (1996) Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *The Journal of biological chemistry* 271: 16245-52

- Pearson MM, Lu J, Mount DB & Delpire E (2001) Localization of the K(+)-Cl(-) cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience* 103: 481-91
- Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y, Hentschke M, Rune GM, Jentsch TJ & Hübner CA (2009) NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *The Journal of neuroscience* 29: 3419-30
- Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC & Delpire E (1997) Expression of the Na-K2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J. Neurobiol.* 33: 781-795
- Pouille F & Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293: 1159-63
- Price GD & Trussell LO (2006) Estimate of the chloride concentration in a central glutamatergic terminal: a gramicidin perforated-patch study on the calyx of Held. *The Journal of neuroscience* 26: 11432-6
- Pugh JR & Jahr CE (2011) Axonal GABAA Receptors Increase Cerebellar Granule Cell Excitability and Synaptic Activity. *Journal of Neuroscience* 31: 565-574
- Randall J, Thorne T & Delpire E (1997) Partial cloning and characterization of Slc12a2: the gene encoding the secretory Na + -K + -2Cl- cotransporter. *273: 1267-1277*
- Riecki R, Pavlov I, Tornberg J, Lauri SE, Airaksinen MS & Taira T (2008) Altered synaptic dynamics and hippocampal excitability but normal long-term plasticity in mice lacking hyperpolarizing GABA A receptor-mediated inhibition in CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology* 99: 3075-89
- Rinehart J, Maksimova YD, Tanis JE, Stone KL, Hodson C a, Zhang J, Risinger M, Pan W, Wu D, Colangelo CM, Forbush B, Joiner CH, Gulcicek EE, Gallagher PG & Lifton RP (2009) Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell* 138: 525-36
- Rinehart J, Vazquez N, Kahle KT, Hodson CA, Ring AM, Gulcicek EE, Louvi A, Bobadilla NA, Gamba G & Lifton RP (2011) WNK2 is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters. *The Journal of biological chemistry* 286: 30171-30180
- Rinke I, Artmann J & Stein V (2010) ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *The Journal of neuroscience* 30: 4776-86
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvoori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M & Kaila K (1999) The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251-5
- Rossi DJ, Hamann M & Attwell D (2003) Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *The Journal of physiology* 548: 97-110
- Le Rouzic P, Ivanov TR, Stanley PJ, Baudoin FM-H, Chan F, Pinteaux E, Brown PD & Luckman SM (2006) KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain. *Brain research* 1110: 39-45
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 390: 1029-33
- Santhakumar V, Hancher HJ, Wallner M, Olsen RW & Otis TS (2006) Contributions of the GABAA receptor alpha6 subunit to phasic and tonic inhibition revealed by a naturally occurring polymorphism in the alpha6 gene. *The Journal of neuroscience* 26: 3357-64
- Sato Y, Kanda K-ichi & Kawasaki T (1988) Target neurons of floccular middle zone inhibition in medial vestibular nucleus. *Science* 446: 225-235
- De Schutter E & Steuber V (2009) Patterns and pauses in Purkinje cell simple spike trains: experiments, modeling and theory. *Neuroscience* 162: 816-26
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM & Walker MC (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *The Journal of neuroscience* 25: 10016-24

- Shin S-L, Rotter S, Aertsen A & De Schutter E (2007) Stochastic description of complex and simple spike firing in cerebellar Purkinje cells. *The European journal of neuroscience* 25: 785-94
- Simat M, Parpan F & Fritschy J-marc (2007) Heterogeneity of Glycinergic and Gabaergic Interneurons in the Granule Cell Layer of Mouse Cerebellum. *Comparative and General Pharmacology* 83: 71- 83
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M & Barnard E a (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *The Journal of biological chemistry* 279: 41422-35
- Sine SM & Engel AG (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440: 448-55
- Smith GB & Olsen RW (1995) Functional domains of GABAA receptors. *Trends in pharmacological sciences* 16: 162-168
- Sola E, Prestori F, Rossi P, Taglietti V & D'Angelo E (2004) Increased neurotransmitter release during long-term potentiation at mossy fibre-granule cell synapses in rat cerebellum. *The Journal of physiology* 557: 843-61
- Stahl JS, van Alphen a M & De Zeeuw CI (2000) A comparison of video and magnetic search coil recordings of mouse eye movements. *Journal of neuroscience methods* 99: 101-10
- Staley KJ & Mody I (1992) Shunting of Excitatory Input to Dentate Gym Granule Cells by a Depolarizing GABA , Receptor-Mediated Postsynaptic Conductance. 68: 197-212
- Staley KJ, Smith R, Schaack J, Wilcox C & Jentsch TJ (1996) Alteration of GABA Receptor Function Following Gene Transfer of the CLC-2 Chloride Channel. *Neuron* 17: 543-551
- 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. *The Journal of comparative neurology* 468: 57-64
- Stell BM & Mody I (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience* 22: RC223
- Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Tempia F & Cherubini E (1997) A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant GABAergic potentials in developing hippocampus. *The Journal of neuroscience* 17: 1435-46
- Sung K-wug, Kirby M, Mcdonald MP, Lovinger DM & Delpire E (2000) Abnormal GABA A Receptor-Mediated Currents in Dorsal Root Ganglion Neurons Isolated from Na – K – 2Cl Cotransporter Null Mice. *Experimental Brain Research* 20: 7531-7538
- 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: 233-5
- 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: 757-67
- Takayama C & Inoue Y (2007) Developmental localization of potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) in the Purkinje cells of embryonic mouse cerebellum. *Neuroscience research* 57: 322-5
- Tia S, Wang JF, Kotchabhakdi N & Vicini S (1996) Distinct deactivation and desensitization kinetics of recombinant GABAA receptors. *Neuropharmacology* 35: 1375-82
- Tyzio R, Holmes GL, Ben-Ari Y & Khazipov R (2007) Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* 48: 96-105
- Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, Timmusk T, Rivera C & Airaksinen MS (2007) A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *The Journal of biological chemistry* 282: 30570-6
- Verheugen J a, Fricker D & Miles R (1999) Noninvasive measurements of the membrane potential and GABAergic action in hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience* 19: 2546-55

- Vibat CR, Holland MJ, Kang JJ, Putney LK & O'Donnell ME (2001) Quantitation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport splice variants in human tissues using kinetic polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 298: 218-30
- Voogd J & Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends in neurosciences* 21: 370-5
- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A & Sato K (2002) Short communication D developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Developmental Brain Research* 139: 59-66
- Wang CZ, Yano H, Nagashima K & Seino S (2000) The Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. Cloning, tissue distribution, and functional characterization. *The Journal of biological chemistry* 275: 35486-90
- Warmuth S, Zimmermann I & Dutzler R (2009) X-ray structure of the C-terminal domain of a prokaryotic cation-chloride cotransporter. *Structure* 17: 538-46
- Watanabe D, Inokawa H, Hashimoto K, Suzuki N, Kano M, Shigemoto R, Hirano T, Toyama K, Kaneko S & Yokoi M (1998) Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination. *Cell* 95: 17-27
- Watkins CS & Mathie A (1996) A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Physiology* 491: 401-412
- Woo N-S, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, Deutch AY, Lovinger DM & Delpire E (2002) Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 12: 258-68
- Wulff P, Schonewille M, Renzi M, Viltono L, Sassoè-Pognetto M, Badura A, Gao Z, Hoebeek FE, van Dorp S, Wisden W, Farrant M & De Zeeuw CI (2009) Synaptic inhibition of Purkinje cells mediates consolidation of vestibulo-cerebellar motor learning. *Nature Neuroscience* 12: 1042-9
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ & Fukuda A (2004) Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *The Journal of physiology* 557: 829-41
- Yan Y, Dempsey RJ & Sun D (2001) Expression of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. *Brain research* 911: 43-55
- Yevenes GE & Zeilhofer HU (2011) Allosteric modulation of glycine receptors. *British journal of pharmacology* 164: 224-36
- Yoo S, Liu J, Sabbadini M, Au P, Xie G-xi & Yost CS (2009) Regional expression of the anesthetic-activated potassium channel TRESK in the rat nervous system. *Neuroscience letters* 465: 79-84
- De Zeeuw CI, Hoebeek FE, Bosman LWJ, Schonewille M, Witter L & Koekkoek SK (2011) Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum. *Nature reviews. Neuroscience* 12: 327-44
- De Zeeuw CI, Holstege JC, Ruigrok TJ & Voogd J (1989) Ultrastructural study of the GABAergic, cerebellar, and mesodiencephalic innervation of the cat medial accessory olive: anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *The Journal of comparative neurology* 284: 12-35
- Zhang L-L, Pathak HR, Coulter D a, Freed M a & Vardi N (2006) Shift of intracellular chloride concentration in ganglion and amacrine cells of developing mouse retina. *Journal of neurophysiology* 95: 2404-16
- Zhang X, Zhang H & Oberdick J (2002) Conservation of the developmentally regulated dendritic localization of a Purkinje cell-specific mRNA that encodes a G-protein modulator: comparison of rodent and human Pcp2(L7) gene structure and expression. *Brain research. Molecular brain research* 105: 1-10
- Zhou YD, Turner TJ & Dunlap K (2003) Enhanced G protein-dependent modulation of excitatory synaptic transmission in the cerebellum of the Ca²⁺ channel-mutant mouse, tottering. *The Journal of physiology* 547: 497-507
- Zhu L, Lovinger D & Delpire E (2005) Cortical Neurons Lacking KCC2 Expression Show Impaired Regulation of Intracellular Chloride. *Journal of Neurophysiology* 93: 1557-1568

7. PUBLIKATION

Seja, P., Schonewille, M., Spitzmaul, G., Badura, A., Klein, I., Rudhard, Y., Wisden, W., Hübner, C. A., De Zeeuw, C. I., and Jentsch, T. J. (2012). Raising cytosolic Cl⁻ in cerebellar granule cells affects their excitability and vestibulo-ocular learning. *EMBO J.* 31, 1217–1230.

8. DANKSAGUNGEN

Dies ist der vermutlich meistgelesene und für Laien verständlichste Abschnitt der Dissertation. Trotzdem, oder eher gerade deswegen, ist dies auch der Teil, der für mich am Schwierigsten zu schreiben ist.

Zuallererst möchte ich mich bei Thomas Jentsch für die Möglichkeit zu dieser Arbeit und die jahrelange Unterstützung bedanken. Während der Zeit in seinem Labor hatte ich die Freiheit auszuprobieren was mir in den Kopf kam, und die immerwährende Möglichkeit, dies (vorher und nachher) mit Thomas zu diskutieren. Daher hat mir die Arbeit in diesem Labor sehr gut gefallen!

Für die Begutachtung meiner Dissertation möchte ich mich herzlich bei Prof. Stefan Sigrist bedanken.

Bei Guillermo Spitzmaul bedanke ich mich für die Zusammenarbeit an dem Projekt. Auch wenn es zu einigen Zusammenstößen zwischen argentinischem und deutschem Chaos kam war es insgesamt eine lehrreiche, produktive und oft auch lustige Zeit. ¡Muchas gracias!

Bei Martijn Schonewille möchte ich mich für das fachgerechte Rotieren meiner Mäuse bedanken. Steffi Rode danke ich dafür, dass sie meine Mäuse nicht rotiert, sondern statt dessen rundumbetreut und gepflegt hat.

Als ich anfang war Carsten Pfeffer der einzige im Labor, der an Kcc2 arbeitete. Auch wenn nicht direkt in meinem Projekt involviert, so war er stets interessiert und sehr diskussionsfreudig. So gebührt ihm mein Dank für die Einführung in die Welt des Kaliumchloridkotransports.

Balázs Pál hatte stets mindestens drei offene Ohren für elektrophysiologische Fragen. Sein trockener Humor und die Begeisterung für Basteleien und Duftstoffe hat zu einer sehr unterhaltsamen Zeit im Patchraum geführt. Dank ihm weiß ich nun, wonach der „smelliest bug in the world“, Koyotenurin und Kunstbanane riechen (bzw. ein Mix aus allem: „This is REALLY an unpleasant smell!“), und kenne vielfältige Einsatzmöglichkeiten für Sekundenkleber. Köszönöm, Balázs!

Bei meinen Kollegen aus dem „heißesten Büro der Etage“, die bei tropischen Temperaturen mitgelitten haben, möchte ich mich für eine nette und unterhaltsame Atmosphäre bedanken. Gerade Kristin, mit ihrer entwaffnenden Ehrlichkeit und landestypischem Mundwerk, hat mich nicht selten zum Lachen gebracht.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AGs Jentsch und Plested möchte ich mich für eine hilfsbereite und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor Allem bei Anyess für das Genotypisieren von tausenden Mäusen, und Benchnachbarin Janet für generelle Liebeshwürdigkeit und spontane Anleitungen bei dem ganze WetLab-Kram.

Nun zu den Patch-Prinzessinen, Doro und Kathrin: Die Tage, die ich mit euch beiden in der Elektrophysiologie verbrachte haben zu einigen Lach-induzierten Muskelkatern geführt. Auf der Suche nach M-Strömen, GABA_A-Rezeptoren und Minis haben wir gelernt: Die Patchpipette ist essentiell für den Patchvorgang, und Rosinen darin sind gar nicht gut. Ihr beiden habt für sehr viel Spaß bei der Arbeit gesorgt und den täglichen Wahnsinn mit mir geteilt. Ich werde die gemeinsame Zeit mit euch sehr vermissen! Kathrin hatte die Ausdauer, meine komplette Dissertation mit Böhringer-Ingelheim-Rotstift korrekturzulesen, und war immer für Kaffee/Kaltgetränk inklusive Diskussion, ob fach- oder fremd, zu haben. Daher in bestem Holländisch: Dank je well! (oder *Dankjes!*)

Morena und Rubia-2 (aka Ruth und Luiza): Dank euch war die Zeit im Labor (und auch ausserhalb davon) sehr kurzweilig. Wenn Ablenkung, alles in die richtigen Relationen setzen oder ein generelles Frustrablenden nötig war, konnte ich immer auf euch zählen. Und wenn alles nichts mehr half: Raus aus dem Land! Daher *entre nous*: Vielen Dank euch beiden!

Meiner Familie danke ich für Unterstützung während all der Jahre. Ich glänzte oft durch Abwesenheit, und auch wenn ihr's nicht glaubt: Ich weiß schon, wie man ein Telefon bedient! Insgesamt also noch Raum für Verbesserung, denn die Besuche bei euch waren immer eine schöne Ablenkung. Mama und Papa: Euch mag der Ionenstrom an sich suspekt sein, doch trotzdem habt ihr mich immer unterstützt. Dankeschön!

Und zu guter Letzt Jonas: Du warst die letzten Jahre ein relevanter Teil meines Lebens, hast während der heißen "Paper-Phase" und dem finalen Schreiben "des Buches" für Ablenkung und konstante Anwesenheit von Lieblingsnahrungsmitteln gesorgt, mich ständig in den Wahnsinn und zurück getrieben, und mir meine Experimente und Ergebnisse mit Deinen für mich absolut unerwarteten, sehr verschwurbelten Denkweisen einige Male in anderem Licht erscheinen lassen. Oikein paljon kiitoksia kaikesta!