

**Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker**

**Analyse der Rolle von E-Cadherin
für die Funktion GABAerger Synapsen
mit Hilfe eines konditionalen Knockouts
in kultivierten kortikalen Neuronen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Andreas Clemens Fiederling

2010

Dissertation

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Herr Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf
Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf
Referent: Herr Univ.-Prof. Dr. Kurt Gottmann
Korreferent: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Alfons Schnitzler

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	GABAerge Synapsen	1
1.1.1	Die GABA Rezeptorfamilie	3
1.1.2	Elektrophysiologische Eigenschaften	4
1.2	Das GABAerge System	5
1.2.1	Entwicklung des GABAergen Systems	7
1.3	Zelladhäsionsmoleküle	7
1.3.1	Cadherine	8
1.3.2	E-Cadherin	10
1.3.3	Klassische Cadherine in der Synaptogenese	10
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Lösungen für elektrophysiologische Messungen	13
2.1.1	Extrazellulärelösung	13
2.1.2	Intrazellulärelösung	13
2.1.3	Stimulationselektrolyt	13
2.2	Lösungen zur Zellkultur von Neuronen	14
2.2.1	Neurobasalmedium	14
2.2.2	BME Basalmedium	14
2.2.3	Polyornithin in Boratpuffer	14
2.2.4	Weitere zur Zellkultur notwendige Chemikalien	14
2.3	Neurotoxine	15
2.4	Konditionaler Knockout mit dem Cre-Lox System	15
2.4.1	Die Cre-Rekombinase	16
2.4.2	GVO - Ecad flox	16
2.5	Herstellung von Kulturen kortikaler Neurone auf Poly-L-Ornithin be- schichteten Kulturschalen	17
2.5.1	Poly-L-Ornithin beschichtete Schalen	17
2.5.2	Präparation der Mäuseföten	18
2.6	Transfektion	19
2.6.1	Transfektionschemikalie	19
2.6.2	Vektoren - pBS598 EF1alpha-EGFPcre	19
2.6.3	Vektoren - EGFP-N1	21
2.6.4	Transfektionsvorgehensweise	21
2.7	Elektrophysiologische Untersuchung	22

2.7.1	Das Patch Clamp Experiment	22
2.7.2	Versuchsaufbau	26
2.7.3	Registrierung von postsynaptischen Miniaturströmen	27
2.7.4	Registrierung von evozierten postsynaptischen Strömen	29
2.8	Auswertung und Statistik	31
2.8.1	Auswertung von postsynaptischen Miniaturströmen	31
2.8.2	Auswertung von evozierten postsynaptischen Strömen	32
2.8.3	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Konditionaler E-Cadherin Knockout	34
3.1.1	Auswirkung der creGFP Expression auf Wildtyp Zellen	36
3.2	GABA _A Rezeptor vermittelte mPSCs in E-Cadherin defizienten kortikalen Neuronen	41
3.2.1	GABA _A mPSCs an DIV 7	41
3.2.2	GABA _A mPSCs an DIV 14	46
3.2.3	GABA _A mPSCs an DIV 10 nach Transfektion an DIV 8	52
3.2.4	Zusammenfassung der Effekte auf GABA _A mPSCs	57
3.3	Evozierte GABA _A Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme	59
4	Diskussion	64
4.1	Transfektion	64
4.2	Expression des creGFP Proteins in kortikalen Neuronen	65
4.3	Konditionaler E-Cadherin Knockout in kortikalen Neuronen	66
4.4	Eigenschaften von GABA _A mPSCs im Vergleich mit der Literatur	69
4.5	Evozierte GABA _A PSCs	75
4.6	Auswirkungen des konditionalen Knockouts von E-Cadherin - Modellvorstellung	76
4.7	Ausblick	82
5	Zusammenfassung	83
6	Abkürzungsverzeichnis	84
	Literaturverzeichnis	I
	Danksagung	XIII
	Eidesstattliche Versicherung	XIV

1 Einleitung

1.1 GABAerge Synapsen

Synapsen sind spezialisierte Zellkontakte, die der Übertragung von Signalen, in der Regel Änderungen des Membranpotentials, dienen. Man unterscheidet elektrische von chemischen Synapsen. Bei elektrischen Synapsen beträgt der Abstand zwischen den interagierenden Zellen nur wenige Nanometer. Dieser Spalt wird von Proteinkomplexen überbrückt, den sogenannten Connexonen. Diese bilden zwei Hemikanäle, ein Hemikanal auf jeder Zellseite. Dabei formen 6 Connexin Untereinheiten ein Connexon, welches eine zentrale Pore besitzt (Wei et al., 2004). Connexone bilden eine Verbindung zwischen zwei Zellen, die den direkten Austausch von Ionen (K^+ , Ca^{2+}), Second Messengern (cAMP, cGMP, IP3) und Metaboliten wie Glucose (Mese et al., 2007) ermöglicht.

Die häufigsten Synapsen im Zentralnervensystem (ZNS) von Säugern sind chemische Synapsen. Hierbei gibt es keine direkte cytoplasmatische Verbindung, die Signalübertragung von Zelle zu Zelle erfolgt über Botenstoffe, die Neurotransmitter, sowie entsprechende postsynaptische Rezeptoren. Das Signal (Änderung des Membranpotentials) wird hierbei postsynaptisch durch die Rezeptorfunktion neu generiert. Der Abstand zwischen prä- und postsynaptischer Zelle beträgt bei chemischen Synapsen 20-40 nm. Man unterscheidet die chemischen Synapsen an der Art des verwendeten Neurotransmitters, sowie weiterhin an der Beschaffenheit des postsynaptischen Rezeptors. Die GABAergen Synapsen setzen γ -Amino-Buttersäure (GABA) als Transmitter frei. GABA wird im Neuron durch zwei Isoformen der Glutamat Decarboxylase (GAD) synthetisiert. Die Isoformen GAD65 und GAD67 werden auf zwei unterschiedlichen Genen (Erlander et al., 1991), beim Menschen auf den Chromosomen 2q31 und 10p11.23 kodiert (Bu et al., 1992). Die Enzyme katalysieren die Decarboxylierung von Glutamat zu GABA und CO_2 . Das hierbei nötige Glutamat kann einerseits aus α -Ketoglutarat aus dem Citratcyklus bereitgestellt werden, andererseits aus Glutamin über die Phosphat-aktivierte Glutaminase. Neurone nehmen Glutamin aus Astrozyten auf, welches seinerseits in den Astrozyten aus GABA gewonnen wird: GABA wird im Mitochondrium über die GABA Transaminase in Glutamat und Succinat-Semialdehyd umgesetzt. Glutamat wird im Astrozyten über die Glutamin-Synthase in Glutamin umgewandelt und so in das Neuron transportiert (Soghomonian and Martin, 1998). GABA wird präsynaptisch in intrazellulären Vesikeln gespeichert. Ein Teil der gespeicherten Transmittervesikel dockt an die Membran der aktiven Zone an. Die aktive Zone kann als Teil der Synapse beschrieben werden, an dem vesikuläre Exozytose stattfindet sowie eine hohe Dichte von spannungsgesteuerten

Kalziumkanälen vorliegt. Am Andockvorgang sind beispielsweise die Proteine Syntaxin (ein SNARE Protein), UNC-13 (Hammarlund et al., 2007), Munc18-1 (Gulyas-Kovacs et al., 2007), sowie Rab3a (Coleman et al., 2007) beteiligt. Der nächste Schritt in der Bereitstellung schnell freisetzbarer Vesikel besteht im sogenannten Priming. Bei dem Vorgang des Priming formiert sich der SNARE (soluble NSF attachment protein receptor; NSF, N-ethylmaleimide-sensitive factor) Kernkomplex zwischen angedocktem Vesikel und präsynaptischer Membran. Der SNARE Kernkomplex besteht aus den Proteinen Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP-25 (Sutton et al., 1998). Erst nach dem Priming sind die Transmittervesikel freisetzungskompetent. Die Transmitter enthaltenden Vesikel lassen sich in unterschiedliche Gruppen einteilen: Zunächst den readily releasable pool, die Gesamtmenge der freisetzungskompetenten Vesikel, welche bei Hochfrequenzstimulation exozytiert wird und in etwa der Anzahl an gedockten Vesikeln entspricht. Weiterhin der recycling pool, der bei länger andauernder Stimulation aus dem readily releasable pool sowie einem reserve pool gebildet wird. Weiterhin wird von einem resting pool ausgegangen, welchem die relativ große Anzahl an elektronenmikroskopisch sichtbaren präsynaptischen Transmittervesikeln entspricht, die nicht primär an Exozytosevorgängen beteiligt sind. Bei der Ankunft eines Aktionspotentials an der Präsynapse öffnen sich spannungsgesteuerte Ca^{2+} Kanäle und es kommt zu einem lokal begrenzten Anstieg der Ca^{2+} Konzentration, den sogenannten Ca^{2+} Mikrodomänen. Die Ca^{2+} Ionen interagieren mit Ca^{2+} Sensoren am SNARE Komplex, darunter Synaptotagmin 1 und 2. Dies führt zu einer Fusion der Transmittervesikelmembran mit der anliegenden präsynaptischen Zellmembran und dadurch zu einer schnellen Exozytose des Transmitters. Die Ca^{2+} gesteuerte Exozytose findet nicht deterministisch statt, sondern nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit, der Freisetzungswahrscheinlichkeit (Pr). Selbst ohne Aktionspotential und fehlendem Ca^{2+} Einstrom besitzen freisetzungskompetente Transmittervesikel eine geringe Wahrscheinlichkeit zur Exozytose. Bei der großen Anzahl an Synapsen in Kultur kommt dieses stochastische Ereignis durchaus vor. Der so ausgeschüttete Transmitter bindet regulär an postsynaptische Rezeptoren und führt dort zu einem postsynaptischen Miniaturstrom (mPSC). Die Größe eines postsynaptischen Miniaturstroms entspricht der Rezeptoraktivierung durch ein Transmitterquantum. Bei der regulären Exozytose nach Ankunft eines Aktionspotentials, werden entsprechend mehr Transmitterquanten ausgeschüttet, die Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren führt zu einem postsynaptischen Strom (PSC) der ein Vielfaches größer ist als ein mPSC. Die GABAergen Synapsen gehören zu den Gray II Synapsen und zeigen einen spezialisierten Aufbau (s. Abb. 1).

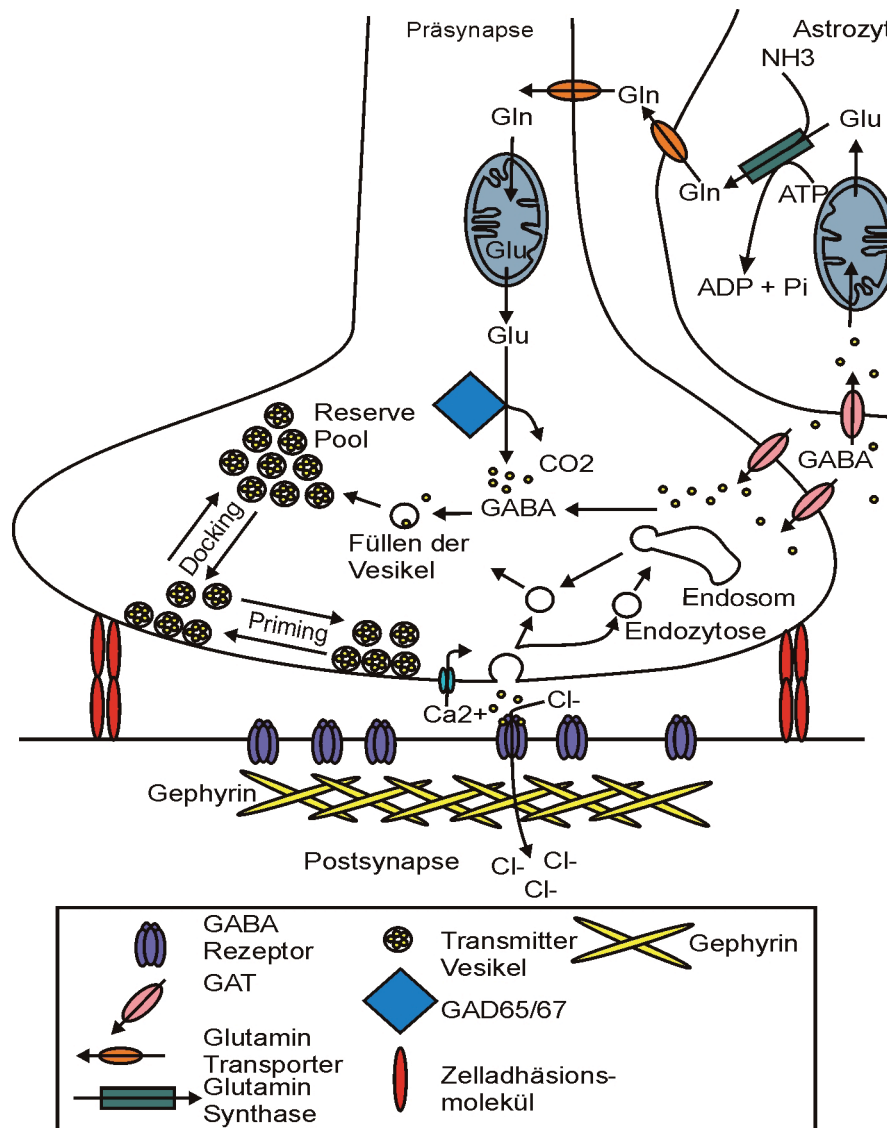


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer GABAergen Synapse. Erläuterungen siehe Text.

1.1.1 Die GABA Rezeptorfamilie

Die Rezeptoren, die GABA als Transmittersubstanz binden, werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: GABA_A , GABA_B und GABA_C Rezeptoren. Der GABA_A Rezeptor ist ionotrop, die Leitfähigkeit für Cl^- Ionen wird durch Binden von GABA an diesem Rezeptor erhöht. Er kommt hauptsächlich postsynaptisch vor und wird dort über das Zytoskelett bindende Protein Gephyrin verankert. Es existieren zahlreiche andere GABA_A Rezeptor assoziierte Proteine (GABARAP), die regulatorische Funktionen ausüben.

Der GABA_B Rezeptor ist ein metabotroper Rezeptor, der zur Signalübermittlung ein heterotrimeres G-Protein besitzt. Der GABA_B Rezeptor kommt präsynaptisch

und postsynaptisch vor und führt zu einem Anstieg der Kaliumleitfähigkeit und einer Reduktion der Kalziumleitfähigkeit. GABA_C Rezeptoren sind ionotrop und vermittelt ebenfalls eine Leitfähigkeitsänderung der Cl⁻ Ionen bei Bindung von GABA. GABA_A Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten, welche sich um eine zentrale Pore arrangieren. Jede Untereinheit besitzt vier Transmembrandomänen sowie eine zytosolische Schleife. Es existiert eine große Heterogenität in der Untereinheitenkomposition. Bislang wurden 19 verschiedene GABA_A Rezeptor Untereinheiten identifiziert, sie werden in die Hauptgruppen α , β , γ , δ , ϵ sowie σ eingeteilt (Nutt, 2006). Die häufigste Komposition besteht aus zwei $\alpha 1$, zwei $\beta 2$ sowie einer $\gamma 2$ Untereinheit. Die Zusammensetzung der Untereinheiten hat Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von Pharmaka, aber auch auf kinetische Parameter der GABAergen synaptischen Übertragung. Beispielsweise wird die sedative, amnestische und antikonvulsive Wirkung von Benzodiazepinen über die im Cerebrum und Cerebellum vorhandene $\alpha 1$ Untereinheit, die Ethanol Sensitivität jedoch über die $\alpha 4$ Untereinheit bevorzugt im Thalamus, Striatum und Gyrus dentatus vermittelt (Michels and Moss, 2007). Die Untereinheitenkomposition hat weiterhin regulatorische Funktion, beispielsweise bindet das GABA_A Rezeptor assoziierte Protein (GABARAP) selektiv an die $\gamma 1$, $\gamma 2S$ und $\gamma 2L$ Untereinheiten (Chen and Olsen, 2007).

1.1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften

Das physiologische Cl⁻ Ionenverhältnis beträgt in der Regel intrazellulär 4 mM zu extrazellulär 120 mM. Dies entspricht einem Verhältnis von 30:1. Das Gleichgewichtspotential errechnet sich aus der Nernst Gleichung und beträgt ≈ -90 mV. Bei einem Membranpotential von -60 mV ergäbe sich eine elektrochemische Triebkraft für Cl⁻ Ionen von +30 mV. Es resultiert also eine Triebkraft für Cl⁻ Ionen in den Intrazellulärraum, deshalb führt die Bindung von GABA an einen GABA_A Rezeptor physiologisch zu einem hyperpolarisierenden Auswärtssstrom. Die Cl⁻ Ionenverteilung ist in der frühen embryonalen Entwicklung noch nicht ausgebildet, da die zur Bildung des Gradienten notwendigen Cl⁻ Transporter KCC-1, 2 und 3 erst später exprimiert werden (Cherubini et al., 1991; Rivera et al., 1999). Dadurch führt an diesem Punkt der Entwicklung die Öffnung von Cl⁻ Kanälen zu einer Depolarisation. Analog dazu kann im Experiment eine beliebige extra- und intrazelluläre Cl⁻ Konzentration gewählt werden. Beispielsweise bei 110,5 mM intrazellulär und 141 mM extrazellulär beträgt das Gleichgewichtspotential -6,45 mV und bei einem Membranpotential von -60 mV würde eine elektrochemische Triebkraft von -53,55 mV resultieren, die bei Öffnung von Cl⁻ Kanälen zu einem depolarisierenden Ausstrom von Cl⁻ -Ionen führt. GABA_A Rezeptoren besitzen Bindungsstellen für Neurosteroid, Benzodia-

zepine und Barbiturate. Bicucullinmethchlorid und Gabazine blockieren selektiv GABA_A Rezeptoren (Michels and Moss, 2007).

1.2 Das GABAerge System

Im zerebralen Kortex der Säugetiere synthetisieren etwa 20 % der Neurone GABA und bilden das sogenannte kortikale GABAerge System, welches inhibitorische Signale vermittelt. GABAerge Zellen bilden lokale Schaltkreise, sie projizieren größtenteils innerhalb einer kortikalen Säule. GABAergen Neuronen werden Funktionen im Bereich der Erregbarkeit, der Integration von Information, der Generation von zeitlicher Synchronität und oszillierender Aktivität glutamaterger Systeme sowie in Entwicklungsprozessen und erfahrungsabhängiger Abstufung lokaler Schaltkreise zugewiesen (McInnes and Michaud, 2007). In den lokalen Schaltkreisen projizieren GABAerge Interneurone sowohl auf Projektionsneurone, auf exzitatorische Interneurone sowie auf andere inhibitorische Interneurone, wobei die von GABAergen Interneuronen gebildeten axo-axonischen Synapsen auf Projektionsneurone eine Besonderheit im zerebralen Kortex darstellen (Somogyi et al., 1998). Das histologische Korrelat des GABAergen Systems besteht zum größten Teil aus Neuronen ohne Dornfortsätze, eine morphologisch, biochemisch und elektrophysiologisch heterogene Gruppe. Die Neurone ohne Dornfortsätze werden von den kortikalen Neuronen mit Dornfortsätzen unterschieden. Als Dornfortsätze bezeichnet man auf Dendriten lokalisierte Fortsätze von 1 µm Durchmesser (Jones and Powell, 1969). Neurone, welche diese Dornfortsätze enthalten, besitzen entweder einen Apikaldendrit und werden als Pyramidenzellen bezeichnet, oder sie besitzen keinen Apikaldendrit und werden als bedornzte Sternzellen bezeichnet. Zellen ohne Dornfortsätze sind zum Beispiel Korbzellen im Zerebellum oder Hippokampus, sowie kortikale Martinotti-Zellen, Kandelaberzellen, Double-bouquet Zellen, Bitufted Zellen und Neurogliaforme Zellen. Es handelt sich bei kortikalen GABAergen Neuronen fast ausschließlich um glatte Interneurone (Ribak, 1978). Diese vermitteln ihre synaptischen Kontakte an ausgewählte subzelluläre Lokalisationen ihrer Zielzelle (Somogyi et al., 1998). Bei Untersuchungen des visuellen Kortex der Katze konnten Somogyi und Cowey zeigen, dass GABAerge Synapsen, welche von Double Bouquet Zellen auf Pyramidenzellen projizieren, subzellulär am distalen Dendriten lokalisiert sind (Somogyi and Cowey, 1981). Diese spezifische subzelluläre Organisation GABAerger Synapsen findet sich bei weiteren inhibitorischen Interneuronen: Kandelaberzellen projizieren mit ihren GABAergen Synapsen auf den Axonhügel von Pyramidenzellen (Somogyi, 1977), Korbzellen vermitteln ihre synaptischen Kontakte vorwiegend am Soma und dem proximalen Teil der Dendriten (Martin and Somogyi, 1983), Martinotti Zellen so-

wie Bitufted Zellen, Neurogliaforme Zellen und Double bouquet Zellen vermitteln ihre inhibitorischen Synapsen auf den Dendritenbaum (Markram, 2004). Aus dieser subzellulären Organisation der GABAergen synaptischen Kontakte resultiert die Fähigkeit der GABAergen Interneurone, bestimmte neuroinformatische Parameter zu beeinflussen: beispielsweise unterdrücken Kandelaberzellen durch ihre inhibitorische synaptische Verbindung mit dem Axonhügel der nachgeschalteten Pyramidenzelle die Generation von Aktionspotentialen und hemmen somit die Weiterleitung der vom Dendriten eingehenden Signale (Huang et al., 2007; Zhu et al., 2004). Korbzellen können weiterhin die Signalstärke der räumlich und zeitlich summierten, vom Dendriten kommenden, Eingangssignale modifizieren, indem sie ihre inhibitorischen Synapsen vorwiegend am proximalen Dendriten sowie am Soma ausbilden (Huang et al., 2007; Miles et al., 1996). Diejenigen Subtypen inhibitorischer Interneurone, welche ihre Synapsen vorwiegend an den distalen Dendriten ausbilden, darunter Martinotti Zellen, Bipolare sowie Bitufted und Double Bouquet Zellen, modifizieren den dendritischen Input und damit verbundene Zellfunktionen. Zur Ausbildung der sogenannten Langzeitpotentierung, einer aktivitätsabhängigen Änderung der synaptischen Übertragungsstärke, ist eine durch Aktivierung ionotroper AMPA Rezeptoren hervorgerufene oder durch retrograde Fortleitung von Aktionspotentialen vermittelte Depolarisation der Postsynapse nötig. Durch die Depolarisation wird der Magnesiumblock der NMDA Rezeptoren aufgehoben und die NMDA Rezeptoren werden durch Glutamat aktiviert (Raymond, 2007). Durch die NMDA Rezeptoren werden nun Prozesse in Gang gesetzt, die zur Langzeitpotentierung führen. Eine GABA vermittelte Hyperpolarisation der Membran kann diese Zellfunktion beeinflussen (Huang et al., 2007). Die verschiedenen Typen kortikaler GABAerger Interneurone unterscheiden sich weiterhin in ihrer kortikalen Topographie: die meisten genannten Interneurone sind in den kortikalen Schichten II bis VI vorhanden, jedoch mit unterschiedlicher Verteilung. Der Anteil der Martinotti Zellen steigt von Schicht II/III bis Schicht VI auf annähernd 50% an (Markram, 2004), wohingegen beispielsweise in Schicht II/III 50% der Interneurone Korbzellen entsprechen, kontinuierlich abnehmend bis Schicht VI. Neben den genannten morphologischen und topographischen Unterschieden verdeutlicht auch die unterschiedliche Expression der Kalzium bindenden Proteine Calbindin, Parvalbumin und Calretinin sowie der Neuropeptide Neuropeptid Y, Vasoactives Intestinales Peptid, Somatostatin sowie Cholecystokinin die Heterogenität der kortikalen Interneurone (DeFelipe, 1993; Markram, 2004).

1.2.1 Entwicklung des GABAergen Systems

Bei Nagern entwickeln sich kortikale GABAerge Interneurone im Subpallium und wandern in ihren späteren Funktionsort, das Pallium, ein. Es existieren grundsätzlich drei große Ursprungsgebiete: Die Mediale ganglionische Eminenz (MGE), die Caudale ganglionische Eminenz (CGE) und die Laterale ganglionische Eminenz (LGE). Die MGE entwickelt sich später zum Globus pallidus, die LGE zum Striatum.

Ein histologischer Nachweis der MGE ist ab dem embryonalen Stadium E10.5 möglich (Sussel et al., 1999). Die Bildung von GABAergen Interneuronen in der MGE ist abhängig von der korrekten Expressierung des Transskriptionsfaktors Nkx2.1 (Marin et al., 2000). Ein Knockout dieses Transskriptionsfaktors führte zu einer Fehlbildung der MGE sowie zu einer signifikanten Reduktion kortikaler Interneurone. Interneurone, die das GABA synthetisierende Enzym GAD67 exprimieren, waren an E18.5 im Vergleich zum Wildtyp um 40% reduziert (Sussel et al., 1999). Marin et al. (2000) konnten anhand von Interneuron-spezifischen Markern zeigen, dass im NKx2.1 knockout Calretinin, Somatostatin, Neuropeptid-Y sowie NO-Synthase positive Interneurone praktisch nichtmehr vorhanden waren. Xu et al. (2004) konnten zeigen, dass Parvalbumin und Somatostatin exprimierende kortikale Interneurone ihren Ursprung in der MGE haben, sowie dass Calretinin exprimierende kortikale Interneurone nicht auf eine korrekte MGE Funktion angewiesen sind. NKx2.1 ist ab E11 in der MGE stark exprimiert (Sussel et al., 1999). Zwischen E11.5 und E14.5 wandern GABA synthetisierende Interneuron-Vorläuferzellen tangential durch die LGE in den zerebralen Kortex aus (Anderson et al., 2001)

Der Beitrag der LGE zu den später im Kortex vorhandenen Interneuronen wird jedoch in der Literatur als geringfügiger eingestuft (Wonders and Anderson, 2006). Die CGE ist ein weiterer wichtiger Ursprungsort für Calretinin positive kortikale Interneurone (Nery et al., 2002).

Ein an humanen embryonalen Hirnschnitten von Letinic et al. (2002) durchgeführtes Experiment wies den Ursprungsort für humane kortikale Interneurone als subventrikuläre Zone des dorsalen Vorderhirnes, sowie die ganglionischen Eminenzen aus.

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (CAM) sind membrangebundene Glykoproteine, welche zwischen zwei aneinanderliegenden Zellen eine nicht kovalente Verbindung vermitteln. Die möglichen Bindungspartner zwischen den Zellen können vom gleichen Typ (ho-

mophil) oder unterschiedlich (heterophil) sein. CAM werden in sämtlichen Geweben von Eumetazoa exprimiert und stellen eine heterogene Gruppe mit einer Vielzahl von Molekülen dar. Die unterschiedlichen Expressionsmuster von CAM während der Entwicklung eines Organismus ist die Vorraussetzung für die Schaffung von unterschiedlich definierten Zellaggregaten und die Bildung von Geweben und Organen. CAM werden auf Zellen unterschiedlich in apikalen und basalen Anteilen verteilt und schaffen so die Vorraussetzung für die Polarität von Geweben. CAM spielen nicht nur bei der Entwicklung unterschiedlicher Organe und Gewebe eine Rolle sondern auch in der regulären Zellfunktion fertig entwickelter Organismen. Beispielsweise wird durch die rein mechanisch definierten Eigenschaften der Zelladhäsion die organische Integrität aufrechterhalten. CAM finden sich beispielsweise in Epithelien, bei der Extravasion von Leukozyten und der Adhäsion von T-Zellen an ihre Zielzellen oder auch in neuronalen Geweben. Die dem Organismus typischen Mechanismen der Zelladhäsion werden von Pathogenen wie Viren oder Bakterien für die Passage der Gewebesbarrieren genutzt. Eine Auswahl von in neuronalem Gewebe vorkommenden CAM umfasst Mitglieder der Immunglobulin Gruppe (Nectin, SynCAM, N-CAM, L1), das Neurexin-Neurologin System sowie ephrin/Eph und die Familie der Cadherine.

1.3.1 Cadherine

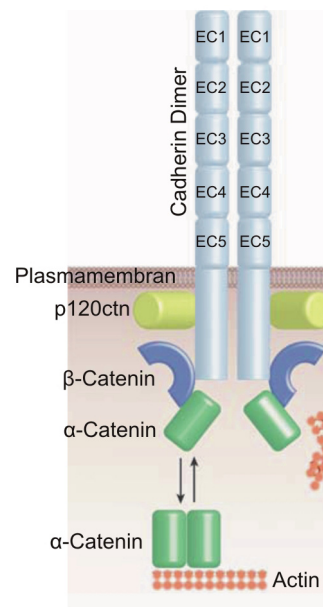


Abbildung 2: Schematische Abbildung eines in die Zellmembran integrierten Cadherin Homodimers. Modifiziert aus Niessen, (2007).

Cadherine werden in klassische Cadherine, Protocadherine und atypische Cadherine unterteilt. Klassische Cadherine bilden zwischen zwei Zellen homophile, Kalzium abhängige Verbindungen aus und bestehen aus einer extrazellulären, einer intrazellulären und einer einzelnen Transmembrandomäne. Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf einzelnen EC (extrazellulären Cadherin) Domänen. Diese besitzen untereinander eine Strukturhomologie von 50 - 60%. Die EC Domänen werden vom N-Terminalen zum C-Terminalen Ende von 1 - 5 durchnummeriert. An den vier Verbindungsstellen der EC Domänen liegen Kalziumbindungsstellen, an die jeweils 3 Kalziumionen gebunden werden können. Eine Kalziumkonzentration von $>0,5$ mM führt zu einer ausreichenden Sättigung der Bindungsstellen sowie zu einer funktionstüchtigen zur Adhäsion fähigen Proteinkonformation. Von den fünf EC Domänen mediert die EC1 Domäne am N-Terminalen Ende die Subtypselektivität der Cadherin-Cadherin Interaktion. Es wird von einem Modell ausgegangen, bei dem ein von der EC1 Domäne ausgehender W2 Arm eines Cadherin Moleküls, in einer passende Seitentasche in einem anderen Cadherinmolekül in der EC1 Domäne, über Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen gehalten wird (Shapiro et al., 2007). Die Intrazelluläre Domäne von klassischen Cadherinen bindet an p120-catenin und β -catenin, α -catenin bindet an β -catenin und vermittelt über die Bindung an Aktin die Verankerung von Cadherinen an das Cytoskelett (Niessen, 2007). Die klassischen Cadherine werden gemeinsam mit β -catenin an die Zelloberfläche gebracht (Bryant and Stow, 2004). β -catenin ist ein integraler Bestandteil des WNT Signalweges. Die klassischen Cadherine lassen sich in Subgruppen einteilen, welche in ihrer Struktur Ähnlichkeiten aufweisen, jedoch in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Beispiele für diese Subgruppen sind N-Cadherin (neuronales Cadherin), E-Cadherin (epitheliales Cadherin), VE-Cadherin (vaskulär-endotheliales Cadherin), P-Cadherin (plazentares Cadherin) oder R-Cadherin (Retinales Cadherin), sämtlich benannt nach dem Gewebe, in dem sie vorwiegend exprimiert werden. Jedoch ist diese vorwiegende Expression nicht als starre Regel zu interpretieren, es existieren durchaus gemischte Expressionsmuster, welche entwicklungsabhängig sein können. Die klassischen Cadherin Subtypen gehen vorwiegend untereinander homophile Bindungen ein, wobei Hinweise auf Kreuzreaktivität mit entsprechend veränderten Bindungsaffinitäten existieren (Leckband and Prakasam, 2006). Cadherin vermittelte Zelladhäsionen werden in neuronalem Gewebe beobachtet. Dort bilden sie an den aktiven Zonen von Synapsen die sogenannten Puncta Adherentia. Den klassischen Cadherinen werden in neuronalem Gewebe Rollen bei der Morphogenese, der Bildung der grauen Substanz, der Migration von neuronalen Zellen, dem Auswachsen und der Zielfindung von Axonen sowie der Synaptogenese und synaptischen Plasti-

zität zugewiesen (Shapiro et al., 2007).

1.3.2 E-Cadherin

E-Cadherin, Synonym die Bezeichnungen Cadherin-1 (Cdh-1) und Uvomorulin, das epitheliale Cadherin, ist an der Entwicklung sämtlicher epithelialer Gewebe beteiligt und wird in allen epithelialen Geweben des adulten Organismus exprimiert. Es spielt dort eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der epithelialen apiko-basalen Polarität. In der Literatur existieren wenige Hinweise auf die Expression von E-Cadherin im Kortex von Säugern. In der CA3 Region im Hippocampus adulter Mäuse konnte E-Cadherin an Dendriten von Pyramidenzellen immunhistochemisch nachgewiesen werden, in einer Immunogoldfärbung war E-Cadherin dort an Puncta Adherentia axo-dendritischer Synapsen nachweisbar (Fannon and Colman, 1996). In der CA1 Region des Hippocampus wurde Immunhistochemisch E-Cadherin nachgewiesen und kolokalisierte dort teilweise mit Synapsin I (Tang et al., 1998). Die E-Cadherin Expression im Ektoderm sistiert in dem Teil, der die Neuralplatte bildet, jedoch gibt es später in neuronalem Gewebe (Mesencephalon, Diencephalon) ein Neuauftreten von E-Cadherin (Shimamura and Takeichi, 1992; Matsunami and Takeichi, 1995). Das GENSAT Projekt (<http://www.gensat.org>) der Rockefeller Universität zeigt eine Expression von E-Cadherin für Neurone im Cerebralen Cortex, Piriformen Cortex, Entorhinalen Cotex, Hippocampus, Amygdala und Cerebellum in adulten Mäusen (GENSAT, 2008). Die Funktion von E-Cadherin in neuronalem Gewebe ist bislang wenig untersucht worden. Beispielsweise konnte durch Blockade der E-Cadherin Adhäsion durch Antikörper an hippocampalen Neuronen der CA1 Region eine Reduktion der Langzeitpotentierungseffekte nach Hoch- oder Niederfrequenzstimulation der Schaffer-Kollateralen gezeigt werden (Tang et al., 1998).

1.3.3 Klassische Cadherine in der Synaptogenese

Während der Synaptogenese werden die korrekten Verbindungen angelegt, die im reifen Gehirn funktionelle Schaltkreise innerhalb aber auch zwischen einzelnen Regionen bilden. Die Cadherine bilden eine Gruppe von Molekülen, von der vermutet wird, dass sie zur Bildung dieser spezialisierten Schaltkreise beitragen. Es wird vermutet, dass die Beschränkung von einzelnen Cadherin Subtypen auf bestimmte Faserbündel, Schaltkreise oder sogar Synapsen eine Art Zelladhäsionsschema bildet. Bereits beim ersten Schritt der Entwicklung des Zentralnervensystems, der Neurulation, beginnt eine Beschränkung auf Cadherinsubtypen. Bei der Neurulation findet ein Wechsel von E-Cadherin zu N-Cadherin statt (Shimamura and Takeichi, 1992; Matsunami and Takeichi, 1995). Die Zellen der frühen Neuralleiste weisen ein

weiteres Cadherin auf, Cadherin-6B (Nakagawa and Takeichi, 1995). Während der weiteren Entwicklung des murinen ZNS wird Cadherin-6 im Rautenhirn exprimiert (Inoue et al., 1997a). Die Area pretectalis sowie der dorsale Thalamus weisen ebenfalls ein bestimmtes Cadherin Expressionsmuster auf (Redies et al., 2000). Während der Bildung der grauen Substanz findet eine Sortierung von Neuronen in der Mantelschicht aufgrund unterschiedlicher Cadherin Expression statt, bestimmte Kerngebiete weisen ebenfalls charakteristische Cadherin Muster auf (Korematsu et al., 1997; Yoon et al., 2000). Unterschiedliche Cadherin Expression ist ebenfalls innerhalb von funktionellen Regionen im Kortex von Mäusen nachweisbar (Redies et al., 1993a). Das Muster der Cadherin Expression ist sogar auf bestimmte Faserverbindungen ausweitbar: beispielsweise werden im Tektum des Huhns vier verschiedene Cadherine, N-Cadherin, R-Cadherin, Cadherin-6B und Cadherin-7, in unterschiedlichen Projektionsneuronen exprimiert, die wiederum nach Cadherinexpression sortierte Faserverbindungen zu Regionen ausbilden, die ihr exprimiertes Cadherin enthalten (Redies et al., 1993b, Woehr et al., 1999). Selbst auf synaptischer Ebene ist eine funktionelle Differenzierung aufgrund des Cadherin Expressionsmusters erkennbar: N-Cadherin und E-Cadherin als Puncta Adherentia an hippocampalen Neuronen in der CA3 Region von Mäusen (Fannon and Colman, 1996), N- und R-Cadherin an Synapsen im optischen Tectum des Huhns (Miskevich et al., 1998) sowie Cadherin-7 und R-Cadherin an Synapsen im sich entwickelnden Cerebellum des Huhns (Arndt et al., 1998). Bei der Synaptogenese müssen die Axone weite Strecken durch unterschiedliche Umgebungen zurücklegen um ihr Ziel mit subzellulärer Genauigkeit zu erreichen. Es wird in der Literatur von einem mehrstufigen Modell ausgegangen: vom Ziel sezernierte Faktoren führen zunächst zu einer chemotaktischen Attraktion des Axons in die Nähe der Zielzelle, darunter Netrine, Semaphorine und ephrinA (Bagri et al., 2002; Pascual et al., 2004; Tessier-Lavigne, 1995). Es wird vermutet, dass Zelladhäsionsmoleküle nun zu einer Sortierung der wachsenden Axone sowie zu einer zielspezifischen Adhäsion und Ausbildung einer frühen Synapse führen. Diese frühe Zelladhäsion muss dann zu einer funktionalen Synapse ausreifen, daran sind an glutamatergen Synapsen beispielsweise Faktoren wie Narp und Ephrin beteiligt (Dalva et al., 2000).

1.4 Ziele der Arbeit

Das Zustandekommen der komplexen Organisation der kortikalen Schaltkreise ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Die subzelluläre Genauigkeit, mit der verschiedene Neurone ihr Ziel erreichen, ein erstaunliches Phänomen. Es wird vermutet, dass Zelladhäsionsmoleküle einen Code darstellen, anhand dessen die korrekte

Verschaltung erfolgen kann. Eine Störung der korrekten Funktion GABAerger Systeme wird beispielsweise bei Epilepsie, Angststörungen oder Schizophrenie vermutet (Wong et al., 2003).

Zelladhäsionsmoleküle sind in den weiteren Organen an der Entwicklung einer funktionalen Integrität sowie Gewebepolarität beteiligt und werden entwicklungspezifisch exprimiert. Für einige Zelladhäsionsmoleküle konnte bereits eine Funktion bei der Synaptogenese aufgezeigt werden (Paradis et al., 2007; Ango et al., 2005; Inoue et al., 1997b; Togashi et al., 2002). Die Ausbildung exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen stellt bei der Synaptogenese einen Vorgang dar, der über die Funktion der Verschaltungen entscheidend ist. Hinweise, dass N-Cadherin an glutamatergen Synapsen exprimiert wird, jedoch ein oder mehrere weitere Cadherine an GABAergen Synapsen (Benson and Tanaka, 1998), ließen die Hypothese entstehen, dass E-Cadherin eine solche Funktion als zur GABAergen Synaptogenese notwendiges Zelladhäsionsmolekül haben könnte. Ein Knockout des E-Cadherin Gens in Neuronen würde es ermöglichen, diese Hypothese zu untersuchen. Aufgrund der frühen embryonalen Lethalität von E-Cadherin Knockout-Mäusen, wurde der konditionale Knockout von E-Cadherin als in-vitro Versuch an primär kultivierten kortikalen Neuronen als Alternative gewählt. Ziel der Arbeit war es, zu analysieren, ob E-Cadherin an GABAergen Synapsen in Kultur kortikaler Neurone eine Rolle bei der Ausbildung und Reifung der synaptischen Funktion besitzt. Hierfür wurde in einem ersten Ansatz der konditionale Knockout von E-Cadherin in drei Reifungsgraden und drei unterschiedlichen Expressionszeiträumen durchgeführt und jeweils die Eigenschaften von GABAergen, postsynaptischen Miniaturströmen über Patch-Clamp Experimente untersucht. Dies lieferte Hinweise über Veränderungen prä- und postsynaptischer Parameter. Um einen möglichen Effekt besser bestimmten prä- oder postsynaptischen Eigenschaften zuordnen zu können, wurde ein zweiter Ansatz durchgeführt, bei der E-Cadherin exprimierende und defiziente Neurone extrazellulär stimuliert wurden. Hierbei wurden evozierte postsynaptische Ströme über Patch-Clamp Experimente registriert und analysiert.

2 Materialien und Methoden

2.1 Lösungen für elektrophysiologische Messungen

2.1.1 Extrazellulärelösung

NaCl	130 mM	J.T. Baker; Cat. No. 0278
KCl	5 mM	Sigma-Aldrich; Cat. No. 31248
CaCl ₂	2 mM	Sigma-Aldrich; Cat. No. 12074
MgCl ₂	1 mM	J.T. Baker; Cat. No. 0163
HEPES	20 mM	AppliChem GmbH; Cat. No. 7365-45-9

pH = 7,3 eingestellt mit NaOH

Osmolarität 300 mosmol

2.1.2 Intrazellulärelösung

KCl	110 mM	Sigma-Aldrich; Cat. No. 31248
CaCl ₂	0,25 mM	Sigma-Aldrich; Cat. No. 12074
EGTA	10 mM	Serva; Cat. No. 11290
HEPES	20 mM	AppliChem GmbH; Cat. No. 7365-45-9

pH=7,3 eingestellt mit KOH

Osmolarität 290 mosmol

2.1.3 Stimulationselektrolyt

Extrazellulärelösung

NaCl	1 M
------	-----

Im Verhältnis 1 : 1 gemischt

2.2 Lösungen zur Zellkultur von Neuronen

2.2.1 Neurobasalmedium

Neurobasal Medi- um	500 ml	Gibco; Cat. No. 21103-049
B27	2%	Gibco; Cat. No. 17504-044
Glutamax	1 mM	Gibco; Cat. No. 35050-038
Penicillin	100 U/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
Streptomycin	100 µg/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122

2.2.2 BME Basalmedium

BME Medium	500 ml	Gibco; Cat. No. 21370-028
FBS (hintzeinakti- viert)	10%	Gibco; Cat. No. 10500-064
Glucose 40%	20 mM	J.T. Baker; Cat. No. 0114
Insulin- Transferrin- Selenium-A	6,5 µM	Gibco; Cat. No. 5130-044
Penicillin	100 U/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
Streptomycin	100 µg/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
L-Glutamin	2 mM	Gibco; Cat. No. 25030-024

2.2.3 Polyornithin in Boratpuffer

Boratpuffer:

Boric Acid	0,15 M	Sigma; Cat. No. 083K0055
NaOH		Aldrich; Cat. No. 22,146-5

Auf pH 8,35 mit NaOH puffern, 40mg Poly-L-Ornithin in 40 ml des so hergestellten Boratpuffers lösen

2.2.4 Weitere zur Zellkultur notwendige Chemikalien

Trypsin	Gibco; Cat. No. 25050-014
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich; Cat. No. P-3655
PBS Dulbecco's Phosphatbuffered Saline	Gibco; Cat. No. 14040-091
Cytosin- β -D-Arabinofuranosid- hydrochlorid (ARA-C)	Sigma-Aldrich; Cat. No. C-6645

2.3 Neurotoxine

Tetrodotoxin	1 μ M	Tocris; Cat. No. 1078
DNQX	20 μ M	Tocris; Cat. No. 0189
Gabazine	7,5 μ M	Tocris; Cat. No. 1262
QX314	10 mM	Tocris ; Cat. No. 2313

2.4 Konditionaler Knockout mit dem Cre-Lox System

Der Vorteil der Cre-Lox Methode besteht darin, Knockouts von Genen durchführen zu können, welche im Gesamtorganismus lethal wären. Beispielsweise führt der Knockout von E-Cadherin im Gesamtorganismus zum Absterben der Embryonen zum Zeitpunkt der Implantation, was durch die fehlerhafte Anlage des Trophekto-derms bedingt ist (Larue et al., 1994). Es handelt sich beim Cre-Lox System um einen konditionalen Knockout, d.h. das Ausschalten des Gens ist an bestimmte Bedingungen geknüpft, die der Experimentator zum geeigneten Zeitpunkt setzen kann. Hierbei entspricht die Genexpression bei fehlenden Knockoutbedingungen dem Wildttyp. Beim Cre-Lox System müssen zwei Bedingungen gegeben sein: Zum einen wird ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO) benötigt, der in dem auszuschaltenden Gen modifiziert sein muss. Hierzu werden in intronische Sequenzen eines Gens spezielle, 34 bp lange Erkennungssequenzen eingefügt, die sogenannten loxP (locus of X-over of P1) Stellen. GVO's, die loxP Stellen in einem bestimmten Gen besitzen, werden als gefloxt - flankiert von loxP Stellen - für das jeweilige Gen bezeichnet. Da beim Cre-Lox System keine Gensequenzen als Ganzes herausgetrennt werden können, werden vom Zielgen bestimmte kritische Exonsequenzen herausgetrennt. Diese Exone müssen von 2 loxP Stellen gleicher Strangorientierung flankiert werden. Das Einbringen der loxP Stellen erfolgt über Transfektion eines loxP Überträgervektors in R1 embryonale Stammzellen sowie folgender Selektion und Sequenzanalyse. Die Anwesenheit der loxP Stellen in den intronischen Sequenzen lässt eine weitestgehend normale Expressierung des Zielgens zu. Die zweite Bedingung, die für den Knockout gegeben sein muss, ist das Vorhandensein der Cre-Rekombinase (Cre). Cre ist eine Rekombinase aus der Familie der Tyrosin Rekombinasen und erkennt loxP Stellen als Rekombinationssignal. Bei Vorhandensein von zwei loxP Stellen gleicher Strangorientierung wird die Sequenz zwischen den loxP Stellen aus dem Genom herausgetrennt und zu einem Ringförmigen DNS-Konstrukt, welches eine der beiden loxP Stellen enthält, kovalent zusammengefügt. Haben die beiden loxP Stellen eine gegensätzliche Strangorientierung erfolgt lediglich eine Inversion des betreffenden Genabschnittes. Bei dem konditionalen Knockout macht man sich die Exzision der exonischen Sequenzen zwischen zwei gleichartig orientierten loxP Stellen zunutze.

Die Anwesenheit der Cre-Rekombinase ist hier die vom Experimentator zu setzende Bedingung: Cre kann einerseits über Transfektion eines Plasmides in Zellkulturen exprimiert werden und dort zum Knockout führen. Andererseits besteht die Möglichkeit, gefloxt Tiere mit transgenen Cre-Mäusen zu kreuzen. Diese exprimieren die Cre-Rekombinase unter einem gewebespezifischen Promotor. Bei den Abkömmlingen ist nun Gewebespezifisch ein Knockout vorhanden. Bei der Transfektion von Zellkulturen gefloxter Tiere mit der Cre-Rekombinase entsteht bedingt durch geringe Transfektionsraten eine heterogene Kultur, bei der gleichartige Zellen mit und ohne Knockout nebeneinander vorhanden sind.

2.4.1 Die Cre-Rekombinase

Die Cre-Rekombinase findet sich im Bakteriophagen P1 und wird dort bei der Zyklierung der Virion-DNS sowie dem lysogenen Zyklus benötigt (Sternberg et al., 1986). Es handelt sich bei der Cre-Rekombinase um ein 38-kDa Protein aus 343 Aminosäuren. Das Protein besitzt eine Kern-Lokalisierungs-Sequenz (NLS), gelangt also nicht durch Diffusion, sondern durch aktiven, energieabhängigen Prozess in den Zellkern (Le et al., 1999a). Im Zellkern lokalisiert erkennt Cre die beiden gleichartig orientierten loxP Stellen auf Chromosomen gentechnisch modifizierter, eukaryotischer Zellen und führt dort zu einer exzisen Rekombination. Hierfür binden an jede loxP Stelle 2 Cre Moleküle und bilden dort je einen Cre-DNS Komplex. Die Cre-DNS Komplexe beider loxP Stellen lagern sich einander an und bilden ein Cre-DNS Dimer, an dem 4 Cre Moleküle beteiligt sind (Ghosh et al., 2007). Das Anlagern der Cre-Rekombinase an die DNS ist nicht Abhängig von divalenten Kationen, jedoch vom pH Wert und erfolgt mit einer hohen Affinität (Ghosh et al., 2007). Die Rekombination erfolgt für die DNS Doppelstränge getrennt unter Ausbildung einer intermediären Holliday-junction. Im katalytischen Zentrum der Rekombinase befindet sich ein nucleophiles Tyrosinmolekül. Für die Rekombination werden kovalente DNS-Cre-Protein-Phosphotyrosin Bindungen als Übergangsstadium ausgebildet und es findet ein Strangaustausch statt (Grindley et al., 2006). Die Rekombinationseffektivität von geflochten, mit cre transfizierten Zellen, wird in der Literatur mit 80-100 % angegeben (Sauer, 1998).

2.4.2 GVO - Ecad flox

Als Grundlage der Arbeit diente ein gentechnisch veränderter Mäusestamm. Es handelt sich um den homozygoten Ecad flox Stamm. Dieser wurde uns freundlicherweise aus dem Max-Planck Institut für Immunbiologie in Freiburg, Abteilung molekulare Embryologie, von Prof. R. Kemler zur Verfügung gestellt. Bei dem dort hergestellten

GVO sind die loxP Stellen in intronische Sequenzen des E-Cadherin Gens eingefügt worden (Boussadia et al., 2002). Die loxP Stellen befinden sich vor Exon 6 und hinter Exon 10 (s.Abb 3). Dieser Genotyp wird als Ecad flox bezeichnet. Die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des betreffenden Genabschnitts führt zu einem Genotyp bei dem die Exone 6 bis 10 fehlen. Der dadurch resultierende Genotyp wird als Ecad flox-del bezeichnet. Da die vorliegenden Tiere homozygot für das Allel Ecad flox gezüchtet sind, resultiert ein homozygoter Ecad flox-del Genotyp in mit der Cre-Rekombinase transfizierten Zellen. Es handelt sich dabei um ein Nullallel mit Nachweisbarkeit einer fehlenden E-Cadherin Expression (Boussadia et al., 2002). Der Ecad flox Stamm trägt die Tierversuchsanstalt Nummer 1162.

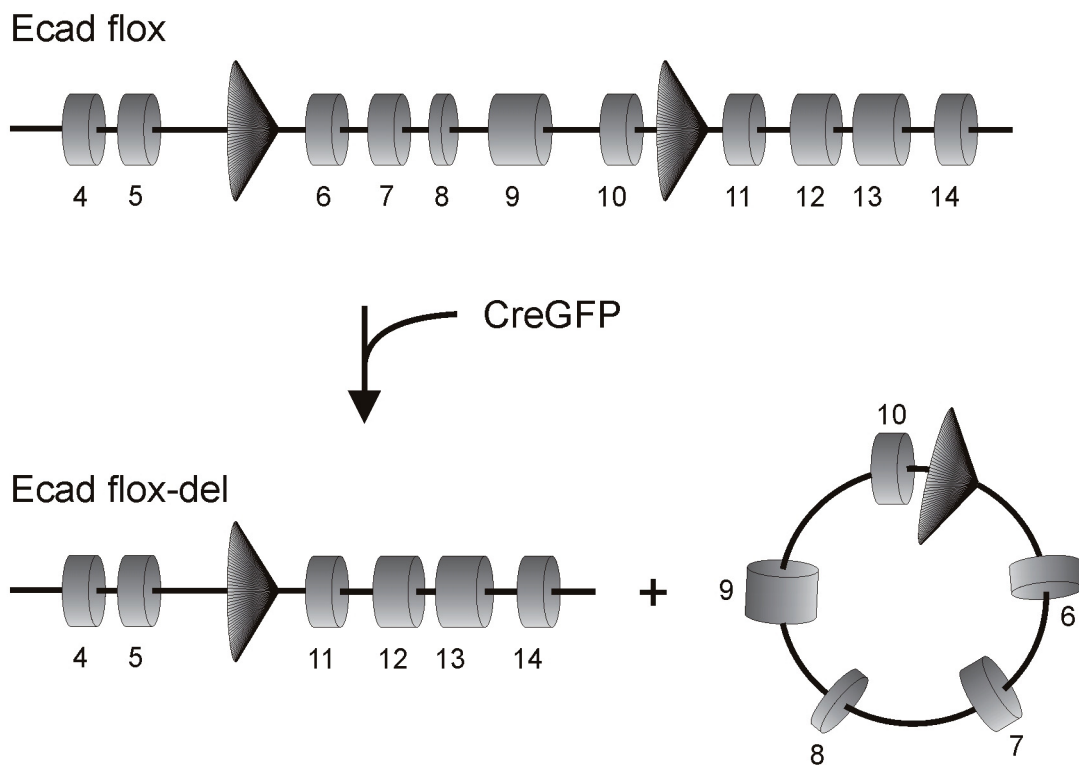


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ecad flox und Ecad flox-del Allels. Exone 4 bis 14 sind durch graue Zylinder repräsentiert, die loxP Stellen vor Exon 6 und nach Exon 10 sind durch graue Pyramiden repräsentiert.

2.5 Herstellung von Kulturen kortikaler Neurone auf Poly-L-Ornithin beschichteten Kulturschalen

2.5.1 Poly-L-Ornithin beschichtete Schalen

Zum Beschichten der 35x10mm Falcon Zellkulturschalen wurden 150 µl Poly-L-Ornithin in Boratpuffer mittig auf der Schale appliziert. Die so behandelten Zellkul-

turschalen lagerten 24 Stunden bei Raumtemperatur. Zum endgültigen Fertigstellen war ein Spülvorgang nötig: Dieser erfolgte mit autoklaviertem, destilliertem Wasser. Nach Hinzugabe von 2 ml Wasser wurde die Spülflüssigkeit abgesaugt. Dieser Vorgang ist insgesamt dreimal wiederholt worden. Die gewaschenen Zellkulturschalen trockneten nun 24-48 h bei Raumtemperatur.

2.5.2 Präparation der Mäuseföten

Eine trächtige Maus (*Mus musculus*), Stamm Ecad flox, wurde im embryonalen Entwicklungsstadium E17 präpariert. Diese Maus war mit einem Ecad flox Stamm Männchen verpaart worden. Die Tötung des trächtigen Tieres erfolgte durch CO₂-Begasung. Den Richtlinien entsprechend wurde das tote Tier dekapitiert. Es erfolgte die Öffnung der Bauchhöhle durch scharfe Präparation mit der Schere. Es wurden die Föten entfernt - etwa 4 bis 10 pro trächtigem Tier - und in eine auf Eis stehende große Zellkulturschale überführt. Die folgende Präparation der Föten erfolgte zur Vermeidung von Kontaminationen unter einer Sterilbank.

Mit Schere und Pinzette wurde der Fötus vorsichtig, ohne ihn zu verletzen, aus dem Uterussack herausgeschält, die Nabelschnur durchtrennt. Nach Überführung in eine sterile 35x10mm Falcon Zellkulturschale wurde der Fötus dekapitiert. Mit zwei Pinzetten wurde von okzipital her die Haut von median nach lateral auseinandergezogen, der Schädelknorpel freigelegt. Beginnend am Foramen magnum wurde der Schädelknorpel ebenfalls mit zwei Pinzetten von median nach lateral auseinandergezogen und das Gehirn freigelegt. Zuletzt wurde mit einer Pinzette in die Orbitae eingestochen, der Schädel so fixiert und die gelösten Knorpelschalen abgezogen. Mit einem Mikrolöffel erfolgt die Entfernung des Gehirns aus dem Schädel und die anschließende Überführung in eine mit PBS Lösung gefüllte 35x10mm Zellkulturschale. Die PBS Lösung war zur Reduzierung von hypoxischen Zellschäden eisgekühlt.

Das so gewonnene Gehirn wurde unter einem Binokular Lupenmikroskop (Zeiss) weiterpräpariert. Zunächst wurde keilförmig das Kleinhirn sowie der anhängende Hirnstamm und Reste der Medulla oblongata von den Großhirnhemisphären durch Skalpellschnitt getrennt. Folgend wurden die Großhirnhemisphären durch Skalpellschnitt in der Medianlinie (Durchtrennung des Corpus callosum) separiert. Mit zwei Pinzetten wurden die Hirnhäute, ohne den Kortex zu beschädigen, abgezogen. Letztendlich wurde der Kortexmantel mit einem Skalpell von den übrigen Hirnanteilen abgeschält und in pipettendurchgängige Blöcke geschnitten. Die so gewonnenen Kortexblöcke wurden zusammen mit 1 ml PBS aus der Präparationsschale herauspipetiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß verbracht. Zum Lösen des Zellverbands wurden folgend 200 µl Trypsin hinzugegeben und anschließend 5 Minuten bei 37°C

und 5 % CO₂ inkubiert.

Zum Beenden der proteolytischen Trypsinwirkung wurde der Überstand abgenommen und die Kortextblöcke mit 1 ml BME gewaschen. Das BME Medium war zur Reduktion von hypothermischem Stress auf 37°C angewärmt. Der Überstand an BME wurde abgenommen und es wurden 200 µl PBS hinzugegeben. Es erfolgte nun die mechanische Dissoziation der Zellverbände. Dazu wurde die Lösung einige wenige Male mit einer 1 ml Pipette und anschließend mit einer 200 µl Pipette auf- und abpipettiert, bis keine Festkörper in der Lösung festzustellen waren und die Lösung gleichmäßig getrübt erschien.

Die so gewonnene kortikale Zellsuspension wurde nun auf ein Volumen von 4 ml mit BME aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden auf die vorbereiteten Poly-L-Ornithin Zellkulturschalen je 200 µl übertragen. Dies entspricht einer Zellzahl von 5×10^5 . Nach einer Stunde Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C erfolgte die Zugabe von je 2 ml Neurobasalmedium.

Am fünften Kulturtag wurde je 10 µl Cytosin- β -D-Arabinofuranosidhydrochlorid (ARA-C) hinzugegeben, um eine überschießende Proliferation von Gliazellen zu vermeiden. Die auf diese Art angelegten primären kortikalen Neuronenkulturen konnten etwa 14-20 Tage bearbeitet werden, wobei ab Zellkulturtag (Day in vitro, DIV) 7 alle 2-3 Tage ein Medienwechsel stattfand, bei dem jeweils 1 ml Kulturmedium gegen 1 ml frisches Neurobasalmedium ausgetauscht wurde.

2.6 Transfektion

2.6.1 Transfektionschemikalie

Als Transfektionschemikalie diente Lipofectamine 2000, Invitrogen Cat. No. 11668-027. Es handelt sich um ein Reagenz, das kationische Lipidvesikel ausbildet, an welche die vektorielle DNS bindet und die den Transport in eukaryotische Zellen vermittelt.

2.6.2 Vektoren - pBS598 EF1alpha-EGFPcre

Der Verwendete Vektor wurde über <http://www.addgene.org/> bezogen (Plasmid 11923) (Abb. 4). Es handelt sich um einen 8418bp langen, unter dem EF1 alpha Promotor stehenden Vektor, der das 1800bp lange Fusionsprotein EGFP-cre kodiert (folgend creGFP genannt). (Le et al., 1999c) Das Fusionsprotein enthält EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) welches im Bezug zum GFP (Green Fluorescent Protein) gentechnisch verändert wurde. GFP kommt nativ in der Qualle *Aequorea victoria* vor und ist ein unter UV Licht spezifischer Wellenlänge grün fluoreszieren-

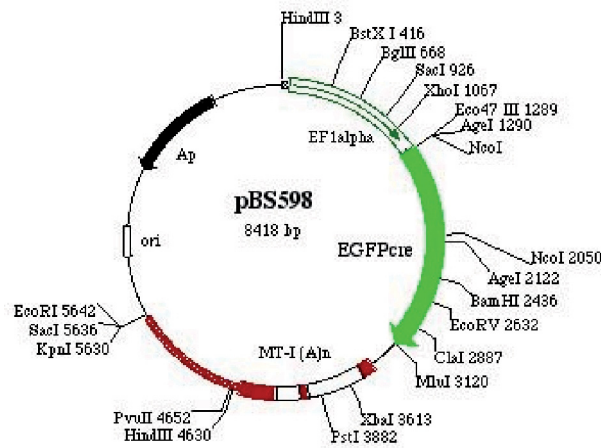


Abbildung 4: Karte des Vektors. Brian Sauer via <http://www.addgene.org>

des Protein. EGFP enthält im Vergleich zu GFP zum einen einen Aminosäureaustausch an Stelle 65 von Serin nach Threonin (S65T). Dieser Austausch verändert die chromophore Gruppe und führt zu einer Änderung der Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Typ	Anregung(nm)	Emission(nm)
GFP-Wt	395 bzw. 470	510
GFP-S65T	490	508

Die posttranslationale Modifikation (Oxidation zur Herstellung des Fluorophoren) des Proteins erfolgt etwa viermal schneller, die Helligkeit des emittierten Lichts ist um den Faktor 100 gesteigert (Heim et al., 1995).

Weiterhin ist das Wildtyp GFP humanisiert worden: Kodons hochexprimierter humaner Proteine wurden dem GFP-S65T zugefügt, die sekretorische Sequenz von humanem CD5 Antigen angefügt (Haas et al., 1996). Dies bedingt eine 20-fach höhere Expression in eukaryotischen Zellen (Chiu et al., 1996). An das EGFP wurde die Cre-Rekombinase fusioniert. Dieser Vektor vermittelt nun einerseits die Cre-Rekombinase vermittelte Inaktivierung des E-Cadherin Gens im verwendeten GVO (E-cad flox) durch Heraustrennen der DNS, welche von den loxP Sites flankiert wird, zum anderen ist eine Detektion der Zellen unter UV Anregung möglich (Gagneten et al., 1997). Der Vektor wird durch Transfektion in die Neurone verbracht.

2.6.3 Vektoren - EGFP-N1

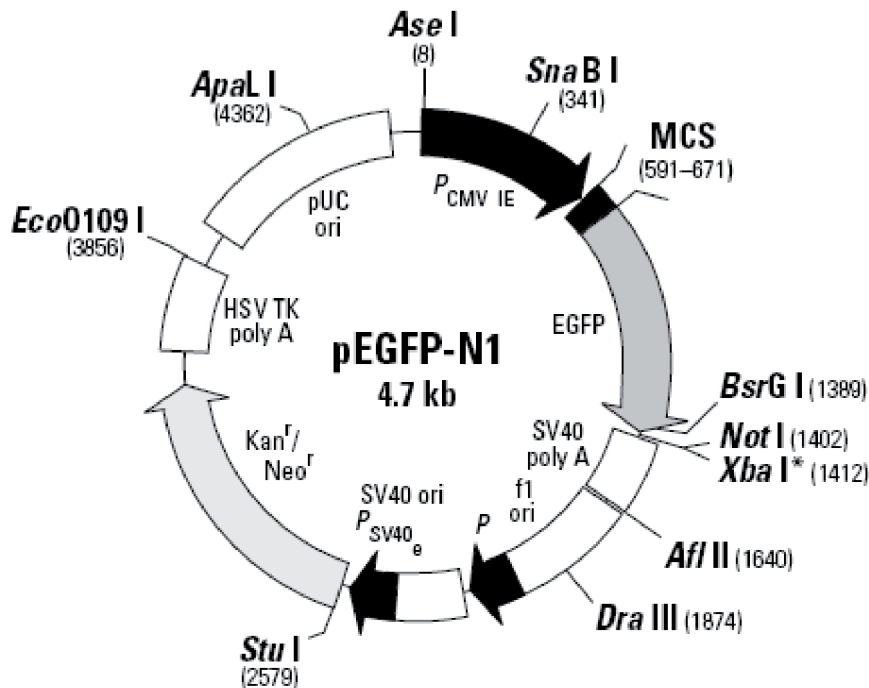


Abbildung 5: Karte des Vektors via <http://www.addgene.org>

Für die Kontrollzellen wurde der EGFP kodierende Vektor pEGFP-N1 verwendet. Dieser enthält das verbesserte, humanisierte EGFP unter einem CMV Promotor. Bei Expression dieses Vektors entsteht lediglich EGFP welches eine Detektion der erfolgreich transfizierten Zellen unter UV Anregung erlaubt. Es wird angenommen, dass EGFP keinen Einfluss auf Synaptogenese sowie die synaptische Funktion ausübt. Der Vektor wurde über <http://www.addgene.org> bezogen.

2.6.4 Transfektionsvorgehensweise

An DIV 4 bzw. DIV 8 wurden die primär kultivierten kortikalen Neurone mit den creGFP bzw. GFP codierenden Vektoren transfiziert (Abb. 6). Dazu wurden die auf 1 µg pro µl verdünnten Vektoren zunächst aufgetaut. Jeweils 50 µl Neurobasalmedium wurde in 2 Eppendorfreaktionsgefäße gefüllt. In das erste Gefäß wurden 5 µg Vektor pipettiert. In das zweite Gefäß wurden 10 µl Lipofectamine 2000 pipettiert. Die Lösungen wurden durchmischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Während dieser Zeit konnten sich die kationischen Lipidvesikel in der Lö-

sung ausbilden. Nach diesen 5 Minuten wurde die DNS-Neurobasal-Lösung zu der Lipofectamine-Neurobasal-Lösung gegeben. Ein vorsichtiges Pipettieren der DNS Lösung in beiden Schritten verbesserte die Transfektionsergebnisse deutlich. Bei Raumtemperatur ruhte die Lösung 20 Minuten. Die DNS bindet in dieser Zeit an die kationischen Lipidvesikel. Die so gewonnene Transfektionslösung wurde nun mit 800 µl Medium aus der Zellkulturschale versetzt. Das verbleibende Medium wurde aus der Zellkulturschale gewonnen und in einem Eppendorfgefäß gesichert sowie bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Es handelt sich dabei um von Neuronen konditioniertes Medium, in welches während der Zellkulturzeit von 5 Tagen zahlreiche Stoffwechselprodukte sowie Neurotrophine abgegeben wurden. Darunter befinden sich beispielsweise Brain derived neurotrophic factor (BDNF) sowie Neurotrophin 3 (NT-3) (Chang et al., 2003), wichtig für einen ausreichenden Neurotrophismus (Huang and Reichardt, 2001). Das mit der Transfektionslösung versetzte Neurobasalmedium wurde vollständig tropfenweise auf die Zellkultur gegeben. Die kationischen Lipidvesikel vermittelten nun den Transport der Plasmid DNS in die Neurone. Die Zellen wurden hierfür 6 Stunden mit dem Transfektionsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium ausgetauscht. Hierzu wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und verworfen, das konditionierte Medium hinzugegeben sowie das Kulturmediumvolumen mit auf 37°C angewärmtem Neurobasalmedium auf 2 ml aufgefüllt. Zur weiteren Kultur wurden die Zellen wie gewohnt inkubiert.

Eine zu lange Inkubationsdauer ruft Zellschäden hervor, da die Transfektionschemikalie Lipofectamin zytotoxische Eigenschaften besitzt. Die angegebenen 6 Stunden versprechen gute Transfektionsergebnisse bei relativ geringen zytotoxischen Effekten.

Der Erfolg der Transfektion ließ sich zwei bis zu zehn Tage nach der Transfektion durch die vorhandene Fluoreszenz unter UV Anregung feststellen. Diese wird durch das grün fluoreszierenden Protein ausgelöst.

2.7 Elektrophysiologische Untersuchung

2.7.1 Das Patch Clamp Experiment

Die Patch Clamp Technik wurde 1976 von Neher und Sakmann vorgestellt (Neher and Sakmann, 1976). Sie stellt eine Modifikation der Voltage Clamp Technik dar. Diese wurde von Cole in den 1940er Jahren entwickelt und am Versuchsobjekt des

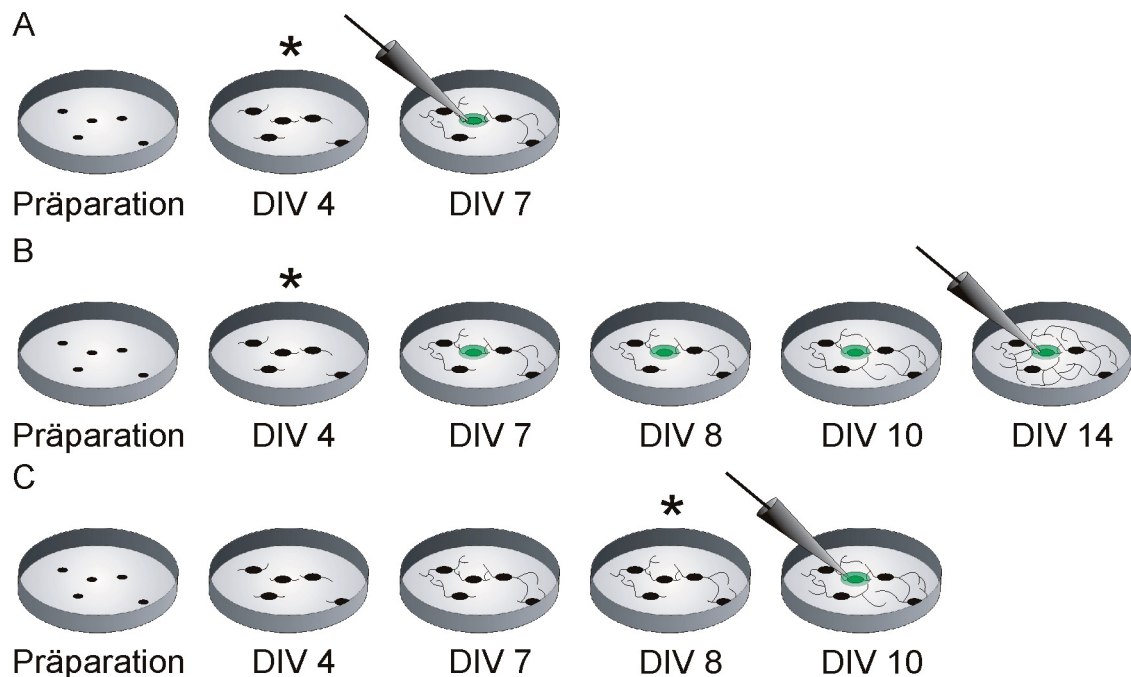


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Transfektionsprotokolles. Die Sterne (*) geben den Transfektionszeitpunkt an. Die Patchpipetten geben den Messzeitpunkt an.

A: DIV 7, Experiment: mPSCs

B: DIV 14, Experiment: mPSCs und evozierte PSCs

C: DIV 10, Experiment: mPSCs

Tintenfischriesenaxons erstmalig angewendet (Cole 1949).

Es handelt sich bei der Voltage Clamp Technik um eine elektrophysiologische Methode, bei der zwei Mikroelektroden in das Zellinnere eingeführt wird - das Tintenfischriesenaxon eignet sich hierfür gut - eine weitere Elektrode befindet sich in der Extrazellulärlösung. Als Elektrodenmaterial dient eine Ag/AgCl Elektrode welche in einer Glasmikroelektrode mündet in die eine Elektrolytlösung hineinpipettiert wurde.

Wenn durch von Aussen zugesetzten Neurotransmitter oder durch elektrische Reizung ein Strom elektrischer Ladungen über die Membran erzeugt wird, würde sich das Membranpotential ändern. Bei der Voltage Clamp Methode wird das Membranpotential auf einem annähernd konstanten, vom Experimentator festgelegten Wert gehalten. Dieser festgelegte Wert, auch Kommandospannung genannt, wird ständig mit dem aktuellen Membranpotential verglichen sowie auf dem festgelegten Wert gehalten - geklemmt (engl. clamp). Dies geschieht durch Injektion eines Stromes entgegengesetzt dem durch Reizung ausgelösten transmembranalen Strom

im Sinne einer negativen Rückkopplung. Das Ausmaß des injizierten Ausgleichsstromes ist messbar und entspricht dem transmembranalen Ionenstrom der durch Reizung der Zelle ausgelöst wird. Es handelt sich also um eine indirekte Messung der Ionenströme über eine Zellmembran. Bei der Patch Clamp Technik wird zur Kontrolle des Membranpotentials nur eine sogenannte Patchelektrode verwendet. Neher und Sakmann verbesserten das bestehende Verfahren durch den sogenannten Membranpatch. Dabei wird die Mikroelektrode nicht traumatisch in das Zellinnere vorgeschoben. Es wird eine besonders feine Pipette als Mikroelektrode verwendet, welche einen Öffnungsdurchmesser von etwa $1\ \mu\text{m}$ besitzt. Im Experiment wurden 10 cm lange Borosilikat Glaskapillaren (GC150TF-10, Harvard Apparatus, 1,5 mm Aussendurchmesser, 1,17 mm Innendurchmesser) verwendet, welche mit einem DMZ Universalpuller (Zeitz) durch Erhitzen und mechanischen Zug in zwei Mikroelektroden getrennt wurde. Eine Mikroelektrode wird mit der Intrazellulärlösung gefüllt und auf den Ag / AgCl Draht im Pipettenhalter befestigt. Mithilfe eines mechanischen Grobtriebes und eines hydraulischen Feintriebes wird diese auf die Membranoberfläche aufgesetzt und durch einen geringen Unterdruck an der Zellmembran festgesaugt. Dadurch bildet sich ein von der Umgebung isolierter, nur unter der Öffnung der Pipette liegender Zellmembranfleck (Patch). Der Widerstand zwischen der Pipetteninnenseite welche dem Membranfleck aufsitzt sowie der umgebenden Extrazellulärlösung beträgt mehrere Gigaohm. Es fließen also um ein vielfaches weniger Leckströme zwischen Pipette und Extrazellulärlösung. Dieser Umstand bedingt die bessere Signalqualität bei dem Patch-Clamp Verfahren, welche eine Messung der Ströme durch einzelne Ionenkanäle ermöglicht.

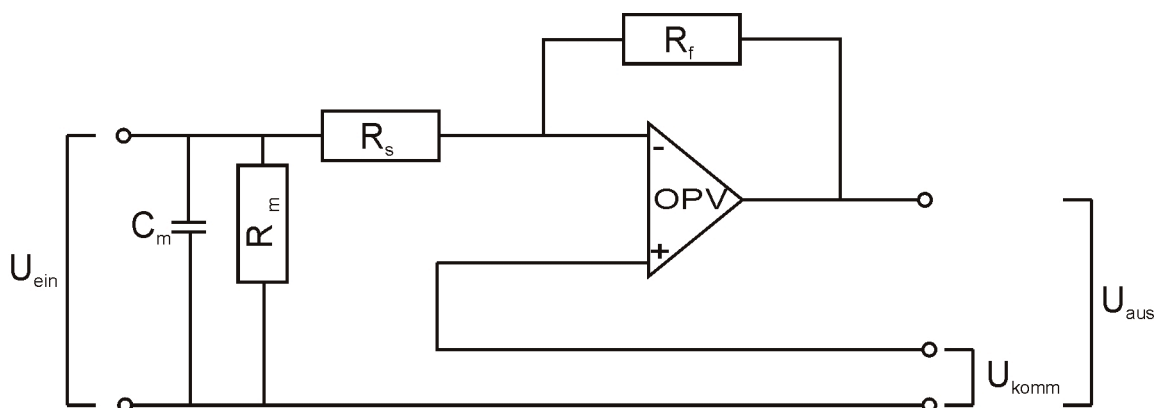


Abbildung 7: Schaltplan des Patchclamp Verstärkers: OPV: Operationsverstärker R_s : Serienwiderstand R_f : Rückkopplungswiderstand R_m : Membranwiderstand C_m : Membrankapazität U_{komm} : Kommandospannung U_{ein} : Membranspannung U_{aus} : ausgegebene Spannung, proportional zum Ionenstrom, Messgröße

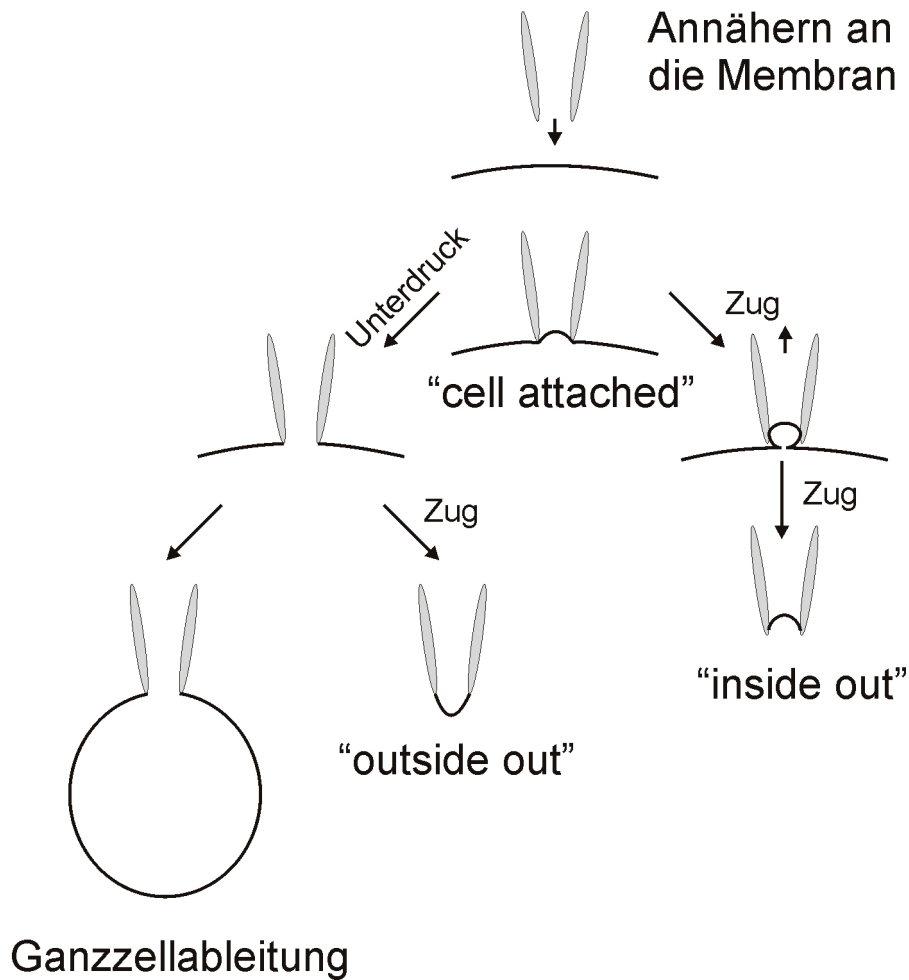


Abbildung 8: Die verschiedenen möglichen Konfigurationen der Membran im Patch Clamp Experiment

Technisch wird die negative Rückkopplung durch den Patch-Clamp Verstärker realisiert (Abb. 7). In den Schaltkreis zwischen Pipette und Strommessung ist im Verstärker ein sogenannter Strom-Spannungswandler integriert. Wichtige Bauteile sind der Operationsverstärker, ein elektronisches Bauteil komplexer Bauart auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, sowie der Rückkopplungswiderstand. Der Operationsverstärker besitzt einen (-) Eingang an dem die Pipettenspannung anliegt sowie einen (+) Eingang, an dem die festgelegte Kommandospannung anliegt. Bei einer Abweichung zwischen diesen beiden Eingängen wird am Ausgang eine Spannung erzeugt. Diese Spannung besteht nun zwischen dem Ausgang des Operationsverstärkers sowie über den Rückkopplungswiderstand an der Pipette. Der durch diese Spannung ausgelöste Strom fließt nun über den Rückkopplungswiderstand in die Pipette hinein, gleicht so die Ladungsdifferenz aus und fließt nicht in den Operationsverstärker, da dieser einen Eingangswiderstand besitzt, der vereinfacht als unendlich hoch angesehen wird.

Eine Abwandlung dieser Messanordnung ist die sogenannte whole-cell (Ganzzell-) Konfiguration, die in den Experimenten, welche meiner Arbeit zugrundeliegen, verwendet wurde. Bei der whole-cell Ableitung wird nach Erreichen des Membranfleckes ein Unterdruck erzeugt, der die Zellmembran durchbricht. So wird der Intrazellularraum mit dem Inneren der Pipette verbunden, es besteht eine elektrische Isolation gegenüber der Extrazellulärlösung. Ströme fließen in dieser Versuchsanordnung zum größten Teil nur noch über die auf der ganzen Zelle vorhandenen Ionenkanäle.

Ein Problem der Ganzzelleableitung ist der durch die Größe der Zellmembranöffnung bedingte Serienwiderstand. Zellmembrantrümmer können die Öffnung zur Pipette verlegen und bedingen somit eine Änderung der elektrischen Leitfähigkeit. Dies führt dazu, dass die Ausgleichsströme, die das Membranpotential der Kommandospannung anpassen sollen, abgeschwächt werden und das Membranpotential nicht mehr der auf dem Verstärker angezeigten Kommandospannung entspricht. Je größer der Serienwiderstand ist, desto ungenauer ist das Verfahren. Eine Kompensation des Serienwiderstandes war zu keinem Zeitpunkt des Experimentes nötig, da dieser vernachlässigbar gering war.

Bei dem Patch Clamp Experiment sind auch andere Konfigurationen möglich (Abb. 8), die alle von der cell-attached Konfiguration aus erreicht werden können. Zu nennen sind die sogenannte inside-out Konfiguration, bei der die eigentliche Membranninnenseite die Glaspipette nach Aussen hin zur Extrazellulärlösung abgrenzt, lediglich der Membranfleck ist mit der Pipette verbunden. Weiterhin ist die outside-out Konfiguration zu nennen, bei der die Membranaussenseite zur Extrazellulärlösung abschließt.

2.7.2 Versuchsaufbau

Zum Versuchsaufbau (Abb. 9) gehörte ein Zeiss AxioVert 35M Mikroskop gelagert auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Zur Mikroskopausstattung zählte ein 10-fach vergrößerndes Phasenkontrastobjektiv (Zeiss LD Achrostatigmat; 10x/0,25 Ph1) und ein 32-fach vergrößerndes Phasenkontrastobjektiv (Zeiss Achrostatigmat 32x/0,40 Ph2). Als Beleuchtung diente eine 12 V Lampe sowie eine UV-Quelle (Zeiss, HBO 50) mit zugehörigem EGFP Filtervorsatz. Ein Glaspipettenhalter (HEKA Elektronik) war an einem Vorverstärkerkästchen montiert, der am Mikromanipulator (Narishige, Japan) montiert war. Der Mikromanipulator war am Mikroskop befestigt. Die so befestigte Elektrode diente als Messelektrode. Ein weiterer Glaspipettenhalter war an einem zweiten Mikromanipulator befestigt. Dieser Glaspipettenhalter war mit einem Reizgeber (SD9 Square Pulse Stimulator,

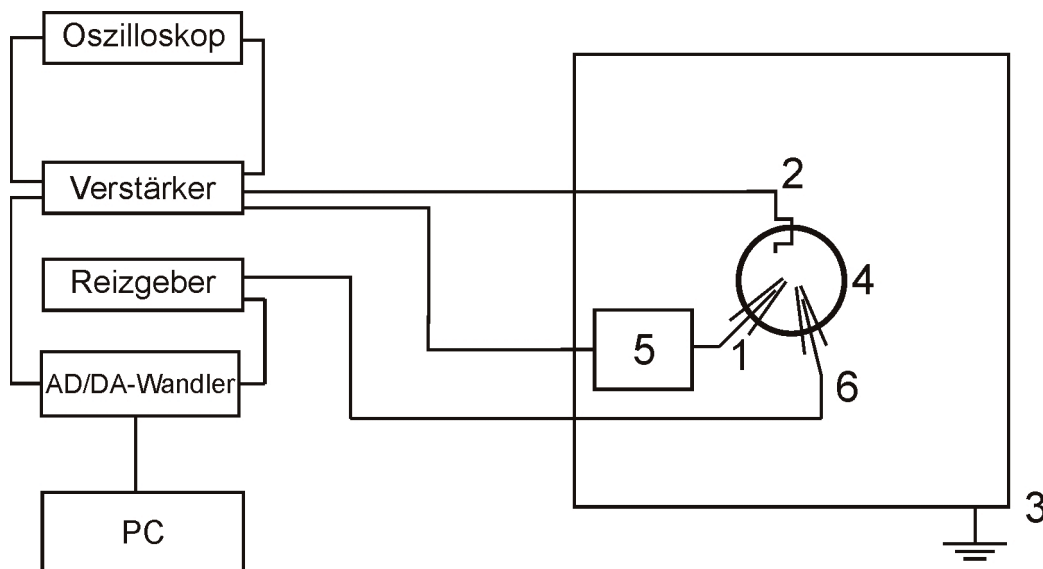


Abbildung 9: Schematische Messstandkonfiguration. 1: Messelektrode 2: Badelektrode 3: Geerdeter Faradaykäfig 4: Zellkulturschälchen 5: Vorverstärker 6: Reizelektrode

Grass Technologies Product Group, Astro-Med, Inc.) verbunden. Diese Elektrode diente als Reizelektrode. Die Verstärkung der an der Messelektrode registrierten Ionenströme erfolgte mit einem HEKA Patch Clamp L/M - EPC7 Verstärker, der gleichzeitig das Signal filtert (Tiefpassfilter 3kHz). Als Analog/Digitalwandler diente ein Axon Instruments DigiData 1200 series interface, an welchem ein IBM Personalcomputer angeschlossen war (Intel Pentium 2) auf dem die Software PClamp 6.0.2 für DOS (Axon Instruments) eingerichtet war. Die Digitalisierungsrate betrug 10 kHz. Die Darstellung der Signale erfolgte simultan an einem Oszilloskop (Hameg HM 205-3) sowie am Computermonitor. Die aufgenommenen Daten wurden auf Festplatte und CD gespeichert.

2.7.3 Registrierung von postsynaptischen Miniaturströmen

Eine Zellkulturschale mit creGFP bzw. GFP transfizierten primär kultivierten Neuronen auf Polyornithin beschichteten Schalen wurde dem Inkubator entnommen. Die Messungen erfolgten an DIV 7, DIV 10 und DIV 14. Die Neurone, die an DIV 4 transfiziert wurden, sind an DIV 7 und DIV 14 gemessen worden, an DIV 8 transfizierte Neurone an DIV 10. Das Nährmedium wurde gegen 3 ml auf 37°C angewärmter Extrazellulärlösung ausgetauscht. Zur Blockade von AMPA Rezeptor vermittelten Signalen enthielt die Extrazellulärlösung 20 μ M DNQX. Zur isolierten Betrachtung



Abbildung 10: Messstand: Links ist eine Übersicht des Arbeitsplatzes sowie der Computerarbeitsplatz mit Verstärker abgebildet, rechts sind der Mikroskopiertisch mit mechanischen Feintrieben sowie zwei Vorverstärker mit Patchelektroden zu erkennen.

der postsynaptischen Miniaturströme (mPSCs) wurden spannungsabhängige Natriumkanäle mit Tetrodotoxin (TTX) in einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ blockiert und somit das Auftreten von Aktionspotentialen verhindert.

Das Auftreten von NMDA Rezeptor vermittelten mPSCs wurde weitestgehend durch die MgCl_2 Konzentration von 1 mM in der Extrazellulärlösung, sowie das niedrige Haltepotential von -60 mV verhindert, da die Glutamatrezeptoren vom NMDA Typ unter diesen Bedingungen durch die Magnesiumionen blockiert werden.

Die Schale wurde auf den Messtisch gelegt, in diese anschließend die Badelektrode

getaucht. Die chlorierte Silberelektrode wurde in den Pipettenhalter eingespannt. Die vom DMZ Puller gezogene Glas Mikroelektrode wurde mit der Intrazellulären Lösung gefüllt und auf dem Silberdraht in die Halterung vorgeschoben, so dass der Silberdraht in die Intrazellulärlösung eingetaucht war. Über einen an dem Pipettenhalter angeschlossenen Gummischlauch wurde mit Hilfe einer 20ml Spritze ein Überdruck angelegt.

Durch UV-Anregung wurden optisch anhand der grünen Fluoreszenz diejenigen Zellen detektiert, welche creGFP bzw. GFP exprimierten. War solch eine fluoreszierende Zelle mit regelrechter Konfiguration zweifelsfrei identifiziert, erfolgte mithilfe des Mikromanipulators das Eintauchen der Mikroelektrode in die Badlösung. Im Suchmodus des Verstärkers wurde wiederholt eine Rechteckspannung mit einer Amplitude von 30mV angelegt. Anhand dieses Testpulses konnte der Pipettenwiderstand, da eine elektrisch leitende Verbindung über Badelektrode zum Verstärker bestand, mithilfe des Ohmschen Gesetzes bestimmt werden. Er lag zwischen 6 und 8 Megaohm. Die Mikroelektrode wurde unter optischer Kontrolle bis in die Nähe der Zellmembran der Zielzelle gefahren. Nun wurden am Verstärker Oberflächen- und Diffusionspotentiale kompensiert.

Mit dem Feintrieb wurde die Mikroelektrode nun auf die Zellmembran aufgesetzt, der Überdruck abgelassen. Über Sog am Gummischlauch wurde die Cell-attached Konfiguration erreicht, der Verstärker in den Voltage-Clamp Modus auf ein Haltepotential von -60mV gestellt. Durch erneuten Sog wurde die Zellmembran unter dem Patch eröffnet und die Ganzzelleableitung erreicht. Die Wirksamkeit des TTX konnte jetzt durch schrittweise Depolarisation der Zelle untersucht werden. Ist TTX vorhanden, kann eine Depolarisation von +40 mV kein Aktionspotential auslösen. Jetzt erfolgte die Registrierung der postsynaptischen Miniaturströme über 35 Messspuren und einer Gesamtdauer von 286,65 Sekunden für jede Zelle.

2.7.4 Registrierung von evozierten postsynaptischen Strömen

Zur Registrierung von evozierten postsynaptischen Ionenströmen wurde der Versuchsaufbau abgeändert (Abb. 11). Die Messungen an primär kultivierten kortikalen Neuronen erfolgten an DIV 14, zuvor waren diese an DIV 4 mit creGFP bzw. GFP transfiziert worden. Das Kulturmedium der aus dem Brutschrank entnommenen Zellkulturschale wurde gegen 3 ml auf 37°C angewärmte Extrazellulärlösung, die DNQX in einer Konzentration von 20 mM enthielt, ersetzt. Der elektrische Stimulus wurde über eine zweite in die Badlösung eingetauchte Elektrode vermittelt. Diese bestand ebenfalls aus einem chlorierten Silberdraht in einer Glas Mikroelektrode, welche mit

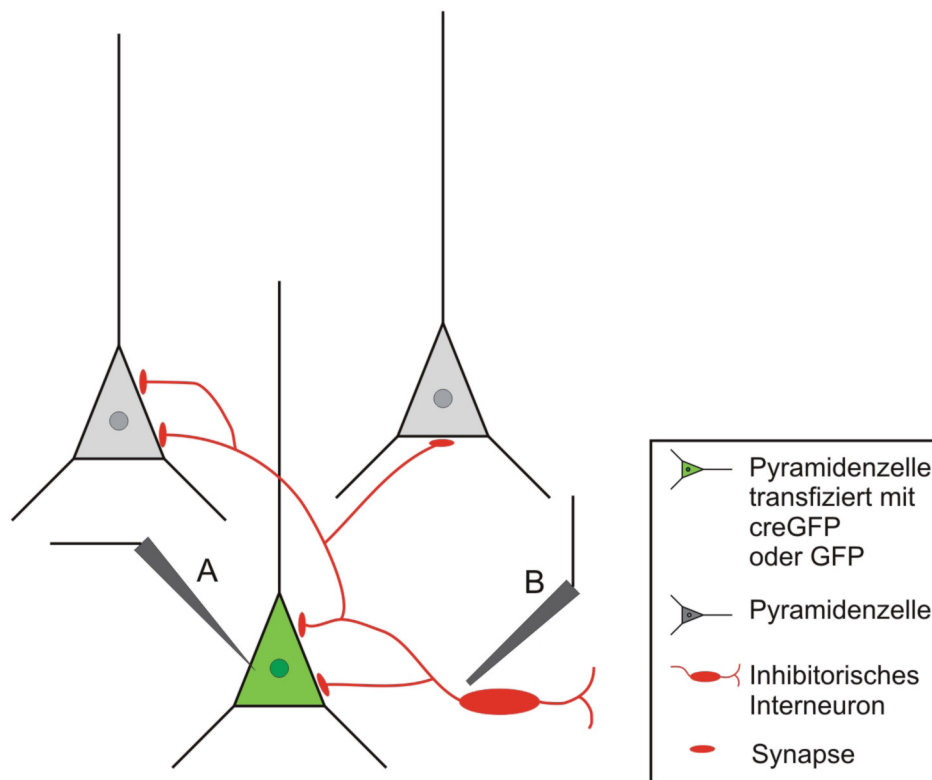


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.
A: Messelektrode B: Reizelektrode

einem Stimulationselektrolyt gefüllt war. An einem zweiten Mikromanipulator befestigt wurde die Reizelektrode an einer peripheren Stelle mit geringer Zelldichte auf den Schalenboden gefahren. Durch langsames Vorschieben wurde die Spitze der Mikroelektrode aufgebrochen, bis eine größere Elektrodenöffnung erreicht wurde. Diese hatte im Durchschnitt die Ausmaße von einem Somadurchmesser. Nun wurde über UV Anregung nach pyramidalen Zellen gesucht, die creGFP bzw. GFP exprimierten und von dieser grün fluoreszierenden Zelle eine Ganzzellableitung im Voltage Clamp Modus bei einem Haltepotential von -60 mV durchgeführt, analog zum vorigen Experiment. Lediglich die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung wich ab: sie enthielt den Natriumionenkanalblocker QX314 in einer Konzentration von 10 mM zur Vermeidung von Aktionspotentialen in der abgeleiteten Zelle. Nun wurde die Reizelektrode vorsichtig an Neurone herangefahren, die sich in der Umgebung der abgeleiteten Zelle befanden. Die Software PClamp 6.0.2 steuerte über den AD/DA Wandler den Reizgeber an. Dieser erzeugte einen monophasischen Spannungsdoppelpuls mit einem Zwischenpulsabstand von 100 ms. Jeder Einzelpuls hatte eine Dauer von 2 ms und eine Amplitude von 30 V. Zwischen dem chlorierten Silberdraht der Reizelektrode und der Erdungselektrode floss nun ein entsprechender kurzdauernder

Strom, der an dem der Reizelektrode vorgelagerten Neuron zu einer Depolarisation mit Aktionspotential führte. Über die Ganzzellaufleitung der transmembranalen Ionenströme konnte nun registriert werden, ob durch Reizung des stimulierten Neurons eine synaptische GABA_A Rezeptor vermittelte Signalübertragung an das abgeleitete Neuron erfolgte. Wurde nach Betrachtung einiger Reizpulse kein postsynaptischer Ionenstrom registriert, wurde die Reizelektrode vorsichtig an ein anderes Neuron in der Umgebung der abgeleiteten Zelle gefahren und das Reizprotokoll wiederholt. Bedingt durch die relative Schwingungslabilität der Ganzzellaufleitung konnte die Reizelektrode nur drei bis fünfmal versetzt werden, bis die Verbindung zwischen Messelektrode und Zellmembran zerstört wurde. Sobald ein postsynaptischer GABA_A Rezeptor vermittelter Chloridionenstrom zu beobachten war, wurde der Doppelpuls unter Aufnahme der Ionenströme 25 mal ausgelöst, zwischen den Doppelpulsen lagen 10 s Pause. Das Ausmaß des postsynaptischen Signals beschrieb nun die synaptische Übertragungsstärke zwischen den untransfizierten präsynaptischen Neuronen und dem transfizierten postsynaptischen Neuron.

2.8 Auswertung und Statistik

2.8.1 Auswertung von postsynaptischen Miniaturströmen

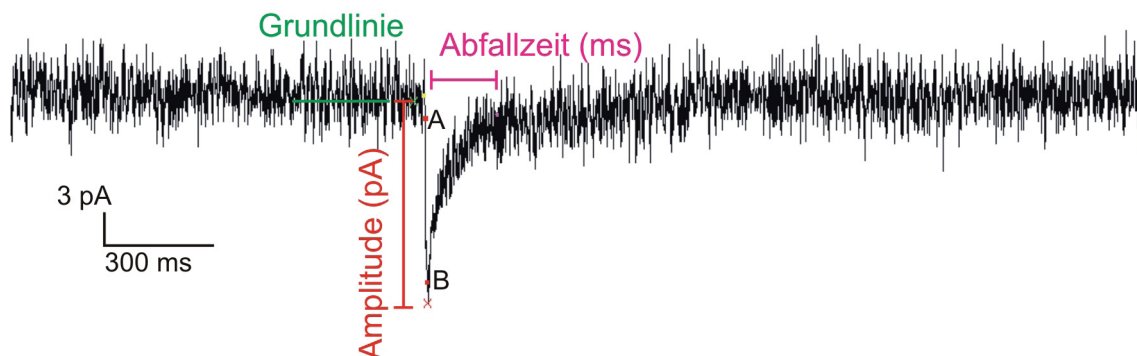


Abbildung 12: Beispiel aus einer Originalregistrierung eines GABA_AmPSC : Grundlinie, Amplitude und Abfallzeitmessung sind schematisch dargestellt. Zwischen Punkt A und B wird die Anstiegszeit gemessen. Zu erkennen ist ein einzelnes Ereignis welches sich vom Grundrauschen abhebt.

Die Aufnahme der postsynaptischen Miniaturströme erfolgte über 35 Messspuren, was einem Zeitraum von 286,65 s entspricht. Als Programm wurde hierbei die Software PClamp 6.0.2 verwendet. Die aufgenommenen Ionenströme wurden im Format [Datum][A][Laufende Nummerierung].DAT abgespeichert. Die Auswertung der so gesammelten Daten wurde mit der Software Mini Analysis Program

6.0.3 (Synaptosoft Inc.) durchgeführt. Dabei wurden Parameter festgelegt, die einen postsynaptischen Miniaturstrom (zu detektierendes Ereignis) beschreiben. Die Mindestamplitude, die das Ereignis vom Hintergrundrauschen trennt, betrug 5 pA. Die Abfallzeit wurde als diejenige Zeit detektiert, in der die Amplitude auf 1% abfiel. Die Anstiegszeit wurde als die Zeit festgelegt, in der das Signal von 10% auf 90% der Amplitude anstieg. Die Frequenz resultierte aus der Anzahl der Ereignisse geteilt durch 286,65s.

2.8.2 Auswertung von evozierten postsynaptischen Strömen

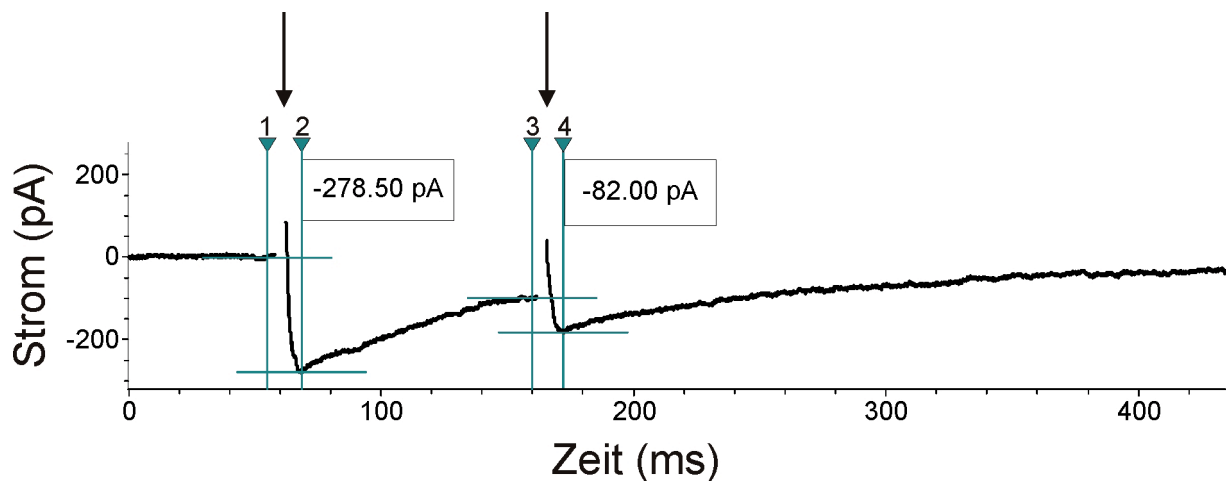


Abbildung 13: Beispiel einer Originalregistrierung eines evozierten GABA_A vermittelten postsynaptischen Stromes: die zwischen den Messbalken 1 und 2 sowie 3 und 4 vermessenen postsynaptischen Ströme wurden durch die Reizpulse evoziert, die durch die Pfeile am oberen Bildrand angezeigt werden. Das Reizartefakt wurde zur besseren Anschaulichkeit entfernt.

Es wurden mit je zehnssekündigem Abstand 25 Doppelpulse abgegeben und die evozierten postsynaptischen Ströme im Format [Datum][A][Laufende Nummerierung].DAT abgespeichert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Clampfit 9.0 (Axon Instruments). Der Abstand zwischen Grundlinie und maximaler Signalstärke charakterisierte die Amplitude der Antwort. Einer fehlenden Antwort auf den Reizpuls wurde eine Amplitude von 0 pA zugewiesen. Für die statistische Auswertung wurden die jeweils ersten Zehn Doppelpulse untersucht.

2.8.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter SigmaPlot 9.01 (Systat Software Inc.). Das Programm berechnete Mittelwerte sowie Standardfehler. Für jede gemessene

Zelle wurden Mittelwerte der untersuchten Parameter gebildet. Diese Mittelwerte dienten einerseits zur Bildung eines Mittelwertes der Mittelwerte, andererseits wurde mit ihnen der Student's t-Test durchgeführt. Der Student's t-Test lieferte Angaben zur statistischen Signifikanz von Unterschieden der Messdaten zwischen GFP exprimierenden Kontrollzellen und den creGFP exprimierenden Zellen. Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Die gemessenen Daten bei den Ecad flox Neuronen entstammen jeweils aus mindestens 2 Präparationen unterschiedlicher Muttertiere. Die graphische Umsetzung der statistisch ausgewerteten Daten erfolgte in Sigmaplot 9.01 sowie CorelDRAW Graphics Suite 12 (Corel Corporation).

3 Ergebnisse

3.1 Konditionaler E-Cadherin Knockout

Um einen konditionalen Knockout von E-Cadherin zu erzeugen, wurden Kulturen kortikaler Neurone, welche aus Ecad flox Föten gewonnen wurden, mit creGFP transfiziert. Als Kontrolle diente eine GFP Transfektion. Zur Überprüfung des Transfektionserfolges wurden die transfizierten Zellen zwei bis zehn Tage nach der Transfektion unter UV-Anregung mikroskopisch untersucht. Eine bei UV-Anregung auftretende grüne Fluoreszenz weist auf die Expression des transfizierten Fluorophoren, GFP respektive creGFP, hin. Zur Untersuchung der genauen Lokalisierung von creGFP in Neuronen besteht die Möglichkeit der Cotransfektion. Hierbei wird das Neuron mit einem zweiten, in einem anderen Spektrum fluoreszierenden Protein transfiziert welches sich in der gesamten Zelle verteilt. Ein Überlagern der beiden Bilder lässt Rückschlüsse auf die Lokalisierung des creGFP zu. Bei den untersuchten Zellen zeigte sich, dass creGFP in Neuronen zum größten Teil nukleär, zu einem geringen Teil auch zytosolisch lokalisiert ist (Abb. 14). Dies ist für alle Altersgruppen gleichermaßen der Fall. Eine orientierende morphologische Untersuchung der Zellen gab keine Hinweise auf einen grundlegenden Unterschied zwischen GFP und creGFP exprimierenden (exp.) Neuronen. creGFP exp. Zellen (Abb. 14) und GFP exp. Zellen erschienen gut integriert in den neuronalen Zellverband der Massenkultur. Die Transfektion mit Lipofectamine 2000 und den angegebenen Mengen Vektor hatte eine Transfektionseffizienz von ca. 5-10 Zellen pro Schale; von diesen waren ca. 2-5 noch vital und konnten elektrophysiologisch untersucht werden. creGFP und GFP transfizierte Neurone wiesen gegenüber untransfizierten Zellen eine leichte Zellschwellung auf, diese war bei GFP transfizierten Neuronen stärker ausgeprägt als bei creGFP transfizierten Neuronen. Für die Registrierung von GABA_A Rezeptor vermittelten mPSCs (GABA_AmPSCs) und evozierten IPSCs wurden nur vitale, stark exprimierende Zellen untersucht, welche ungefähr die gleiche Anzahl an umgebenden Zellen besaßen (ca. 5-10).

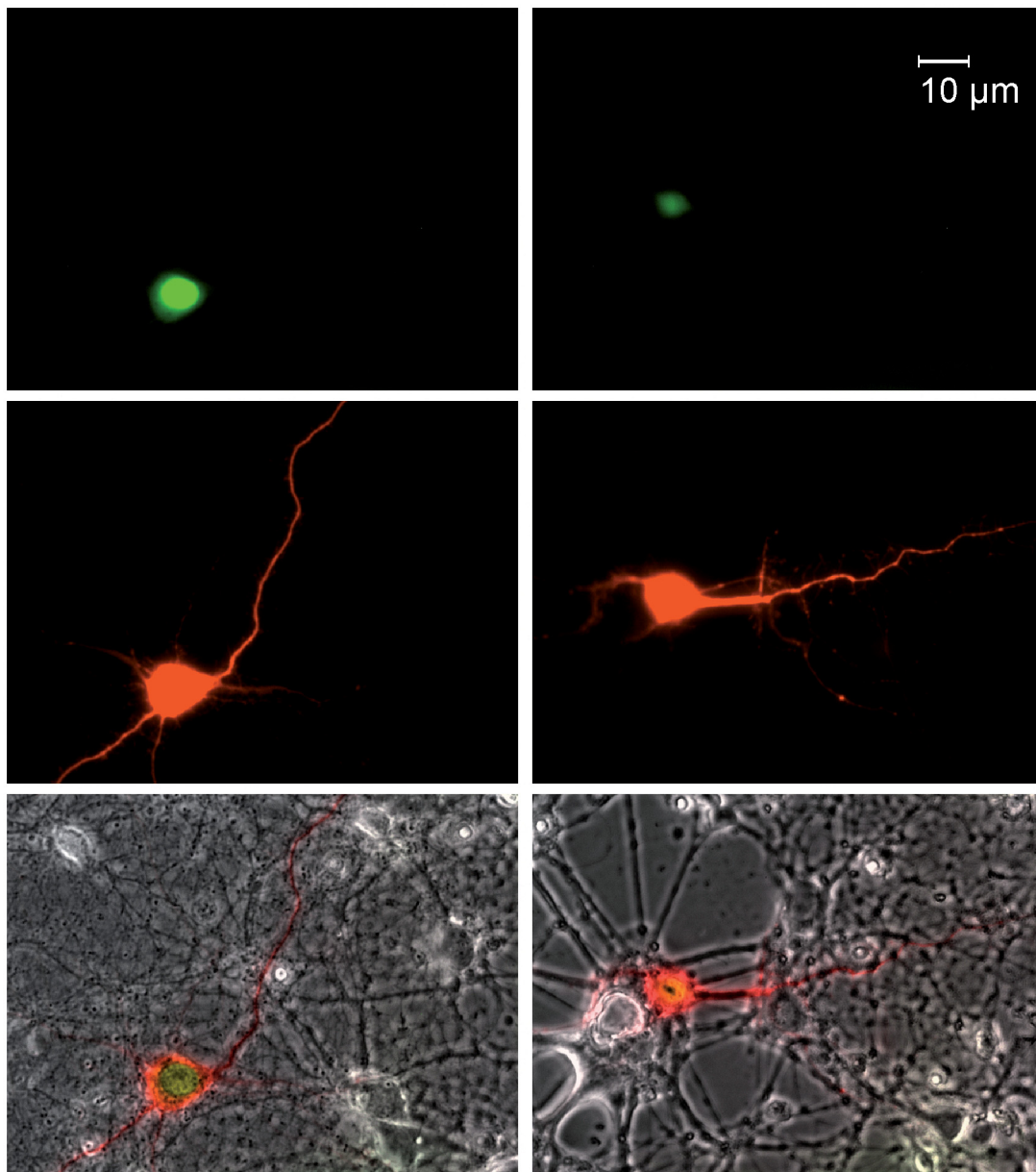


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Neuronen. Die Kultur wurde aus dem Kortex eines Ecad flox Fötus an E17 angelegt. Die Kotransfektion mit 5 µg pBS598 EGFPcre sowie DsRed2 erfolgte an DIV 8. Die Aufnahme wurde an DIV 10 durchgeführt. Zu sehen sind zwei erfolgreich transfizierte Neurone. Die erste Zeile zeigt die grüne Fluoreszenz nach UV Anregung im creGFP Spektrum. Die zweite Zeile zeigt die rote Fluoreszenz nach UV Anregung im DsRed2 Spektrum. Die dritte Zeile zeigt ein Überlagerungsbild des creGFP, DsRed2 sowie Hellfeld Signales.

3.1.1 Auswirkung der creGFP Expression auf Wildtyp Zellen

Um einen störenden systematischen Fehler, ausgelöst durch die Expression von creGFP und mögliche unspezifische Reaktionen, auszuschließen, wurden Massenkulturen kortikaler Wildtypneurone untersucht. Hierfür wurde das angegebene Zellkultur- und Transfektionsprotokoll auf C57BL/6 Wildtyp Mäuse angewendet. Dieser Stamm enthält keine loxP Stellen in seinem Genom und wird daher nicht von der Cre-Rekombinase verändert. Die Transfektion mit 5 μg creGFP bzw. GFP und 10 μl Lipofectamine 2000 wurde an DIV 4 durchgeführt. An DIV 7 erfolgte die Registrierung von GABA_AmPSCs in creGFP bzw. GFP exp. Neuronen. Morphologisch zeigten diese Neurone keine Besonderheiten (Abb. 14).

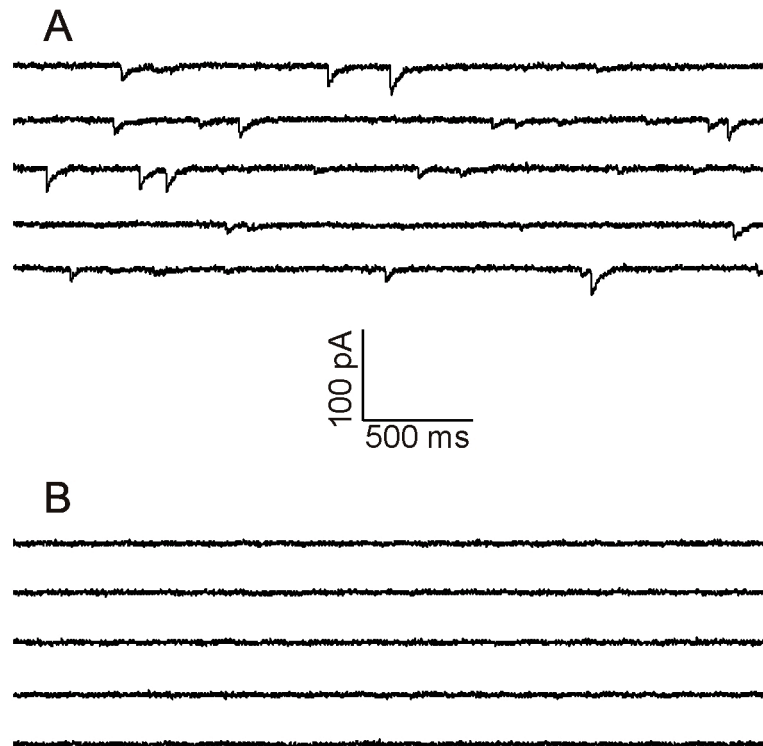


Abbildung 15: Pharmakologische Blockade der GABA_A Rezeptoren. Kortikales Ecad flox Neuron, an DIV 4 mit creGFP transfiziert, an DIV 7 gemessen.

A: GABA_AmPSCs vor Blockade der GABA_A Rezeptoren

B: Pharmakologische Blockade der GABA_A Rezeptoren durch 7,5 μM Gabazine

Die Messungen erfolgten unter den im Methodenteil angegebenen Standardbedingungen bei einem Haltepotential von -60mV. Um die gemessenen Ereignisse als GABA_AmPSCs identifizieren zu können, wurde zusätzlich eine pharmakologische Blockade der GABA_A Rezeptoren durch das Toxin Gabazine, das ein kompetiti-

ver GABA_A Rezeptorantagonist ist, vorgenommen. Nach Applikation waren keine transmembranalen Ionenströme zu beobachten (Abb. 15). Dies galt für alle Altersgruppen.

Bei dem ersten untersuchten Parameter handelte es sich um die Amplituden der GABA_AmPSCs. Hierfür wurden alle 35 Messspuren mit einer Gesamtdauer von 286,65 s für jede Zelle ausgewertet. Es wurden 11 GFP transfizierte und 10 creGFP transfizierte Neurone untersucht.

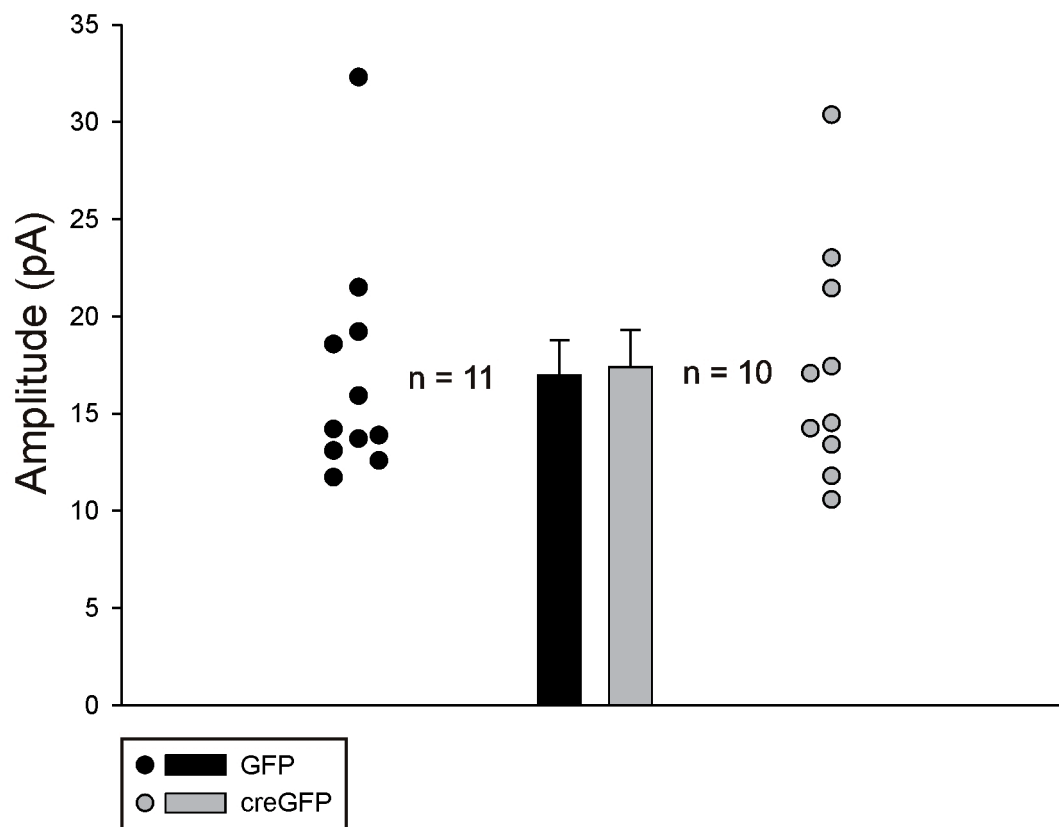


Abbildung 16: DIV 7: Mittlere Amplituden von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten WT C57BL/6 Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Die mittleren Amplituden der GABA_AmPSCs in C57BL/6 Neuronen betrugen bei den geschilderten Standardmessbedingungen für GFP transfizierte Zellen $16,98 \pm 1,79$ pA und für creGFP transfizierte Zellen $17,39 \pm 1,91$ pA (Abb. 16). Ein Student's t-Test lieferte einen p-Wert von 0,87. Es besteht kein signifikanter Unterschied der Amplituden von GABA_AmPSCs zwischen GFP und creGFP transfizierten WT

C57BL/6 Neuronen bei einem Transfektionszeitpunkt von DIV 4 und einem Messzeitpunkt von DIV 7. Die Darstellung der Mittelwerte der Einzelzellen zeigt eine bei GFP und creGFP transfizierten Zellen in etwa gleichartige Verteilung. Es existieren in beiden Messgruppen einzelne Zellen mit hohen Amplituden von 32,3 pA (bei den GFP exp. Zellen) und 30,38 pA (bei den creGFP exp. Zellen).

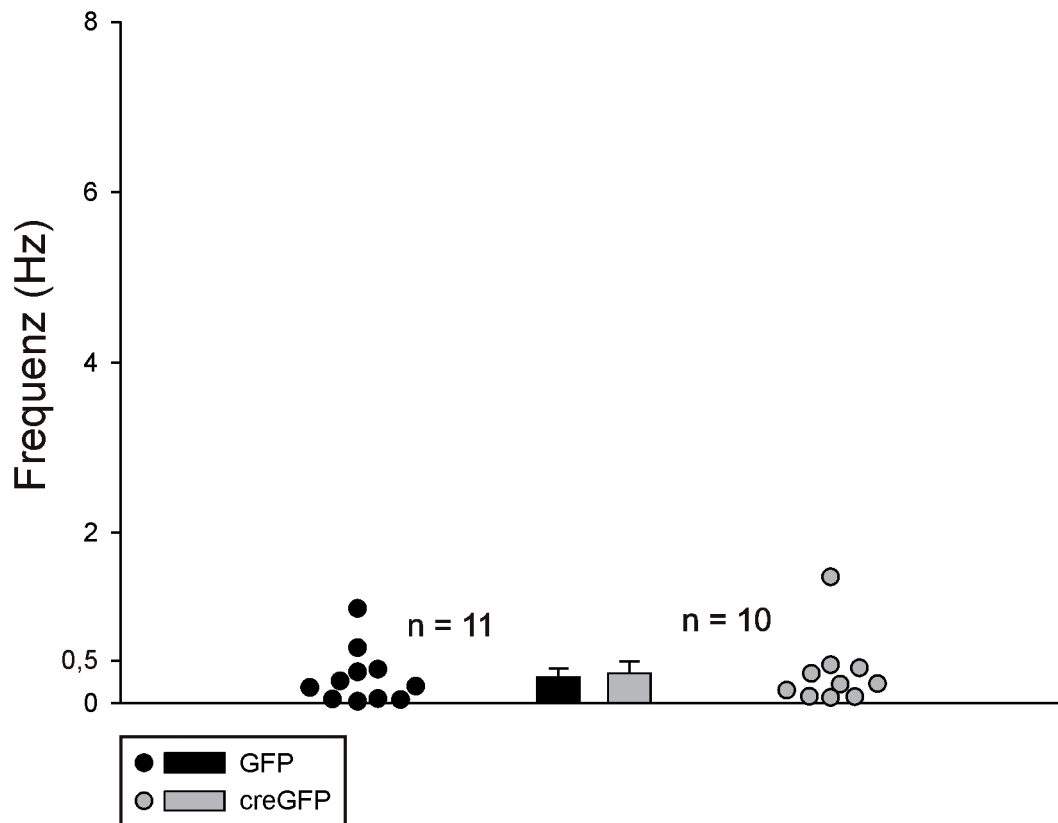


Abbildung 17: DIV 7: Mittlere Frequenzen von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten WT C57/BL6 Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Als nächstes wurde die Frequenz der GABA_AmPSCs untersucht. Bei GFP transfizierten WT C57BL/6 Neuronen traten GABA_AmPSCs mit einer mittleren Frequenz von $0,3 \pm 0,01$ Hz auf, dies entspricht etwa 90 Ereignissen in 35 Messspuren. Bei creGFP transfizierten WT C57BL/6 Neuronen lag eine mittlere Frequenz von $0,35 \pm 0,13$ Hz vor, dies entspricht etwa 100 Ereignissen in 35 Messspuren (Abb. 17). Ein Student's t-Test ergab einen p-Wert von 0,77, somit gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied der GABA_AmPSC Frequenzen zwischen GFP und creGFP

transfizierten WT C57BL/6 Neuronen bei einem Transfektionszeitpunkt von DIV 4 und einem Messzeitpunkt von DIV 7. Die Einzelzellwerte verteilen sich in den GFP und creGFP transfizierten Neuronen ähnlich gleichmäßig zwischen 0,02 Hz und 0,65 Hz, in beiden Gruppen gibt es eine Zelle die sich von der Verteilung abhebt: Bei den GFP exp. Neuronen mit 1,11 Hz und bei den creGFP exp. Neuronen mit 1,48 Hz.

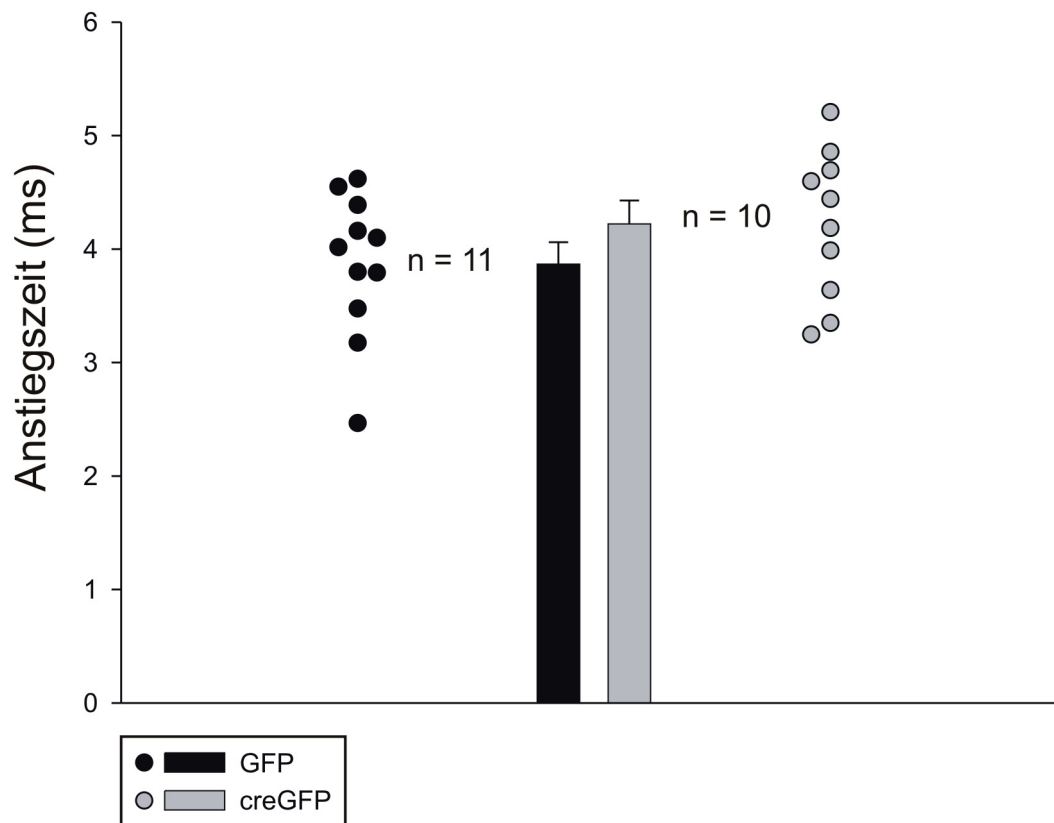


Abbildung 18: DIV 7: Mittlere Anstiegszeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten WT C57/BL6 Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Bei der Untersuchung der Anstiegszeiten der GABA_AmPSCs gab es folgende Ergebnisse: Bei GFP transfizierten WT C57BL/6 Neuronen lag eine mittlere Anstiegszeit von $3,87 \pm 0,19$ ms vor. Bei creGFP transfizierten Neuronen lag dieser Wert bei $4,22 \pm 0,21$ ms (Abb. 18). Der durchgeführte Student's t-Test wies einen p-Wert von 0,23 aus. Somit besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in den mittleren Anstiegszeiten zwischen GFP und creGFP transfizierten WT C57BL/6 Neuronen bei einem Transfektionszeitpunkt von DIV 4 und einem Messzeitpunkt

von DIV 7. Die Einzelzellwerte verteilen sich bei GFP zwischen 2,47 - 4,62 ms. Bei creGFP gab es eine Verteilung zwischen 3,25 - 5,21 ms.

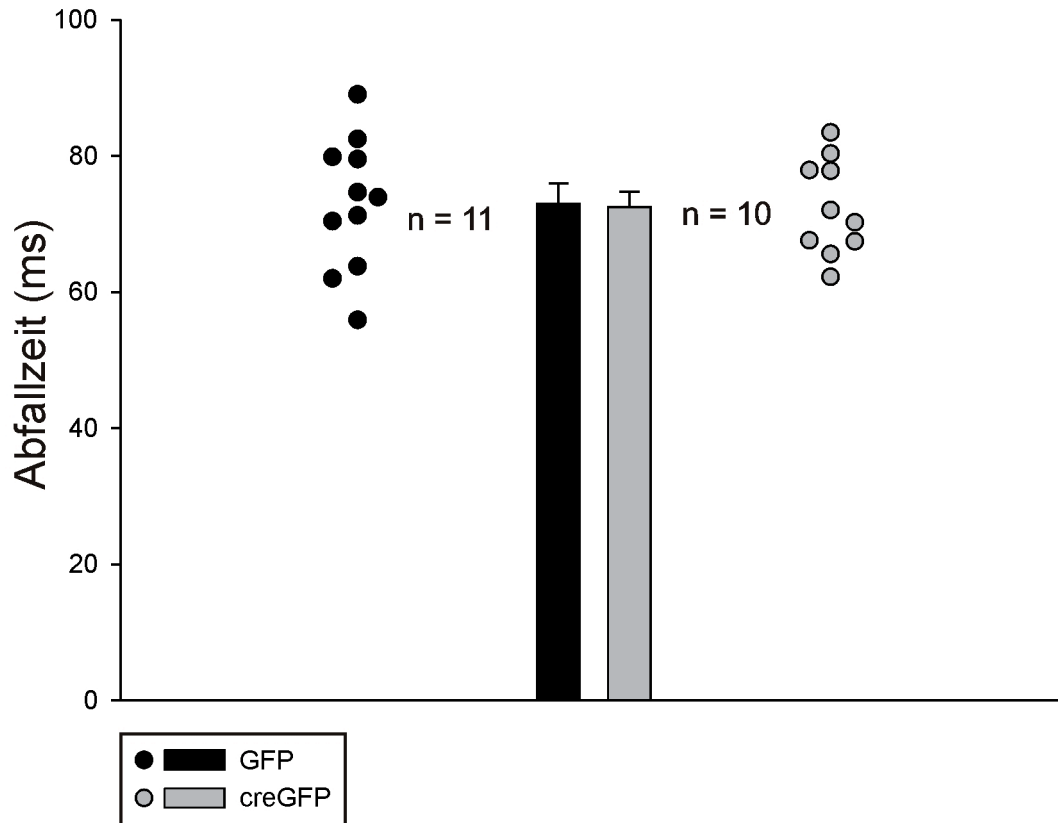


Abbildung 19: DIV 7: Mittlere Abfallzeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten WT C57/BL6 Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Die mittlere Abfallzeit von GABA_AmPSCs lag bei GFP transfizierten WT C57BL/6 Neuronen bei $72,99 \pm 2,94$ ms. Bei creGFP transfizierten Neuronen betrug die mittlere Abfallzeit $72,46 \pm 2,23$ ms (Abb. 19). Zwischen den GFP und creGFP transfizierten Zellen gibt es auch hier keinen statistisch signifikanten Unterschied, der Student's t-Test ergab einen p-Wert von 0,89. Die Verteilung in der Einzelzelldarstellung zeigt eine gleichartige Anordnung der Mittelwerte in den GFP exp. sowie den creGFP exp. Zellen.

Die Betrachtung der GABA_AmPSCs in WT C57BL/6 Kulturen wies keinen statistisch signifikanten Unterschied in den untersuchten Parametern Amplitude, Frequenz, Anstiegs- und Abfallzeit zwischen GFP und creGFP exprimierenden Neuro-

nen auf. Mit diesem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, dass die Expression von creGFP in Wildtypneuronen im Vergleich zu GFP exp. Zellen keine schädigenden Einflüsse auf die Zellfunktion ausübt.

3.2 GABA_A Rezeptor vermittelte mPSCs in E-Cadherin defizienten kortikalen Neuronen

3.2.1 GABA_AmPSCs an DIV 7

Zur Untersuchung eines möglichen Effektes des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf GABA_AmPSCs wurden zunächst GABA_AmPSCs an DIV 7 registriert. Ecad flox Neurone wurden hierbei an DIV 4 mit 5 µg GFP bzw. creGFP sowie 10 µl Lipofectamine transfiziert. An DIV 7 folgte die Messung von GABA_AmPSCs. Der durch die Cre-Rekombinase ausgelöste Knockout von E-Cadherin führte zur Bildung einer heterotypen Zellkultursituation. Die grün fluoreszierenden Neurone befanden sich in einer Umgebung von nicht transfizierten Neuronen. Durch die Anwendung des Patch-Clamp Experiments auf grün fluoreszierende Zellen konnte die Auswirkung eines postsynaptischen Knockouts von E-Cadherin untersucht werden, bei dem E-Cadherin exprimierende Neurone auf ein E-Cadherin defizientes Neuron synaptisch projizierten.

Die Ecad flox Neurone konnten mit GFP bzw. creGFP erfolgreich transfiziert werden, dies zeigte die unter UV-Anregung 3 Tage nach Transfektion auftretende grüne Fluoreszenz. Die Transfektionsrate lag ähnlich wie in der Wildtypkontrolle bei 5-10 transfizierten Neuronen pro Schale von denen 2-5 Neurone vital waren und mit der Patch-Clamp Technik untersucht werden konnten (Abb. 20). Zur statistischen Auswertung wurden 23 GFP sowie 23 creGFP exprimierende Neurone herangezogen. Von diesen wurden alle 35 Messspuren analysiert.

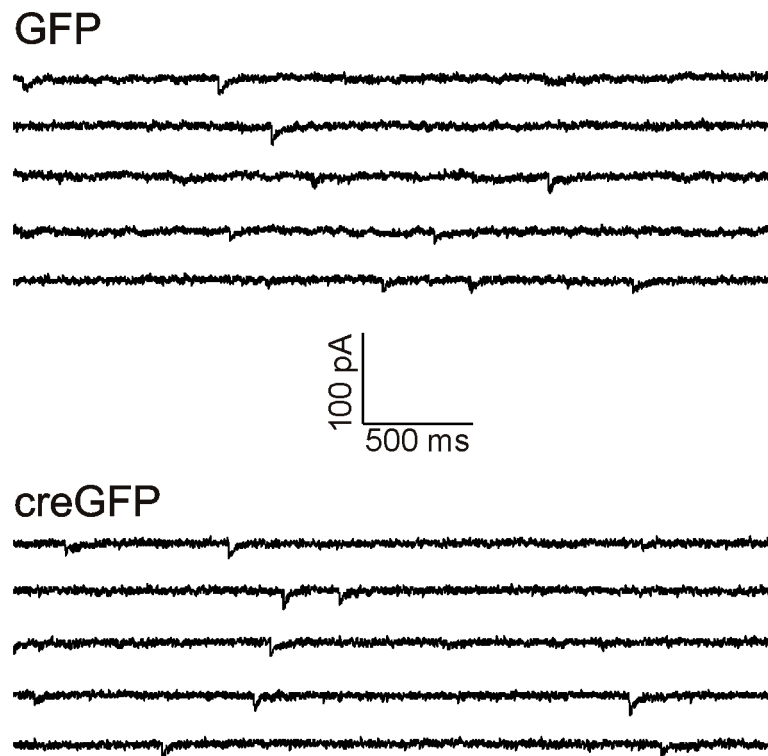


Abbildung 20: Beispiele von GABA_A mPSCs registriert in GFP bzw. creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen an DIV 7. Transfektion an DIV 4. Die gezeigten Beispielströme entsprechen in etwa den Mittelwerten der untersuchten Parameter.

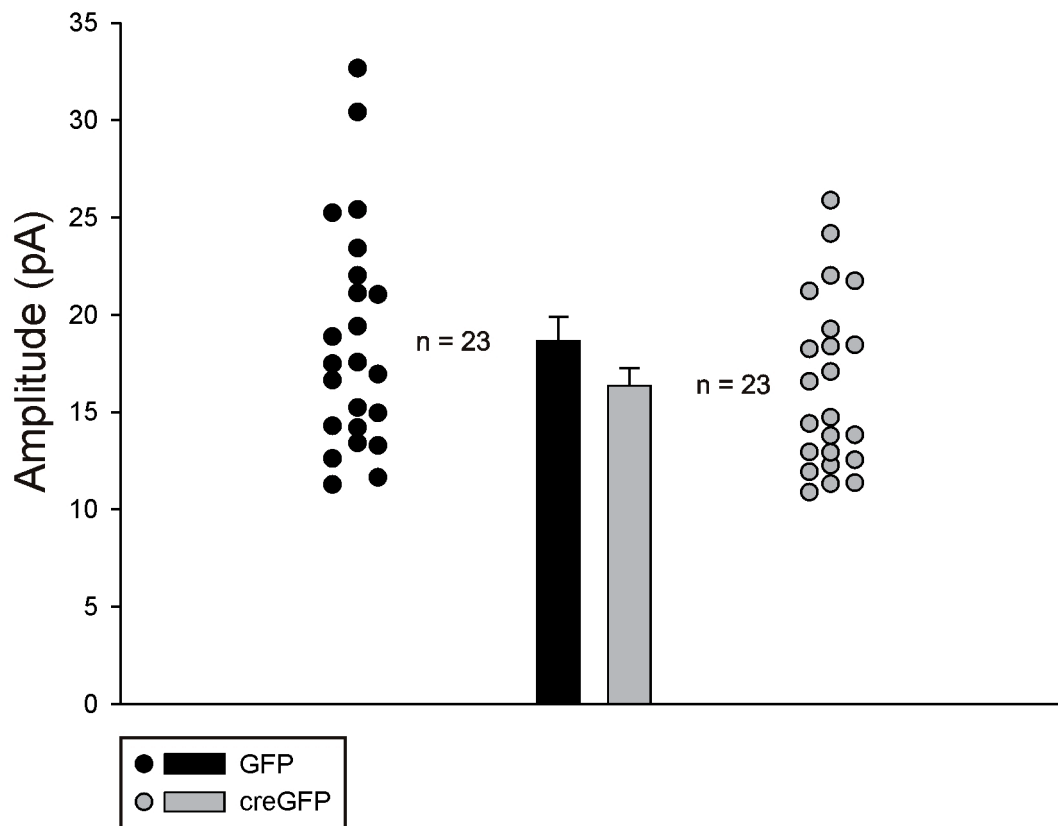


Abbildung 21: DIV 7: Mittlere Amplituden von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Bei der statistischen Auswertung der GABA_AmPSC Amplituden zeigte sich, dass die mittlere Amplitude der GFP transfizierten Ecad flox Neurone bei $18,67 \pm 1,21$ pA lag. Im Vergleich dazu lag die mittlere Amplitude der creGFP transfizierten Ecad flox Neurone bei $16,35 \pm 0,92$ pA (Abb. 21). Es besteht eine tendenzielle Verringerung der mittleren Amplitude in creGFP exp. Neuronen gegenüber GFP exp. Neuronen. Ein durchgeführter Student's t-Test wies für diesen Unterschied einen p-Wert von 0,14 aus, somit besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in den mittleren Amplituden zwischen GFP und creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen. In der Einzelzelldarstellung wird diese tendenzielle Reduktion durch die leicht unterschiedliche Verteilung der Einzelwerte veranschaulicht. Das Spektrum der Mittelwerte liegt in GFP exp. Neuronen bei 11,29 - 32,68 pA. Bei creGFP exp. Neuronen liegt dieses Spektrum bei 10,89 - 25,89 pA. Jedoch gilt es zu berücksichtigen, dass

der andeutete, nicht signifikante Unterschied, von 2 sich von den übrigen Werten deutlich absetzenden Zellen der GFP exp. Neurone abzuhängen scheint (30,42 pA und 32,68 pA).

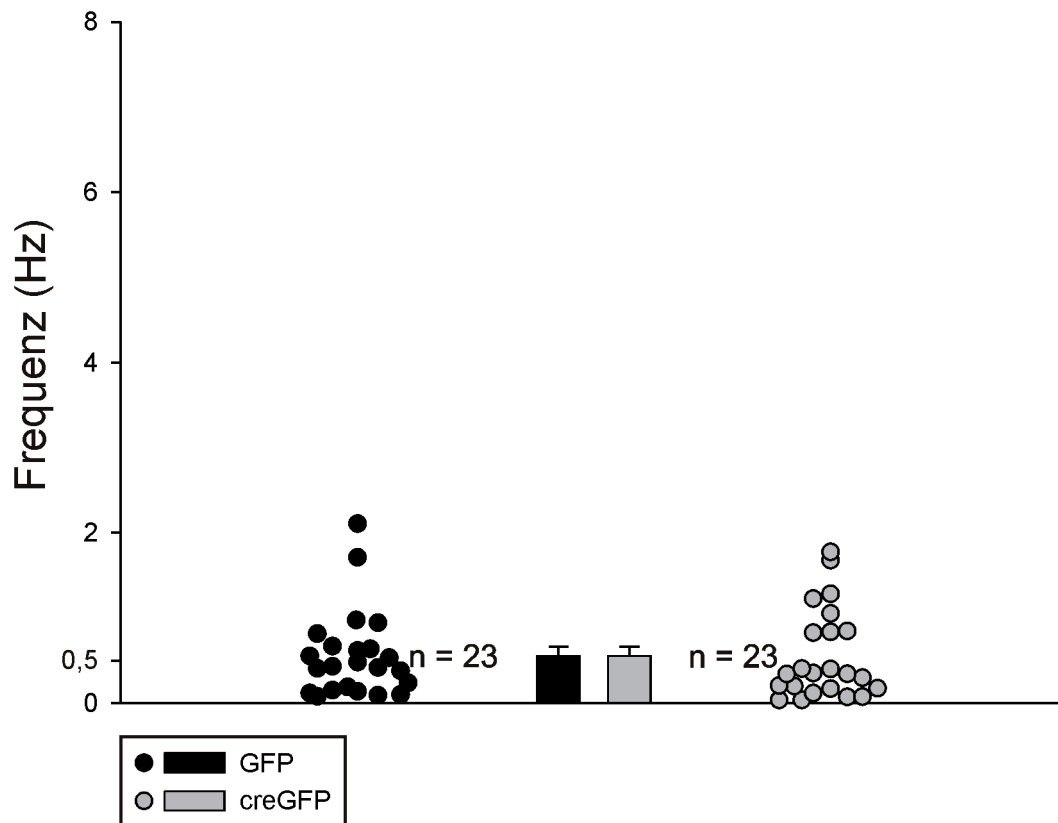


Abbildung 22: DIV 7: Mittlere Frequenzen von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Die Häufigkeit von GABA_AmPSCs wurde statistisch über die Frequenz der GABA_AmPSCs ausgewertet. Die mittlere Frequenz in GFP transfizierten Ecad flox Neuronen lag bei $0,56 \pm 0,11$ Hz. Einen vergleichbaren Mittelwert wiesen die creGFP transfizierten Neurone mit einem Mittelwert von $0,56 \pm 0,11$ Hz auf (Abb. 22). Dies entspricht bei beiden Gruppen eine Anzahl von etwa 160 GABA_AmPSCs in 35 Messspuren. Es gibt also keinen Unterschied in der Frequenz von GABA_AmPSCs zwischen GFP und creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen, wenn an DIV 4 transfiziert und an DIV 7 gemessen wird.

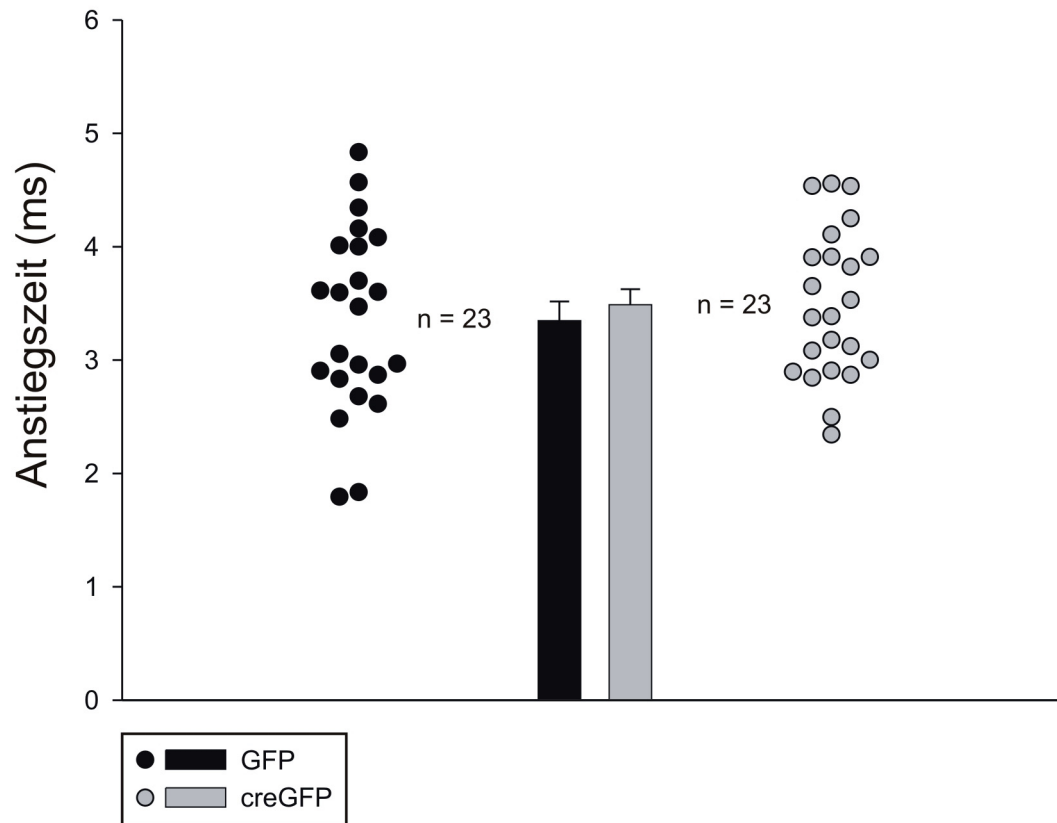


Abbildung 23: DIV 7: Mittlere Anstiegszeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Die mittlere Anstiegszeit von GABA_AmPSCs in GFP transfizierten Ecad flox Neuronen lag bei $3,35 \pm 0,17$ ms, in creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen bei $3,49 \pm 0,14$ ms (Abb. 23). In einem Student's t-Test resultierte ein p-Wert von 0,52, somit besteht kein signifikanter Unterschied in der mittleren Anstiegszeit von GABA_AmPSCs zwischen GFP und creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen.

Die mittlere Abfallzeit betrug in GFP transfizierten Ecad flox Neuronen $60,75 \pm 2,04$ ms. In creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen lag sie bei $63,73 \pm 2,27$ ms. Bei diesem geringfügigen Unterschied existiert keine statistische Signifikanz (p-Wert: 0,33).

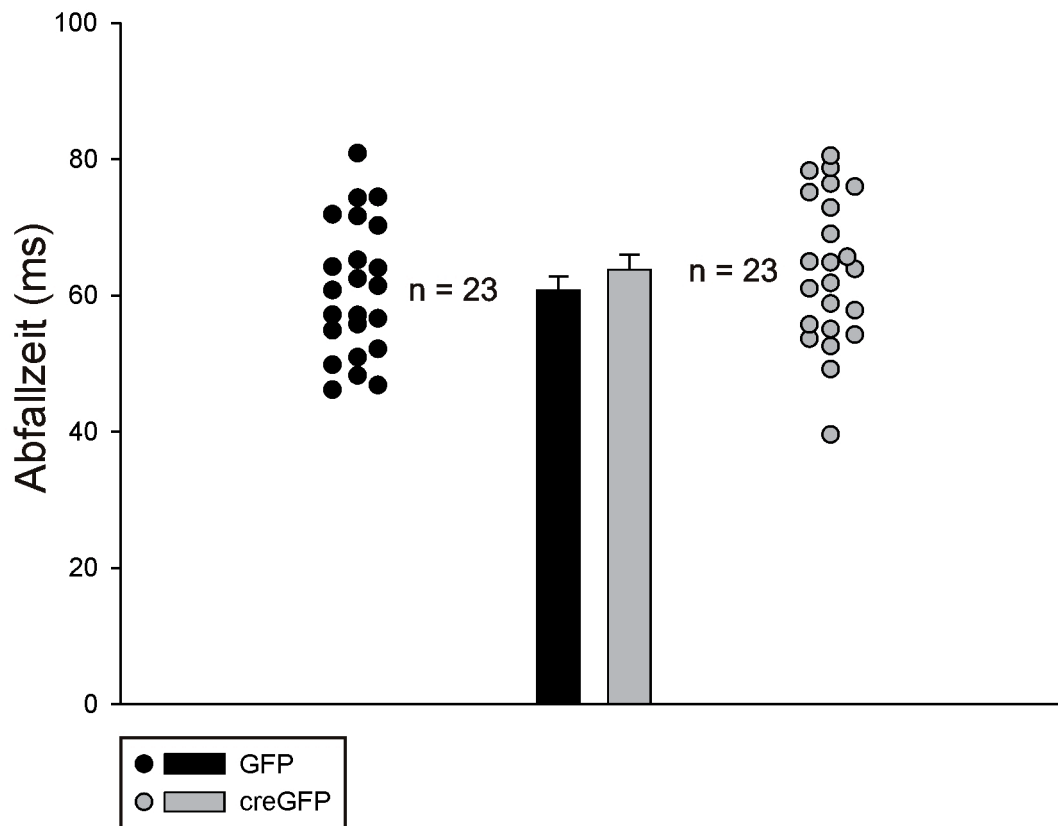


Abbildung 24: DIV 7: Mittlere Abfallzeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

In diesem Experiment konnte kein Unterschied in Amplitude, Frequenz, Anstiegs- und Abfallzeit der GABA_AmPSCs zwischen GFP und creGFP exprimierenden Ecad flox Neuronen nachgewiesen werden. Die Expression von creGFP war vorhanden, da eine grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte.

3.2.2 GABA_AmPSCs an DIV 14

Zur weiteren Abklärung möglicher Auswirkungen des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf GABA_AmPSCs wurde eine längere Expressionsdauer (bis DIV 14) von creGFP und GFP der an DIV 4 transfizierten Ecad flox Neurone gewählt. Die längere Expression von creGFP in den geflochten Neuronen sollte einerseits ermöglichen, dass vorhandenes E-Cadherin abgebaut und nicht mehr durch neu exprimiertes

E-Cadherin ersetzt werden kann. Wie lange das Verschwinden des E-Cadherin Proteins dauert, ist unbekannt. Weiterhin könnte sich ein Effekt erst über die längere Kulturzeit ausprägen, da in diesem Zeitraum eine generelle Reifung der Neurone stattfindet. Wie in 3.2.1 wird durch den konditionalen Knockout eine heterotype Kultur geschaffen. Die Expression von GFP sowie creGFP über einen Zeitraum von zehn Tagen war nachweisbar durch unter UV-Anregung auftretende grüne Fluoreszenz. Die lange Expressionsdauer führte jedoch in GFP transfizierten Zellen zu einem erhöhten Zellsterben, so dass es schwierig wurde, vitale GFP exprimierende Zellen zu untersuchen. In diesem Fall waren 0-2 Zellen pro Schale untersuchbar. Ein erhöhtes Zellabsterben war in creGFP transfizierten Neuronen nicht zu beobachten.

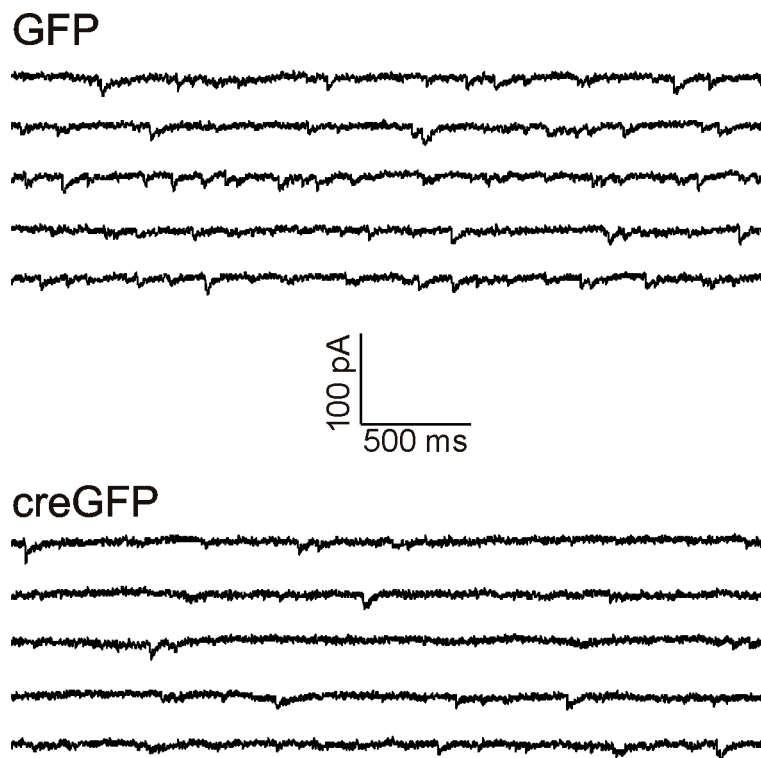


Abbildung 25: Beispiele von GABA_A mPSCs registriert in GFP bzw. creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen an DIV 14. Transfektion an DIV 4.

Im Vergleich zu GFP Zellen war eine längere Expression von creGFP eher möglich, es gab etwa 1-3 Zellen pro Kulturschale. Das Durchführen des Patch-Clamp Experimentes gestaltete sich bei diesen gereiften, lange unter den Einflüssen der Transfektion stehenden Zellen besonders schwierig. Es war häufig nicht möglich, eine stabile Ganzzellableitung zu erhalten. Dies lässt sich mit einem generell höheren Kulturalter und dadurch veränderten Membraneigenschaften in Einklang bringen.

Es wurden im folgenden Experiment 12 GFP und 15 creGFP exprimierende Ecad flox Neurone untersucht (Abb. 25).

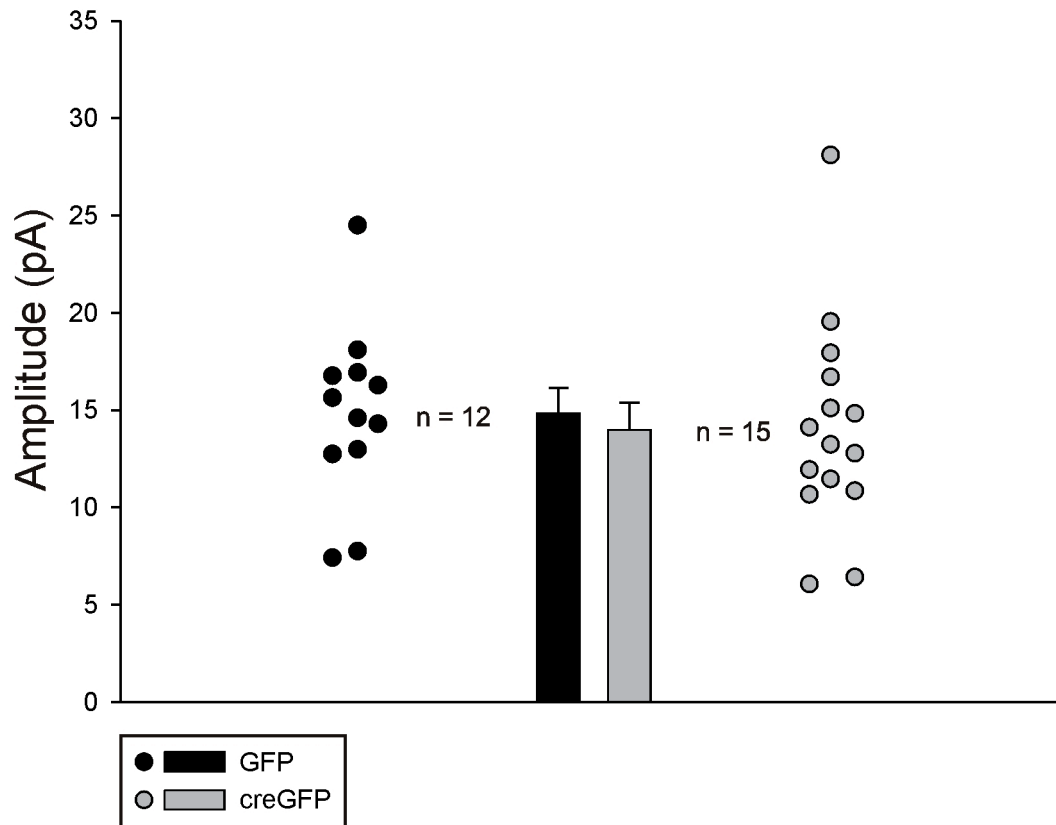


Abbildung 26: DIV 14: Mittlere Amplituden von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Die mittlere Amplitude von GABA_AmPSCs in lange GFP exprimierenden Ecad flox Neuronen lag bei $14,84 \pm 1,31$ pA. creGFP lange exprimierende Ecad flox Neurone wiesen eine mittlere GABA_AmPSC Amplitude von $13,99 \pm 1,39$ pA auf (Abb. 26). Zwischen beiden mittleren Amplituden existiert kein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert: 0,67). Es gibt in der Gruppe der GFP sowie der creGFP exp. Neurone Einzelzellwerte, die sich von der Verteilung der anderen Werte unterscheiden. Dies sind bei den GFP exp. Neuronen Werte von 7,42 pA und 7,76 pA sowie 24,5 pA. Bei den creGFP exp. Neuronen sind es Werte von 6,07 pA und 6,42 pA sowie 28,11 pA.

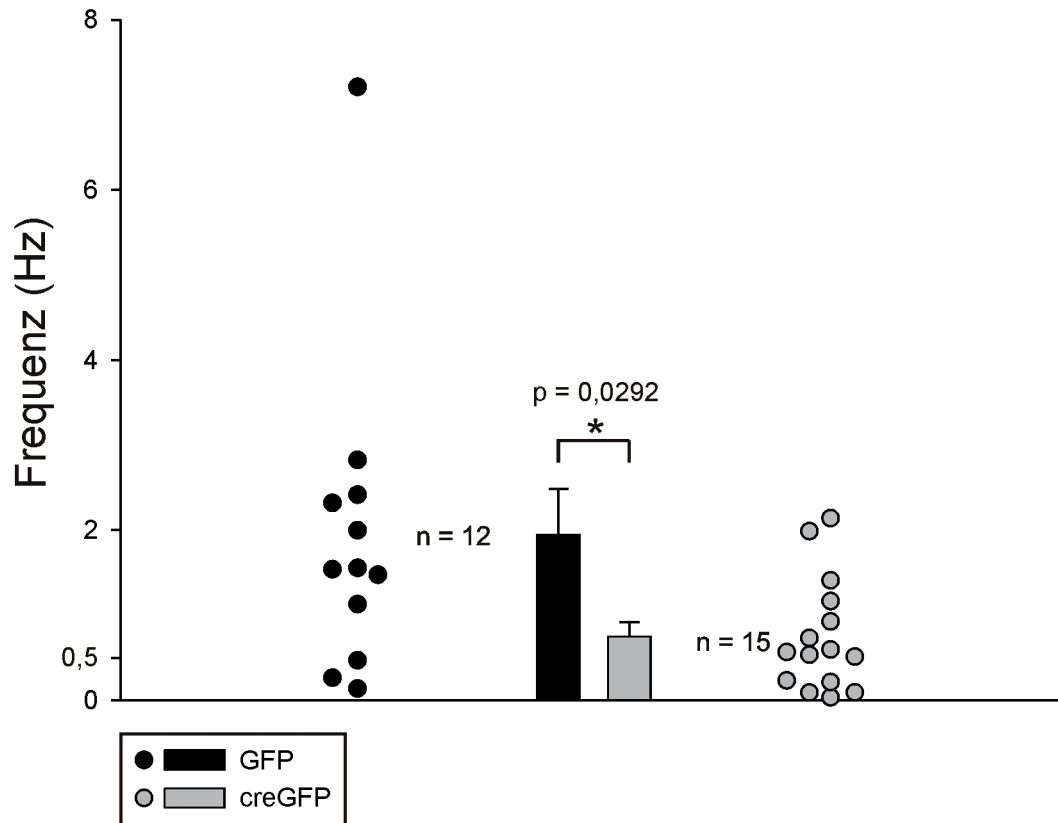


Abbildung 27: DIV 14: Mittlere Frequenzen von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Bei der Auswertung der mittleren Frequenz von GABA_AmPSCs in GFP lang exprimierenden Ecad flox Neuronen ergab sich ein Mittelwert von $1,95 \pm 0,54$ Hz. Dies entspricht einer durchschnittlichen Anzahl von etwa 559 GABA_AmPSCs in 35 Messspuren. Im Unterschied dazu lag die mittlere Frequenz von GABA_AmPSCs in creGFP lang exprimierenden Neuronen bei $0,75 \pm 0,17$ Hz (Abb. 27) was einer durchschnittlichen Anzahl von 215 Ereignissen in 35 Messspuren entspricht. Ein Student's t-Test ergab einen p-Wert von 0,029. Es existiert daher ein statistisch signifikanter Unterschied in der Frequenz der GABA_AmPSCs zwischen GFP und creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen, wenn der Transfektionszeitpunkt bei DIV 4 und der Messzeitpunkt bei DIV 14 liegt. Die Einzelzelldarstellung veranschaulicht diesen Effekt: Die Verteilung der Einzelwerte der GFP transfizierten Zellen ist relativ

gleichmäßig zwischen Werten von 0,14 Hz und 2,82 Hz. Bei den creGFP exp. Zellen kumulieren die Einzelwerte jedoch zwischen 0,03 Hz und ungefähr 0,6 Hz.

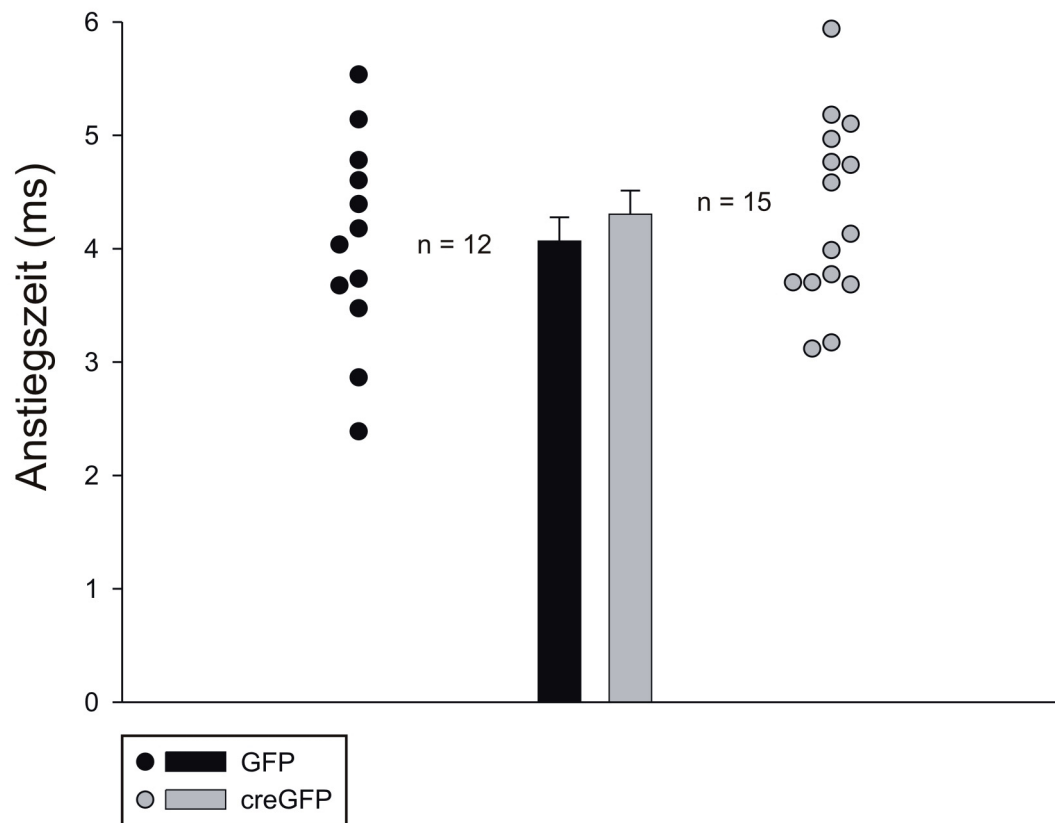


Abbildung 28: DIV 14: Mittlere Anstiegszeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Bei der statistischen Auswertung der mittleren Anstiegszeit zeigten sich keine großen Änderungen. Sie lag bei den GFP exprimierenden Ecad flox Neuronen bei $4,07 \pm 0,21$ ms und bei den creGFP exprimierenden Ecad flox Neuronen bei $4,3 \pm 0,21$ ms. Der Unterschied war nicht signifikant (p-Wert: 0,48).

Als letzter Parameter wurde die mittlere Abfallzeit untersucht. Diese lag bei den GFP transfizierten Ecad flox Neuronen bei $52,8 \pm 1,77$ ms und in creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen bei $56,46 \pm 2,72$ ms, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied bestand (p-Wert: 0,297).

Zusammengefasst konnte an DIV 14 ein signifikanter Effekt des konditionalen E-

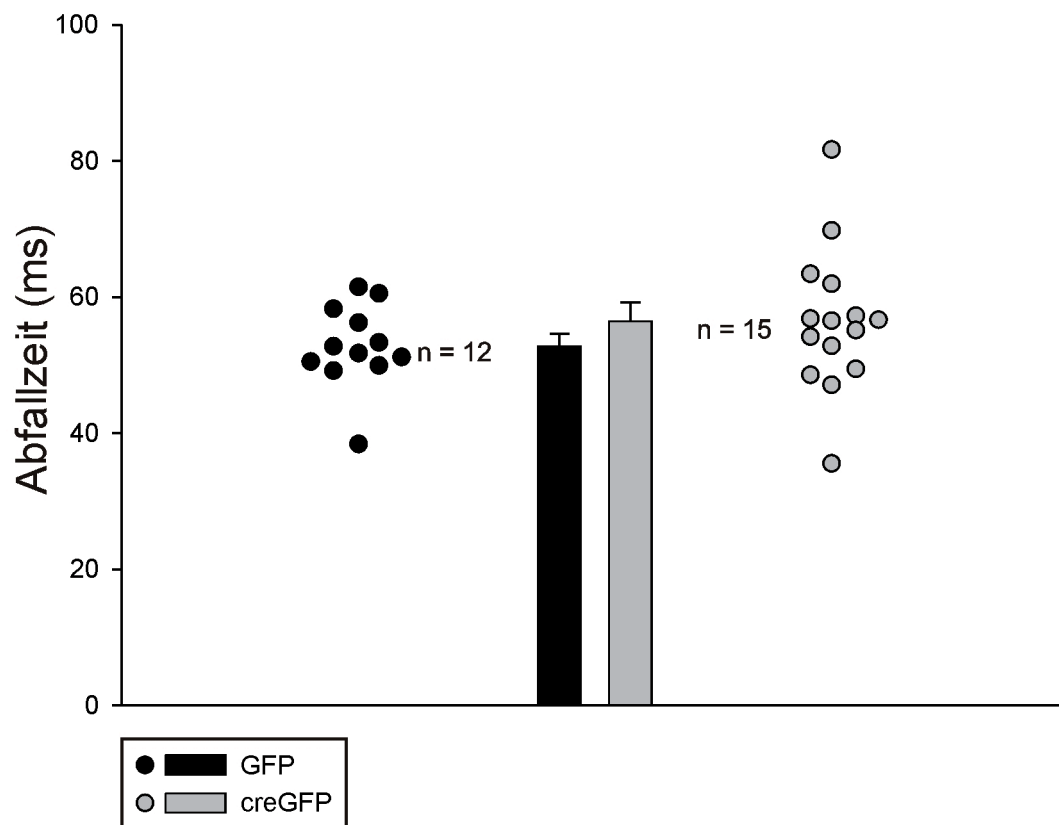


Abbildung 29: DIV 14: Mittlere Abfallzeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Cadherin Knockouts gezeigt werden. Der Unterschied in der Frequenz zwischen GFP exp. Neuronen: $1,95 \pm 0,54$ Hz und creGFP exp. Neuronen: $0,75 \pm 0,17$ Hz wies statistische Signifikanz auf (p-Wert von 0,029). Dieser Effekt ist auf die verlängerte Zeitdauer nach Beginn der Expression von creGFP zurückzuführen. Die Frequenz von GABA_AmPSCs ist ein Parameter, der auf Präsynaptische Veränderungen hindeutet, kann also durch die Anzahl der Synapsen oder die funktionellen Eigenschaften der vesikulären Freisetzung beeinflusst sein. Die hier durchgeführte Untersuchung der heterotypen Kultur E-Cadherin exprimierender sowie E-Cadherin defizienter Neurone zeigte somit eine mögliche Bedeutung von E-Cadherin in der Funktion kortikaler GABAerger Synapsen.

3.2.3 GABA_AmPSCs an DIV 10 nach Transfektion an DIV 8

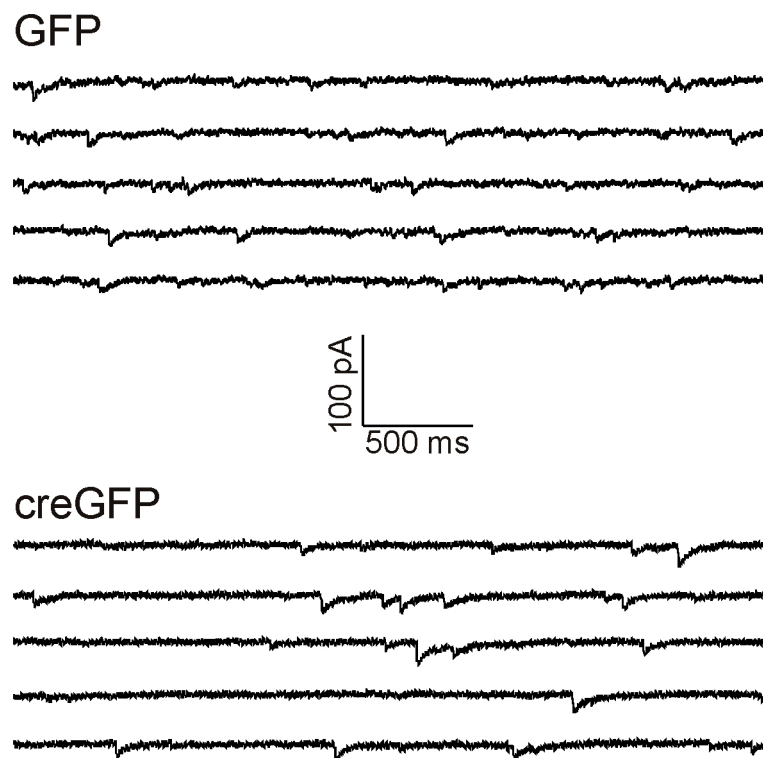


Abbildung 30: Beispiele von GABA_AmPSCs registriert in GFP oder creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen an DIV 10. Transfektion an DIV 8.

Als weiteres elektrophysiologisches Experiment wurden Ecad flox Neurone an DIV 8 transfiziert und an DIV 10 gemessen. Die Transfektion fand zu einem Zeitpunkt statt, an dem die Synaptogenese schon begonnen hatte, jedoch vor der Phase des

stärksten axonalen Wachstums, welches zwischen DIV 10 und DIV 17 stattfindet (Kraszewski et al., 1992a). Um eine mögliche Auswirkung eines konditionalen Knockouts von E-Cadherin in diesem Zeitfenster zu untersuchen, wurden erneut GABA_AmPSCs gemessen und die Parameter Amplitude, Frequenz, Anstiegs- und Abfallzeit untersucht. Die Transfektion zu einem späteren Zeitpunkt als in den vorangegangenen beiden Experimenten, an DIV 8, erwies sich als möglich. Die Zellen exprimierten die fluorophoren Proteine bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung zwei Tage post transfectionem. Die orientierende morphologische Begutachtung war wie in allen Altersgruppen unauffällig. Die Transfektionseffizienz war mit den vorherigen Experimenten vergleichbar - etwa 5-10 transfizierte Zellen sowie 2-5 vitale Neurone, die einer Untersuchung über das Patch-Clamp Experiment zugänglich waren (Abb. 30).

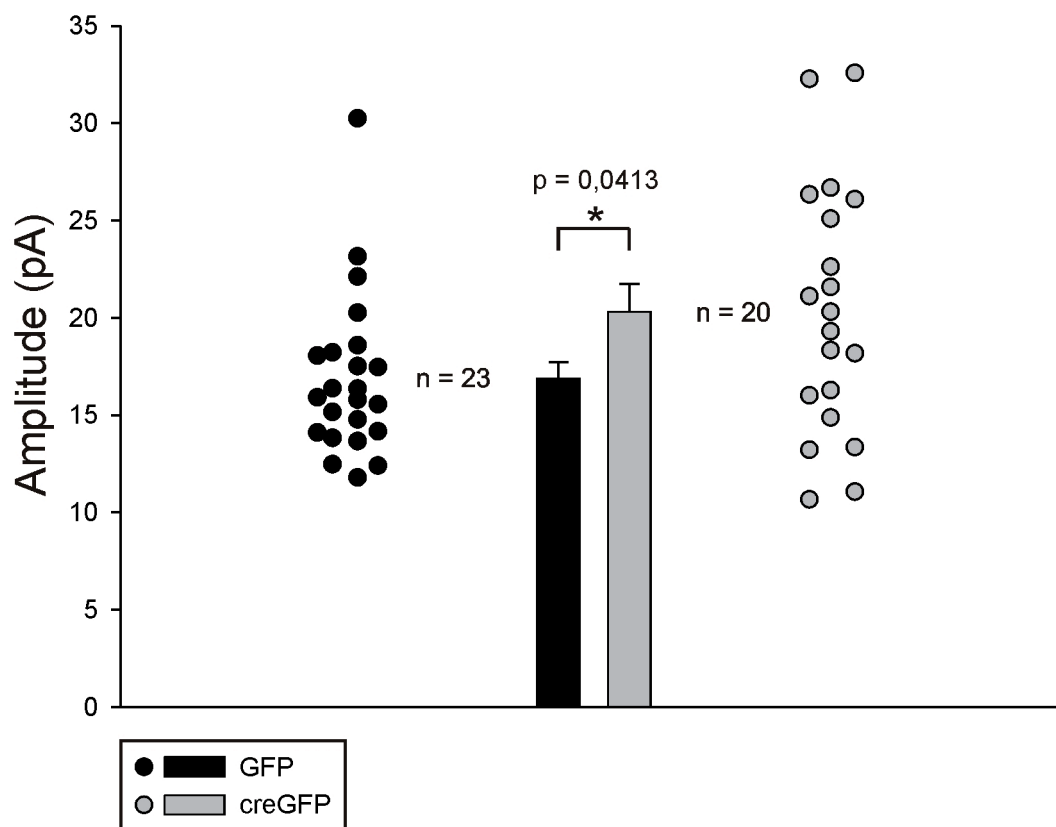


Abbildung 31: DIV 10: Mittlere Amplituden GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzeldarstellung.

Die mittlere Amplitude der GABA_AmPSCs in GFP transfizierten Ecad flox Neuronen betrug $16,88 \pm 0,86$ pA. Im Unterschied dazu lag die mittlere Amplitude der GABA_AmPSCs in creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen bei $20,3 \pm 1,44$ pA. Es besteht ein niedrig-signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Amplitude GFP und creGFP exprimierender Neurone (p-Wert: 0,041). In der Einzelzelldarstellung ist eine Population von Zellen mit mittleren Amplituden über 25 pA in den creGFP exp. Neuronen zu erkennen, die bei den GFP exp. Neuronen nicht vorhanden ist.

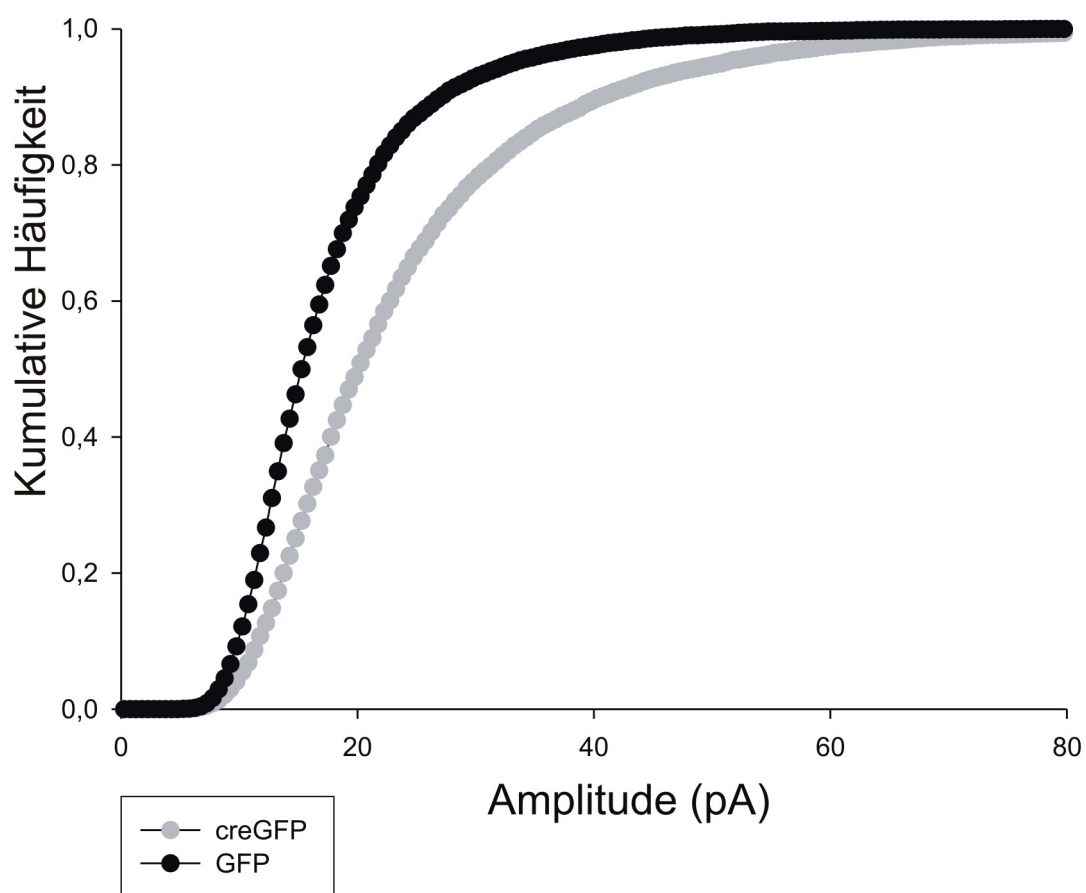


Abbildung 32: DIV 10: Kumulatives Amplitudenhistogramm von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen.

Eine Darstellung der kumulativen Häufigkeiten der Amplituden weist für creGFP exp. Zellen eine Verschiebung nach rechts zu höheren Amplitudenwerten auf (Abb. 32). Die untersuchten Amplituden zeigen einen Effekt für den konditionalen Knock-out von E-Cadherin in DIV 8 transfizierten und DIV 10 gemessenen Neuronen.

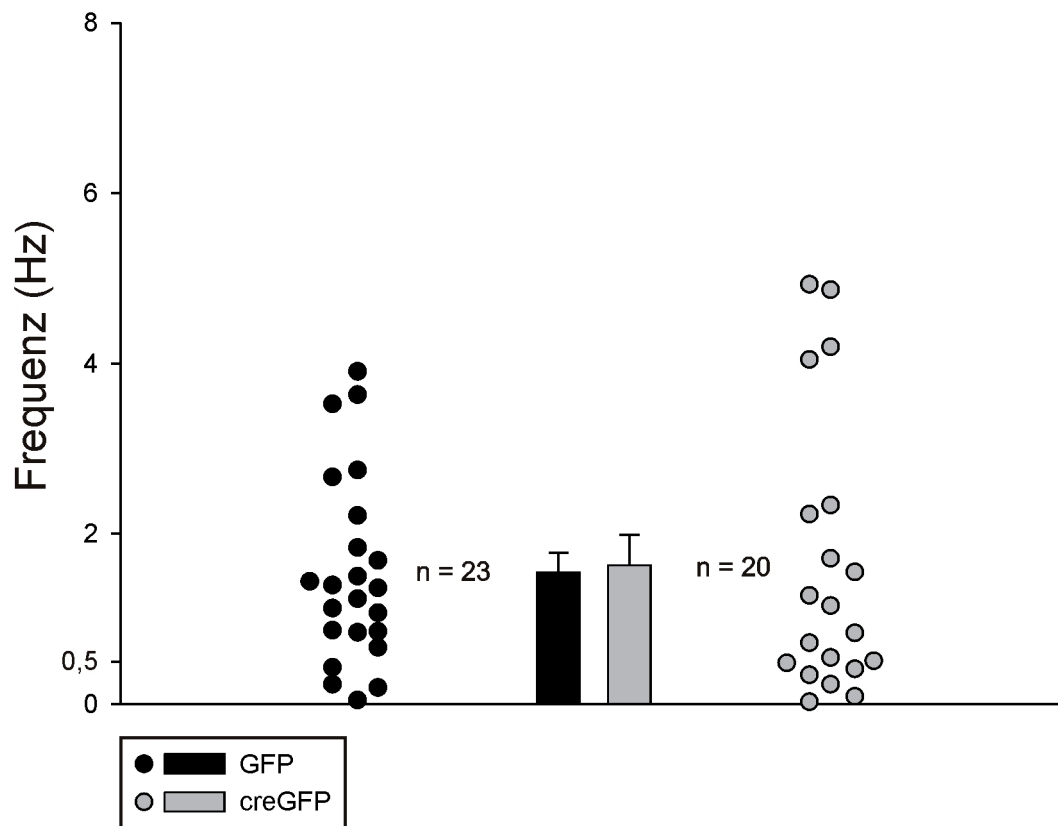


Abbildung 33: DIV 10: Mittlere Frequenzen von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

Bei der Ermittlung der mittleren Frequenz GFP transfizierter Ecad flox Neurone resultierte ein Wert von $1,54 \pm 0,23$ Hz. Die mittlere Frequenz creGFP transfizierter Neurone lag bei $1,63 \pm 0,36$ Hz (Abb. 33). Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,84 jedoch nicht statistisch signifikant.

Bei der Betrachtung der mittleren Anstiegszeit der GABA_AmPSCs ergab sich für GFP transfizierter Ecad flox Neurone ein Wert von $4,21 \pm 0,19$ ms. In creGFP transfizierten Ecad flox Neuronen lag dieser Wert bei $4,12 \pm 0,22$ ms (Abb. 34). Es existiert zwischen den GFP und creGFP Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied der mittleren Anstiegszeit (p-Wert: 0,76). Bei dem letzten untersuchten Parameter, der mittleren Abfallzeit, ergab sich für GFP transfizierter Ecad flox Neurone eine Dauer von $59,3 \pm 1,56$ ms, in creGFP transfizierten Neuronen lag der Wert

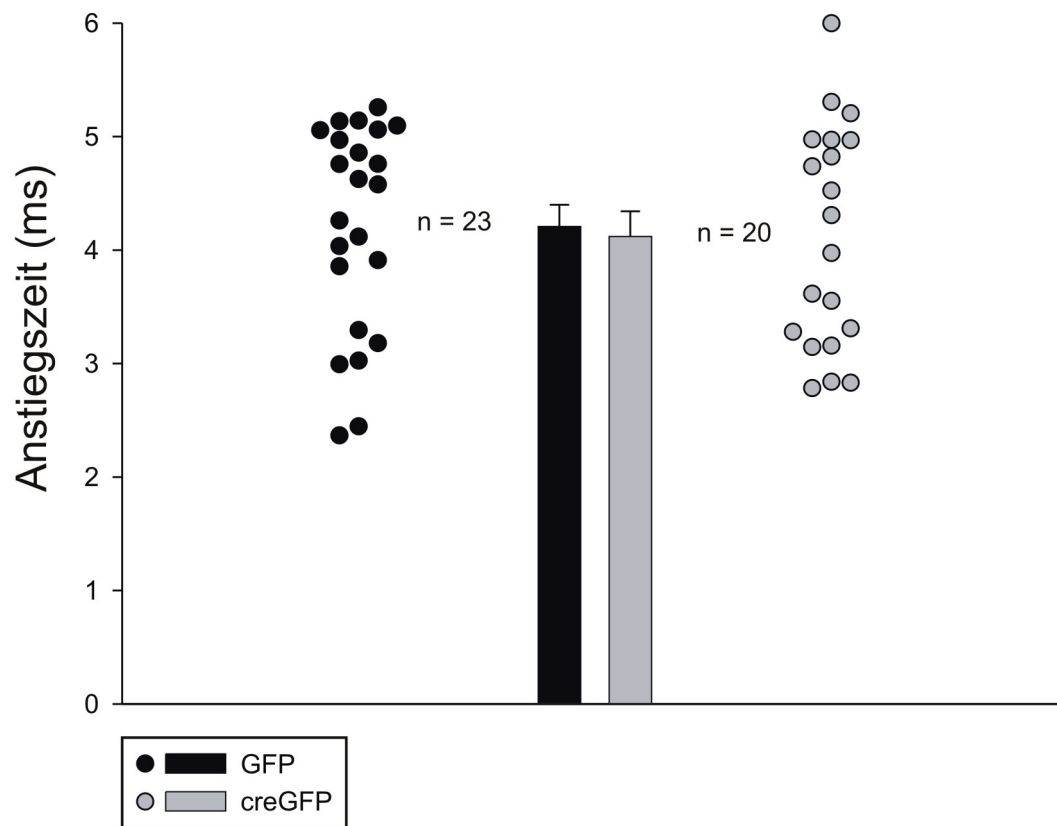


Abbildung 34: DIV 10: Mittlere Anstiegszeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

bei $66,25 \pm 1,67$ ms (Abb. 35). Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant. Der p-Wert betrug 0,004. Die Transfektion an DIV 8 und Messung an DIV 10 zeigt einen Effekt des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf die mittlere Abfallzeit der von GABA_AmPSCs im Sinne einer Verlängerung der mittleren Abfallzeit.

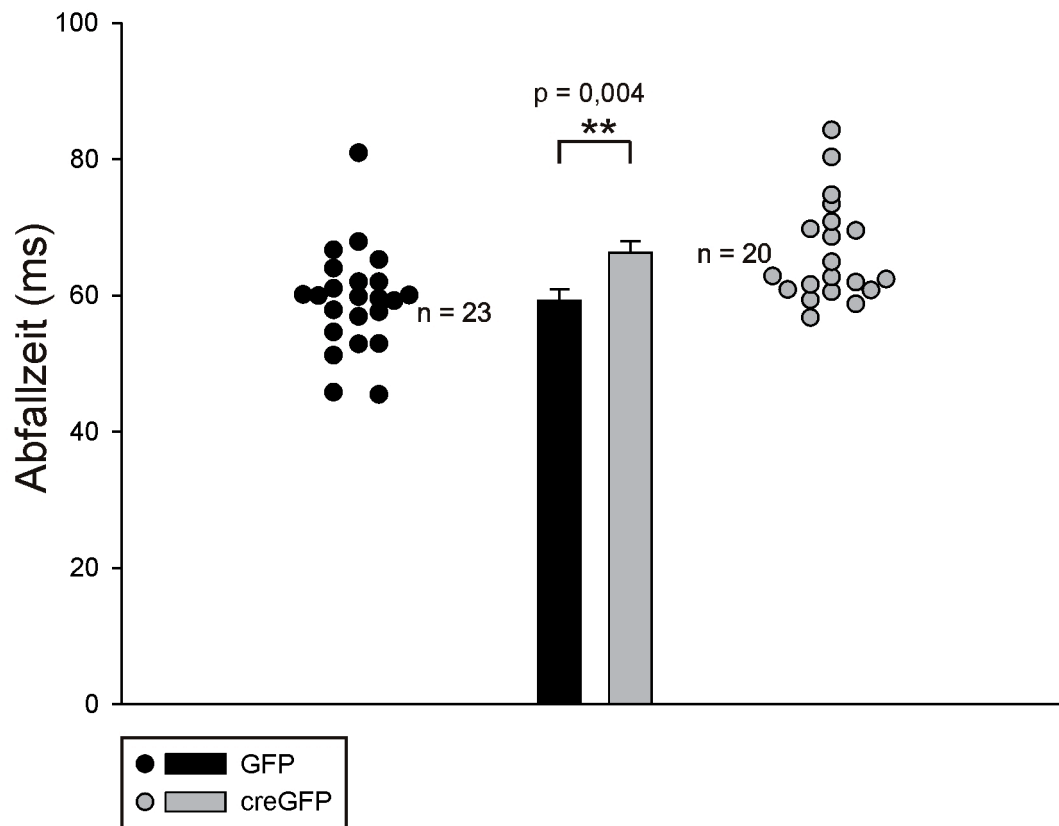


Abbildung 35: DIV 10: Mittlere Abfallzeiten von GABA_AmPSCs in creGFP und GFP transfizierten Ecad flox Neuronen. Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung.

3.2.4 Zusammenfassung der Effekte auf GABA_AmPSCs

Die Experimente an DIV 7, DIV 14 und DIV 10 zeigten, dass die Untersuchung eines konditionalen E-Cadherin Knockouts in primär kultivierten kortikalen Neuronen durch Transfektion und anschließende funktionelle elektrophysiologische Analyse möglich ist. In allen durchgeführten Transfektionsprotokollen resultierten erfolgreich durchgeführte Transfektionen, wenn auch mit unterschiedlicher Anzahl messbarer Zellen. Je länger GFP bzw. creGFP exprimiert wurden, desto geringer war die Zahl elektrophysiologisch untersuchbarer Zellen und desto schwieriger wurde die Durchführung des Patch-Clamp Experimentes. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bestimmte Phasen der Maturierung GABAerger Synapsen in Massenkultur kortikaler Neurone von E-Cadherin beeinflusst werden. Die Abnahme der Frequenz

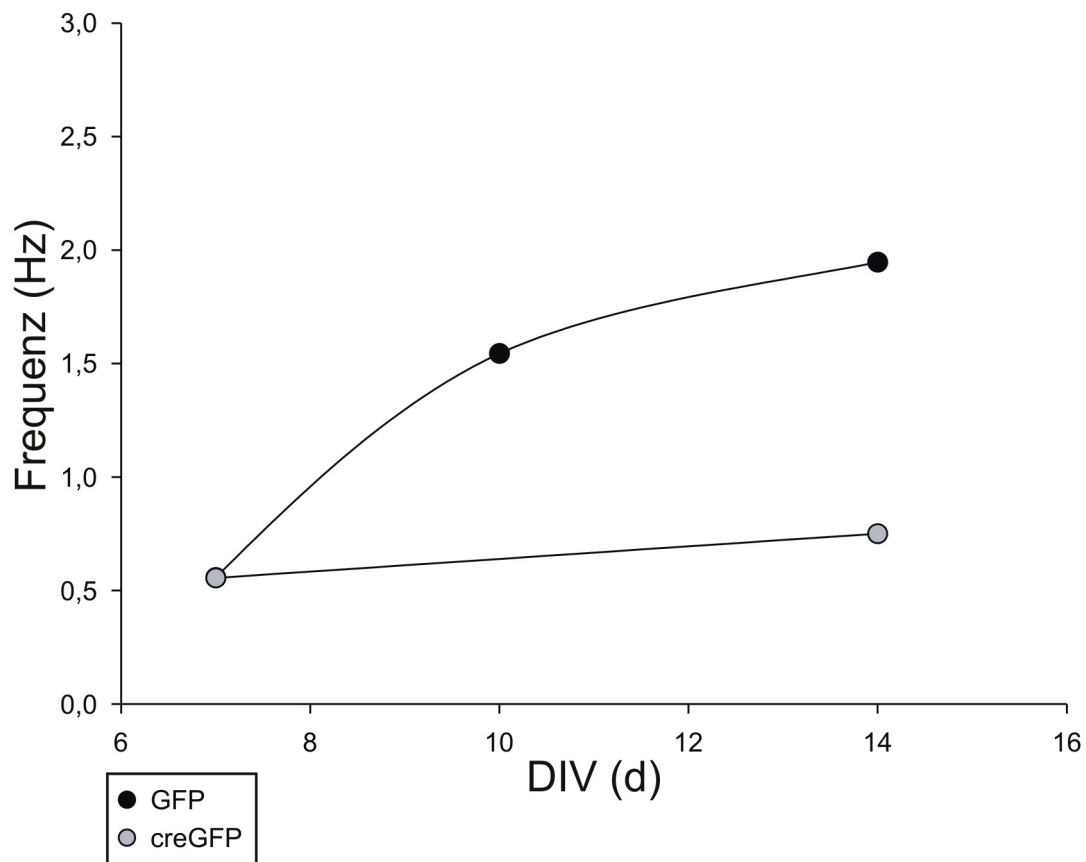


Abbildung 36: Zusammenfassende Darstellung der GABA_AmPSC Frequenzen. Die Frequenzen an DIV 7 sind für GFP und creGFP transfizierte Neurone gleich

an DIV 14, sowie die größere Amplitude und längere Abfallzeit an DIV 10 stellen Befunde dar, die auf den konditionalen Knockout zurückgeführt werden können.

Trägt man die Entwicklung der Frequenz gegen die Zeit auf, resultiert eine zeitabhängige Frequenzzunahme (Abb. 36). Die Frequenzwerte der GFP transfizierten Neurone an DIV 10 sind in dieser Abbildung miteinbezogen, da der Transfektionszeitpunkt bei GFP transfizierten Neuronen keinen Einfluss auf die Funktion haben sollte. Zu erkennen ist, dass bei creGFP transfizierten Zellen nahezu kein Anstieg der Frequenz zwischen den Messzeitpunkten DIV 7 und DIV 14 stattfindet. Im Vergleich dazu steigt die Frequenz GFP transfizierter Neurone. Im Student's t-Test zeigte sich eine signifikante Frequenzzunahme zwischen DIV 7 und DIV 14 (p-Wert: 0,0018). Bei creGFP transfizierten Neuronen resultiert keine signifikante Frequenzzunahme zwischen DIV 7 und DIV 14 (p-Wert: 0,30). Diese Experimente lassen keine Schlussfolgerung zu, ob es sich um einen prä- oder einen postsynaptischen Effekt handelt.

Bei dem Vergleich der Amplituden der Ereignisse zu verschiedenen Zeitpunkten ist festzustellen, dass sich die Amplituden nicht in Abhängigkeit von der Kulturdauer verändern. Beispielsweise ist bei GFP exp. Neuronen zwischen DIV 7 und DIV 14 keine signifikante Änderung der Amplituden zu beobachten (p-Wert 0,055). Auch bei creGFP exp. Neuronen ist zwischen DIV 7 und DIV 14 keine signifikante Änderung der Amplituden vorhanden (p-Wert 0,129).

3.3 Evozierte GABA_A Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme

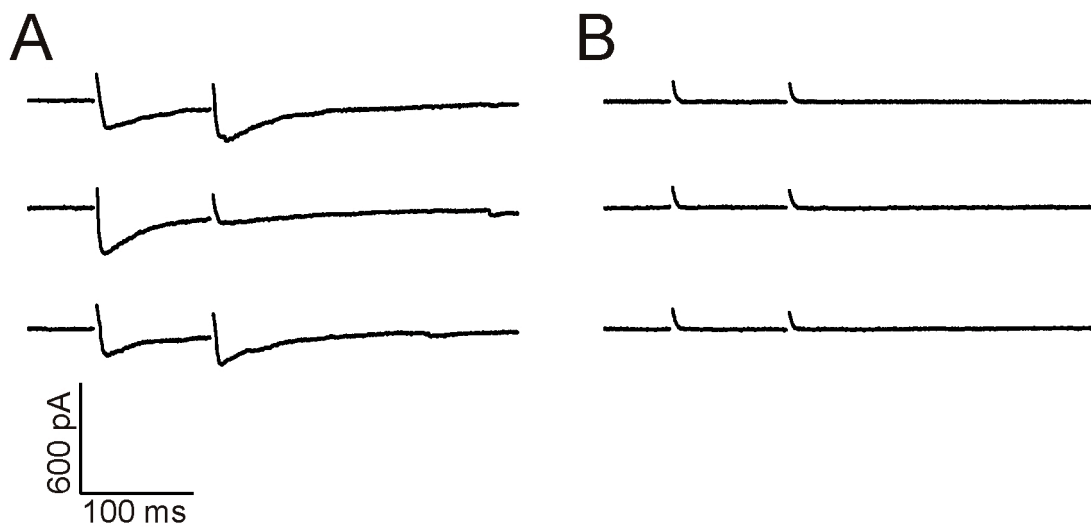


Abbildung 37: DIV 14: Pharmakologische Blockade der evozierten GABA_A Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme. Es handelt sich um ein untransfiziertes Ecad flox Neuron. Das Reizartefakt wurde zum größten Teil entfernt. A: Evozierte PSCs vor Blockade B: Nach Hinzugabe von 7,5 μ M Gabazine und dadurch ausgelöste Blockade der GABA_A Rezeptoren sind keine GABAergen PSCs evozierbar.

Um die Frage anzugehen, ob heterotype Primärkulturen E-Cadherin defizienter Neurone, welche an DIV 4 transfiziert und an DIV 14 gemessen wurden, einen prä- oder postsynaptischen Defekt zeigen, wurde ein Stimulationsexperiment durchgeführt. Die E-Cadherin defizienten Neurone bilden in der Massenkultur synaptische Verbindungen mit E-Cadherin exprimierenden Neuronen. Die Stimulation der präsynaptischen E-Cadherin exprimierenden Zellen ruft mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit einen messbaren transmembranalen Strom an der als Postsynapse gewählten E-Cadherin defizienten Zelle hervor.

Es wurden an DIV 4 transfizierte Ecad flox Neurone an DIV 14 gemessen. Die durch die Stimulation hervorgerufenen postsynaptischen Ströme waren durch Ga-

bazine blockierbar, es handelt sich also um GABA_A Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme (GABA_APSCs) (Abb. 37). Die postsynaptischen Ströme wurden nun hinsichtlich ihrer Amplitude getrennt für den 1. und den 2. Puls ausgewertet. Die Auswertung schloss die ersten 10 Doppelpulse ein, um run-down Effekte zu vermeiden.

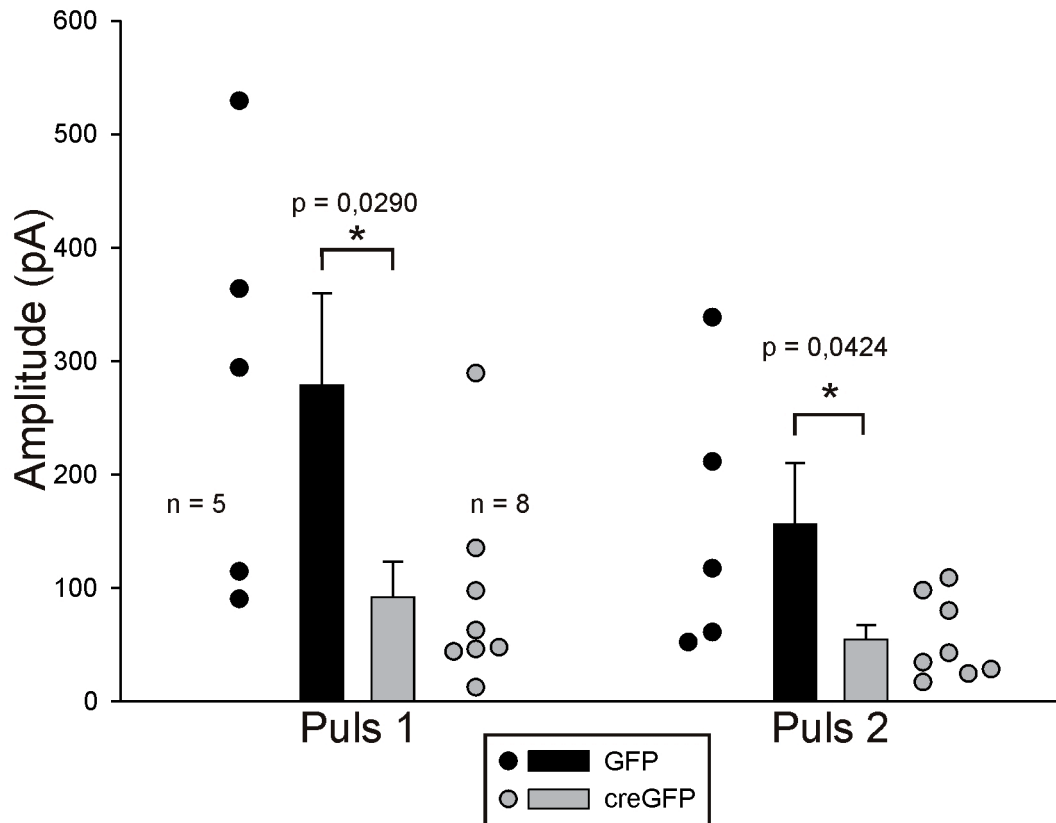


Abbildung 38: DIV 14: Darstellung der mittleren Amplituden der Antworten auf die ersten zehn Doppelpulse als Balkendiagramm mit Standardfehler und Einzelzelldarstellung getrennt nach erstem und zweitem Stimuluspuls. Gemessen wurden creGFP und GFP transfizierte Ecad flox Neurone.

Hierbei zeigte sich, dass GFP transfizierte Neurone nach dem ersten Puls postsynaptische Ströme mit einer mittleren Amplitude von $278,49 \pm 81,49$ pA aufwiesen. creGFP transfizierte Neurone zeigten nach dem 1. Puls eine mittlere Amplitude von $91,89 \pm 12,7$ pA. Der Unterschied in der Amplitude postsynaptischer Ströme nach dem 1. Puls ist signifikant. Ein Student's t-Test weist hierfür einen p-Wert von 0,029 aus. Es handelt sich hierbei um eine Reduktion der Amplituden um den Faktor 3.

Der 2. Puls löste in GFP transfizierten Neuronen postsynaptische Ströme mit einer mittleren Amplitude von $156,14 \text{ pA} \pm 53,71 \text{ pA}$ aus. Bei creGFP transfizierten Neuronen lag die mittlere Amplitude der evozierten postsynaptischen Ionenströme bei $54,24 \pm 12,7 \text{ pA}$ (Abb. 38). Dieser Unterschied in der mittleren Amplitude der postsynaptischen Ionenströme auf den 2. Puls ist statistisch signifikant. Der p-Wert lag bei 0,042. Es zeigte sich bei GFP sowie creGFP exp. Neuronen eine Reduktion der mittleren Amplituden vom 1. Puls auf den 2. Puls um etwa den Faktor 1,7 (GFP: 1,78, creGFP: 1,69).

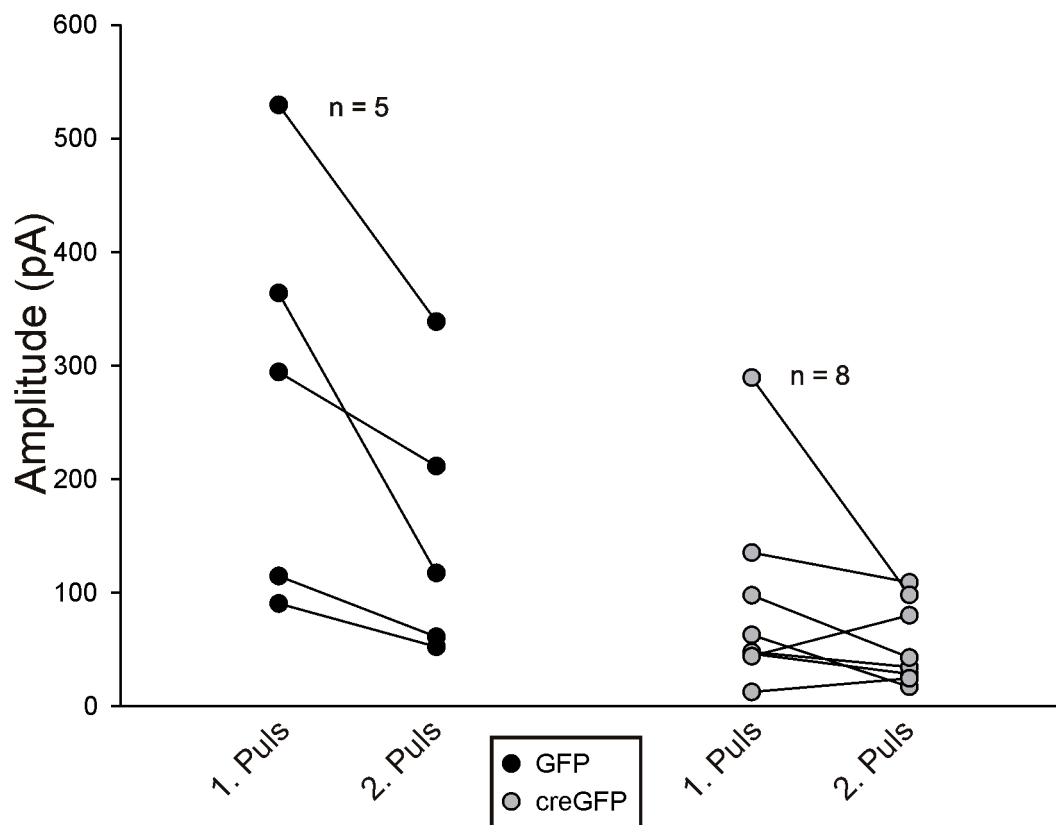


Abbildung 39: DIV 14: Darstellung der mittleren Amplituden der Antworten auf die ersten zehn Doppelpulse als Einzeldarstellung der gemessenen Zellen. Die Linien, welche die Einzelwerte verbinden, ordnen den Antworten auf den ersten Puls die entsprechenden auf den zweiten Puls zu. Gemessen wurden creGFP und GFP transfizierte Ecad flox Neurone.

Der Quotient aus der Amplitude auf den 2. Puls und der Amplitude auf den 1. Puls wird als Paired Pulse Ratio (PPR) bezeichnet. Synaptische Verbindungen,

die auf den 1. Puls eine größere Amplitude aufweisen als auf den 2. Puls haben ein $PPR < 1$ und werden als Synapsen, die Depression zeigen, bezeichnet. In dem anderen Fall, in dem der 2. Puls eine größere Amplitude aufweist als der 1. Puls wird dieser Quotient einen Wert > 1 annehmen, die dementsprechenden Synapsen werden als fazilitierend bezeichnet. Diese Effekte lassen sich darstellen, indem man die Einzelzellwerte des 1. und des 2. Pulses miteinander verbindet (Abb. 39).

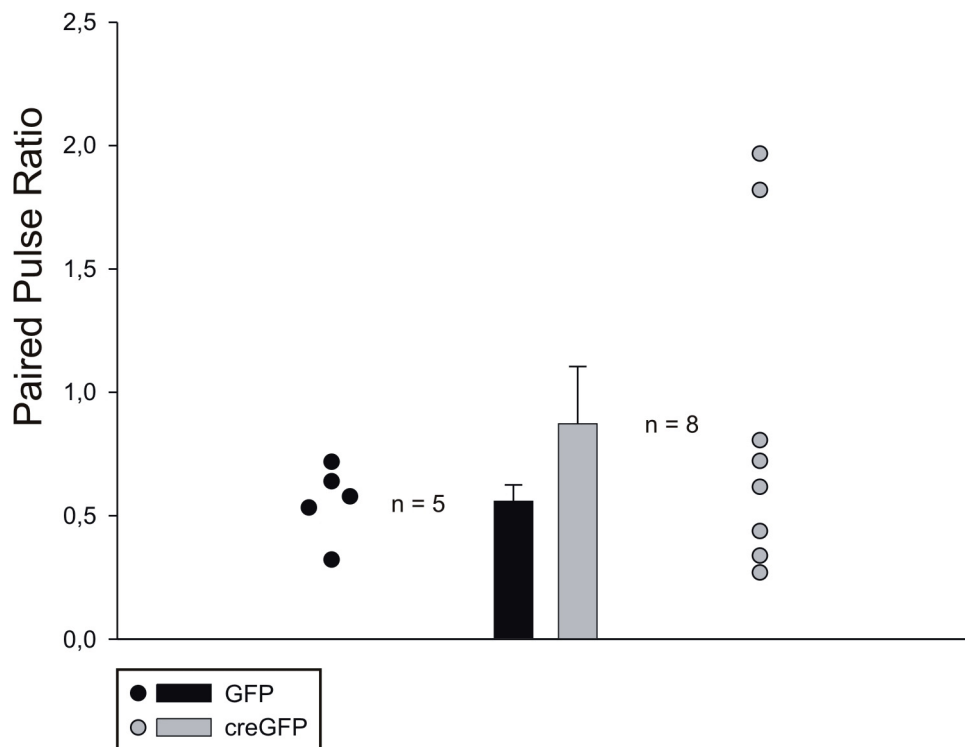


Abbildung 40: DIV 14: Darstellung der mittleren Paired Pulse Ratios der Antworten auf die ersten zehn Doppelpulse als Fehlerbalkendiagramm und Einzeldarstellung. Gemessen wurden creGFP und GFP transfizierte Ecad flox Neurone.

Es ergab sich für GFP transfizierte Zellen ein mittleres PPR von $0,56 \pm 0,07$ sowie für creGFP transfizierte Neurone ein mittleres PPR von $0,87 \pm 0,23$ (Abb. 40). Der tendenzielle Unterschied, dass GFP transfizierte Neurone ein kleineres PPR aufweisen als creGFP transfizierte Zellen ist statistisch nicht signifikant. Der p-Wert liegt bei 0,32.

Eine weitere Möglichkeit der Analyse des Paarpulsverhaltens stellt der Variationskoeffizient (CV) dar. Er errechnet sich aus dem Quotienten von Standardabweichung durch Mittelwert. Für jede Zelle und für jeden Puls getrennt wurde der

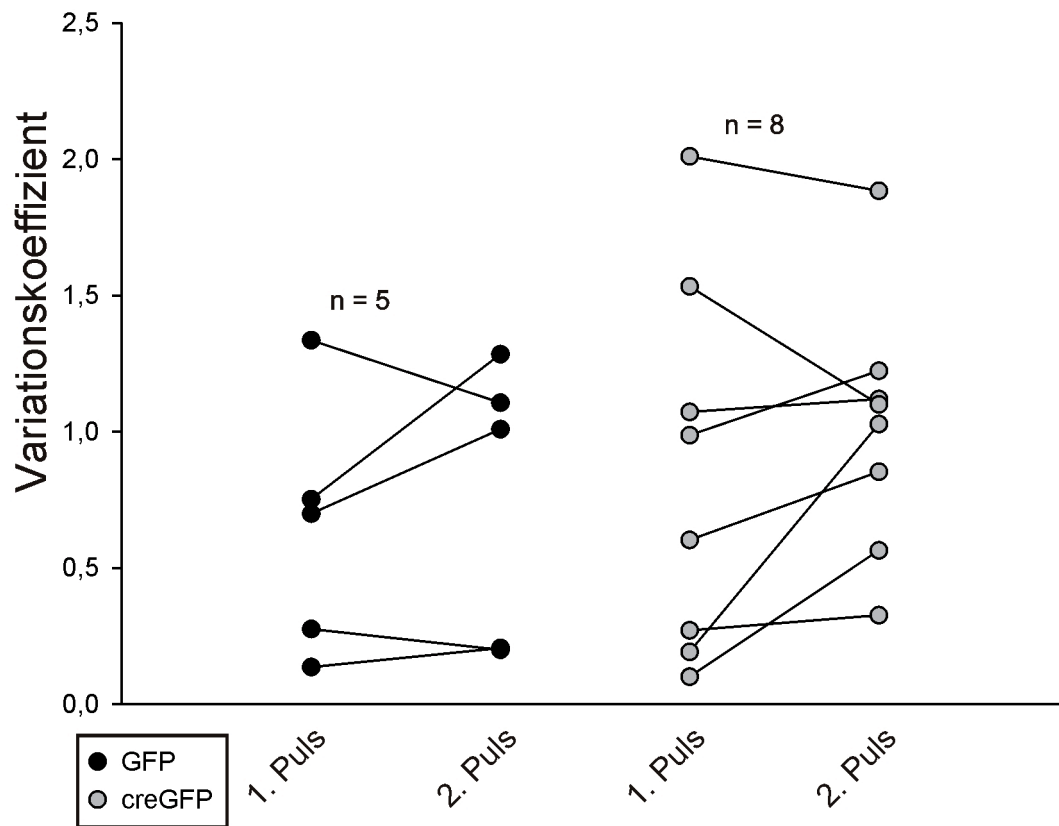


Abbildung 41: DIV 14: Darstellung der Variationskoeffizienten der Antworten auf die ersten zehn Doppelpulse. Die Linien welche die Einzelwerte verbinden ordnen dem ersten Puls die entsprechenden zweiten Pulse zu. Gemessen wurden creGFP und GFP transfizierte Ecad flox Neurone.

Variationskoeffizient bestimmt, die Einzelzellergebnisse dargestellt (Abb. 41). Es resultierten bei GFP und creGFP exp. Neuronen keine klar voneinander getrennten Zellpopulationen. Zellen mit einem großen Variationskoeffizienten lagen neben Zellen mit einem niedrigen Wert in etwa der gleichen Häufigkeit vor. Der Variationskoeffizient ist ein Maß für die Freisetzungswahrscheinlichkeit von synaptischen Vesikeln auf einen Stimulus. Ein hoher Variationskoeffizient weist auf Zellen mit einer hohen Fehlerrate und niedriger Freisetzungswahrscheinlichkeit hin, ein niedriger Variationskoeffizient auf Zellen mit niedriger Fehlerrate und einer hohen Freisetzungswahrscheinlichkeit. Bei der Untersuchung des Variationskoeffizienten lagen sowohl Zellen mit niedrigerer als auch mit höherer Freisetzungswahrscheinlichkeit in etwa der gleichen Verteilung bei den GFP und creGFP transfizierten Zellen vor.

4 Diskussion

In den beschriebenen Experimenten wurde ein konditionaler E-Cadherin Knock-out in primär kultivierten kortikalen Neuronen durchgeführt. Mit dieser Methodik veränderte Neurone wurden mit standardisierten elektrophysiologischen Methoden untersucht. Es konnte ein Effekt des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf maturierende GABAerge Synapsen erfasst werden.

4.1 Transfektion

Die Transfektion von Plasmiden mittels kationischer Lipidvesikel in eukaryotische Zellen stellt ein Standardverfahren dar, welches auch auf postmitotische Neurone angewendet werden kann (Yan et al., 2007; Rakotoarivelo et al., 2007; Tönges et al., 2006; Yamada et al., 2007). Die Anwendung der Patch-Clamp Technik auf liposomal transfizierte Neurone ist ebenfalls beschrieben (Levinson et al., 2005). Für ein Neuron stellt eine Transfektion jedoch ein gravierendes Ereignis dar. Es muss daher auf die Frage eingegangen werden, ob eine Interaktion dieser Chemikalie in elektrisch erregbaren Zellen zu einer Änderung der Zellfunktion führen kann. Toxische Effekte sind für Transfektionen mit Lipidvesikeln beschrieben worden (Bauer et al., 2006). In dieser Arbeit sind nur Neurone untersucht worden, die bei optischer Kontrolle keine Anzeichen eines Zelltodes aufwiesen. Auf mögliche Einflüsse der kationischen Lipidvesikel auf Membranen erregbarer Zellen wird in der Literatur nicht eingegangen. Die richtige Wahl der Kontrollexperimente ist bei Methoden mit möglichen Störeffekten wichtig. In den vorangegangenen Experimenten wurde als Kontrollexperiment die ebenfalls Lipofectamine 2000 vermittelte Transfektion von EGFP-N1 gewählt, die Gesamtmenge an verwendetem Transfektionsreagenz war vergleichbar. Mögliche durch die Transfektion bedingte Störeffekte sollten nun im direkten Vergleich ausgeschlossen sein. Die Transfektionseffizienz ist bei Lipofectamine 2000 kulturabhängig - die Bildung der kationischen Lipidvesikel hängt stark vom umgebenden Medium ab, die Art der zu transfizierenden Zellen sowie die Zelldichte beeinflussen weiterhin die erreichten Transfektionsraten. Postmitotische Zellen wie Neurone gehören mit Transfektionsraten $< 3\%$ zu den am schwierigsten liposomal zu transfizierenden Zellen (Ohki et al., 2001). In den hier beschriebenen Experimenten lagen die Transfektionsraten eher unter diesem Wert. Die Herstellung der Transfektionslösung fand in Neurobasalmedium statt, das Penicillin-Streptomycin enthielt. Die Verwendung von Antibiotika senkt die Transfektionseffizienz deutlich (Angaben des Herstellers), hatte also in den Experimenten einen negativen Einfluss auf die Transfektionsrate, war jedoch gleichzeitig zur Reduktion von bakteriellen Kulturerkrankungen notwendig.

Die besten Transfektionsraten werden bei 90% konfluenten Zellkulturen erreicht. In neuronalen Massenkulturen ist diese Zelldichte nicht sinnvoll zu erreichen, die möglichen exzitotoxischen Effekte bei erhöhter Zelldichte und höherem Kulturalter sind kontraproduktiv. Die in den beschriebenen Experimenten erreichten relativ niedrigen Transfektionsraten und die dadurch geschaffenen heterotypen Kulturbedingungen waren jedoch sinnvoll. Zu hohe Transfektionsraten hätten die Wahrscheinlichkeit von zusätzlichen homotypen Interaktionen E-Cadherin defizienter Zellen gefördert. Durch die realisierten Kulturbedingungen konnten so die Auswirkungen heterotyper Interaktionen E-Cadherin defizienter und E-Cadherin exprimierender Zellen funktionell untersucht werden.

Die niedrigen Transfektionsraten verursachen Schwierigkeiten bei molekularbiologischen Untersuchungen. creGFP bzw. GFP transfizierte Massenkulturen von kortikalen Neuronen sind aufgrund der niedrigen Transfektionsraten nicht durch Methoden wie Westernblots untersuchbar, da das Zellmaterial in der gewünschten Menge aber auch in der gewünschten Homogenität der Genotypen schwer bereitzustellen ist. Einen Ansatz stellt die durchflusszytometrische Trennung der transfizierten und nicht transfizierten Zellen dar (Gagneten et al., 1997). Bei niedrigen Transfektionsraten ist dieses Verfahren recht aufwendig, die wenigen transfizierten Neurone müssten hierfür vom Poly-L-Ornithin beschichteten Boden abgelöst werden ohne sie zu beschädigen. Mögliche Beschädigungen der vielen nicht transfizierten Zellen würden die Lösung verunreinigen und so möglicherweise Ergebnisse verfälschen. Die Anzahl erfolgreich transfizierter Neurone spielt bei der Patch-Clamp Technik eine weniger wichtige Rolle, da es sich um Einzelzelluntersuchungen handelt. Hier kann jede erfolgreich transfizierte, vitale Zelle untersucht werden.

4.2 Expression des creGFP Proteins in kortikalen Neuronen

Die beobachtete überwiegend nukleäre Lokalisation des creGFP Fusionsproteins in Neuronen (Abb. 14) stimmt mit Angaben aus der Literatur überein (Gagneten et al., 1997; Le et al., 1999a). Eine Veränderung des creGFP Proteins im Sinne einer Entfernung der NLS (Nukleären Lokalisations Sequenz) führte zu einer überwiegend zytoplasmatischen Verteilung des trunkierten creGFP Proteins, vergleichbar mit GFP (Le et al., 1999a). Durch den starken EF1 α Promotor des verwendeten pBS598 EGFP-cre Plasmids ist das Expressionslevel hoch (Le et al., 1999c), im Experiment war die Fluoreszenz der transfizierten Zellen bis zu zehn Tage nach Transfektion mikroskopisch zu beobachten. Dies zeigt das langandauernde Vorhandensein eines creGFP Proteins an. Selbst eine kurzzeitige Expression der Cre-Rekombinase sollte

zur vollständigen Rekombination ausreichen (Gagneten et al., 1997, Muramatsu et al., 2008). Daher konnte angenommen werden, dass die im Experiment Fluoreszenz positiven Zellen, welche mit creGFP transfiziert waren, durch Rekombination in den Genotyp Ecad flox-del umgewandelt wurden. Diese Annahme ist durch die oben beschriebenen Probleme schwerlich durch molekularbiologische Methoden zu festigen, lediglich eine Einzelzell PCR hätte den Genotyp aufzeigen können.

4.3 Konditionaler E-Cadherin Knockout in kortikalen Neuronen

Die kortikalen Neurone wurden an DIV 4 transfiziert, bis zu diesem Zeitpunkt konnten die Zellen E-Cadherin bilden. Ein Verlust des Wildtyp E-Cadherin Gens kann nicht gleichgesetzt werden mit dem kompletten zellulären Verlust von E-Cadherin zu einem bestimmten Zeitpunkt kurz nach der Transfektion. Das vorhandene E-Cadherin muss zunächst über proteasomalen Abbau beseitigt werden. Wie lange dieser Prozess dauert, ist unbekannt. E-Cadherin wird zellulär durch eine Vielzahl an Proteinen reguliert. Dazu zählen beispielsweise die Ubiquitin-Ligase Hakai (Fujita et al., 2002) oder die GTPasen Rab5, ARF6, Rac1, RhoA, Cdc42 (Kamei et al., 1999; Fukata and Kaibuchi, 2001). Die Endozytose von membranständigem E-Cadherin findet sowohl Clathrin-abhängig (Le et al., 1999b) als auch Clathrin unabhängig (Paterson et al., 2003) statt. Membranständiges E-Cadherin wird ständig aktiv internalisiert, wobei ein Teil abgebaut wird, ein anderer Teil in die Plasmamembran zurückkehren kann (Le et al., 1999b). Zur Untersuchung eines Effektes der E-Cadherin Depletion auf die Zelladhäsion gab es Ansätze in E-Cadherin exprimierenden Zelllinien. Beispielsweise führte eine Transfektion des E-Cadherin Repressor Snail in MCA3d und PDV Zellen (maligne transformierte Keratinozyten), zu einer morphologischen Veränderung (Cano et al., 2000). Die so erstellten Zelllinien wechselten von ihrer ursprünglichen epithelialen Konfiguration in einen fibroblastenartigen Phänotyp. Weiterhin wurde ein Verlust von E-Cadherin an Zellkontakten bereits nach 24 - 48 h nach der Transfektion beobachtet. In diesen Zelllinien konnte nach der Exprimierung von Snail ebenfalls kein E-Cadherin neu gebildet werden. Zellulär vorhandenes E-Cadherin konnte dort zytoplasmatisch nachgewiesen werden, dieses entsprach am ehesten endozytiertem E-Cadherin (Cano et al., 2000). Dieses Experiment ist jedoch nicht vergleichbar mit denjenigen, die dieser Dissertation zugrundeliegen, denn bei den verwendeten MCA3D oder PDV Kerationzyten handelt es sich um E-Cadherin stark exprimierende Zellen, im Gegensatz zu der geringen Expression von E-Cadherin in kortikalen Neuronen. Weiterhin ist die Expression des E-Cadherin Transskriptionsrepressors Snail nicht mit einem kompletten

Ausschalten des E-Cadherin Gens zu vergleichen. Snail reduzierte die E-Cadherin Expression nur um ca. 56 % (Cano et al., 2000), bei einem Verlust wichtiger codierender Regionen des E-Cadherin Gens ist mit einer 100% igen Reduktion der Expression eines funktionellen E-Cadherin Proteins zu rechnen. Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der E-Cadherin Depletion in Zell-Zellkontakten bediente sich der RNA Interferenz. In MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen wurde E-Cadherin durch siRNA Transfektion ausgeschaltet (Capaldo and Macara, 2006). Die Effektivität der RNA Interferenz wurde mit >90% angegeben. Dort zeigte sich, dass vor der E-Cadherin Depletion gebildete Zell-Zellkontakte 48h nach der Transfektion weiterhin existierten, obwohl dies der Zeitpunkt der maximalen RNA Interferenz war. Die apiko-basale Polarität der so veränderten Zellen veränderte sich ebenfalls nicht. Es kam jedoch zu einer Störung der Neubildung von Zelladhäsionen. Die Versuche zeigten, dass die E-Cadherin Depletion die Neubildung von Zell-Zellkontakten stört, jedoch keine Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung bestehender Zellkontakte zumindest 48h nach Depletion in MDCK Zellen hat (Capaldo and Macara, 2006). Capaldo schlussfolgerte daraus, dass E-Cadherin zur initialen Bildung von Zelladhäsionen benötigt wird, vorhandene Zelladhäsionen jedoch von einer Vielzahl anderer Moleküle (Cadherine anderer Subtypen, Nectin, Claudin, Occludin) stabilisiert werden (Capaldo and Macara, 2006). Diese Überlegungen lassen sich zwar nicht direkt auf die Vorgänge an kortikalen synaptischen Zellkontakten übertragen, liefern aber einen Eindruck über die mögliche Funktion von E-Cadherin. Das von Capaldo durchgeführte Experiment bedient sich der RNA Interferenz und ist somit nicht direkt vergleichbar mit den im Ergebnisteil beschriebenen Experimenten. Weiterhin wurden MDCK Zellen verwendet, die E-Cadherin stark exprimieren. Die Frage des Expressionslevels von E-Cadherin im Kortex von Säugern wird in der Literatur kontrovers diskutiert, die Angaben sind stark methodenabhängig. Westernblots von Hirnhomogenat 20 Wochen alter Mäuse konnten kein E-Cadherin nachweisen (Young et al., 2003), wobei die geringen Expressionslevel möglicherweise mit dem verwendeten Antikörper nicht zu detektieren waren. Mit Immunhistochemie und Immunogoldfärbung konnte E-Cadherin zumindest in synaptischen Zellkontakten im Hippokampus adulter Mäuse nachgewiesen werden, wo es *Puncta Adherentia* bildet, die ringförmig die Transmitterfreisetzungszonen umgeben (Fannon and Colman, 1996; Tang et al., 1998). Eine RNA in-situ Hybridisierung 56 Tage alter Mäuse lieferte diffusgeringe bis keine Aktivität von E-Cadherin im Kortex (Allen Brain Atlas, 2008). Ein vom GENSAT Projekt betriebender Ansatz bedient sich eines artifiziellen Bakterienchromosoms (BAC). Dieses enthält ein unter den regulatorischen Sequenzen des E-Cadherin Gens stehendes EGFP Reporter Gen. Transgene Mäuse, welche dieses

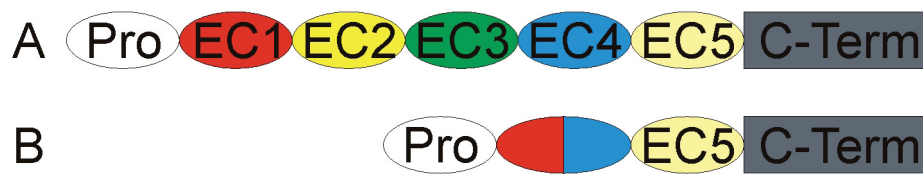


Abbildung 42: Schematische Darstellung des E-Cadherin Genproduktes.

Pro: Prosequenz, EC1 - EC5: Extrazelluläre Cadherindomänen, C-Term: Transmembranregion und C-Terminale zytosolische Region

A: Funktionelles Wildtyp E-Cadherin

B: Mögliche Struktur des trunkierten, funktionslosen E-Cadherins

artifizielle Chromosom beinhalten, bilden nun in E-Cadherin exprimierenden Geweben zusätzlich durch Immunhistochemie oder Fluoreszenzmikroskopie nachweisbares EGFP. Dort konnten E-Cadherin exprimierende pyramidal konfigurierte Neurone in basalen kortikalen Schichten von P7 Mäusen nachgewiesen werden und eher inter-neuronal konfigurierte Neurone in adulten Mäusen (GENSAT Projekt, Stand Juni 2008).

Das nach der creGFP vermittelten Rekombination verbleibende E-Cadherin Gen enthält die Exone 1 bis 5 und 11 bis 16, wodurch das so exprimierte Protein trunkiert ist. Die herausgeschnittenen Exone 6 - 10 codieren die Aminosäuren 232-523, also strukturell Teile der EC1, der EC2 und der EC3 Domäne sowie Teile der EC4 Domäne (VEGA Exon and Protein Report, 2008) . Es ist zu vermuten, dass ein so trunkiertes Protein (Abb. 42) nicht die physiologischen Zelladhäsionseigenschaften haben kann. Dies ist in der Literatur beschrieben: der Genotyp E-cad flox-del ist ein Nullallel (Boussadia et al., 2002). Es ist nicht bekannt, ob ein mögliches trunkiertes Protein tatsächlich exprimiert wird, da es unter Umständen zu einer Verschiebung des Leserasters kommen könnte, oder die transkribierte mRNA instabil ist. Weiterhin könnte ein trunkiertes Protein instabil sein und intrazellulär proteasomal degradiert werden. Ob ein trunkiertes Protein tatsächlich auf die Membranoberfläche transportiert und dort integriert wird, ist nicht beschrieben. Da die C-Terminale intrazelluläre Sequenz nicht verändert ist, wäre denkbar, dass regulatorische Proteine wie α - oder β -catenin bzw. p120-catenin noch binden könnten. Das würde bedeuten, dass der Effekt der E-Cadherin Depletion lediglich über das Fehlen der membranständigen E-Cadherin Adhäsion zu erklären wäre und nicht durch die Aktivierung von Signalkaskaden, beispielsweise durch nukleäre Translokation des β -catenin im WNT Signalweg.

Eine Störung der E-Cadherin Adhäsion für funktionelle Untersuchungen hätte auch

durch Antikörper gegen E-Cadherin erfolgen können. Nachteilig hätten sich unspezifische Bindungen des Antikörpers auswirken können. Weiterhin wäre eine Detektion der Zellen nicht möglich gewesen, bei denen die Antikörperbindung stattfand. Hätte man die Konzentration so hoch gewählt, dass die Kultur gesättigt wäre, wären unspezifische Bindungen ebenfalls häufiger aufgetreten. Eine Reduktion der Ca^{2+} -Ionenkonzentration stört ebenfalls die E-Cadherin Adhäsion, ermöglicht jedoch keine sinnvollen elektrophysiologischen Messungen. Der Konditionale Knockout und die Einzelzelluntersuchung bot demnach die beste Möglichkeit der Untersuchung.

4.4 Eigenschaften von GABA_A mPSCs im Vergleich mit der Literatur

In primärer Massenkultur von Neuronen lassen sich ab DIV 3 - 4 GABA_A erge mPSCs registrieren, wobei durch eine niedrige Auftretenswahrscheinlichkeit bedingt die quantitative Analyse erst ab DIV 5 - 7 sinnvoll ist (Dunning et al., 1999). Durch die Blockade von spannungsgesteuerten Natriumkanälen durch TTX, sowie die AMPA-Rezeptor Blockade durch DNQX und die NMDA-Rezeptor Blockade durch Mg^{2+} Ionen und das niedrige Haltepotential von -60 mV bedingt, wurden in dieser Arbeit lediglich GABA_A erge mPSCs registriert. Das Auftreten von spontanen PSCs ist durch TTX verhindert. Die pharmakologische Blockade der mPSCs durch Gabazine (Abb. 15) lässt darauf schließen, dass die registrierten mPSCs über den GABA_A Rezeptor vermittelt werden, da Gabazine diesen selektiv blockiert. Glycin als Auslöser für Chloridionenströme kann einerseits dadurch ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Ereignisse durch Gabazine blockiert werden konnten, andererseits sind glycinerge Neurone in primären kortikalen Massenkulturen praktisch nicht zu beobachten (Thampy and Barnes, 1984, Young et al., 1973).

GABA_A erge mPSCs repräsentieren die postsynaptische Antwort auf eine spontane, mit geringer Wahrscheinlichkeit stattfindende Exozytose von einzelnen, präsynaptischen Transmittervesikeln (Kraszewski and Grantyn, 1992a). Das Auftreten und die Eigenschaften der mPSCs werden von vielen Faktoren beeinflusst. Beispielsweise modulieren die Extra- sowie Intrazelluläre K^+ bzw. Ca^{2+} -Ionenkonzentration sowohl die Frequenz als auch die Amplitude von spontanen Freisetzungseignissen (Kraszewski and Grantyn 1992b; Suzuki et al., 2002). Die Zelldichte sowie das Alter der Kultur und der dementsprechende Reifegrad der Neurone beeinflusst ebenfalls die Frequenz, wenngleich auch nicht die Amplitude der Ereignisse (Kraszewski and Grantyn, 1992b). Die Messungen sind weiterhin abhängig von den verwendeten Präparaten, der Zusammensetzung der Bad- und Pipettenlösungen, sowie dem Haltepotential. Im Vergleich der mPSC Parameter zwischen Experimenten muss dieser

Variabilität in Abhängigkeit von den Messbedingungen Rechnung getragen werden.

Frequenz	DIV	$[Ca^{2+}]_o$	V_c	Tier	Präparat	Experiment
ca. 0,3 Hz	5 - 10	0,1 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992a ¹
ca. 2,5 Hz	11 - 15	0,1 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992a ¹
ca. 5 Hz	16 - 20	0,1 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992a ¹
ca. 0,5 Hz	5 - 7	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ²
ca. 1,8 Hz	8 - 14	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ²
ca. 5 Hz	15 - 21	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ²
ca. 7,8 Hz	22 - 28	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ²
0,8 Hz 1,1 ± 0,3 Hz 3,96 ± 3,05 Hz	>3 7 - 10 -	1,8 mM 3 mM 2 mM	-80mV -60mV -60mV	Ratte E17 Maus P6 Ratte P10-18	Kultur Thalamus Kultur Cerebellum Hirnschnitt ventrobasaler Thalamus	Liu 1997 Cheng 2003 Le Feuvre 1997
0,3 ± 0,01 Hz	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN GFP transf.	Transfektion WT Neurone mit GFP (Abb. 17)
0,35 ± 0,13 Hz	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN creGFP transf.	Transfektion WT Neurone mit creGFP (Abb. 17)
0,56 ± 0,11 Hz	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 22)
0,56 ± 0,11 Hz	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 22)
1,54 ± 0,23 Hz	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 33)
1,63 ± 0,36 Hz	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 33)
1,95 ± 0,54 Hz	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 27)
0,75 ± 0,17 Hz	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 27)

Tabelle 1: Übersicht der Frequenzen von GABA_AmPSCs in der Literatur und in den durchgeführten Experimenten.

V_c : Haltepotential, $[Ca^{2+}]_o$: Extrazelluläre Kalziumionenkonzentration, DIV: Kulturtag der Registrierung. PCN: Primärkultur kortikaler Neurone. In ¹ Registrierung ohne TTX. In ² sind nur Ereignisse > 20 pA ausgewertet worden.

Amplitude	DIV	$[Ca^{2+}]_o$	V_c	Tier	Präparat	Experiment
8 - 10 pA	n.A	1,5 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992b
25,8 ± 2,1 pA	7 - 10	3 mM	-60mV	Maus P6	Kultur Cerebellum	Cheng 2003
10 pA	7	0,1 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992a
40,7 ± 9,6 pA	7 - 14	2 mM	-70mV	Ratte P4	Kultur Hippokampus	Barberis 2004
78 pA	5 - 7	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
45,2 ± 2,8 pA	>3	1,8 mM	-80mV	Ratte E17	Kultur Thalamus	Liu 1997
10 - 50 pA	5 - 7	2 mM	n.a.	Huhn E34	Kultur Großhirnrinde	Weiss 1988
8 pA	14	0,1 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992a
9 pA	21	0,1 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992a
80 pA	8 - 14	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
78 pA	15 - 21	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
16,1 ± 4,5 pA	14 - 36	2 mM	n.a.	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kirischuk 2000
27 ± 12 pA	-	2 mM	-60mV	Ratte P10-18	Hirnschnitt Nucleus geniculatus lateralis und ventrobasaler Thalamus	Le Feuvre 1997
16,98 ± 1,79 pA	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN GFP transf.	Transfektion WT Neurone mit GFP (Abb. 16)
17,39 ± 1,91 pA	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN creGFP transf.	Transfektion WT Neurone mit creGFP (Abb. 16)
18,67 ± 1,21 pA	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 21)
16,35 ± 0,92 pA	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 21)
16,88 ± 0,86 pA	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 31)
20,3 ± 1,44 pA	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 31)
14,84 ± 1,31 pA	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 26)
13,99 ± 1,39 pA	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 26)

Tabelle 2: Übersicht der Amplituden von GABA_AmPSCs in der Literatur und in den durchgeführten Experimenten.

V_c : Haltepotential, $[Ca^{2+}]_o$: Extrazelluläre Kalziumionenkonzentration, DIV: Kulturtag der Registrierung. In ¹ sind nur Ereignisse > 20 pA ausgewertet worden.

Tabelle 1 liefert eine Übersicht über die Frequenzen von GABA_AmPSCs. In der Tabelle sind weiterhin die experimentellen Bedingungen aufgelistet. Hier liegt keine große Heterogenität der Messwerte vor. Zwischen den einzelnen Studien, inklusive der im Ergebnisteil präsentierten Experimente, gibt es eine erkennbare Übereinstimmung. Die Frequenz der GABA_AmPSCs nimmt in Abhängigkeit vom Kulturalter zu (Kraszewski and Grantyn, 1992a; Dunning et al., 1999). Dieser Effekt wurde im Experiment in der Kontrollgruppe ebenfalls beobachtet. Die Wahl der Messbedingungen beeinflusst auch die Frequenzen, als Faktoren sind die extra- und intrazelluläre Konzentration von Ca²⁺-Ionen sowie K⁺-Ionen, die Raumtemperatur, das verwendete Präparat sowie die Zelldichte zu nennen. Die Bestimmung der Ereignisfrequenz bei Kraszewski und Grantyn (1992a) fand ohne TTX statt, strenggenommen sind dort spontane inhibitorische postsynaptische Ströme gemessen worden. TTX blockiert das Auftreten von Aktionspotentialen, die Frequenz der Ereignisse ließ sich davon jedoch bei Kraszewski und Grantyn (1992a) nicht stark beeinflussen. Die Messwerte an DIV 7, DIV 10 sowie in der GFP Kontrolle an DIV 14 entsprechen von der Größenordnung den Angaben aus der Literatur.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über Angaben aus der Literatur zu den Amplituden von GABA_AmPSCs. Es zeigt sich, dass die Amplituden von GABA_AmPSCs in der Literatur sehr variabel sind, was jedoch mit den unterschiedlichen Messbedingungen zusammenhängen kann. Von der Größenordnung liegen die in dieser Arbeit erhobenen Werte in einem vergleichbaren Bereich. Die von Dunning et al. (1999) publizierten Werte sind beispielsweise größer als die übrigen Angaben. Dies könnte daran liegen, dass hier nur die Ereignisse ausgewertet wurden, die eine Amplitude > 20 pA besaßen.

Die Beobachtung, dass die GABA_AmPSC Amplituden im Verlauf der Kultivierungszeit keine statistisch signifikante Änderung aufweisen wird durch Angaben aus der Literatur bestätigt (Dunning et al., 1999; Kraszewski and Grantyn, 1992a). Demnach existiert keine reifungsabhängige Änderung der mPSC Amplituden.

Anstiegszeit	DIV	$[Ca^{2+}]_o$	V_c	Tier	Präparat	Experiment
ca. 1,5 ms	5 - 7	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
ca. 1,7 ms	8 - 14	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
ca. 1,7 ms	15 - 21	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
ca. 1,6 ms	22 - 28	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
1,65 ms	n.A	1,5 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992b
3,1 ± 0,2 ms	7 - 10	3 mM	-60mV	Maus P6	Kultur Cerebellum	Cheng 2003
2 ± 0,3 ms	-	2 mM	-60mV	Ratte P10-18	Hirnschnitt ventrobasaler Thalamus	Le Feuvre 1997
3,87 ± 0,19 ms	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN GFP transf.	Transfektion WT Neurone mit GFP (Abb. 18)
4,22 ± 0,21 ms	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN creGFP transf.	Transfektion WT Neurone mit creGFP (Abb. 18)
3,35 ± 0,17 ms	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 23)
3,49 ± 0,14 ms	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 23)
4,21 ± 0,19 ms	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 34)
4,12 ± 0,22 ms	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 34)
4,07 ± 0,21 ms	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 28)
4,3 ± 0,21 ms	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 28)

Tabelle 3: Übersicht der Anstiegszeiten von GABA_AmPSCs in der Literatur und in den durchgeführten Experimenten.

V_c : Haltepotential, $[Ca^{2+}]_o$: Extrazelluläre Kalziumionenkonzentration, DIV: Kulturtag der Registrierung. In ¹ sind nur Ereignisse > 20 pA ausgewertet worden.

50% Abfallzeit	DIV	$[Ca^{2+}]_o$	V_c	Tier	Präparat	Experiment
ca. 36 ms	5 - 7	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
ca. 29 ms	8 - 14	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
ca. 23 ms	15 - 21	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
ca. 14 ms	22 - 28	1 mM	-70mV	Maus P0	Kultur Somat.Sens.Kortex	Dunning 1999 ¹
$\tau \approx 63\%$ Abfallzeit	DIV	$[Ca^{2+}]_o$	V_c	Tier	Präparat	Experiment
$14,7 \pm 2,3$ ms	7 - 10	3 mM	-60mV	Maus P6	Kultur Cerebellum	Cheng 2003
$16,2 \pm 2,5$ ms	n.A	1,5 mM	-80mV	Ratte E21	Kultur Colliculus Superior	Kraszewski 1992b
99% Abfallzeit	DIV	$[Ca^{2+}]_o$	V_c	Tier	Präparat	Experiment
$72,99 \pm 2,94$ ms	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN GFP transf.	Transfektion WT Neurone mit GFP (Abb. 19)
$72,46 \pm 2,23$ ms	7	2 mM	-60mV	WT C57BL/6 E17	PCN creGFP transf.	Transfektion WT Neurone mit creGFP (Abb. 19)
$60,75 \pm 2,04$ ms	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 24)
$63,73 \pm 2,27$ ms	7	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 24)
$59,3 \pm 1,56$ ms	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 35)
$66,25 \pm 1,67$ ms	10	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 35)
$52,8 \pm 1,77$ ms	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN GFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit GFP (Abb. 29)
$56,46 \pm 2,72$ ms	14	2 mM	-60mV	Ecad flox E17	PCN creGFP transf.	Transfektion Ecad flox Neurone mit creGFP (Abb. 29)

Tabelle 4: Übersicht der Abfallzeiten von mPSCs in der Literatur und in den durchgeführten Experimenten.

V_c : Haltepotential, $[Ca^{2+}]_o$: Extrazelluläre Kalziumionenkonzentration, DIV: Kulturtag der Registrierung. In ¹ sind nur Ereignisse > 20 pA ausgewertet worden. Die unterschiedlichen Berechnungen der Abfallzeit sind zu beachten.

Tabelle 3 zeigt die Anstiegszeiten im Vergleich. Die in der Literatur angegebenen Werte liegen bei 1,5 - 3,1 ms, die in dieser Arbeit erhobenen Werte lagen eher darüber: zwischen 3,35 - 4,3 ms. Die Abweichung der Werte sowohl in der Kontroll- als auch der Knockoutgruppe im Vergleich zu der Literatur könnte durch die Auswertung bedingt sein. Die verwendete Software Mini analysis Program 6.0.3 lieferte möglicherweise ungenaue, zu hohe Werte bei der Bestimmung der Anstiegszeiten von GABA_AmPSCs geringer Amplitude. In Tabelle 4 sind Abfallzeiten der GABA_AmPSC Signale bei verschiedenen Experimenten und unterschiedlichen Berechnungen dargestellt. Es finden sich 50% Abfallzeit, τ ($1-1/e \approx 63\%$ Abfallzeit)

sowie die in dieser Arbeit bestimmte 99% Abfallzeit. Die Werte geben die Zeiten an, an denen die Signale um 50%, 63% bzw. 99% ihrer maximalen Amplitude abgefallen sind. Die Berechnung bei τ stützt sich auf die Hypothese eines monoexponentiellen Abfallens des GABA_A mPSC Signals, jedoch sind in der Literatur Ereignisse mit einem biexponentiellen Abfallverhalten, bestehend aus einer schnellen und einer langsamen Komponente, beschrieben worden (Ing and Poulter, 2007). Die Angabe einer 50% oder 99% Abfallzeit ist durchaus möglich (vgl. Dunning et al., 1999), die verschiedenen Angaben sind jedoch nur unter Vorsicht miteinander vergleichbar. Die Größenordnung der in dieser Arbeit erhobenen Werte ist aber mit der Literatur durchaus in Einklang zu bringen.

4.5 Evozierte GABA_A PSCs

Eine synaptische Übertragung zwischen zwei Neuronen lässt sich auf unterschiedliche Art und Weise evozieren. Prinzipiell unterscheidet man zwischen extra- und intrazellulärer Stimulation. Bei der extrazellulären Stimulation wird ein Draht in den Hirnschnitt oder in die Kulturlösung eingeführt (beispielsweise Beckstead and Williams, 2007), ein zwischen Draht und Erdungselektrode fließender kurzdauernder Strom führt zu mehr oder weniger großen lokalen Depolarisationen von Axonen, Dendriten oder Somata und so über Aktionspotentiale vermittelt zu synaptischen Übertragungen an ein gepatchtes Neuron. Der Vorteil ist, dass hierbei ein relativ großes Areal in der Umgebung des gepatchten Neurons gereizt wird und eine postsynaptische Antwort leicht zu erkennen ist. Nachteilig wirkt sich aus, dass hierbei mehr als ein Zellpaar stimuliert wird, was zu einer Steigerung der Spontanaktivität im System führen könnte. Die intrazelluläre Stimulation wird meist mittels Patch-Clamp Verfahren durchgeführt. Hierbei werden Paarableitungen zweier synaptisch kommunizierender Neurone angewendet, die Stimulation der Präsynapse erfolgt durch kurzzeitige Membrandepolarisation auf den Schwellenwert spannungsgesteuerter Natriumkanäle am Verstärker. Vorteilhaft ist, dass bei der Intrazellulären Stimulation nur ein einzelnes Neuron gereizt wird. Der Nachteil besteht darin, dass eine Paarableitung methodisch aufwendiger ist, da stabile Patchclampexperimente an zwei Neuronen gleichzeitig erfolgen müssen. Weiterhin sind in der Kultur nicht alle Neurone mit jedem anderen synaptisch verbunden, es besteht zwar eine gewisse Wahrscheinlichkeit der Verbindung zweier benachbarter Neurone, diese ist jedoch nicht immer gleich hoch. Ausserdem gilt es zu berücksichtigen, dass GABA nur etwa 25% der Neurone als Transmittersubstanz zur Verfügung steht. Demnach wird klar, dass bei der Festlegung eines transfizierten Neurons als Postsynapse, die Suche nach einem GABAergen Interneuron, welches mit dem postsynaptischen Neuron

verbunden ist, ein relativ schweres Unterfangen darstellt. Wenn man nun die Fehlerrate bei erfolglosen simultanen Patch-Clamp Versuchen miteinbezieht, werden die Gründe deutlich, warum im experimentellen Teil eine extrazelluläre Stimulation gewählt wurde. Im Experiment wurde eine abgeänderte extrazelluläre Stimulation mit einer zweiten Mikropipette gewählt, bei der das stimulierte Areal kleiner ist als bei der einfachen Verwendung eines Drahtes in der Badlösung. Ob es sich um mono- oder polysynaptische Antworten handelte, konnte anhand der Latenzzeit der Antwort erkannt werden. Polysynaptisch vermittelte PSCs haben eine größere Latenz nach dem Stimulus als monosynaptische. Es wurden nur monosynaptisch vermittelte PSCs untersucht. Das verwendete Stimulationsverfahren ist in der Literatur bereits beschrieben (Kirischuk et al. 1999; Kirischuk and Grantyn, 2000; Kirischuk et al., 2003, Bardoni et al., 2007). Die Registrierung der postsynaptischen Antworten, die durch die extrazelluläre Stimulation evoziert wurden, zeigte eine starke Abschwächung des Signales sowie Instabilität der Ganzzelleableitung bei extrazellulärer Stimulation, so dass von den jeweils 25 aufgenommenen Doppelpulsen nur die ersten zehn Doppelpulse ausgewertet wurden. Von den postsynaptischen Antworten wurden die Amplituden auf den ersten sowie den zweiten Puls bestimmt. Eine Vergleichbarkeit der Werte zwischen den durchgeführten Experimenten und der Literatur ist schwierig. Das verwendete Präparat, die Beschaffenheit und Positionierung der Reizelektrode sowie Interstimulus-Intervall, die Zusammensetzung von Extra- und Intrazellulärlösung, Haltepotential der gemessenen Zelle und die Reizstärke beeinflussen die gemessenen Antworten. Diese Parameter variieren sehr stark in der Literatur und machen einen Vergleich der absoluten Amplituden der Ereignisse sehr schwierig. Die selben Gründe erschweren ebenfalls einen Vergleich der PPR-Werte und Variationskoeffizienten.

4.6 Auswirkungen des konditionalen Knockouts von E-Cadherin - Modellvorstellung

Um einen Effekt des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf GABAerge Synapsen festzustellen, wurden die Knockoutzellen (creGFP transfiziert) mit Kontrollzellen (GFP transfiziert) verglichen. Im Vergleich der Amplituden der GABA_AmPSCs dieser beiden Gruppen an DIV 7 und DIV 14, gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied. Lediglich an DIV 10 gab es einen Effekt des konditionalen Knockouts auf die Amplituden. creGFP exprimierende Neurone wiesen eine statistisch signifikant höhere Amplitude auf. Bemerkenswert ist, dass an DIV 7 und DIV 14 dieser Effekt nicht zu beobachten war. Eine Erklärung mag die spätere Transfektion (an DIV 8 statt DIV 4) sowie der abweichende Messzeitpunkt (DIV 10 statt DIV 7 bzw.

DIV 14) sein. Typischerweise wird in der Literatur eine Erhöhung der Amplituden von mPSCs durch in der Anzahl vermehrte, oder in ihren Eigenschaften veränderte Rezeptoren erklärt (Cheng and Yeh, 2003). Im E-Cadherin Knockout müssten demnach mehr GABA_A Rezeptoren an der Postsynapse vorhanden sein, sei es durch eine Erhöhung der Gesamtanzahl oder lediglich eine Erhöhung der Rezeptordichte an der Postsynapse im Vergleich zur übrigen Membranoberfläche. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine geänderte Untereinheitszusammensetzung des GABA_A Rezeptors und dadurch bedingte Veränderungen der Amplitude (Barberis et al., 2004). Ein physiologisch vorkommender Wechsel der Untereinheitenkomposition des GABA_A Rezeptors von $\alpha 5$ zu $\alpha 1$ während eines Voranschreitens der Kulturdauer von DIV 7 - 14 zu DIV 22 - 28 ist jedoch nicht mit einem Anstieg der GABA_AmPSC Amplituden verbunden (Dunning et al., 1999). Der statistisch signifikante Amplitudenunterschied war an DIV 10 mit einem signifikanten Unterschied der Abfallzeit des GABA_AmPSC Signales gekoppelt. Dies ist ein kinetischer Parameter, der einerseits mit einer geänderten GABA_A-Rezeptor Untereinheitenkomposition zusammenhängen kann, andererseits ist bei einer Störung der GABA Wiederaufnahme eine über die Zeit erhöhte GABA Konzentration im synaptischen Spalt vorstellbar. Diese aktiviert nun über eine längere Zeit GABA_A Rezeptoren. Eine in diesem Fall höhere Amplitude der Signale, bedingt durch erhöhte Transmitterkonzentrationen im synaptischen Spalt, wäre vorstellbar und passt mit den Beobachtungen im Experiment zusammen. In dem durchgeführten Experiment konnte jedoch nicht sicher gezeigt werden, ob es sich um einen prä- oder einen postsynaptischen Effekt handelt. Die Transfektion an DIV 8 fand an einem Zeitpunkt statt, an dem die Synaptogenese bereits begonnen hat, jedoch vor der Phase der stärksten Synaptogenese zwischen DIV 10 und DIV 17 (Kraszewski and Grantyn, 1992a). Anhand der Daten kann gesagt werden, dass die E-Cadherin Depletion in diesem Abschnitt einen Einfluss auf die GABAerge Übertragung hat.

Ein weiteres besonders auffälliges Ergebnis war der statistisch signifikante Unterschied der mPSC Frequenz zwischen den GFP und den creGFP transfizierten Zellen an DIV 14. creGFP transfizierte Zellen zeigten eine deutliche Reduktion der Frequenz um etwa den Faktor 2 bei gleichbleibender Amplitude, Abfall- und Anstiegszeit. Dieser Frequenzverlust beruht auf einer ausgebliebenen Frequenzzunahme zwischen DIV 7 und DIV 14 (Abb.36). Die Frequenzzunahme in Kontrollzellen zwischen DIV 7 und DIV 14 stellt einen Reifungsprozess dar, der in Experimenten an Massenkulturen von dissoziierten Neuronen in der Literatur gut beschrieben ist (Kraszewski and Grantyn, 1992a; Dunning et al., 1999). Der Verlust von E-Cadherin führt zu einem Ausbleiben dieses Reifungsprozesses. Es ist bekannt, dass die Frequenz von

mPSCs von der Gesamtzahl der GABAergen Synapsen ($n_{Synapse}$), der Gesamtzahl der präsynaptischen, GABAergen Transmittervesikel ($n_{Vesikel}$), welche für die Fusion mit der Membran gedockt und geprimed sind, sowie der Freisetzungswahrscheinlichkeit (Pr) der Transmittervesikel abhängt. Exozytoseereignisse finden in nichtneuronalen, Madin Darby Canine Kidney Zellen (MDCK) häufiger über Arealen statt, die mit E-Cadherin beschichtet sind als über nicht mit E-Cadherin beschichteten Arealen (Hunt and Nelson, 2007). Dies kann eine Bedeutung für den Transport von synaptischen Transmittervesikeln im Sinne der Initiation des Dockingvorganges haben und bei einem Verlust von E-Cadherin diesen möglicherweise stören, was zu einer Reduktion von $n_{Vesikel}$ führen würde. Dem vesikulären Antransport von Proteinen wird bei der Bildung der Präsynapse eine wichtige Rolle zugewiesen (Waites et al., 2005), bei einer Störung der korrekten Zusammensetzung der Präsynapse könnte Pr herabgesetzt werden. Die Analyse von mPSCs erlaubt keine Unterscheidung zwischen $n_{Synapse}$, $n_{Vesikel}$ und Pr .

Zur Untersuchung der Eigenschaften der präsynaptischen Transmitterfreisetzungstellen wurde daher eine extrazelluläre Stimulation mit Doppelpulsen unter Registrierung von postsynaptischen Strömen durchgeführt. Das Zellkulturpräparat entsprach demjenigen bei der Registrierung von mPSCs an DIV 14. Bei der Ankunft eines durch den Stimulationspuls ausgelösten Aktionspotentials an der Synapse werden die Transmittervesikel nicht deterministisch in den synaptischen Spalt entleert. Vielmehr läuft dieser Prozess mit der Wahrscheinlichkeit Pr ab, welche durch die molekularen Eigenschaften der Präsynapse bestimmt wird (Redman, 1990; Bolshakov and Siegelbaum, 1995; Auger and Martyr, 2000). Es treten daher auch fehlende Exozytoseereignisse auf. Bei der Betrachtung der postsynaptischen Ströme ergibt sich, dass bei weniger aktiven synaptischen Freisetzungstellen die Amplitude des postsynaptischen Summenstromes geringer ist als bei vielen Freisetzungstellen, da das postsynaptisch abgeleitete Signal die Summe der aktivierten Synapsen darstellt. Bei Freisetzungstellen mit hoher Pr werden auf den ersten Stimulationspuls an vielen Freisetzungstellen Transmittervesikel ausgeschüttet. Wenn ein zweiter Puls kurz darauf folgt, stehen der Präsynapse der vorher aktivierten Synapsen weniger freisetzungskompetente Transmittervesikel zur Verfügung (Thomson, 2000), die beobachtete Amplitude auf den zweiten Puls ist daher geringer als auf den ersten. Dieses Verhalten wird als Paired Pulse Depression (Paarpulsdepression) bezeichnet, das Paarpulsverhältnis (PPR) ist in diesem Fall < 1 .

Liegen im Vergleich dazu viele synaptische Freisetzungstellen mit einer geringen Pr vor, werden auf den ersten Puls an wenigen Freisetzungstellen Transmittervesikel ausgeschüttet, eine geringe Amplitude wird beobachtet. Bei dem zweiten Puls

ist in den vorher nicht aktiven Präsynapsen die Ca^{2+} -Konzentration vom Vorpuls erhöht, weiterhin stehen freisetzungskompetente Transmittervesikel zur Verfügung. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration bedingt, dass der durch den zweiten Puls vermittelte Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Präsynapse mit einer höheren Pr beantwortet wird. Die Amplitude auf den zweiten Puls ist daher größer als auf den ersten, das Paarpulsverhältnis ist > 1 . Als weiterer Parameter beschreibt der Variationskoeffizient die präsynaptischen Eigenschaften. Bei Synapsen mit geringer Pr ist er auf den ersten Puls initial hoch und auf den zweiten Puls niedrig.

Die im Experiment gemachte Beobachtung, dass das Paarpulsverhältnis von GFP und von creGFP transfizierten Zellen keinen signifikanten Unterschied aufweist, sowie der Variationskoeffizient ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich ist, deutet auf eine in ihrer Funktion im Vergleich zur Kontrolle nicht abgeänderte Präsynapse an E-Cadherin defizienten postsynaptischen Zellen hin. Die Amplituden der evozierten postsynaptischen Ströme waren jedoch bei creGFP transfizierten Neuronen signifikant geringer als bei den GFP Kontrollzellen. Aus diesem Experiment könnte nun auf eine Reduktion der postsynaptischen Rezeptoren oder auf eine Reduktion von $n_{Synapse}$ geschlossen werden. Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse aus der mPSC Registrierung und den evozierten PSCs bleibt als wahrscheinlichste Erklärung die Reduktion von $n_{Synapse}$ als Effekt der E-Cadherin Depletion, da an DIV 14 die Amplituden der mPSCs, als postsynaptische Antwort auf einzelne Transmitterquanten, keine Unterschiede aufwiesen und lediglich eine Reduktion der Frequenz zu beobachten war. Die Reduktion der PSC Amplituden, als Repräsentation der Summe aller postsynaptischen Ionenströme ausgelöst durch synaptische Übertragung, bei gleichartigen übrigen präsynaptischen Parametern, lässt sich ebenfalls durch eine Reduktion von $n_{Synapse}$ erklären.

Frühe Synapsen hippocampaler Neurone in Zellkultur exprimieren sämtlich N-Cadherin, nach DIV 7 beschränkt sich die Expression von N-Cadherin jedoch auf glutamaterge Synapsen, GABAerge Synapsen verlieren N-Cadherin, exprimieren jedoch ein oder mehrere andere Cadherine (Benson and Tanaka, 1998). Dieser Cadherinsubtypwechsel an GABAergen Synapsen findet zwischen DIV 7 und DIV 14 statt (Benson and Tanaka, 1998), ist jedoch nicht mit einer Reduktion der Synapsenzahl verbunden sondern findet vielmehr in einer Phase der Kulturreifung statt, in der die Zahl GABAergen Synapsen linear ansteigt (Bähr and Wolff, 1985).

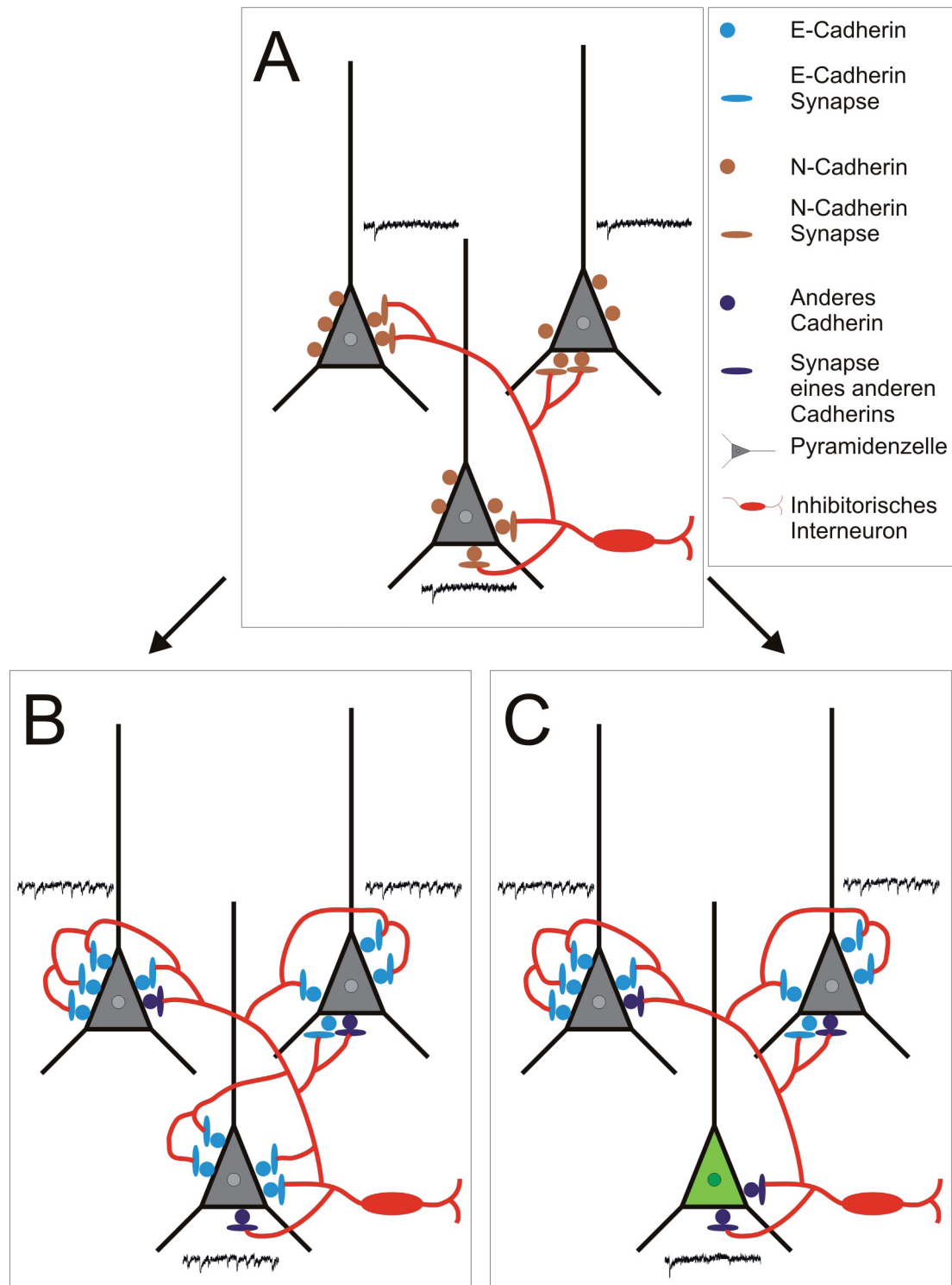


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Erklärungsmodells zur E-Cadherin Depletion in kortikalen Neuronen.

A: Zustand der Kultur an DIV 4 vor der Transfektion

B: Gereifte Kultur an DIV 14

C: Heterotype Kultur an DIV 14, gestörte Synaptogenese am creGFP transfizierten, grün fluoreszierenden Neuron.

Erläuterungen siehe Text.

Aus den im Experiment gewonnenen Daten lässt sich ein Modell entwickeln, welches die Rolle von E-Cadherin beschreiben und die Effekte des E-Cadherin Knockouts erklären kann. E-Cadherin könnte zur Bildung initialer Zellkontakte im Sinne einer Zielführung bei der Synaptogenese von bestimmten Subgruppen GABAerger Interneurone notwendig sein, jedoch bei der Aufrechterhaltung von bereits gebildeten Synapsen überflüssig und in der Funktion durch andere Cadherinsubtypen ersetzbar sein. Wie bereits zitiert, ist E-Cadherin in nicht-neuronalen Zellen zur initialen Bildung, aber nicht zur Aufrechterhaltung von Zell-Zelladhäsionen nötig (Capaldo and Macara, 2006), was die Hypothese stützen mag. An DIV 4 erfolgt die Transfektion, hier haben sich bereits GABAerge Synapsen ausgebildet. Diese sind zu diesem Zeitpunkt N-Cadherin vermittelt (Abb. 43A). Erfolgt kein Knockout, bilden sich zwischen DIV 4 und DIV 14 GABAerge Synapsen, welche in diesem Reifungsgrad jedoch auf prä- und postsynaptische Expression von E-Cadherin angewiesen sind, welches an GABAergen Synapsen inhibitorischer Interneurone das N-Cadherin ersetzen könnte. Die Anzahl GABAerger Synapsen steigt, die mPSC Frequenz nimmt zu (Abb. 43B). Erfolgt der Konditionale Knockout, verliert die transfizierte Zelle die Möglichkeit, E-Cadherin zu exprimieren (Abb. 43C). Die GABAerge Synaptogenese ist an der transfizierten Zelle gestört, die Anzahl GABAerger Synapsen nimmt nicht weiter zu, es besteht ein Unterschied in der Frequenz GABAerger mPSCs zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen.

In der Literatur sind Experimente beschrieben, in der die Blockade von N-Cadherin durch N-Cadherin spezifische Antikörper in der Kultur nicht die Synaptogenese per se stört, sondern zu einem Überschießen der synaptischen Kontakte über ihr Ziel führt (Inoue and Sanes, 1997), weiterhin zu einer veränderten Morphologie der Dornsynapsen sowie der Synapsendichte (Togashi et al., 2002). Dieser Versuchsansatz ist nicht direkt mit einer heterotypen Kultur vergleichbar, zeigt aber eine Rolle für Cadherine bei der Synaptogenese auf. Weitere Hinweise für die Wichtigkeit der Zelladhäsion liefern Experimente, bei denen mithilfe der RNA Interferenz ein Cadherin-11 und Cadherin-22 Knockout zu einer gestörten glutamatergen und GABAergen Synaptogenese führte (Paradis et al., 2007). Als Zielmolekül subzellulärer Organisation wurde das L1-Zelladhäsionsmolekül Neurofascin186 beschrieben (Ango et al., 2005). Es wäre vorstellbar, dass es eine Gruppe von inhibitorischen Cadherinen gibt, die für die initiale Formierung einer frühen inhibitorischen Synapse benötigt werden. Es ist denkbar, dass hierfür nicht nur einzelne Zelladhäsionsmoleküle nötig sind, diese jedoch in einem bestimmten Expressionsmuster eine Funktion übernehmen (Salinas and Price, 2005). Eine Kombination aus einem Erkennungsmolekül für den Synapsentyp (exzitatorisch versus inhibitorisch, eventuell nach Transmittersubstanz

geordnet) und einem Marker für die subzelluläre Lokalisation der Synapse wäre denkbar.

4.7 Ausblick

Es ist nicht bekannt, auf welche in vivo Schaltkreise das diskutierte Modell zutreffen könnte.

Ob die Zahl GABAerger Synapsen tatsächlich reduziert ist und ob es eine Einschränkung auf bestimmte inhibitorische Interneurone oder GABA_A Rezeptorsubtypen gibt, könnte mit immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden. Der nächste Schritt wäre dann der in vivo Knockout. Das vorhandene E-Cadherin flox Tier böte dafür eine gute Ausgangssituation. Eine Adenovirus vermittelte in-vivo Transfektion von creGFP in bestimmte Hirnareale wäre denkbar. Weiter könnte der E-cad flox GVO mit einer Cre-Maus gekreuzt werden, welche die Cre-Rekombinase unter einem bestimmten gewebespezifischen oder entwicklungsspezifischen Promotor exprimiert. Cre sollte möglichst nur im Kortex exprimiert sein, um eine mögliche Lethalität oder Störeffekte anderer Systeme auszuschließen. Ein GVO, welcher die Cre-Rekombinase im Locus des tau Proteins, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, exprimiert, wäre vorstellbar. Dort wird die Cre-Rekombinase nur in Neuronen des Zentralnervensystems exprimiert (Muramatsu et al., 2008). Weiterhin würde sich ein Konstrukt eignen, das unter dem Promotor des Fezl (forebrain embryonic zinc-finger-like protein) Proteins steht, welches in den kortikalen Schichten 5 und 6 exprimiert wird und zur Differenzierung von Projektionsneuronen in Schicht 5 benötigt wird (Chen et al., 2005). Eine wichtige Rolle von Zelladhäsionsmolekülen wurde in der Literatur bereits beschrieben, jedoch ist es wichtig, den spezifischen Adhäsionscode zu erforschen, auf dem die korrekte neuronale Verschaltung basieren könnte. Der gewebe- oder entwicklungsspezifische konditionale Knockout von Adhäsionsmolekülen mittels des Cre-Lox Systems stellt für diesen Zweck eine probate Möglichkeit dar. Anhand des konditionalen in-vivo Knockouts ließen sich auch Verhaltensstudien der so erzeugten GVOs durchführen.

5 Zusammenfassung

Das Zustandekommen der subzellulären Organisation der interneuronalen Vernetzung sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bislang nicht vollständig verstanden. Zelladhäsionsmoleküle wie das in dieser Arbeit untersuchte E-Cadherin könnten eine Schlüsselrolle spielen. In den durchgeführten Experimenten konnte ein Effekt eines konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf GABAerge Synapsen in neuronalen Primärkulturen nachgewiesen werden. Kortikale Neurone wurden aus Mäusen gewonnen, deren E-Cadherin Gene loxP Sequenzen enthielten und somit einen konditionalen Knockout mittels Cre-Rekombinase ermöglichten. Im ersten Teil der Experimente wurden GABA_A-Rezeptor vermittelte mPSCs (GABA_A-mPSCs) von mit GFP bzw. mit creGFP transfizierten Neuronen in zwei verschiedenen Kulturreifungsstadien verglichen - an DIV 7 und an DIV 14. Hier zeigte sich, dass in E-Cadherin defizienten Neuronen der vom Kulturstadium abhängige Frequenzanstieg der GABA_A-mPSCs ausblieb. Auf die Amplitude, Anstiegs- oder Abfallzeit hatte die E-Cadherindefizienz jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss. Da die Frequenz der GABA_A-mPSCs sowohl von der Anzahl der Synapsen, als auch von der Freisetzungswahrscheinlichkeit der Transmittervesikel abhängt, wurde zur weiteren Untersuchung eine extrazelluläre Stimulation der GABAergen Synapsen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine E-Cadherindefizienz an DIV 14 zu einer signifikant verringerten Amplitude der postsynaptischen Ströme auf zwei aufeinanderfolgende extrazelluläre Stimuli führt. Das Paarpulsverhältnis (PPR) als Maß der Freisetzungswahrscheinlichkeit war in den E-Cadherin defizienten Neuronen zwar tendenziell größer, jedoch bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Die beobachteten Effekte lassen sich aufgrund der gewonnenen Daten am ehesten mit einer Reduktion der Synapsenzahl erklären. Zur weiteren Untersuchung der Auswirkung einer E-Cadherindefizienz wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt, in dem GABA_A-mPSC Messungen nach späterer Transfektion an DIV 10 durchgeführt wurden. Erstaunlicherweise war die GABA_A-mPSC Amplitude E-Cadherin defizienter Neurone unter diesen Bedingungen größer, die Abfallzeit des Signals länger. Ob dieser Effekt mit einer Änderung der Zusammensetzung der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten oder mit einer Störung der GABA Wiederaufnahme zusammenhängt, bedürfte einer weiteren Untersuchung. Der Nachweis eines Effekts der E-Cadherindefizienz auf GABAerge Synapsen zeigt eine Beteiligung dieses Zelladhäsionsmoleküls an der Reifung kortikaler Neurone. Zur genaueren Aufklärung der Rolle von E-Cadherin in der Synaptogenese sollten jedoch in-vivo Experimente erwogen werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

AD/DA	Analog Digital / Digital Analog
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure
ARA-C	Cytosin- β -D-Arabinofuranosid-Hydrochlorid
BAC	Bacterial Artificial Chromosome (Artifizielles Bakterienchromosom)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor (Neurotropher Faktor aus dem Gehirn)
BME	Basalmedium mit Earle's Salzen
CAM	Cell Adhesion Molecule (Zelladhäsionsmolekül)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cdh-1	Cadherin-1, E-Cadherin
CGE	Caudale Ganglionische Eminenz
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cre	Cyclisation Recombinase (zyklisierende Rekombinase)
creGFP	Fusionsprotein der Cre-Rekombinase und dem grün fluoreszierenden Protein
CV	Coefficient of Variation (Variationskoeffizient)
DIV(x)	Day In Vitro (x) (Zellkulturtag x)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion
EC	Extracellular Cadherin repeat (Extrazellulärer Cadherinabschnitt)
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein (Verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
EGTA	Ethylenbis(oxyethylen-nitrilo-)Tetraessigsäure
exp.	exprimierend
E(x)	Tag x der Embryonalentwicklung
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GABA _A mPSCs	GABA _A Rezeptor vermittelte mPSCs
GABARAP	GABA _A Rezeptor assoziiertes Protein
GAD65/67	Glutamic Acid Decarboxylase (Glutamatdecarboxylase)
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
GVO	Gentechnisch Veränderter Organismus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
IP3	Inositoltrisphosphat
LGE	Laterale Ganglionische Eminenz
loxP	Locus of X-Over of P1 (Crossoverstelle von Bakteriophage P1)
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (cells) (Madin-Darby Hundenierenzellen)

MGE	Mediale Ganglionische Eminenz
mPSC	miniature Post Synaptic Current (postsynaptischer Miniaturstrom)
n.a.	nicht angegeben
NLS	Nukleäre Lokalisations Sequenz
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT-3	Neurotrophin 3
NSF	N-ethylmaleimid Sensitiver Faktor
OPV	Operationsverstärker
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCN	Primary cultivated Cortical Neurons (primärkultivierte kortikale Neurone)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PPR	Paired Pulse Ratio (Paarpulsverhältnis)
Pr	Probability of Release (Freisetzungswahrscheinlichkeit)
PSC	Post Synaptic Current (postsynaptischer Strom)
P(x)	Tag x der postpartalen Entwicklung (x Tage nach der Geburt)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
siRNA	small interfering RNA (kleine, interferierende RNA)
SNARE Kom- plex	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment-protein-receptor-Komplex (Rezeptorkomplex des löslichen NSF Anhangsproteins)
TTX	Tetrodotoxin
UV	Ultra Violett
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Literatur

- [1] ALLEN-BRAIN-ATLAS: *RNA in-situ Hybridisierung von E-Cadherin im Gehirn 56 Tage alter männlicher Mäuse*. Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>), 2008
- [2] ANDERSON, SA ; MARIN, O ; HORN, C ; JENNINGS, K ; RUBENSTEIN, JL: Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. In: *Development* 128 (2001), S. 353–363
- [3] ANGO, F ; CRISTO, G di ; HIGASHIYAMA, H ; BENNETT, V ; WU, P ; HUANG, ZJ: Ankyrin-based Subcellular Gradient of Neurofascin, an Immunoglobulin Family Protein, Directs GABAergic Innervation at Purkinje Axon Initial Segment. In: *Cell* 119 (2005), S. 257–272
- [4] ARNDT, K ; NAKAGAWA, S ; TAKEICHI, M ; REDIES, C: Cadherin-defined segments and parasagittal cell ribbons in the developing chicken cerebellum. In: *Molecular and cellular neurosciences* 10(5-6) (1998), S. 211–228
- [5] AUGER, C ; MARTYR, A: Quantal currents at single-site central synapses. In: *The journal of Physiology* 526(1) (2000), S. 3–11
- [6] BAGRI, A ; TESSIER-LAVIGNE, M: Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. In: *Advances in experimental medicine and biology* 515 (2002), S. 13–31
- [7] BARBERIS, A ; PETRINI, EM ; CHERUBINI, E: Presynaptic source of quantal size variability at GABAergic synapses in rat hippocampal neurons in culture. In: *European Journal of Neuroscience* 20 (2004), S. 1803–1810
- [8] BARDONI, R ; GHIRRI, A ; SALIO, C ; PRANDINI, M ; MERIGHI, A: BDNF-Mediated Modulation of GABA and Glycine Release in Dorsal Horn Lamina II from Postnatal Rats. In: *Developmental Neurobiology* 67(7) (2007), S. 960–975
- [9] BAUER, M ; KRISTENSEN, BW ; MEYER, M ; GASSER, T ; WIDMER, HR ; ZIMMER, J ; UEFFING, M: Toxic Effects of Lipid-Mediated Gene Transfer in Ventral Mesencephalic Explant Cultures. In: *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98 (2006), S. 395–400
- [10] BECKSTEAD, MJ ; WILLIAMS, JT: Long-Term Depression of a Dopamine IPSC. In: *The Journal of Neuroscience* 27(8) (2007), S. 2074–2080

- [11] BENSON, DL ; TANAKA, H: N-Cadherin Redistribution during Synaptogenesis in Hippocampal Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 18(17) (1998), S. 6892–6904
- [12] BÄHR, S ; WOLFF, JR: Postnatal development of axosomatic synapses in the rat visual cortex: morphogenesis and quantitative evaluation. In: *The Journal of comparative neurology* 233(3) (1985), S. 405–420
- [13] BOLSHAKOV, VY ; SIEGELBAUM, SA: Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. In: *Science* 269(5231) (1995), S. 1730–1734
- [14] BOUSSADIA, O ; KUTSCH, S ; HIERHOLZER, A ; DELMAS, V ; KEMLER, R: E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. In: *Mechanisms of Development* 115 (2002), S. 53–62
- [15] BRYANT, DM ; STOW, JL: The ins and outs of E-cadherin trafficking. In: *TRENDS in Cell Biology* 14(8) (2004), S. 427–434
- [16] BU, DF ; ERLANDER, MG ; HITZ, BC ; TILLAKARATNE, NJ ; KAUFMAN, DL ; WAGNER-MCPHERSON, CB ; EVANS, GA ; TOBIN, AJ: Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992), S. 2115–2119
- [17] CANO, A ; PEREZ-MORENO, MA ; RODRIGO, I ; LOCASCIO, A ; BLANCO, MJ ; BARRIO, MG del ; PORTILLO, F ; NIETO, MA: The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-Cadherin expression. In: *Nature Cell Biology* 2 (2000), S. 76–83
- [18] CAPALDO, CT ; MACARA, IG: Depletion of E-Cadherin Disrupts Establishment but Not Maintenance of Cell Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. In: *Molecular Biology of the Cell* 18 (2006), S. 189–200
- [19] CHANG, MY ; SON, H ; LEE, YS ; LEE, SH: Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* 23 (2003), S. 414–26
- [20] CHEN, B ; SCHAEVITZ, LR ; MCCONNELL, SK: Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(47) (2005), S. 17184–17189

- [21] CHEN, ZW ; OLSEN, RW: GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. In: *Journal of Neurochemistry* 100 (2007), S. 279–294
- [22] CHENG, Q ; YEH, HH: Brain-derived neurotrophic factor attenuates mouse cerebellar granule cell *GABA_A* receptor-mediated responses via postsynaptic mechanisms. In: *The Journal of Physiology* 548(3) (2003), S. 711–721
- [23] CHERUBINI, E ; GAIARSA, JL ; BEN-ARI, Y: GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. In: *Trends in neurosciences* 14(12) (1991), S. 515–9
- [24] CHIU, W ; NIWA, Y ; ZENG, W ; HIRANO, T ; KOBAYASHI, H ; SHEEN, J: Engineered GFP as a vital reporter in plants. In: *Current Biology* 6 (1996), S. 325–30
- [25] COLE, KS: Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. In: *Archives des sciences physiologiques* 3 (1949), S. 253–258
- [26] COLEMAN, WL ; BILL, CA ; BYKHOVSKAIA, M: Rab3a deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse. In: *Neuroscience* 148(1) (2007), S. 1–6
- [27] DALVA, MB ; TAKASU, MA ; LIN, MZ ; SHAMAH, SM ; HU, L ; GALE, NW ; GREENBERG, ME: EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. In: *Cell* 103(6) (2000), S. 945–956
- [28] DEFELIPE, J: Neocortical Neuronal Diversity: Chemical Heterogeneity Revealed by Colocalization Studies of Classic Neurotransmitters, Neuropeptides, Calcium-binding Proteins, and Cell Surface Molecules. In: *Cerebral cortex* 3(4) (1993), S. 273–289
- [29] DUNNING, DD ; HOOVER, CL ; SOLTESZ, I ; SMITH, MA ; O'DOWD, DK: *GABA_A* Receptor-Mediated Miniature Postsynaptic Currents and α -Subunit Expression in Developing Cortical Neurons. In: *The Journal of Neurophysiology* 82(6) (1999), S. 3286–3297
- [30] ERLANDER, MG ; TILLAKARATNE, NJ ; FELDBLUM, S ; PATEL, N ; TOBIN, AJ: Two Genes Encode Distinct Glutamate Decarboxylases. In: *Neuron* 7 (1991), S. 91–100
- [31] FANNON, AM ; COLMAN, DR: A Model for Central Synaptic Junctional Complex Formation Based on the Differential Adhesive Specificities of the Cadherins. In: *Neuron* 17 (1996), S. 423–434

- [32] FUJITA, Y ; KRAUSE, G ; SCHEFFNER, M ; ZECHNER, D ; MOLINA LEDDY, HE ; BEHRENS, J ; SOMMER, T ; BIRCHMEIER, W: Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-Cadherin complex. In: *Nature Cell Biology* 4 (2002), S. 222–231
- [33] FUKATA, M ; KAIBUCHI, K: Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. In: *Nature reviews molecular cell biology* 2(12) (2001), S. 887–807
- [34] GAGNETEN, S ; LE, Y ; MILLER, J ; SAUER, B: Brief expression of a GFPcre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. In: *Nucleic Acids Research* 25(16) (1997), S. 3326–3331
- [35] GENSAT: *BAC vermittelter Nachweis der E-Cadherin Expression*. GENSAT (<http://www.gensat.org/>), 2008
- [36] GHOSH, K ; GUO, F ; VAN DUYN, GD: Synapsis of loxP Sites by Cre Recombinase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282(33) (2007), S. 24004–24016
- [37] GRINDLEY, ND ; WHITESON, KL ; RICE, PA: Mechanisms of Site-Specific Recombination. In: *Annu Rev Biochem* 75 (2006), S. 567–605
- [38] GULYAS-KOVACS, A ; WIT, H de ; MILOSEVIC, I ; KOCHUBEY, O ; TOONEN, R ; KLINGAUF, J ; VERHAGE, M ; SØRENSEN, JB: Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. In: *The Journal of neuroscience* 27(32) (2007), S. 8676–86
- [39] HAAS, J ; PARK, E ; SEED, B: Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. In: *Current Biology* 6 (1996), S. 315–324
- [40] HAMMARLUND, M ; PALFREYMAN, MT ; WATANABE, S ; OLSEN, S ; EM, Jorgensen: Open syntaxin docks synaptic vesicles. In: *PLoS biology* 5(8) (2007), S. 1695–1711
- [41] HEIM, R ; CUBITT, AB ; TSIEN, RY: Improved green fluorescence. In: *Nature* 373 (1995), S. 663 – 664
- [42] HUANG, EJ ; REICHARDT, LF: NEUROTROPHINS: Roles in Neuronal Development and Function. In: *Annual Review of Neuroscience* 24 (2001), S. 677–736

- [43] HUANG, Z J. ; DI CRISTO, G ; ANGO, F: Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. In: *Nature Reviews Neuroscience* 8 (2007), S. 673–686
- [44] HUNT, SJ ; NELSON, WJ: Fabrication of a dual substrate display to test roles of cell adhesion proteins in vesicle targeting to plasma membrane domains. In: *FEBS Letters* 581 (2007), S. 4539–4543
- [45] ING, T ; POULTER, MO: Diversity of GABA_A receptor synaptic currents on individual pyramidal cortical neurons. In: *European Journal of Neuroscience* 25 (2007), S. 723–734
- [46] INOUE, A ; SANES, JR: Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. In: *Science* 276(5317) (1997), S. 1428–1431
- [47] INOUE, T ; CHISAKA, O ; MATSUNAMI, H ; M., Takeichi: Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and neural crest subpopulations in mouse embryos. In: *Developmental biology* 183 (1997), S. 183–194
- [48] JONES, EG ; POWELL, TPS: Morphological Variations In The Dendritic Spines Of The Neocortex. In: *Journal of cell science* 5(2) (1969), S. 509–529
- [49] KAMEI, T ; MATOZAKI, T ; SAKISAKA, T ; KODAMA, A ; YOKOYAMA, S ; PENG, YF ; NAKANO, K ; TAKAISHI, K ; TAKAI, Y: Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells-regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. In: *Oncogene* 19 (1999), S. 6776–6784
- [50] KIRISCHUK, S ; AKYELI, J ; IOSUB, R ; GRANTYN, R: Pre- and postsynaptic contribution of GABA_C receptors to GABAergic synaptic transmission in rat collicular slices and cultures. In: *European Journal of Neuroscience* 18 (2003), S. 752–758
- [51] KIRISCHUK, S ; GRANTYN, R: A readily releasable pool of single inhibitory boutons in culture. In: *Neuroreport* 11(17) (2000), S. 3709–3713
- [52] KIRISCHUK, S ; VESELOVSKY, N ; GRANTYN, R: Single-bouton-mediated synaptic transmission: postsynaptic conductance changes in their relationship with presynaptic calcium signals. In: *European Journal of Physiology* 438 (1999), S. 716–724

- [53] KOREMATSU, K ; REDIES, C: Restricted expression of cadherin-8 in segmental and functional subdivisions of the embryonic mouse brain. In: *Developmental dynamics* 208(2) (1997), S. 178–189
- [54] KRASZEWSKI, K ; GRANTYN, R: Development of Gabaergic Connections in vitro: Increasing Efficacy of Synaptic Transmission Is Not Accompanied by Changes in Miniature Currents. In: *Journal of Neurobiology* 23(6) (1992a), S. 766–781
- [55] KRASZEWSKI, K ; GRANTYN, R: Unitary, Quantal and Miniature GABA-Activated Synaptic Chloride Currents in Cultured Neurons From the Rat Superior Colliculus. In: *Neuroscience* 47(3) (1992b), S. 555–570
- [56] LARUE, L ; OHSUGI, M ; HIRCHENHAIN, J ; KEMLER, R: E-Cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994), S. 8263–8267
- [57] LE, TL ; YAP, AS ; STOW, JL: Recycling of E-Cadherin: A Potential Mechanism for Regulating Cadherin Dynamics. In: *The Journal of Cell Biology* 146 (1999b), S. 219–232
- [58] LE, Y ; GAGNETEN, S ; TOMBACCINI, D ; BETHKE, B ; SAUER, B: Nuclear targeting determinants of the phage P1 Cre DNA recombinase. In: *Nucleic Acids Research* 27(24) (1999a), S. 4703–4709
- [59] LE, Y ; MILLER, JL ; SAUER, B: GFPcre Fusion Vectors with Enhanced Expression. In: *Analytical Biochemistry* 270 (1999c), S. 334–336
- [60] LE FEUVRE, Y ; FRICKER, D ; LERESCHE, N: GABA_A receptor-mediated IPSCs in rat thalamic sensory nuclei: patterns of discharge and tonic modulation by GABA_B autoreceptors. In: *Journal of Physiology* 502(1) (1997), S. 91–104
- [61] LECKBAND, D ; PRAKASAM, A: Mechanism and Dynamics of Cadherin Adhesion. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 8 (2006), S. 259–287
- [62] LETINIC, K ; ZONCU, R ; RAKIC, P: Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. In: *Nature* 417 (2002), S. 645–649
- [63] LEVINSON, JN ; CHERY, N ; HUANG, K ; WONG, TP ; PRANGE, O: Neuro-ligins Mediate Excitatory and Inhibitory Synapse Formation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280(17) (2005), S. 17312–17319

- [64] LIU, QY ; VAUTRIN, J ; SCHAFFNER, AE ; WU, M ; BARKER, JL: GABA Induces GABAergic MSCs in Cultured Embryonic rat Thalamic Neurons. In: *Synapse* 25(15) (1997), S. 15–23
- [65] MARIN, O ; ANDERSON, SA ; RUBENSTEIN, JL: Origin and Molecular Specification of Striatal Interneurons. In: *The Journal of Neuroscience* 20(16) (2000), S. 6063–6076
- [66] MARKRAM, H: Interneurons of the neocortical inhibitory system. In: *Nature Rev. Neurosci.* 5 (2004), S. 793–807
- [67] MARTIN, KA ; SOMOGYI, P ; WHITTERIDGE, D: Physiological and morphological properties of identified basket cells in the cats visual cortex. In: *Exp. Brain Res.* 50 (1983), S. 193–200
- [68] MATSUNAMI, H ; TAKEICHI, M: Fetal Brain Subdivisions Defined by R- and E-Cadherin Expressions: Evidence for the Role of Cadherin Activity in Region-Specific, CellCell Adhesion. In: *Developmental Biology* 172 (1995), S. 466–478
- [69] MCINNES, RR ; MICHAUD, JL: Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. In: *Clinical Genetics* 72 (2007), S. 1–8
- [70] MESE, G ; RICHARD, G ; WHITE, TW: Gap Junctions: Basic Structure and Function. In: *Journal of Investigative Dermatology* 127 (2007), S. 2516–24
- [71] MICHELS, G ; MOSS, SJ: GABAA Receptors: Properties and Trafficking. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 42 (2007), S. 3–14
- [72] MILES, R ; TOTH, K ; GULYAS, AI ; HAJOS, N ; FREUND, TF: Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus. In: *Neuron* 16 (1996), S. 815–823
- [73] MISKEVICH, F ; ZHU, Y ; RANSCHT, B ; SANES, JR: Expression of multiple cadherins and catenins in the chick optic tectum. In: *Molecular and cellular neurosciences* 12(4-5) (1998), S. 240–255
- [74] MURAMATSU, K ; HASHIMOTO, Y ; UEMURA, T ; KUNII, M ; HARADA, R ; SATO, T ; MORIKAWA, A ; HARADA, A: Neuron-specific recombination by Cre recombinase inserted into the murine tau locus. In: *Biochemical and biophysical research communications* 370(3) (2008), S. 419–423

- [75] NAKAGAWA, S ; TAKEICHI, M: Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. In: *Development* 121(5) (1995), S. 1321–1332
- [76] NEHER, E ; SAKMANN, B: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: *Nature* 260 (1976), S. 799–802
- [77] NERY, S ; FISHELL, G ; CORBIN, JG: The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. In: *nature neuroscience* 5(12) (2002), S. 1279–1287
- [78] NIESSEN, CM: Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. In: *Journal of Investigative Dermatology* 127 (2007), S. 2525–2532
- [79] NUTT, D: GABAA Receptors: Subtypes, Regional Distribution, and Function. In: *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2 (2006), S. 7–11
- [80] OHKI, EC ; TILKINS, ML ; CICCARONE, VC ; PRICE, PJ: Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. In: *Journal of Neuroscience Methods* 112 (2001), S. 95–99
- [81] PARADIS, S ; HARRAR, DB ; LIN, Y ; KOON, AC ; HAUSER, JL ; GRIFFITH, EC ; ZHU, L ; BRASS, LF ; CHEN, C ; GREENBER, ME: An RNAi-Based Approach Identifies Molecules Required for Glutamatergic and GABAergic Synapse Development. In: *Neuron* 53 (2007), S. 217–232
- [82] PASCUAL, M ; POZAS, E ; BARALLOBRE, MJ ; TESSIER-LAVIGNE, M ; SORIANO, E: Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections. In: *Molecular and cellular neurosciences* 26(1) (2004), S. 24–33
- [83] PATERSON, AD ; PARTON, RG ; FERGUSON, C ; STOW, JL ; YAP, AS: Characterization of E-Cadherin Endocytosis in Isolated MCF-7 and Chinese Hamster Ovary Cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278(23) (2003), S. 21050–21057
- [84] RAKOTOARIVELO, C ; PETITE, D ; WEILLE, J de ; LUMBROSO, S ; PRIVAT, A ; SULTAN, C ; MERSEL, M: Mild surfaction of neural cells, especially motoneurons, in primary culture and cell lines. In: *Experimental Neurology* 204 (2007), S. 118–130
- [85] RAYMOND, CR: LTP forms 1,2 and 3: different mechanisms for the 'long' in long-term potentiation. In: *TRENDS in Neurosciences* 30 (2007), S. 167–175

- [86] REDIES, C ; AST, M ; NAKAGAWA, S ; TAKEICHI, M ; TORRE, M Martinez-de-la ; PUELLES, L: Morphologic fate of diencephalic prosomeres and their subdivisions revealed by mapping cadherin expression. In: *The Journal of Comparative Neurology* 421(4) (2000), S. 481–514
- [87] REDIES, C ; ENGELHART, K ; TAKEICHI, M: Differential expression of N- and R-cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain. In: *The Journal of Comparative Neurology* 333(3) (1993), S. 398–416
- [88] REDIES, C ; TAKEICHI, M: Expression of N-cadherin mRNA during development of the mouse brain. In: *Developmental dynamics* 197(1) (1993), S. 26–39
- [89] REDMAN, S: Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. In: *Physiological Reviews* 70 (1990), S. 165–198
- [90] RIBAK, CE: Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. In: *Journal of Neurocytology* 7(4) (1978), S. 461–78
- [91] RIVERA, C ; VOIPIO, J ; PAYNE, JA ; RUUSUVUORI, E ; LAHTINEN, H ; LAMSA, K ; PIRVOLA, U ; SAARMA, Mart ; KAILA, K: The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. In: *NATURE* 397 (1999), S. 251–255
- [92] SALINAS, PC ; PRICE, SR: Cadherins and catenins in synapse development. In: *Current Opinion in Neurobiology* 15(1) (2005), S. 73–80
- [93] SAUER, B: Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. In: *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 14 (1998), S. 381–392
- [94] SHAPIRO, L ; LOVE, J ; COLMAN, DR: Adhesion Molecules in the Nervous System: Structural Insights into Function and Diversity. In: *Annual Review of Neuroscience* 30 (2007), S. 45174
- [95] SHIMAMURA, K ; TAKEICHI, M: Local and transient expression of E-Cadherin involved in mouse embryonic brain morphogenesis. In: *Development* 116 (1992), S. 1011–1019
- [96] SOGHOMONIAN, JJ ; MARTIN, DL: Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? In: *Trends in pharmacological sciences* 19 (1998), S. 500–505

- [97] SOMOGYI, P: A specific axo-axonal interneuron in the visual cortex of the rat. In: *Brain Res.* 136 (1977), S. 345–50
- [98] SOMOGYI, P ; COWEY, A: Combined Golgi and Electron Microscopic Study on the Synapses Formed by Double Bouquet Cells in the Visual Cortex of the Cat and monkey. In: *The Journal of comparative neurology* 195 (1981), S. 547–566
- [99] SOMOGYI, P ; TAMAS, G ; LUJAN, R ; BUHL, EH: Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. In: *Brain Res. Brain Res. Rev* 26 (1998), S. 113–135
- [100] STERNBERG, N ; SAUER, B ; HOESS, R ; ABREMSKI, K: Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. In: *J Mol Biol* 187(2) (1986), S. 197–212
- [101] SUSSEL, L ; MARIN, O ; KIMURA, S ; RUBENSTEIN, JL: Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. In: *Development* 126 (1999), S. 3359–3370
- [102] SUTTON, RB ; FASSHAUER, D ; JAHN, R ; BRUNGER, AT: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4Å° resolution. In: *Nature* 395(6700) (1998), S. 347–53
- [103] SUZUKI, K ; OKAMOTO, T ; KIDOKORO, Y: Biphasic modulation of synaptic transmission by hypertonicity at the embryonic Drosophila neuromuscular junction. In: *Journal of Physiology* 545(1) (2002), S. 119–131
- [104] TANG, L ; HUNG, CP ; SCHUMAN, EM: A Role for the Cadherin Family of Cell Adhesion Molecules in Hippocampal Long-Term Potentiation. In: *Neuron* 20 (1998), S. 1165–1175
- [105] TESSIER-LAVIGNE, M: Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. In: *Cell* 82(3) (1995), S. 345–348
- [106] THAMPY, KG ; BARNES, EG: γ- Aminobutyric Acid-gated Chloride Channels in Cultured Cerebral Neurons. In: *The Journal of Biological Chemistry* 259(3) (1984), S. 1753–1757
- [107] THOMSON, AM: Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. In: *Trends in neurosciences* 23 (2000), S. 305–312

- [108] TÖNGES, L ; LINGOR, P ; EGGLE, R ; DIETZ, G ; FAHR, A ; BÄHR, M: Stearilated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons. In: *RNA* 12(7) (2006), S. 1431–1438
- [109] TOGASHI, H ; ABE, K ; MIZOGUCHI, A ; TAKAOKA, K ; CHISAKA, O ; TAKEICHI, M: Cadherin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis. In: *Neuron* 35 (2002), S. 77–89
- [110] VEGA: *VEGA Mouse: Vega Exon Report, Vega Protein Report für Cadherin-1; Locus ID OTTMUSG00000020588*. VEGA Mouse (http://vega.sanger.ac.uk/Mus_musculus/index.html), 2008
- [111] WAITES, CL ; CRAIG, AM ; GARNER, CC: Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis. In: *Annual Reviews Neuroscience* 28 (2005), S. 251–274
- [112] WEI, CJ ; XU, X ; LO, CW: Connexins and cell signaling in development and disease. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (2004), S. 811–38
- [113] WEISS, DS ; BARNES, EM ; HABLITZ, JJ: Whole-Cell and Single-Channel Recordings of GABA-Gated Currents in Cultured Chick Cerebral Neurons. In: *Journal of Neurophysiology* 59(2) (1988), S. 495–513
- [114] WÖHRN, JC ; NAKAGAWA, S ; AST, M ; TAKEICHI, M ; REDIES, C: Combinatorial expression of cadherins in the tectum and the sorting of neurites in the tectofugal pathways of the chicken embryo. In: *Neuroscience* 90(3) (1999), S. 985–1000
- [115] WONDERS, CP ; ANDERSON, SA: The origin and specification of cortical interneurons. In: *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2006), S. 687–696
- [116] WONG, CG ; BOTTIGLIERI, T ; SNEAD, OC: GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. In: *Annals of neurology* 54(S6) (2003), S. 3–12
- [117] XU, Q ; COBOS, I ; DE LA CRUZ, E ; RUBENSTEIN, JL ; ANDERSON, SA: Origins of Cortical Interneuron Subtypes. In: *The Journal of Neuroscience* 24(11) (2004), S. 2612–2622
- [118] YAMADA, M ; HASHIMOTO, T ; HAYASHI, N ; HIGUCHI, M ; MURAKAMI, A ; NAKASHIMA, T ; MAEKAWA, S ; MIYATA, S: Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization. In: *Brain Research* 1165 (2007), S. 5–14

- [119] YAN, QS ; FENG, MJ ; YAN, SE: RNA interference-mediated inhibition of brain-derived neurotrophic factor expression increases cocaine's cytotoxicity in cultured cells. In: *Neuroscience Letters* 2(6) (2007), S. 165–169
- [120] YOON, MS ; PUELLES, L ; REDIES, C: Formation of cadherin-expressing brain nuclei in diencephalic alar plate divisions. In: *The Journal of comparative neurology* 427(1) (2000), S. 461–480
- [121] YOUNG, AB ; SNYDER, SH: Strychnine Binding Associated with Glycine Receptors of the Central Nervous System. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(10) (1973), S. 2832–2836
- [122] YOUNG, P ; BOUSSADIA, O ; HALFTER, H ; GROSE, R ; BERGER, P ; LEONE, DP ; ROBENEK, H ; CHARNAY, P ; KEMLER, R ; SUTER, U: E-Cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. In: *The EMBO Journal* 22(21) (2003), S. 5723–5733
- [123] ZHU, Y ; STORNETTA, RL ; ZHU, JJ: Chandelier Cells Control Excessive Cortical Excitation: Characteristics of Whisker-Evoked Synaptic Responses of Layer 2/3 Nonpyramidal and Pyramidal Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 24(22) (2004), S. 5101–5108

Danksagung

Mein Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kurt Gottmann, der mir die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte und mich exzellent in die Materie einführte. Der wissenschaftlich-kritische Blick, den ich in der Neurophysiologie unter Prof. Dr. Gottmann kennenlernte, wird mich mein ärztliches Leben in positiver Weise begleiten.

Ich danke Prof. R. Kemler aus dem Max-Planck Institut für Immunbiologie in Freiburg, Abteilung molekulare Embryologie, für die Überlassung des Ecad flox GVOs.

Weiterhin bin ich den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe zu Dank verpflichtet. Dipl.-Biol. Adriana Stan und Dipl.-Biol. Kim Pielarski führten mich in die Zellkultur primärer Neurone ein und hatten jederzeit ein offenes Ohr für mich. Martina Bohndorf unterstützte mich ebenso in jedem Anliegen und half unermüdlich bei der Bereitstellung weiterer Vektoren.

Für eine freundliche und gesellige Atmosphäre im gemeinsam bewohnten Laborzimmer bin ich in besonderer Weise Dr. Corinna Walz, Dipl.-Biol. Bastian Elßner-Beyer sowie cand. med. Sebastian Flerus dankbar.

Der Technischen Unterstützung der fakultätseigenen feinmechanischen Werkstatt, besonders Herrn Stefan Schätz, bin ich ebenso zu dank verpflichtet.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, Dr. Nikolaus Fiederling und Christiane Fiederling, sowie meinem Bruder Bastian Fiederling, für die große Geduld und das Verständnis für meinen neurophysiologischen Exkurs sowie die tolle Unterstützung.

Ein sehr großer Dank gebührt ebenfalls Anne Maaßen, für ihr Verständnis und ihre Geduld. Ihre tolle Unterstützung war stets sehr wichtig für mich.

Weiterhin Danke ich Herr Wittek, meinem ehemaligen Biologielehrer, für die Erweckung der Faszination für Neurone in mir.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt. Ich bin mir darüber klar, daß der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, daß die Fakultät die Promotion widerruft.

Düsseldorf, den

Andreas Fiederling

Lebenslauf

Andreas Clemens Fiederling

Geboren am 03.05.1983 in Würzburg, Bayern

Schulbildung:

1989-1993	GGs Waldschule in Leverkusen
1993-2002	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Leverkusen
2002	Abitur

Hochschulstudium:

2002-2009	Studium der Humanmedizin an der HHU Düsseldorf
2004	Physikum nach alter AO
2008-2009	Praktisches Jahr Sana Krankenhaus Gerresheim Wahlfach: Anästhesie
2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Vollapprobation als Arzt

Forschung:

2007-2008	Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie HHU Düsseldorf Experimentelle Tätigkeit zur Vorbereitung der Promotion Betreuung Neurophysiologischer Praktika
-----------	--