

2 Materialien und Methoden

2.1 Präparation der Hirnschnitte

Als Versuchstiere werden junge bis adulte Wistar Ratten (16-29 Tage alt) verwendet. Nach Induzierung tiefer Narkose mit Halothan oder Isofluran wird die Ratte dekapitiert und das Gehirn durch vorsichtiges Entfernen der Kopfhaut und der Schädeldecke freipräpariert. Zwei Skalpellschnitte legen den okzipitalen Gehirnpol frei: ein caudaler Schnitt trennt das Cerebellum und ein rostraler Schnitt den vorderen Teil des Gehirns ab. Die rostrale Schnittfläche wird anschließend mit Histoacryl auf einen Teflonblock geklebt. Mit Hilfe eines Vibratoms können auf diese Weise koronale Schnitte (300-400 μm) vom visuellen Cortex (Campden Instruments, Loughborough, UK) hergestellt werden. Das Schneiden erfolgt in eiskalter Ringer Lösung⁶. Sie ist mit 5% CO_2 und 95% O_2 gesättigt. Das gewählte Verhältnis zwischen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen der Lösung verringert dabei die Gefahr von Exzitotoxizität und Epilepsie während des Präparierens. Die Hirnschnitte ruhen zunächst 30 Minuten lang in oxygenierter, 37°C warmer Ringer Lösung, damit beschädigtes Gewebe sich von den Schnittflächen ablöst. Anschließend können sie bei Zimmertemperatur bis zu 6 Stunden aufbewahrt werden (Abb. 2-1).

⁶ in mM: NaCl 125, KCl 2.5, NaH_2PO_4 1.25, NaHCO_3 25, CaCl_2 1, MgCl_2 2, glucose 25, pH 7.4

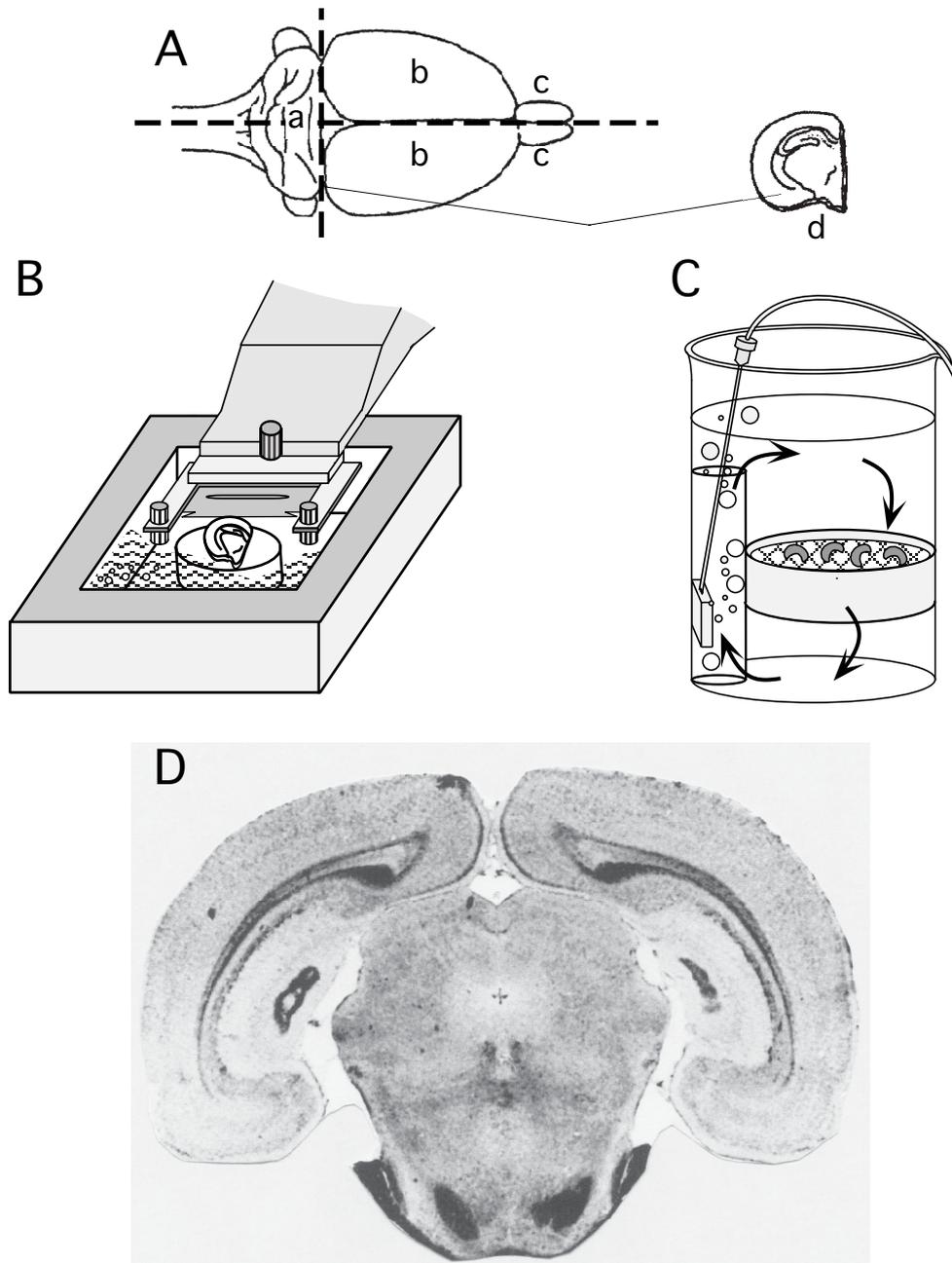


Abbildung 2-1: Schematische Illustration der Präparation von koronalen Hirnschnitten

A Dorsale Ansicht eines freipräparierten Rattengehirns,

a Cerebellum, **b** Hirnhemisphären, **c** Bulbus olfactorius, **d** Herauspräpariertes Hirngewebe.

B Schneidekammer des Vibratoms.

C Aufbewahrungsgefäß und Hirnschnitte.

D Koronale Ansicht des visuellen Cortex.

2.2 Ableitung

2.2.1 Ableitkammer

Nach der Präparation ist eine Ruhezeit von mindestens einer Stunde einzuhalten. Danach wird ein Hirnschnitt in die Ableitkammer plaziert. Er muß dort kontinuierlich mit leicht modifizierter Ringer Lösung⁷ umspült sein. Die Ringer Lösung wird in einem geschlossenen Kreislauf mit 5% CO₂ und 95% O₂ begast. Befördert wird sie von einer peristaltischen Pumpe (Minipuls 3, Gilson®, France) mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min. Eine Heiz-Spirale erwärmt die Lösung unmittelbar vor dem Einlauf in die Ableitkammer auf 35°C (Heiz-Spirale und Heiz-Kontroller, Max-Planck-Institut Werkstatt). Damit der Hirnschnitt trotz der Strömung der Lösung in der Ableitkammer stabil in seiner Lage erhalten bleibt, wird seine Position durch eine u-förmige mit Nylon-Fäden bespannte Platin-Iridium Harfe gefestigt.

2.2.2 Ableitelektroden

Die Ableitelektroden werden aus Borosilikatglas-Kapillaren (GB150F-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (P-87, Sutter Instruments, USA) hergestellt. Im Inneren der Kapillaren befindet sich ein feines Glasfilament. Es erleichtert die direkte anterograde Füllung der Elektrodenspitze. Der Widerstand der Elektroden beläuft sich auf 5 bis 10 MΩ in der Ringer Lösung. Die Zusammensetzung der intrazellulären Lösung⁸ richtet sich nach (Markram et al., 1997). Durch Zusatz von Biocytin⁹ in die intrazelluläre Lösung kann die Zelle immunzytochemisch angefärbt und rekonstruiert werden (siehe unten, Abschnitt 2.6, Charakterisierung von Schicht II/III Pyramidenzellen). Zur Ableitung wird die Kapillare mit intrazellulärer Lösung gefüllt und in den Elektrodenhalter eingespannt. Dort befindet sich am Übergang zwischen elektrischem Strom in der

⁷ in mM: CaCl₂ 2, MgCl₂ 1

⁸ in mM: K-Gluconat 100, KCl 20, ATP-Mg²⁺ 4, Phosphocreatin 10, Na⁺-GTP 0.3, HEPES 10

⁹ oder Neurobiotin 0.5%

Meßapparatur und Ionenstrom in der intrazellulären Lösung ein mit Silberchlorid (AgCl) überzogener Silberdraht.

Da sich die AgCl Schicht verbraucht, wurde der Silberdraht regelmäßig alle 6 Wochen durch Elektrolyse in HCl chloriert. Eine zweite Ag-AgCl Elektrode (Referenz Ag-AgCl Pellet, Science Products, Hofheim, Deutschland) in der Ableitkammer schließt den Stromkreislauf als Übergang zwischen Ionenfluß in der extrazellulären Lösung und Elektronenfluß der Meßapparatur. Da sich die Ionen- und darunter die Cl⁻ Konzentration der intra- und extrazellulären Lösungen unterscheiden (Cl⁻ 20 mM intra-, 133.5 mM extrazellulär) entsteht ein Potentialunterschied¹⁰.

2.2.3 Patch-clamp Ableitung

1981 entwickelten E. Neher und B. Sakmann die *patch-clamp* Ableitungstechnik. Damit revolutionierten sie das Feld der Elektrophysiologie. 1991 wurde ihre Arbeit mit der Vergabe des Nobelpreises für Medizin honoriert. Diese Technik ermöglicht die Auflösung sehr kleiner Membranströme, indem ein hochohmiger Widerstand¹¹ zwischen Glaselektrode und Zellmembran gebildet wird. Dabei entsteht eine elektrische Abdichtung gegen Hintergrundrauschen. Die *patch-clamp* Messung kann an einzelnen Membrankanälen¹² oder an der Gesamtheit aller Membrankanäle durchgeführt werden (Ganzzell-Ableitungen¹³). Alle hier beschriebenen Versuche erfolgten als Ganzzell-Ableitungen.

Grundsätzlich werden zwei Meßmodi unterschieden: der *voltage-clamp* und der *current-clamp* Modus. Im *voltage-clamp* Modus wird die Spannung, die an der Elektrode und folglich an der Zelle anliegt, vorgegeben und konstant gehalten. Gemessen wird der benötigte Strom, um die Spannung auf dem Soll-Wert zu halten. Im *current-clamp* Modus, wird der durch die Elektrode fließende Strom konstant gehalten. Gemessen werden Spannungsänderungen an der Zelle. Alle hier beschriebenen Experimente wurden im *current-clamp* Modus durchgeführt.

¹⁰ *liquid junction potential*, -13.5 mV berechnet mit der Software JP-Calc, P.H. Barry, in Clampex 8., Axon Instruments, USA.

¹¹ im GΩ Bereich, *giga seal*

¹² *cell-attached, inside-out, outside-out patch*

¹³ *whole cell configuration*

2.2.3.1 Ausgangssituation für *patch-clamp* Ableitungen

Zuerst wird die Ableitelektrode in das extrazelluläre Bad plaziert. Die unterschiedliche Ionenzusammensetzung, Ionenbewegung und die Temperatur-Schwankungen bewirken, dass ein Potentialunterschied zwischen intra- und extrazellulären Lösungen auftritt (*offset*). Dieser wird am Verstärker (Axoclamp 2B, Axon Instruments, USA) auf Null ausgeglichen, sodaß kein Strom durch die Elektrode fließt. Wird daraufhin ein Strompuls I durch die Elektrode injiziert, kann der Spannungsabfall U am Elektrodenwiderstand R gemessen werden und R nach der Ohm'schen Regel ($R = U \div I$) berechnet werden. Somit läßt sich der Elektrodenwiderstand durch die Kompensationsschaltung des Verstärkers ausgleichen (*bridge balance*), bevor die Elektrode im Gewebe plaziert wird. Der zur Kompensationskontrolle benutzte Rechteckstrompuls (-510 pA, 100ms) wird weiterhin injiziert, um Widerstandsänderungen zu verfolgen, die sich als Spannungsänderungen am Oszilloskop äußern (Oszilloskop: 5223 Tektronix, Deutschland).

2.2.3.2 *Giga seal* Bildung, Ganzzell-Konfiguration

Der Elektrodenhalter ist so konzipiert, daß Druck auf die Elektrode ausgeübt werden kann (Manometer, Max-Planck-Institut Werkstatt). Während die Elektrode im Gewebe bewegt wird, wird ein leicht positiver Druck (+50 mbar) appliziert. So wird vermieden, daß Neuropil oder totes Zellmaterial an der Elektrodenspitze haften bleibt. Berührt die Elektrodenspitze eine Zelle, erhöht sich der Widerstand. Im *current-clamp* Modus zeigt sich dies an einer schlagartigen Zunahme des Spannungsabfalls. Der positive Druck wird sofort unterbunden. Nun wird durch ein leichtes Ansaugen ein negativer Druck (-50 mbar) auf der Elektrode appliziert. Als Folge davon bildet sich ein hochohmiger Widerstand im Gigaohm-Bereich zwischen Elektrode und Zellmembran (*giga seal*). Durch Halten der Spannung nahe dem Ruhemembranpotential (nahe -70 mV) mittels hyperpolarisierender Strominjektion wird die *giga seal* Bildung unterstützt. Mit fortschreitender Zunahme des Widerstands muß die Amplitude des Rechteckstrompulses von -510 pA auf -110 bis -10 pA verringert werden, um eine zu große Hyperpolarisierung der Zellmembran zu vermeiden. Nachdem ein Widerstand von mindestens 1 G Ω (mindestens -10 mV Spannungsabfall bei einer Injektion von -10 pA) erreicht ist, wird die Membran, die sich unter der Elektrodenspitze befindet, durch kurze kräftige Saugpulse

durchbrochen und der elektrische Zugang zum Zytoplasma gewährleistet (Ganzzell-Konfiguration, Abb. 2-2). Die Kompensation des Serienwiderstandes (Elektrode) wird vor und während des Experiments approximiert (*bridge balance*).

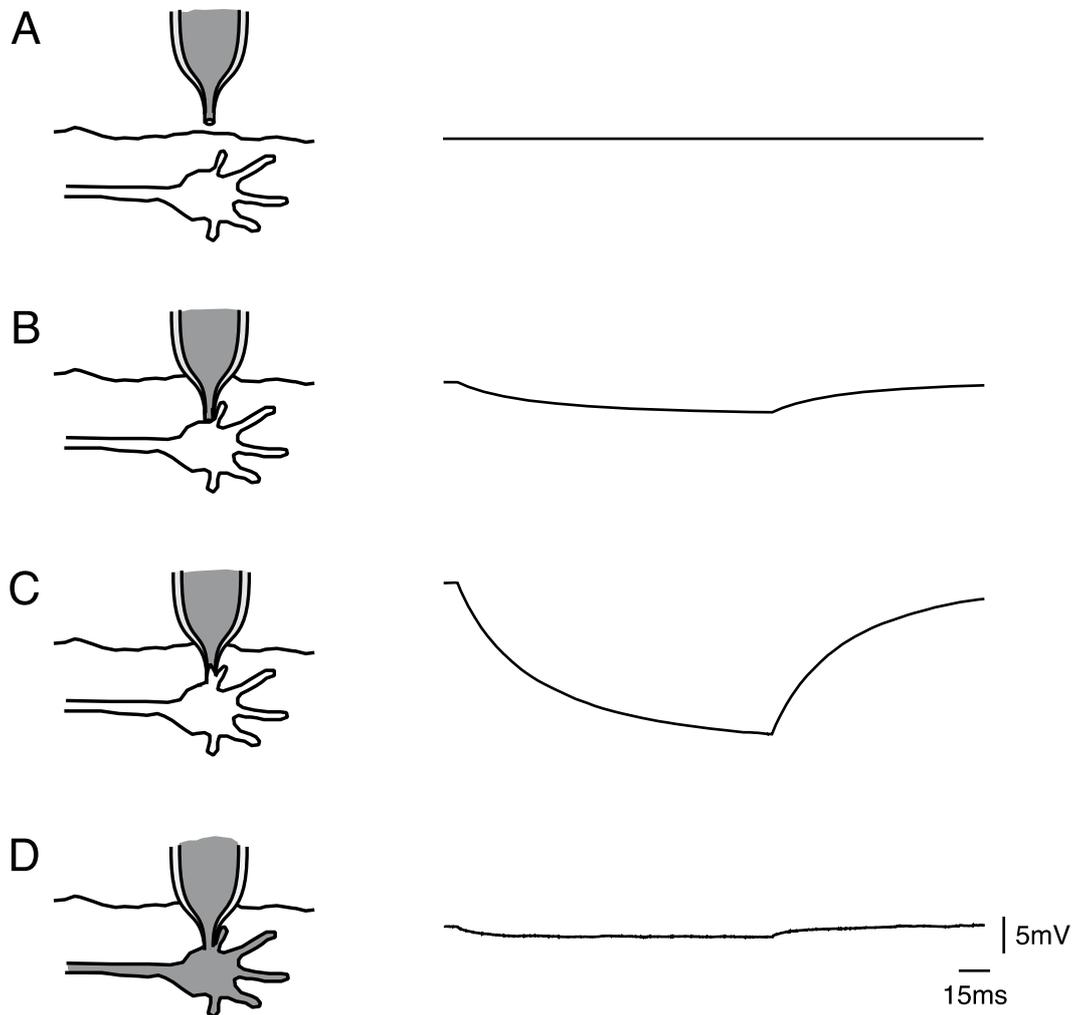


Abbildung 2-2: Schematische Illustration der Ganzzell-Konfiguration

A Die Elektrode befindet sich in der Ringer Lösung außerhalb des Gewebes. Positiver Druck wird auf die Elektrodenspitze appliziert.

B Berührt die Elektrodenspitze die Zellmembran, wird der positive Druck unterbunden. Der Elektrodenwiderstand erhöht sich, was am Spannungsabfall an der Elektrode zu erkennen ist (Strompuls -10 pA).

C Durch leichtes Ansaugen entsteht ein *giga seal* (*cell-attached* Konfiguration).

D Kräftige Saugpulse reißen die Membran unter der Elektrodenspitze und verschaffen einen elektrischen Zugang zu den Membranströmen der ganzen Zelle (Ganzzell-Konfiguration).

2.2.4 Verbindung der Ableitelektrode zur Meßapparatur

Die Ableitelektrode ist durch den Elektrodenhalter am *patch-clamp* Vorverstärker befestigt (Vorverstärker HS2, H=0.1, Axon Instruments, USA). Auch die Referenzelektrode in der Ableitkammer (Ag/AgCl-Pellet, Science Products, Deutschland) ist mit dem Vorverstärker verbunden. Der nachgeschaltete *patch-clamp* Verstärker (Axoclamp 2B, Axon Instruments, USA) liefert ein Strom- (I_m) und ein Spannungssignal ($10V_m$). Das Stromsignal verläuft proportional zum Elektrodenstrom ($I_m = 100 \text{ mV/nA}$). Das Spannungssignal entspricht 10-fach dem Spannungsabfall an der Elektrodenspitze. Beide Signale passieren am Ausgang des Verstärkers einen 3 oder 10 kHz Tiefpaßfilter. Ein zusätzlich eingebauter Nachverstärker (Max-Planck-Institut Werkstatt) ermöglicht das differentielle Amplifizieren der Analogsignale (10-fach für $10V_m$, 50-fach für I_m). Die Signale werden am Oszilloskop (Tektronix 5223 Digitizing Oscilloscope, Oregon, USA) verfolgt und am DAT-Recorder aufgenommen (DTR-1204, Biologic, France). Zur Digitalisierung passieren die Signale einen Analog-Digital-Wandler (Digidata 1200, Axon Instruments, USA), um schließlich mit einer Sampling-Rate von 20 kHz an einem Personalcomputer aufgenommen zu werden (Pentium2, 200 MHz, Software: Clampex Versionen 6.,7. und 8., Axon Instruments, USA). Die Software bietet die Möglichkeit, den Elektrodenstrom zu steuern, Strompulsprogramme zu entwickeln und Triggerpulse für weitere Geräte zu generieren (z.B. für den Stimulusgenerator).

2.3 Reizelektroden

Als Reizelektroden werden konzentrisch bipolare Mikro-Elektroden (Typ MCE-100, Science Products, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Spitze der Reizelektrode verjüngt sich von einem Durchmesser von $150 \mu\text{m}$ (Außenpol) auf $25 \mu\text{m}$ (Innenpol). Zwischen beiden Polen befindet sich eine isolierende Schicht (Epoxyharz). Die Reizelektroden sind durch vorgeschaltete batteriebetriebene Isoliereinheiten (HG203, HI-MED, UK) mit dem Reizpulsgenerator (PC oder Hivotronic HG300G, HIMED, UK) verbunden. An den Isoliereinheiten kann die Reizpulsintensität eingestellt werden (Einstellungsbereich der Spannung 0-30 V).

2.4 Meßaufbau, Vibrationsisolierung, Abschirmung, Erdung

Das Videomikroskop ist auf einer Grundplatte befestigt, welche durch eine ringförmige Vorrichtung die Aufnahme von mehreren Säulen ermöglicht. An einer Säule ist die Ableitkammer angebracht. Drei weitere Säulen dienen der Befestigung von Mikromanipulatoren. Mit Mikromanipulatoren können die Ableit- und Reizelektroden mit feinen und präzisen Bewegungen manuell und elektrisch gesteuert werden (Grundplatte, Säulen und Manipulatoren, Luigs und Neumann, Deutschland). Die Fokusachse des Mikroskops läßt sich ebenfalls manuell und elektrisch bewegen (Luigs and Neumann, Deutschland). Die gesamte Meßapparatur ist vor Vibrationen und Gebäudebewegungen geschützt, da sie auf einem auf schwingungsgedämpften Tisch (T-250, PI Physik Instrumente, Deutschland) steht. Ein Faradayscher Käfig schirmt die Messungen vor elektromagnetischen Einstreuungen ab. Alle anderen Meß- und Steuergeräte (Video-Kontroller, Monitor, Manometer, Temperaturkontroller, Pumpe, Stimulusgenerator, Reiz-Isoliereinheiten, Manipulatorenkontroller, Oszilloskop, Verstärker, Nachverstärker, DAT-Recorder, AD-Wandler und PC) sind außerhalb des Faradayschen Käfig an einem Rack angeordnet. Der Käfigaufbau und der Rackaufbau sind mittels gut abgeschirmten Kabeln miteinander verbunden. Alle elektrisch leitende Gegenstände im Käfigaufbau, die als potentielle Antennen elektromagnetische Störungen einfangen könnten (Metallgegenstände, Perfusionsschläuche), werden sternförmig an einer Kupferleiste verbunden und am Massenpunkt des Verstärkers geerdet.

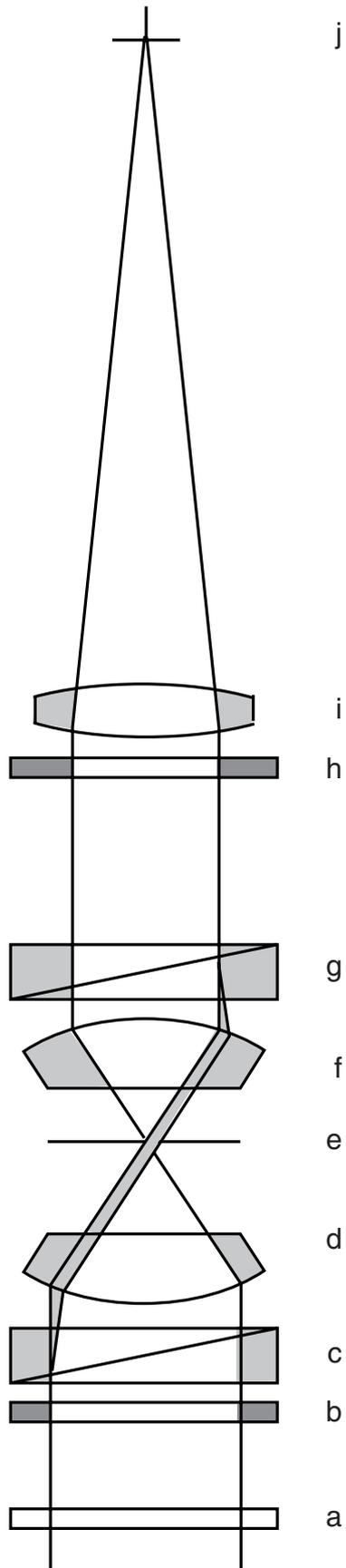
2.5 DIC Mikroskopie

Die Identifizierung der Schicht II/III Pyramiden Zellen wurde mit Hilfe der Infrarot *differential interference contrast* (DIC) Videomikroskopie ermöglicht (Dodt and Zieglansberger, 1990). Das DIC-Mikroskop (aufrechtes Mikroskop: Axioskop, Zeiss, Deutschland) ist wie folgt aufgebaut (Abb. 2-3): Zunächst wird das Licht polarisiert. Zu diesem Zweck befindet sich vor dem Kondensator ein Polfilter (der Polarisator), der nur eine Schwingungsebene des diffusen Lichts durchläßt. Ein zweiter hinter dem Objektiv angebrachter Polfilter (der Analysator) ist im 90°-Winkel zum Polarisator angeordnet. Dadurch ist er undurchlässig für die erst gefilterte Schwingungsebene. Befindet sich nichts zwischen Polarisator und Analysator, kommt kein Licht durch. Wenn aber im Lichtpfad ein Präparat ist, das die Schwingungsrichtung des

polarisierten Lichtes dreht, kann partiell Licht durch den Analysator kommen. Im DIC-Mikroskop befinden sich zusätzlich zwei Prismen zwischen beiden Polfiltern. Das erste Prisma (Kondensorprisma) führt eine vektorielle Teilung des polarisierten Lichtes in zwei senkrecht zueinander stehenden Schwingungsrichtungen durch. Treffen die beiden Teilstrahlen auf unterschiedliche Strukturen im Hirnschnitt (z.B. Zytoplasma versus Nukleus), erfahren sie einen Gangunterschied. Nach Aufhebung der vektoriellen Teilung durch das zweite Prisma hinter dem Objektiv interferieren wiedervereinte, phasenversetzte Teilstrahlen miteinander. Somit werden Gangunterschiede in Lichtintensitätsunterschiede übersetzt. Durch diese Kombination von polarisiertem Licht und DIC-Prismen entsteht ein reliefartiges Bild unterschiedlicher Hirnschnittstrukturen. Eine bessere Auflösung wird durch das Einbringen eines Infrarotfilters (RG 9, Schott, Deutschland) im Lichtpfad zwischen Leuchtfeldblende und DIC-Kondensor erzielt, da das Infrarot-Licht im Gewebe weniger streut als das sichtbare Licht. Optimalerweise wird dafür ein spezielles für Infrarot-Licht durchlässiges Wasserimmersionsobjektiv (IR-Achroplan 40x, 0.80W, Zeiss, Deutschland) verwendet. Das am Mikroskop 400-fach vergrößerte Bild wird durch eine Videokamera (Videokamera und Kamerakontroller: C2400, Hamamatsu, Japan) eingefangen und auf einen Standard Schwarz-Weiß-Monitor projiziert.

Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau der Infrarot-DIC Mikroskops

a Infrarotfilter, **b** Erster Polfilter (Polarisator), **c** Kondensorprisma zur vektoriellen Teilung des polarisierten Lichtes, **d** Kondensor, **e** Fokusebene (Präparatebene), **f** Objektiv, **g** Zweites Prisma zur Aufhebung der vektoriellen Teilung, **h** Zweiter Polfilter (Analysator), **i** Tubuslinse, **j** Okular bzw. Videokamera.



2.6 Charakterisierung von Schicht II/III Pyramidenzellen

Mit Hilfe der DIC-Videomikroskopie lassen sich Pyramidenzellen durch die konische Gestalt ihrer Somata (5-10 μm in Schicht II/III) und die Y-förmige Aufgabelung des Apikaldendrits, der in Schicht I hineinragt, deutlich wiedererkennen (Feldman, 1985). Gesunde Zellen haben eine glatte im Mikroskopbild kontrastarm erscheinende Membran und zeigen keine Anschwellung des Nukleus. Das mikroskopische Bild der Pyramidenzelle kann anhand von charakteristischen elektrophysiologischen Antworten bestätigt werden (Abb. 2-4A). Wird eine Pyramidenzelle depolarisiert, feuert sie relativ langsam in regelmäßigen Abständen (Beispiel in Abb. 2-4A: 10 Hz bei +280 pA Strominjektion). Mit anhaltender Depolarisation (mehrere 100 ms) werden diese Abstände allmählich länger (Frequenz-Akkommodation). Ergänzend zur mikroskopischen und elektrophysiologischen Identifizierung von Pyramidenzellen wird nach der Ableitung die mit Biocytin (oder Neurobiotin) gefüllte Zelle immunzytochemisch rekonstruiert (Abb. 2-4B). Hierdurch werden feine dendritische und axonale Verästelungen sichtbar.

Zwei alternative Markierungsmethoden werden durchgeführt, die DAB- oder die Fluoreszenzmarkierung. Zunächst wird die Ableitelektrode am Ende des Experiments von der Zellmembran vorsichtig abgelöst und der Hirnschnitt für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert.

2.6.1 DAB-Markierung

Diese Markierung beruht auf der von Horikawa and Armstrong (1988) beschriebenen immunhistochemischen Rekonstruktionsmethode. Der fixierte Hirnschnitt wird über Nacht in einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, USA) inkubiert, das mit hoher Affinität Biocytin (bzw. Neurobiotin) bindet. Anschließend wird durch Zusatz von Diaminobenzidinsäure (DAB) und H_2O_2 die Peroxidase-Reaktion eingeleitet. Dabei reagiert DAB mit freigesetztem O_2 und bildet einen braunen Niederschlag. Die Entwicklungsreaktion wird durch Zugabe von Nickel verstärkt. Die DAB-Markierung liefert ein dauerhaftes lichtundurchlässiges Bild der rekonstruierten Zelle.

2.6.2 Fluoreszenzmarkierung

Bei der Fluoreszenzmarkierung wird Biocytin ebenfalls durch Avidin gebunden. Avidin liegt jedoch nicht in einem Peroxidase-Komplex vor, sondern ist direkt an einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert (Alexa Fluor™ 546, Molecular Probes, USA, Beispiel in Abb. 2-4B). Immunfluoreszenzmethoden bieten den Vorteil der mehrfachen Markierung (z.B. Biocytin und GABA-Visualisierung durch konjugiertes Avidin und konjugierte Antikörper). Allerdings verbleicht das fluoreszierende Bild der Zelle und deren Fortsätze nach einigen Wochen bis Monaten.

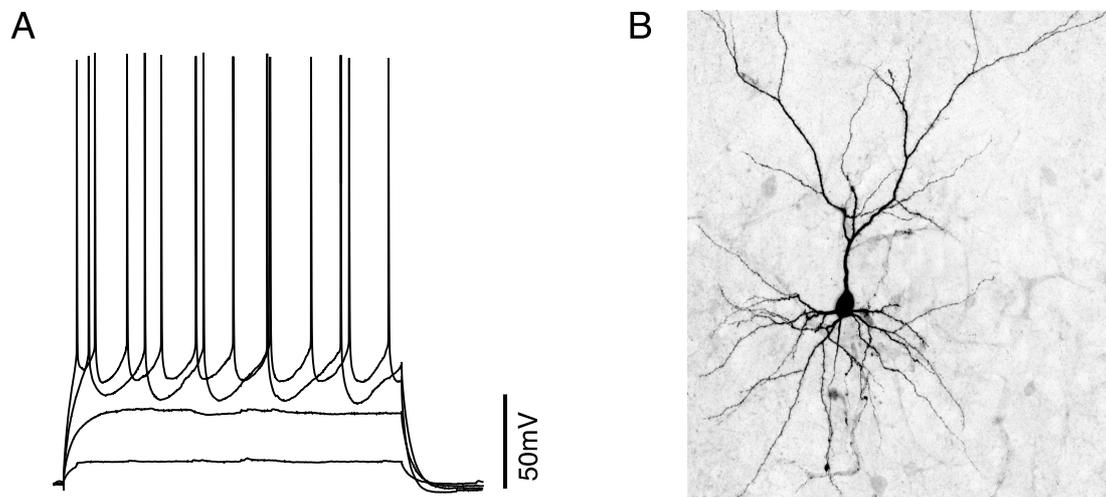


Abbildung 2-4: Charakterisierung von Schicht II/III Pyramidenzellen

A Elektrophysiologische Spannungsantworten einer Schicht II/III Pyramidenzelle auf zunehmende depolarisierende Strominjektion (+40, +120, +200, +280 pA). Charakteristisch sind das regelmäßige AP-Muster und die relativ niedrige, mit anhaltender Depolarisation akkomodierende AP-Frequenz.

B Morphologie einer rekonstruierten Schicht II/III Pyramidenzelle (Fluoreszenz-Markierung).

2.7 Experimentelle Konfiguration

Nach Positionierung der Reizelektrode in Schicht II/III wird intrazellulär (Ganzzell-*current-clamp*) von einer Pyramidenzelle derselben Schicht abgeleitet. In dieser Konfiguration können durch Stimulation horizontaler Afferenzen exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) in der Pyramidenzelle gemessen werden. Um inhibitorische GABAerge Potentiale (IPSPs) zu vermeiden, wurde der Abstand zwischen Reizelektrode und Zelle relativ groß gewählt (0.5 bis 1 mm). Die Reizintensität wird vor Beginn der Experiments so eingestellt, daß sich die EPSP-Amplitude in einem mittleren Wertebereich befindet (circa 3 bis 5 mV). Hierdurch können Amplitudenzunahme und -abnahme gleichermaßen erfaßt werden. Ein Experiment ist in Test-Stimulation, Konditionierung und Test-Stimulation gegliedert.

2.8 Test-Stimulation

Die Test-Stimulation besteht aus 4 Pulsen (Pulslänge 100 μ s, Interpulsintervall 50 ms, Spannungsstärke 2-25 V), welche 4 EPSPs evozieren und alle 10 s wiederholt werden (Abb. 2-5).

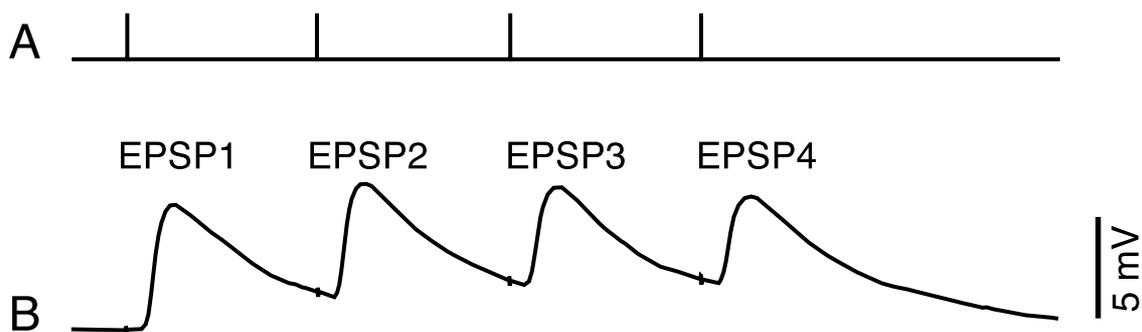


Abbildung 2-5: Test-Stimulation

Vier aufeinander folgende Rechteckpulse (Pulslänge 100 μ s, Interpulsintervall 50 ms, Reizintensität 2 bis 25V) reizen Schicht II/III Afferenzen und evozieren 4 EPSPs in der postsynaptischen Zelle. Die Test-Stimulation wird mit einer Frequenz von 0.01 Hz appliziert.

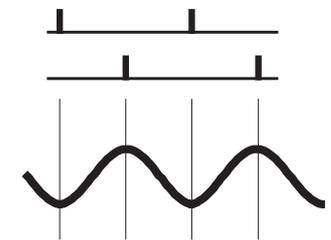
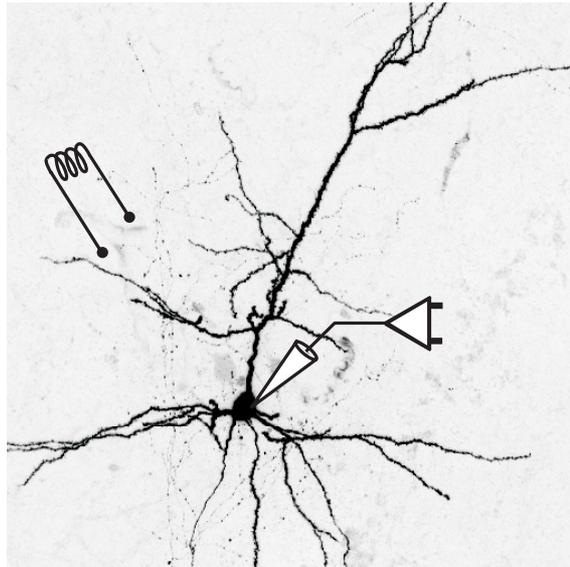
Das Evozieren von vier schnell aufeinanderfolgenden EPSPs anstatt von einem Einzelnen liefert Information über die kinetischen Eigenschaften der untersuchten Synapsen (Markram, Tsodyks, 1996). Nach einer 10 minütigen Test-Stimulation erfolgt die Konditionierung. Anschließend wird die Test-Stimulation mindestens 20 Minuten lang wieder appliziert. Einige Experimente werden mit einer zweiten Reizelektrode in Schicht II/III auf der gegenüberliegenden Seite der Zelle durchgeführt. Der damit aktivierte synaptische Input bleibt unkonditioniert und dient als Kontrolle für die lokale Spezifität der induzierten synaptischen Veränderungen. Die Test-Stimulation wird entweder alle 10 Sekunden am konditionierten Input oder alle 5 Sekunden abwechselnd am konditionierten und unkonditionierten Input oder alle 10 Sekunden in zehner Blöcken abwechselnd am konditionierten und unkonditionierten appliziert. Eventuelle Veränderungen des Serien- und des Membranwiderstands werden während des Experiments überwacht, indem die Spannungsantwort auf einen kurzen hyperpolarisierenden Strompuls regelmäßig gemessen wird (-40 pA, 300 ms, wiederholt alle 2 bis 3 Minuten). Widerstandsschwankungen im Bereich von $\pm 20\%$ werden zugelassen, größere Schwankungen führen zum Abbruch der Ableitung.

2.9 Konditionierungsprotokolle

2.9.1 Oszillationskonditionierung (OSZ-Konditionierung)

Durch intrazelluläre Injektion eines sinuswellenförmigen Stroms wird das Membranpotenzial (V_m) der postsynaptischen Zelle in eine Oszillation von etwa 10 mV Amplitude mit einer Frequenz von 20 Hz (oder 40 Hz) moduliert. Gleichzeitig depolarisiert ein injizierter Gleichstrom die Zelle in die Nähe der Schwelle (-60 mV bis -35 mV), sodaß auf der positiven Phase der Oszillation Aktionspotentiale (APs) ausgelöst werden. Während der Oszillation werden mit einer Frequenz von 20 Hz EPSPs in einem spezifischen Phasenverhältnis zur Oszillation evoziert (Abb. 2-6). Dabei wird zwischen zwei Phasenverhältnissen unterschieden. Entweder werden die EPSPs so evoziert, daß die EPSP-Maxima mit der positiven depolarisierenden Phase der Oszillation und folglich mit APs zusammentreffen (*Peak-Konditionierung*). Oder sie koinzidieren mit der negativen hyperpolarisierenden Phase der Oszillation und sind somit phasenversetzt zu den APs (*Trough-Konditionierung*). *Peak-* und

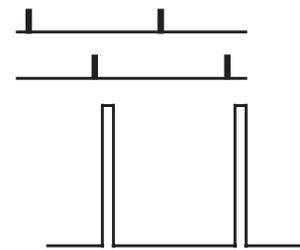
Trough-Konditionierungen erfolgen in 10 oder 20 Blöcken von 10 Oszillationsperioden (10x 10 EPSPs bei 20 Hz; 20x 5 EPSPs bei 40 Hz Oszillationen). Das Zeitintervall zwischen zwei Blöcken beträgt eine Sekunde.



OSZ-Konditionierung



Kontroll-Oszillationen



AP-Konditionierung

Abbildung 2-6: Experimentelle Konfiguration und Konditionierungen

OSZ-Konditionierung: das Membranpotential der postsynaptischen Zelle wird oszillatorisch moduliert (Oszillationsamplitude ± 10 mV, 20 oder 40 Hz), indem von einem depolarisierten Haltepotential (-35 bis -60 mV) ein sinuswellenförmiger Strom injiziert wird. Zu einer spezifischen Phase der Oszillation (Peak oder Trough) werden durch Stimulation in Schicht II/III EPSPs (20 Hz) evoziert.

Kontroll-Oszillationen: oszillatorische V_m Modulation (20 Hz) ohne EPSPs.

AP-Konditionierung: durch kurze depolarisierende Pulse (5 ms, +400 bis +700 pA, 20 Hz) von einem depolarisierten Haltepotential (-55 mV bis -40 mV) werden in der postsynaptischen Zelle APs getriggert. In einem bestimmten Phasenwinkel zu den APs (koinzident versus phasenversetzt) werden durch Stimulation in Schicht II/III EPSPs (20 Hz) evoziert.

2.9.2 Kontroll-Oszillationen (ohne EPSPs)

Im Falle der Kontroll-Oszillationen entsprechen alle Bedingungen denen der OSZ-Konditionierung, es werden jedoch keine EPSPs evoziert (Abb. 2-6).

2.9.3 AP-Konditionierung (ohne Oszillation)

Im Vergleich zur OSZ-Konditionierung werden bei der AP-Konditionierung APs durch kurze depolarisierende Pulse (5 ms, +400 bis +700 pA, 20 Hz) von einem depolarisierten Potential (-55 mV bis -40 mV) in der postsynaptischen Zelle getriggert. Währenddessen werden EPSPs derselben Frequenz (20 Hz) in einem gewählten Phasenwinkel relativ zu den APs evoziert (koinzident mit APs versus phasenversetzt zu APs, Abb. 2-6). Auch hier erfolgt die Konditionierung in 10 Blöcken von 10 APs (10x 10 EPSPs, Interblockintervall 1 Sekunde).

2.10 Evaluierung der synaptischen Plastizität

Für jedes einzelne der 4 EPSPs (Test-Stimulationsantworten) werden die Amplitude, die Steigung der Anstiegsflanke, der Zeitpunkt am Maximum und das Flächenintegral über den Experimentverlauf analysiert (Labview-Routine programmiert von Dr. K. Stiefel). Zur Evaluierung von synaptischen Veränderungen wird als Meßgröße die Amplitude des ersten EPSPs gewählt (EPSP1, siehe Abb. 2-5). Verglichen werden 20 oder 30 Amplituden-Meßwerte 5 Minuten unmittelbar vor und 15-20 Minuten nach der Konditionierung. Die verwendeten statistischen Tests sind sowohl der *Student t-test*¹⁴ als auch der weniger sensitive *Mann-Whitney rank sum test* (MW-test)¹⁵. Eine signifikante Zunahme der EPSP-Amplitude nach der Konditionierung (Signifikanzniveau: $p < 0.05$) wird einer Langzeitpotenzierung (LTP, >115% der Amplitude vor der Konditionierung) zugeordnet. Eine signifikante Abnahme der EPSP-Amplitude wird einer Langzeitdepression (LTD, <85% der Amplitude vor der Konditionierung) zugeordnet. Aufgrund der EPSP-

¹⁴ Voraussetzung: Normalverteilung der Daten

¹⁵ keine zwingende Verteilung vorausgesetzt

Amplitudenvariabilität vor der Konditionierung ($\pm 15\%$) wird das zusätzliche Kriterium $>115\%$ bzw. $<85\%$ für die LTP- bzw. LTD-Einteilung eingeführt.

2.11 Pharmakologie

Alle Pharmaka sind während des ganzen Experiments in der extrazellulären Lösung. In einzelnen Fällen wird das Einwaschen vom Pharmakon über 10 Minuten beobachtet, um eventuelle Veränderungen des V_m , des Membranwiderstands, des APs, der synaptischen Hintergrundsaktivität und/oder der synaptischen Übertragung zu überwachen. Verwendete Pharmaka:

Carbachol (CCH, 5 μM) Carbamylcholin Chlorid, nicht selektiver cholinerges Agonist, von Cholinesterasen nicht abgebaut, Hersteller: Sigma

Gallamin (GAL, 50 μM) Gallamin Triethiodid, präsynaptischer cholinerges Rezeptor Antagonist, Hersteller: Sigma

APV (APV, 50 μM) DL-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure, NMDA-Rezeptor-Antagonist, Hersteller: Sigma

Scopolamin (SCO, 10 μM) (-)-Scopolamin Hydrochlorid, muskarinischer Rezeptor-Antagonist, Hersteller: Sigma

Hexamethonium (HEX, 100 μM) Hexamethonium Chlorid, nikotinischer Rezeptor-Antagonist, Hersteller: Sigma

Isoproterenol (ISO, 10 μM) (\pm)-Isoproterenol Hydrochlorid, β -adrenerger Agonist, erhöht cytoplasmatisches cAMP, Hersteller: Sigma

Um zu sicherzustellen, daß die gemessenen PSPs keine inhibitorischen Komponenten beinhalten, werden in einzelnen Fällen die glutamatergen Rezeptoren am Ende des Experiments durch Co-Applikation von CNQX (20 μM) and APV (50 μM) blockiert.

CNQX (CNQX, 20 μ M) 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dion Disodium, AMPA-Rezeptor Antagonist, Hersteller: Tocris