

Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Neurologische Klinik und Hertie- Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Kognitive Neurologie
Direktor: Professor Dr. H. P. Thier

Funktionelle Architektur der Kleinhirnerne der Ratte

Untersuchungen zur Membranphysiologie, Morphologie und
glycinergen synaptischen Transmission der
Kleinhirnerneurone

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Kamphausen
aus Mönchengladbach
2006

Aus dem Zentrum für Neurologie Tübingen
Neurologische Klinik und Hertie- Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Kognitive Neurologie
Direktor: Professor Dr. H. P. Thier

Funktionelle Architektur der Kleinhirnerne der Ratte

Untersuchungen zur Membranphysiologie, Morphologie und
glycinergen synaptischen Transmission der
Kleinhirnerneurone

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Kamphausen
aus Mönchengladbach
2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Schwarz
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

Der schlimmste Weg, den man wählen kann, ist der, keinen zu wählen.

Für meine Eltern, in Liebe und Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1	Ce re bell um	1
1.1.1	Makroskopische Anatomie des Kleinhirns	2
1.1.2	Mikroskopische Anatomie des Kleinhirns	3
1.1.3	Funktionen des Kleinhirns	5
1.2	Die Kleinhirnkerne der Ratte	7
1.2.1	Bedeutung der Kleinhirnkerne für die Funktion des Kleinhirns	7
1.2.2	Makroskopische Anatomie der Kleinhirnkerne	7
1.2.3	Mikroskopische Anatomie der Kleinhirnkerne	8
1.3	Inhibitorische Informationsübertragung	10
1.3.1	Neurophysiologische Grundlagen	10
1.3.2	Bedeutung der Inhibition in den Kleinhirnkernen	11
1.3.2.1	Die <i>lurcher</i> – Mutante	12
1.3.2.2	Die <i>pcd</i> - Mutante	14
1.3.3	Glycinerge Neurotransmission in den Kleinhirnkernen	15
1.3.3.1	Grundlagen	15
1.3.3.2	Glycin als Neurotransmitter in den Kleinhirnkernen?	16
1.4	Ziel dieser Studie	17

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1	Versuchstiere	21
2.2	Elektrophysiologie	21
2.2.1	Präparation und Aufbewahrung der Gehirnschnitte	21
2.2.2	Versuchsaufbau	25
2.2.3	Visualisierung der Hirnschnitte	26
2.2.4	Herstellung der Ganzzellkonfiguration	27
2.3	Pharmakologie	29
2.4	Datenerfassung	30
2.5	Datenauswertung	31
2.6	Immunhistochemie	32

3	ERGEBNISSE	
3.1	Membranphysiologie	34
3.1.1	Spontanes Feuerverhalten	35
3.1.2	Feuerverhalten unter Stimulation	39
3.1.2.1	Depolarisierende Pulse	39
3.1.2.2	Hyperpolarisierende Pulse	43
3.1.3	Aktionspotentialparameter	47
3.1.4	Analyse unterschiedlicher Neuronentypen	49
3.2	Morphologie	57
3.3	Clusteranalyse	61
3.4	Glycinerge synaptische Transmission in den Kleinhirnkernneuronen	64
3.4.1	Glycin bewirkt Einwärtsströme in den Kleinhirnkernneuronen	65
3.4.2	Glycinerge synaptische Aktivität ist in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen nicht nachweisbar	68
3.4.3	Glycinerge synaptische Aktivität in Kleinhirnkernneuronen jung-adulter Ratten	73
3.4.4	Auswirkungen von Pikrotoxin	75
3.4.5	Kinetik glycinерger IPSCs	77
3.4.6	Glycin hat einen inhibitorischen Effekt auf alle Typen von Kleinhirnkernneuronen	78
4	DISKUSSION	
4.1	Elektrophysiologische Charakterisierung unterschiedlicher Neuronentypen in den Kleinhirnkernen	84
4.2	Morphologie unterschiedlicher Neuronentypen in den Kleinhirnkernen	88
4.3	Glycinerge Neurotransmission in den Kleinhirnkernneuronen	93
4.4	Methodische Überlegungen	98
4.5	Funktionelle Überlegungen	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	LITERATUR	107

1 EINLEITUNG

1.1 „Ce|re|bel|lum, das: <aus lat. cerebellum "kleines Gehirn", Verkleinerungsform von Cerebrum>“

Unsere Sichtweise des Kleinhirns hat sich im Laufe des vergangenen Jahrhunderts grundlegend verändert. Wurde es im Vergleich zum Cerebrum zunächst bloß als „kleines Gehirn“ angesehen, findet es nun aufgrund seiner verblüffenden Leistungen Beachtung als eigenständiges funktionelles Modul. Das Kleinhirn ist eine der phylogenetisch ältesten Strukturen des Wirbeltiergehirns und war während der Evolution, mehr als jede andere Region des zentralen Nervensystems, starken Veränderungen unterworfen. Somit hat die Evolution Kleinhirne in erstaunlich vielfältiger Form und Größe hervorgebracht. Beim *Homo sapiens* hat sich die Größe des Kleinhirns in den vergangenen 10 Millionen Jahren vervierfacht. Nichtsdestotrotz wurde das grundlegende strikte Verschaltungsmuster während der Evolution vom Fisch zum Menschen im Wesentlichen beibehalten, was auf eine gewisse Universalität seiner Rolle und Funktion schließen läßt (Llinas et al., 1998). Obwohl das Kleinhirn mit nur einem Sechstel des cerebralen Volumens deutlich kleiner als das Großhirn ist, entspricht seine Fläche einer entfalteten Hemisphäre der Großhirnrinde (Heck und Sultan, 2001). Ebenso verblüffend ist die Beobachtung, dass das Kleinhirn fünfmal so viele Neurone enthält wie das Großhirn. Vor dem Hintergrund dieser Neuronenzahl und der Größe seiner Oberfläche darf man vermuten, dass das Kleinhirn ähnlich komplexe Aufgaben zu erfüllen hat wie das Großhirn (Heck und Sultan, 2001). Das Kleinhirn war aufgrund seiner besonderen Struktur über Jahrhunderte hinweg ein bevorzugtes anatomisches Studienmodell. Bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieb Purkinje (1837) die größten Zelltypen, die er im Kleinhirncortex fand, und gab diesen Zellen damit seinen Namen. Auch Ramón y Cajal befasste sich hauptsächlich mit der Struktur des Kleinhirns und beschrieb erstmals die auffallende Schichtung von Nervenzellen und Fasern

der Kleinhirnrinde (1889). Die Zelltypen, die er im Kleinhirn beschrieb, gelten heute noch, ebenso ihre Namen.

1.1.1 Makroskopische Anatomie des Kleinhirns

Das Kleinhirn befindet sich in der hinteren Schädelgrube und sitzt Medulla oblongata und Pons von dorsal her auf. Es bildet damit das Dach des vierten Ventrikels. Durch die drei Kleinhirnstiele (Pedunculus cerebellaris superior, medius und inferior) ist das Cerebellum mit dem Hirnstamm verbunden. Während es vorwiegend über den mittleren und unteren Pedunculus Afferenzen erhält, entsendet es seine Efferenzen vorwiegend über den oberen Kleinhirnstiel (Trepel, 1999). Das Kleinhirn besteht aus zwei Hemisphären, die über den Vermis miteinander verbunden sind. Aus funktionellen und entwicklungsgeschichtlichen Gründen lässt sich nach Brodal (1981) eine Gliederung des Kleinhirns in drei Anteile treffen: das *Vestibulocerebellum* wird mit dem phylogenetisch ältesten Teil des Kleinhirns, dem Archicerebellum, gleichgestellt und besteht aus Nodus und Flocculus. Beide weisen enge Verbindungen zum Vestibularapparat des Innenohres auf und bilden zusammen den Lobus flocculonodularis. Das *Spinocerebellum* (Palaeocerebellum) erhält den Hauptteil seiner Afferenzen aus dem Rückenmark und setzt sich aus dem Vermis und den paravermalen Zonen zusammen. Das *Pontocerebellum* ist als sog. Neocerebellum der jüngste Teil des Kleinhirns und besteht aus den beiden Hemisphären. Seine Afferenzen erhält es vorwiegend aus den Nuclei pontis, die wiederum überwiegend Signale aus dem Neocortex erhalten. Im Sagittalschnitt des Kleinhirns erkennt man durch die starke Fältelung der cerebellären Rinde den sogenannten Arbor vitae. Im Horizontalschnitt stellen sich die paarig angelegten Kleinhirnkerne innerhalb des Marklagers dar. Auf diese wird in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.1.2 Mikroskopische Anatomie des Kleinhirns

Im Kleinhirn sind mehr als die Hälfte aller Neurone des gesamten Gehirns lokalisiert. Der größte Anteil dieser Neurone befindet sich in der stark gefalteten Rinde, die sich in drei Schichten unterteilen lässt. Von außen nach innen sind dies die Molekularschicht, die Purkinjzellschicht und die Körnerzellschicht. Die der Pia mater zugewandte *Molekularschicht* besteht überwiegend aus den Axonen der Körnerzellen, die parallel zur Längsachse der Kleinhirnwindungen verlaufen. Sie enthält überdies verstreute GABAerge Stern- und Korbzellen, die jeweils als Interneurone fungieren, sowie die Dendritenbäume der darunterliegenden Purkinjzellen (Chan- Palay, 1974; Kandel, 1995). Alle intracorticalen Schaltkreise enden nach wenigen Synapsen auf einer Purkinjzelle der *Purkinjzellschicht*. Die Somata dieser größten Zellen des Kleinhirncortex sind in strikter Anordnung nebeneinander aufgereiht. Als einzige Efferenz der Kleinhirnrinde führen diese Neurone das Resultat der Verarbeitung tausender intracorticaler Verschaltungen in Form von inhibitorischen Impulsen den Kleinhirn- und vestibulären Kernen zu. Die Purkinjzelle stellt damit die zentrale Integrationseinheit des Kleinhirncortex dar. Die inhibitorische Wirkung der Purkinjzelle auf ihre postsynaptischen Zielzellen wird durch den Transmitter GABA vermittelt (Ottersen und Storm- Mathisen, 1984). Die innerste *Körnerschicht* ist die zellreichste Schicht des Kleinhirncortex und enthält eine Fülle dichtgepackter kleiner Neurone. Sie besteht zum größten Teil aus Körnerzellen, doch auch Somata von Golgi-, Lugaro- und „Pale“- Zellen finden sich in dieser Schicht. Die Golgizellen vermitteln über ihren Transmitter GABA inhibitorische Impulse auf die Körnerzellen. Die unter Nissl- Färbung blaß erscheinenden und daher als Pale- Zellen bezeichneten Zellen treten vorwiegend in Regionen mit starker vestibulärer Afferenz auf und wirken über Glutamat als exzitatorisches Verstärkungssystem (Altman et al., 1977). Die Dendriten der Lugarozellen bilden Synapsen mit Golgi- und Korbzellen aus (Chan-Palay, 1974). Aufgrund der zahlreichen Kontakte mit rekurrenten Kollateralen der Purkinjzellen und der starken inhibitorischen Projektion in die Molekularschicht wird diesen Neuronen die Funktion eines „Feedback“-

Interneurons zugeschrieben (Lainé und Axelrad, 1996). Die Lugaro-Golgzellprojektion war die erste synaptische Verbindung des Kleinhirns, an der eine Kotransmission von GABA und Glycin gezeigt werden konnte (De Schutter et al., 2002). Die Körnerzellen entsenden ihre Axone als *Parallelfasern* auf direktem Wege in die Molekularschicht, wo sie sich T-förmig aufteilen. Die Äste verlaufen parallel zur Ausrichtung eines Folioms und senkrecht auf den fächerartigen Dendritenbäumen der Purkinjezellen (Chan-Palay, 1974), wobei sie mit zahlreichen Purkinjezellen in Kontakt treten. Jede Purkinjezelle empfängt auf diese Weise konvergierende Eingänge aus ca. 200.000 Parallelfasern. Das Kleinhirn empfängt Afferenzen aus extracerebellären Hirnarealen über drei verschiedene Fasersysteme: die *Moosfasern* haben ihren Ursprung im Tractus spinocerebellaris und in den pontinen Kernen, wohin Bahnen des Großhirns projizieren. Sie ziehen dann zu den Körnerzellen des Kleinhirncortex. Über die Parallelfasern setzt sich der Moosfaserimpuls damit bis zu den Purkinjezellen fort. Die *Kletterfasern* entstammen der inferioren Olive. Ihre Axone verlaufen durch den unteren Kleinhirnstil und enden am Dendritenbaum der Purkinjezelle. Jede Purkinjezelle wird dabei nur durch eine einzige Kletterfaser innerviert (Chan-Palay, 1974). Beide Fasersysteme geben Kollateralfasern zu den Kleinhirnkernen ab (Llinas et al., 1988). Genauso wie die Parallelfasern haben auch die Moosfasern eine exzitatorische Wirkung. Die Aktivierung der Kletterfasern führt zu einer lokal begrenzten, starken Erregung der Purkinjezellen (Chan et al., 1989). Gleichzeitig werden Golgzellen aktiviert, die den Moosfaser-Eingang hemmen (Dieudonné, 1998). Beides, die Aktivierung der Purkinjezellen und die Blockierung der Moosfaser-Afferenzen, bedeutet, daß sich die Kletterfaser-Eingänge bei ihrer Aktivierung der Purkinjezellen voll bemächtigen und konkurrierende Eingänge seitens der Moosfasern ausschalten. Die Erregung der Moosfasern aktiviert über die Körnerzellen und Parallelfasern eine große Anzahl von Purkinjezeldendriten. Zusätzlich werden alle drei Typen inhibitorischer Interneurone erregt, die den Reiz räumlich und zeitlich begrenzen, die Korb-, Stern- und Golgzellen. Das Gesamtergebnis dieser Interaktion führt dazu, daß nach einer kurzen Entladungssalve einer relativ großen, aber umschriebenen Purkinjezell-

population die Aktivierung blitzschnell zusammenbricht. Dies macht eine genaue zeitliche Kontrolle der Aktivierungsmuster möglich (Geurts et al., 2003). Die *monoaminergen Afferenzen* spielen im Vergleich zu Moos- und Kletterfasern nur eine untergeordnete Rolle. Sie stellen die Projektion aus Kernen der *Formatio reticularis* dar, genauer dem serotoninerger Raphe- Kern und dem *Locus coeruleus*, in dem sich Noradrenalin als Transmittersubstanz findet (Ito, 1984). Der Einfluß dieses Systems ist diffus und noch weitestgehend ungeklärt.

1.1.3 Funktionen des Kleinhirns

Anhand von Läsionsstudien wurde dem Kleinhirn bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts eine Bedeutung für die Koordination von Bewegungen zugesprochen (Flourens, 1842). Gemäß Eccles (1967) arbeitet das Kleinhirn wie ein analoger Computer, der eine komplexe Erregungseingabe automatisch in einen neuen Code transformiert. Die präzise Anordnung der Neuronentypen, so Eccles, mache das Kleinhirn ideal für die Speicherung von Informationen und den Prozeß des Lernens. Diese Idee wurde von den Mathematikern Marr (1969) und Albus (1971) zu Theorien über die motorische Lernfähigkeit des Kleinhirns weiterentwickelt. Beide nahmen an, daß die Stärke einer Synapse zwischen Parallelfaser und Purkinjezelle genau dann modifiziert wird, wenn diese aktiv ist und die Purkinjezelle gleichzeitig durch die zugehörige Kletterfaser erregt wird. Marr deutete dabei das Netzwerk der Kleinhirnrinde als Perzeptron. Trotz des großen Erfolgs dieser Theorie blieben wichtige Fragen unbeantwortet, vor allem solche nach den zeitlichen Aspekten der neuronalen Informationsverarbeitung. Die klare orthogonale Anordnung von Parallel- und Kletterfasern zu den Dendritenfächern der Purkinjezellen veranlaßte Braitenberg in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts dazu, das Kleinhirn als Zeitdetektor, der Zeitintervalle misst, neu zu definieren. Die Purkinjezellen messen in diesem Sinne die Zeitintervalle zwischen den Aktivitätsimpulsen der Parallelfasern (Braitenberg, 1967). Der Verlust dieser elementaren Leistung könnte erklären, warum bei Kleinhirnerkrankungen

Wahrnehmung, Handeln und Fühlen zwar noch möglich sind, aber an Präzision und Koordination verlieren. Nach Ito et al. (1990) hat das Kleinhirn darüber hinaus eine Schlüsselrolle im impliziten Lernen. Trainierte, automatisierte Bewegungsabläufe, für die kein Nachdenken mehr erforderlich ist, würden im Kleinhirn gespeichert. Dies werde beispielsweise bei der Koordination der Gesichtsmuskulatur beim Sprechen oder der Bewegung der Finger beim Klavierspielen unentbehrlich. Imamizu et al. (2000) konnten in ihrer Studie eine fehlerbezogene Aktivierung des Cerebellum in früheren motorischen Lernstadien entdecken sowie eine Aktivierung in späteren Lernstadien, die nicht auf der Detektion von Fehlern basieren konnte (weil diese nicht mehr vorhanden waren), und die sie einer internen Repräsentation von Bewegungen zuschrieben. Vermutlich ist das Cerebellum so lange aktiv, bis die unterschiedlichen Möglichkeiten einer zu planenden Bewegungen ausreichend eingeschränkt sind und es nicht mehr notwendig ist, die Bewegung gezielt zu überwachen. Das Kleinhirn spielt auch eine entscheidende Rolle für die Adaptation sakkadischer Augenbewegungen, glatter Augenfolgebewegungen und für die Konditionierung des Blinkreflexes (Ito, 1984; Thier et al., 2000). Neben der unbewussten Steuerung der Motorik, der sensomotorischen Integration und der Zeitanpassung motorischer Reaktionen kann das Kleinhirn aber auch vegetative Funktionen beeinflussen, vermutlich über Projektionen in die vegetativen Zentren der *Formatio reticularis* und in den Hypothalamus (Ito, 1984; Voogd et al., 1981). Die Beteiligung des Cerebellum an kognitiven Funktionen war lange umstritten. Obwohl Ivry (1997) eine Beteiligung des Cerebellum an kognitiven Prozessen in Frage stellte, existieren inzwischen mehrere Studien, insbesondere von Middleton und Strick (2000), die die kognitiven Funktionen des Cerebellum anatomisch und physiologisch genau beschreiben. Der Output des Cerebellum über den Nucleus dentatus zeigt eine topische Organisation. Der laterale Teil des Kernes projiziert Informationen extern gesteuerter Bewegungen zum ventralen prämotorischen Areal und ist beim motorischen Lernen entscheidend beteiligt. Der dorsale Nucleus dentatus und der Nucleus interpositus projizieren über den ventrolateralen Thalamus zum primärmotorischen Areal und wurden mit der Ausführung von Bewegungen

assoziiert (Middleton und Strick 2000). Zusätzlich hat der Nucleus dentatus für das Wiederfinden bei der Auswahl erlernter Sequenzen eine wesentliche Bedeutung (Hikosaka 2002). Hinsichtlich des motorischen Lernens wurden Unterschiede zwischen der Funktionsweise der Basalganglien und des Cerebellum beschrieben. Im Gegensatz zu den Basalganglien verarbeitet das Cerebellum sensorisches Feedback, um das Ergebnis der passiven oder aktiven Bewegung zu überwachen (Jueptner und Weiller, 1998).

1.2 Die Kleinhirnerne der Ratte

1.2.1 Bedeutung der Kleinhirnerne für die Funktion des Kleinhirns

Obwohl Informationen aus dem Kleinhirncortex nur unter Vermittlung der Kleinhirnerne die nachgeschalteten Zentren des Hirnstammes, des Mittelhirns und des Thalamus erreichen, wurde ihre Bedeutung lange unterschätzt. Läsionsstudien im Cerebellum verdeutlichen jedoch die Fähigkeit der Kerneurone, funktionelle Defizite zu kompensieren: während beispielsweise Läsionen des Kleinhirncortex nur vorübergehend zu Beeinträchtigungen des konditionierten Lidschlagreflexes führen, ziehen Läsionen der Kerne einen permanenten Ausfall des Reflexes nach sich (McCormick et al, 1984). Die besondere Rolle der Kleinhirnerne bei der Aufrechterhaltung der Funktionalität des Gehirns wird auch an Mutationsstudien deutlich. Trotz Degeneration des Kleinhirncortex verfügen Mausmutanten mit intakten Kleinhirnernen über normales motorisches Lernen (Lalonde, 1994). Auf zwei besondere Mutationen, die Lurcher- und PCD- Mausmutante, werde ich zu einem späteren Zeitpunkt näher eingehen.

1.2.2 Makroskopische Anatomie der Kleinhirnerne

Die Kleinhirnerne der Ratte werden nach Weidenreich (1899) je Hemisphäre in zwei miteinander verbundene Gruppen unterteilt.

Die caudal liegende Gruppe besteht aus Nucleus medialis und Nucleus interpositus posterior, die rostrale Gruppe aus Nucleus interpositus anterior und Nucleus lateralis. Beide Gruppen werden durch myelinisierte Fasern getrennt, die genauen Grenzen sind innerhalb einer Gruppe jedoch nur schwer zu identifizieren. Beim Menschen werden der größte und am weitesten lateral gelegene Nucleus dentatus, der Nucleus emboliformis, Nucleus globosus und der Nucleus fastigii unterschieden. Als phylogenetisch ältester Kern liegt dieser in der Mitte des Marklagers des Vermis (Kandel, 1995).

1.2.3 Mikroskopische Anatomie der Kleinhirnkerne

Während die afferenten und efferenten Verschaltungen der Kleinhirnkerne bekannt sind, ist die Konnektivität der Kleinhirnkernneurone untereinander bisher weitestgehend unerforscht. Eine genauere Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kleinhirnkernneurone ist damit grundlegend für ein tieferes Verständnis des cerebellären Systems. Die Verknüpfung dieser Neurone in ihrer Gesamtheit verspricht eine privilegierte Rolle dieser Zellen in der Funktion des Kleinhirns. Ihre Axone bilden den Hauptausgang des Kleinhirns und projizieren zu Rückenmark, Hirnstamm und Frontalhirn. Im Gegenzug sind sie Hauptziel der Purkinjezellaxone, die ihrerseits das einzige Ausgangssystem des cerebellären Cortex darstellen (Batini et al., 1992, Voogd, 2003). Die Kleinhirnkerne sind jedoch alles andere als eine reine Durchgangsstation. Vielmehr bestimmt das synaptische Geschehen innerhalb der Kerne wesentlich die Kleinhirnfunktion. Die Kleinhirnkernneurone werden im Wesentlichen über den exzitatorischen Eingang von Kollateralen der cerebellären Afferenzen (Moos- und Kletterfasern) sowie über inhibitorische Impulse der Purkinjezellen gesteuert, die durch die Aktivierung von Kletter- und Moosfasern generiert werden. Daher führt jeder Impuls, der das Kleinhirn erreicht, zu einer direkt erregenden und verzögert hemmenden Beeinflussung der Kerne (Voogd, 2003). Die Kernneurone erhalten über die Kollateralen eine Direktkopie der Information, die dem Kleinhirncortex zugeleitet wird, und über die Axone der Purkinjezellen eine Kopie der in der Kleinhirnrinde bearbeiteten

Information. Das resultierende Aktivitätsmuster der Kernneurone reflektiert damit die Summe der neuronalen Verrechnungen aller Eingänge des cerebellären Systems, welches anschließend in unterschiedlichste Motorprogramme umgesetzt wird (Middleton et al., 1997). Die Ausgangsinformation des Kleinhirns entsteht als Ergebnis der synaptischen Interaktionen in den Kleinhirnkernen und durch die elektrischen Membraneigenschaften der Neurone selbst (Jahnsen et al., 1986). Die intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften der Kleinhirnkernneurone wurden anhand von intrazellulären Ableitungen in einer Reihe von Studien an unterschiedlichen Geweben untersucht, einschließlich Untersuchungen an Hirnschnitten des Kleinhirns (Aizenman et al., 1999; Gardette et al., 1985b; Jahnsen 1986a,b) und organotypischen Kulturen (Mouginot und Gähwiler 1995; Muri und Knöpfel 1994; Sastry et al., 1997). Die Zellen der Kleinhirnkernne sind eine heterogene Gruppe, bestehend aus großen und kleinen Projektionsneuronen sowie lokalen Interneuronen. Ihre anatomischen Eigenschaften wurden in früheren Studien ausführlich beschrieben. Die großen exzitatorischen Projektionsneurone besitzen fusiforme bzw. multipolare Somata mit Durchmessern von 15 - 35 μm , außerdem 2 - 5 primäre Dendriten. Diese können entweder dornig oder glatt sein (Chan- Palay 1977; Voogd, 1996). Diese Neurone sind immunoreaktiv auf Glutamat (Batini et al., 1992) und bilden den Hauptausgang der Kleinhirnkernne. Die Axone dieser Zellen ziehen zu den Motorzentren des Hirnstammes, des Mesencephalons und zum Thalamus (Teune et al., 1995). Über Verbindungen mit den vestibulären Kernen können sie Einfluß nehmen auf die vestibuläre Informations-verarbeitung. Die mittelgroßen GABAergen Projektionsneurone innervieren vorwiegend die inferiore Olive, (93%; De Zeeuw et al., 1989) einige dieser Zellen entsenden jedoch auch Projektionen zum cerebellären Cortex oder zur Brücke (Batini et al., 1992). Auch diese Neurone haben fusiforme oder multipolare Somata mit mittelgroßen bis kleinen Durchmessern von 5 – 20 μm . (Aizenman und Linden, 2003). Die lokalen inhibitorischen Neurone sind meist mittelgroß bis klein mit einem Durchmesser von 5 - 15 μm und gebrauchen GABA und/oder Glycin als Neurotransmitter (Batini 1992, Chen und Hillman, 1993). Eine eindeutige Identifizierung der Neurone zu verschiedenen Klassen

nur anhand ihrer Somagrößen ist nicht möglich, da diese teilweise überlappen. Dennoch lässt sich festhalten, dass es sich bei den glutamatergen Neuronen eher um Zellen mit großen Somata und großen Dendritenbäumen handelt (Chan-Palay, 1977), während GABA- und glycinerge Neurone eher kleinere Somata besitzen. Während die glutamatergen und GABAergen Projektionsneurone in großer Zahl vorkommen (Batini et al., 1992), treten die glycinergen Neurone mit der geringsten Frequenz auf (Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1997). Obwohl bei einem Großteil der glycinergen Neurone in den Kleinhirnkernen (50 - 70%) eine GABAerge Kolokalisation beschrieben wurde (Chen und Hillman, 1993), konnte bei keinem dieser Neurone eine Projektion zur inferioren Olive nachgewiesen werden (De Zeeuw et al., 1994). Weiterhin wurde gezeigt, dass zumindest ein Teil der glycinergen synaptischen Boutons von diesen Neuronen selbst gebildet werden. Schon Chan-Palay beschrieb 1977 Neurone, deren Axonterminalien ausschließlich in den Kleinhirnkernen selbst lagen. Es kann daher vermutet werden, daß es sich bei den Zellen mit den kleinsten Somata, die bisher in den Kleinhirnkernen gefunden wurden, um lokale Interneurone handelt (Teune et al., 1998). Beide Projektionsneurontypen sowie die Interneurone sind in den Kleinhirnkernen ohne Ortspräferenz lokalisiert (Teune et al., 1998, Chen und Hillman, 1993).

1.3. Inhibitorische Informationsübertragung

1.3.1 Neurophysiologische Grundlagen

Die Funktionalität des Gehirns resultiert aus einer fein abgestimmten Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Prozessen innerhalb des neuronalen Netzwerkes. Die Informationsübertragung innerhalb eines Neurons erfolgt dabei durch Aktionspotentiale, welche auf Potentialveränderungen der Nervenzellmembran beruhen. Die Übertragung der Aktionspotentiale von Neuron zu Neuron geschieht entweder durch elektrische oder, weit häufiger, durch chemische Synapsen. Chemische Synapsen benutzen einen Botenstoff (Neurotransmitter), der indirekt und unidirektional die Signalübermittlung

übernimmt: erreicht ein Aktionspotential das präsynaptische Ende eines Neurons (Bouton), wird der Neurotransmitter freigesetzt und diffundiert über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran. Über - für den sezernierten Neurotransmitter spezifische - Rezeptoren der Postsynapse ändert sich die Permeabilität der postsynaptischen Membran für bestimmte Ionen und damit das Membranpotential. Man unterscheidet exzitatorische (erregende) und inhibitorische (hemmende) Neurotransmittersysteme. Nach Loewi (1920) stuft man auch heute noch eine Substanz erst dann als Neurotransmitter ein, wenn sie die folgenden Kriterien erfüllt: (1) Sie muß präsynaptisch in einem Neuron synthetisiert werden. (2) Nach Aktivierung des Neurons wird sie in Abhängigkeit vom Calciumeinstrom freigesetzt und ruft eine bestimmte Wirkung an der postsynaptischen Zelle hervor. (3) Es sollte spezifische Mechanismen zur Entfernung der Substanz aus dem synaptischen Spalt geben. (4) Die Substanz und ihre Agonisten lösen postsynaptisch ein identisches Potential aus. (5) Die Wirkung der Agonisten läßt sich durch Antagonisten in gleichem Sinne unterdrücken wie das physiologische Signal.

Die Bindung eines exzitatorischen (z.B. Glutamat) oder inhibitorischen Neurotransmitters (z.B. Glycin) an seinen spezifischen Rezeptor bewirkt an der postsynaptischen Membran ein entsprechendes exzitatorisches oder inhibitorisches postsynaptisches Potential (EPSP; IPSP), d.h. eine Depolarisierung bzw. Hyperpolarisierung der Zellmembran. Etwa ein Drittel aller Synapsen im Gehirn und Rückenmark von Vertebraten ist inhibitorisch. Im Kleinhirn ist die Inhibition der bevorzugte Übertragungsmodus und beeinflusst die Gehirnfunktion auf vielfältige Weise.

1.3.2 Bedeutung der Inhibition in den Kleinhirnkernen

Die Kleinhirnkernneurone werden über die direkte GABAerge Purkinjezellprojektion des darüberliegenden cerebellären Cortex inhibiert. Mit ca. 75% bilden die Purkinjezelleingänge die häufigste Synapse in den Kleinhirnkernen (De Zeeuw and Berrebi 1995; Teune et al., 1998). Zusätzlich werden die Neurone, wie oben beschrieben, durch lokale GABA- und glycinerge

Interneurone inhibiert. Die Kleinhirnkerne gehören damit zu den Gebieten mit dem höchsten Anteil inhibitorischer Innervation im Gehirn von Säugetieren (Bäurle et al., 1997), ihre Erregungsschwelle ist demnach sehr hoch (Ito, 1984). Einzelne Purkinjezellen bilden sowohl mit glutamatergen als auch mit GABAergen Projektionsneuronen Synapsen aus (De Zeeuw und Berrebi, 1995, Teune et al., 1998), das Verhältnis der Purkinjezellen zu Neuronen der Kleinhirnkerne wurde auf 10:1 geschätzt (Chan- Palay, 1977). Beide Zelltypen werden demnach von derselben elektrophysiologischen Aktivität beeinflusst. Eine kortikale Inhibition kann somit einerseits zu einer Aktivierung prämotorischer Zentren und andererseits zu einer Inhibition der inferioren Olive führen (Teune et al., 1998, Horn et al., 1996). Die mögliche zusätzliche Interaktion der Projektionsneurone mit anderen inhibitorischen Einheiten wie z.B. glycinergen oder gemischt GABAerg/glycinergen Interneuronen (Chen und Hillman, 1993; De Zeeuw und Berrebi, 1995) wurde in Anbetracht der geringen möglichen Zahl inhibitorischer Interneurone und der oben beschriebenen inhibitorischen Purkinjezellprojektion lange angezweifelt. Die besondere Bedeutung weiterer inhibitorischer Systeme über die Purkinjezellen hinaus wird jedoch an Untersuchungen mit cerebellären Mutationen, die Störungen der inhibitorischen Purkinjezellprojektion aufweisen, besonders deutlich. Vor diesem Hintergrund ist der Nachweis inhibitorischer Interneurone und ihre elektrophysiologische Charakterisierung von entscheidender Bedeutung für ein besseres Verständnis der Informationsvermittlung zum und vom Kleinhirn.

1.3.2.1 Die *lurcher*- Mutante

Der *lurcher*- Mutante (Gensymbol *Lc/+*) liegt eine 1954 spontan aufgetretene Punktmutation auf Chromosom 6 zugrunde (Norman et al., 1991). Das betroffene Gen codiert für einen ionotropen Glutamatrezeptor, dessen Fehlfunktion zu einem Ioneneinstrom in die Purkinjezellen führt (Zuo et al., 1997). Der Erbgang ist autosomal semi- dominant, homozygote Tiere sind aufgrund eines massiven Neuronenverlustes diencephaler und Hirnstammneurone nicht überlebensfähig (Cheng und Heintz, 1997). Die klinischen Veränderungen, die die Tiere zeigen, ähneln den menschlichen Symptomen

einer cerebellären Ataxie (z.B. SCA Typ 6), mit Störung der Koordination und ruckartigem Bewegungsmuster (Zuo et al., 1997; Caddy und Biscoe, 1975). Die Lurcher- Mutante kann somit als Tiermodell für das Studium der physiologischen Konsequenzen des Kleinhirncortexverlustes dienen. Primäres Ziel des Gendefektes der Lurchermutante sind die Purkinjezellen, die in einem Ausmaß von bis zu 97% einem vermutlich apoptosevermittelten Zelltod unterliegen (Caddy und Biscoe, 1975; Selimi et al., 2000, Wüllner et al., 1995). Erst sekundär kommt es zur transsynaptischen Degeneration von bis zu 90% der Körnerzellen und 75% der Neurone der unteren Olive (Caddy und Biscoe, 1979). Wie oben gezeigt stellen die GABAergen Purkinjezellaxone die Hauptafferenz der Kleinhirnkernneurone dar (De Zeeuw et al., 1995). Trotz des Ausfalles dieser Projektion kommt es jedoch nur zu einer geringen anterograden transneuronalen Degeneration der Kernneurone von etwa 20 - 30% (Heckroth, 1994a) und einer milden ataktischen Symptomatik. Sogar sensomotorisches Lernen kann bis zu einem gewissen Grade erhalten bleiben (Lalonde et al., 1996). Unter zusätzlicher Läsion der Kleinhirnkernneurone kommt es zu einer Verstärkung der klinischen Symptomatik, was auf eine kompensatorische Funktion der Kleinhirnkernneurone schließen lässt (Caston et al., 1995, Linnemann et al., 2004). In der Lurchermutante unterliegen GABAerge und glycinerge Boutons einer in Anbetracht des massiven Ausfalles der inhibitorischen Purkinjezellprojektion nur milden Reduktion von jeweils 30% (Sultan et al., 2002). Dies deutet auf einen kompensatorischen Anstieg von GABAergen Synapsen hin, die nicht von Purkinjezellen ausgehen. Die wahrscheinlichste Quelle dieser Synapsen sind die Neurone, die eine Kolokalisation von GABA und Glycin aufweisen. Die Anzahl dieser Zellen stieg um 40% an, während sich die Neuronenzahl derer, die nur einen der inhibitorischen Transmitter exprimierten, jeweils um ca. 40% verringerte (Sultan et al., 2002). Da das Verhältnis der GABA und Glycin kolokalisierenden Neurone zur Gesamtheit aller GABAergen Neuronen erhöht ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Neurone die Quelle der GABAergen und glycinergen Boutons darstellen, die in der Lurcher Mutante gefunden wurden. Die Größe dieser synaptischen Boutons nimmt in der Mutante sowohl für GABA

als auch für Glycin zu (Sultan et al., 2002). Da keine glycinerge Projektion zur inferioren Olive bekannt ist (De Zeeuw und Berrebi, 1995), ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei den Neuronen, die GABA und Glycin kolokalisieren, um Projektionsneurone handelt. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Neuronen um Interneurone handelt (Chen und Hillman 1993, Czubyko et al 2001). Auch die Morphologie dieser Zellen deutet in diese Richtung: die Neurone, die GABA und Glycin kolokalisieren, sind vorwiegend Neurone mit kleinem Somadurchmesser (Sultan et al., 2002). Die kompensatorischen Mechanismen, mit denen lokale inhibitorische Interneurone dem Verlust der Purkinjezellinhibition entgegenwirken könnten, sind noch nicht vollständig geklärt. Elektrophysiologische Studien belegen jedoch den Anstieg inhibitorischer Leitfähigkeiten in den Kleinhirnkernen der Lurchermutante im Sinne eines adaptiven, kompensatorischen Prozesses (Linnemann et al., 2004). Der größere Umfang der inhibitorischen Boutons in der Lurchermutante könnte auf einen vergrößerten vesikulären Speicherpool der Präsynapse hindeuten, was zu einem quantitativen Anstieg der Transmitterausschüttung und damit zu einer erhöhten synaptischen Effektivität führen könnte (Sultan et al., 2002). In Anlehnung an Studien von Charpier et al. (1995) und Gubellini et al. (2001) könnte auch die erhöhte Rekrutierung von zuvor nicht - funktionalen Synapsen in aktivitätsabhängiger Weise zu einem Anstieg der synaptischen Inhibition führen.

1.3.2.2 Die *pcd*- Mutante

Auch bei der PCD- Mutante kommt es zu einer nahezu vollständigen primären Degeneration von Purkinjezellen (>99%, Mullen et al, 1976, Green 1981) und einer sekundären Degeneration einer großen Zahl von Körnerzellen (Triarhou et al, 1987) und Neuronen der unteren Olive (Triarhou et al, 1987). Die Neurone der Kleinhirnerne nehmen um 21% ab, ihr Volumen sinkt um etwa 50% (Bäurle et al, 1997). Die massiven makro- und mikroskopischen Befunde im Kleinhirn korrelieren auch im Zusammenhang mit dieser Mutante nicht mit der

vergleichsweise milden cerebellären Symptomatik, so dass angenommen wird, dass auch hier Kompensationsmechanismen am Werk sind (Bäurle et al, 1997). Im Gegensatz zur oben vorgestellten Lurcher- Mutante lässt sich jedoch kein Anstieg der GABAergen Inhibition messen, es kommt vielmehr nur zu einem signifikanten Anstieg glycinerner Somata um 70.5% und einer Vergrößerung glycinerner Boutons um das Doppelte (Bäurle et al., 1997). Dies könnte bedeuten, dass in diesem Falle Glycin als Hauptakteur die Funktionalität des Kleinhirns aufrechterhält (Bäurle et al, 1997).

Zusammenfassend verweisen die aufgeführten Studien zu cerebellären Mausmutanten auf eine besondere Rolle inhibitorischer Mechanismen in den Kleinhirnkernen. Insbesondere lokalen inhibitorischen Interneuronen könnte eine besondere Rolle in der Kompensation des Verlustes der Purkinjezellprojektion zukommen. Vieles spricht dafür, daß insbesondere Glycin eine wesentliche Rolle bei der Reorganisation der intranuklearen Inhibition in den Kleinhirnkernen spielt. Hierbei ist die Untersuchung der Frage, ob Glycin hierbei tatsächlich als Neurotransmitter fungiert oder nur eine metabolische Funktion innehat von besonderer Bedeutung. Die mögliche Rolle von Glycin als Neurotransmitter in den Kleinhirnkernen ist vor dem Hintergrund der Ergebnisse verschiedener Studien fraglich und Gegenstand der folgenden Abschnitte.

1.3.3 Glycinerge Neurotransmission in den Kleinhirnkernen

1.3.3.1 Grundlagen

Glycin wird aus Serin synthetisiert und, ähnlich wie GABA, über aktive Transporter (GLYT- 1, GLYT- 2) aus dem synaptischen Spalt entfernt. Der Glycinrezeptor (GlyR) ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal, der aus zwei homologen Untereinheiten (α und β) besteht, die sich zu einem pentameren Proteinkomplex zusammenlagern. Funktionale Glycinrezeptoren können entweder homomer aus fünf α - Untereinheiten oder heteromer aus drei α und zwei β - Untereinheiten aufgebaut sein. Darüber hinaus liegt die α - Untereinheit

in verschiedenen Isoformen ($\alpha 1 - \alpha 3$) vor (Takahashi et al., 1992; Kaneda et al., 1995; Flint et al., 1998; Ye, 2000). $\alpha 2$ - GlyR konnten noch vor der Ausbildung funktionaler Synapsen im sich entwickelnden Gehirn nachgewiesen werden (Malosio et al., 1991). Während homomer aufgebaute GlyR vornehmlich an extrasynaptischer Stelle lokalisiert sind, sind heteromere α/β - GlyR eher postsynaptisch zu finden (Lynch, 2004). Die Bindung des Agonisten führt zum Ausstrom von Chloridionen (Legendre, Review 2001), was ab dem Umkehrpotential von > -70 mV die Membran hyperpolarisiert. Glycinrezeptoren binden das Krampfgift Strychnin, das eine sehr hohe Affinität für den Rezeptor besitzt und den natürlichen Transmitter aus seiner Bindungsstelle verdrängt. In der Großhirnrinde agiert Glycin als Koaktivator der NMDA- Glutamatrezeptoren und ist somit an der exzitatorischen Erregungsübertragung beteiligt. Die Effizienz der inhibitorischen Erregungsübertragung hängt entscheidend von der genauen Gegenüberstellung und funktionellen Anpassung der prä- und postsynaptischen Nervenzellmembranen ab. Synaptische Zielfindung und Aggregation der postsynaptischen Rezeptoren wird über die Interaktion der Rezeptoreinheiten mit dem Zytoskelett vermittelt. Sowohl für die Verankerung des GABA_A- als auch des Glycinrezeptors ist Gephyrin (griech. für „Brücke“) als Membranprotein essentiell, wodurch die Möglichkeit einer Kolokalisierung mit dem GABA_A- Rezeptor in inhibitorischen Synapsen besteht.

1.3.3.2 Glycin als Neurotransmitter in den Kleinhirnkernen ?

Immunohistochemische Daten belegen das Vorhandensein glycinerner Neurone in allen Kleinhirnkernen, vorzugsweise in den kleinen Zellen (Chen und Hillman, 1993; Berrebi und De Zeeuw, 1995; Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1997; Sultan et al., 2002). Das Vorhandensein von Glycin in den Neuronen der Kleinhirnkern bedeutet, für sich betrachtet, jedoch nicht unbedingt, dass es hier auch als Neurotransmitter fungiert. Nach Werman und Aprison (1965) könnte Glycin auch metabolische Funktionen übernehmen. Anatomische Studien zeigen jedoch, dass glycinerge oder gemischt glycinerg/GABAerge Endigungen ausschließlich große, vermutlich glutamaterge

Kleinhirnkernneurone kontaktieren, die den Glycinrezeptor exprimieren (Chen und Hillman, 1993; Berrebi und De Zeeuw, 1995; Bährle und Grüsser-Cornehls, 1997; Sultan et al., 2002). Die enge Korrelation zwischen der Verteilung von Glycin und Glycinrezeptoren lässt vermuten, dass Glycin in den Kleinhirnkernen tatsächlich als Neurotransmitter fungiert. Der Nachweis des Verankerungsproteins Gephyrin sowie für den Glycintransporter GLYT-2 codierender mRNA weist ebenfalls in diese Richtung (Garin und Escher, 2000; Garin et al., 2002; Luque et al., 1995). Darüber hinaus zeigten in situ-Hybridisierungsstudien, dass Transkripte für die β und $\alpha 1$ -Untereinheiten in ausgereiften, nukleären Zellen exprimiert werden (Fujita et al., 1991; Sato et al., 1991; Malosio et al., 1992). Zusätzlich zu diesen anatomischen Daten zeigte eine kürzlich erschienene Studie von Kawa et al. (2003) mittels elektrophysiologischer Methoden, dass glycinerge Inhibition in neonatalen Kleinhirnkernneuronen stattfindet. Es ist nicht bekannt, ob diese Synapsen im erwachsenen Tier immer noch vorhanden sind und, falls dies der Fall sein sollte, welche Veränderungen während der funktionalen Ausreifung auftreten.

Die besondere Rolle der glycinergen Inhibition in den Kleinhirnkernen, die mögliche kompensatorische Funktion dieser inhibitorischen Synapsen und der noch ausstehende Nachweis glycinergener Transmission in Kleinhirnkernneuronen unterschiedlichen Alters macht eine genauere Untersuchung der glycinergen Übertragung in Kleinhirnkernneuronen unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Alters besonders interessant.

1.4 Ziel dieser Studie

Aus den oben aufgeführten Studien und Überlegungen ergeben sich eine Reihe von Fragestellungen. Kleinhirnkernneurone sind das primäre Ziel von Purkinjezellen und die wichtigste Ausgangsstruktur des Cerebellum. Es liegt auf der Hand, dass das synaptische Geschehen innerhalb der Kerne wesentlich die Kleinhirnfunktion mitbestimmt. Die Charakterisierung der Kleinhirnkernneurone bezüglich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und Transmittersysteme ist demnach grundlegend für das Verständnis der Funktionsweise des

cerebellären Systems. Bisher sind die elektrophysiologischen Eigenschaften und das Zusammenspiel unterschiedlicher Kleinhirnkernneurone untereinander noch unklar. Auch unklar ist, ob die morphologischen Unterschiede der Kleinhirnkernneurone, die bis heute festgestellt wurden, ihre Entsprechung in unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften finden. Anatomische Daten verweisen auf das Vorhandensein dreier Neuronenpopulationen in den Kleinhirnkernen: große glutamaterge Projektionsneurone, mittelgroße GABAerge Projektionsneurone und letztlich kleine lokale Interneurone, die glycinerg sind oder GABA und Glycin kolokalisieren (Voogd et al., 1996; Sultan et al., 2002). Die Kleinhirnkernneurone sind mittels elektrophysiologischer Methoden nur schwer abzuleiten und insbesondere die kleinsten Zellen, bei denen es sich möglicherweise um Interneurone handelt, werden *in vitro* sehr leicht durch die Ableitelektrode zerstört. Da in früheren Studien von Kleinhirnkernneuronen (Gardette et al., 1985b; Jahnsen, 1986a,b; Aizenman und Linden, 1999; Llinas und Mühlethaler, 1988b) vorwiegend konventionelle Mikroelektroden benutzt wurden, die ohne visuelle Kontrolle in das Hirnschnittpräparat eingebracht wurden, war es unmöglich, gezielt von Neuronen unterschiedlicher Morphologie abzuleiten. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Czubayko et al. (2001) verwendete die Patch-Clamp Technik in der „Ganzzell-Konfiguration“ in Verbindung mit einer Visualisierung der Zellen mittels Infrarot-Videomikroskopie. Dies machte erstmalig die Untersuchung der elektrophysiologischen Membraneigenschaften von Neuronen auch kleineren Somadurchmessers möglich. Die Autoren charakterisierten anhand elektrophysiologischer und anatomischer Eigenschaften zwei unterschiedliche Neuronengruppen in den Kleinhirnkernen: dies waren zum einen Neurone mit mittelgroßem bis großem Somadurchmesser, die Plateaupotentiale entluden und andere depolarisierende Potentiale zeigten (sog. „Typ I“-Neurone) und zum anderen Neurone mit kleinem Somadurchmesser, die diese Potentiale nicht zeigten (sog. „Typ II“-Neurone; Czubayko et al., 2001). Ein vergleichbares Ergebnis findet sich bei Aizenman und Linden (2003). Die Autoren beschrieben Neurone großen Somadurchmessers mit einem ähnlichen elektrophysiologischen Profil wie die

von Czubayko et al. vorgestellten Typ I- Neurone. Bei diesen Neuronen könnte es sich am ehesten um Projektionsneurone handeln. Ca. 10% der untersuchten Neurone wiesen eine unterschiedliche Charakteristik auf, die den von Czubayko et al. als Typ II bezeichneten Zellen ähnelte, von der Studie um Aizenman jedoch nicht näher bezeichnet wurde. Beide Untersucher vermuteten jedoch einheitlich, dass es sich hierbei um Interneurone handeln könnte. Keine der genannten Studien untersuchte eine weitere Unterteilung der möglichen Projektionsneurone, die Plateaupotentiale entluden. Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen morphologischen Daten sind jedoch zumindest drei unterschiedliche Neuronenpopulationen in den Kleinhirnkernen wahrscheinlich. Eines der Ziele dieser Studie ist demzufolge die Untersuchung der Frage, ob die unterschiedliche Morphologie der Neuronentypen ihre Entsprechung in elektrophysiologischen Unterschieden findet. Eine eindeutige Identifizierung unterschiedlicher Neuronenklassen lässt sich anhand der Somagröße und elektrophysiologischen Eigenschaften jedoch nicht treffen, da die Neurone bezüglich ihrer anatomischen und elektrophysiologischen Parameter teilweise miteinander überlappen (Batini et al., 1993; Chen und Hillman, 1993, Czubayko et al., 2001). Größere Eindeutigkeit wäre nur durch den zusätzlichen Nachweis des verwendeten Neurotransmitters zu erlangen. Kein Versuch wurde bisher unternommen, eine elektrophysiologische Charakterisierung der Kleinhirnkernneurone mit immunhistochemischen Untersuchungen zu verbinden. Die vorliegende Studie versucht nun erstmalig, diese Brücke zu schaffen, und verbindet die elektrophysiologische Charakterisierung der Kleinhirnkernneurone mit ihrer anatomischen Klassifizierung. Hierzu wurden die Zellen während der elektrophysiologischen Ableitung mit einem Farbstoff gefüllt, der später entwickelt wurde und eine Rekonstruktion der Morphologie erlaubte. In einem zweiten Schritt wurden immunhistochemische Methoden angewendet, um das Transmittersystem des abgeleiteten Neurons zu bestimmen.

Die oben aufgeführten Studien zu cerebellären Mausmutanten verweisen auf eine besondere Rolle inhibitorischer Mechanismen in den Kleinhirnkernen. Insbesondere lokale inhibitorische Interneurone, die am ehesten glycinerg oder

gemischt glycinerg/GABAerg sind, könnten in der Reorganisation der intranukleären Inhibition unter Bedingungen geschwächter Purkinjzellafferenz eine besondere Rolle zukommen. In diesem Sinne bilden elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle von Glycin in der inhibitorischen synaptischen Transmission der Kleinhirnerneuronen den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit. Hierbei war die Frage, ob Glycin in den Kleinhirnerneuronen tatsächlich als Neurotransmitter fungiert und welche Eigenschaften diese glycinerge Transmission hat von besonderer Bedeutung. In einer kürzlich veröffentlichten Studie beschreibt Kawa (2003) die glycinerge Inhibition in neonatalen Kleinhirnerneuronen. Unbekannt ist, welchen Veränderungen diese Synapsen während der funktionalen Reifung unterliegen und ob diese Synapsen im erwachsenen Tier überhaupt noch vorhanden sind. Um dieser bisher ungelösten Frage auf den Grund zu gehen, wurden Kleinhirnerneuronen neonataler, jugendlicher und jung-adulter Ratten vom 7. bis 23. postnatalen Tag auf das Vorhandensein glycinergischer Rezeptoren und Synapsen untersucht.

Inhibitorische Neurone sind klinisch von besonderer Bedeutung. Viele psychoaktive Pharmaka verändern die Balance zwischen Exzitation und Inhibition über die Beeinflussung der inhibitorischen Transmission. Die Aufklärung der Mechanismen der inhibitorischen Transmission in den Kleinhirnerneuronen weckt berechtigte Hoffnungen auf ein besseres Verständnis ihrer Rolle bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen und auf die Entwicklung effektiverer und selektiverer Therapiemöglichkeiten dieser Krankheiten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Sowohl elektrophysiologische als auch morphologische Untersuchungen wurden an Hirngewebe von neonatalen, juvenilen und jung-adulten Sprague-Dawley Ratten beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Tiere hatten während der Versuchsdurchführung ein Alter von P7 bis P23. Das Muttertier und 8 neugeborene Tiere wurden unter freiem Zugang zu Wasser und Nahrung zusammen in einem Käfig gehalten bei 12- stündigem Hell-Dunkel-Wechsel. Alle Richtlinien des National Institutes of Health den Tierschutz betreffend wurden eingehalten und von einer Ethik-Kommission überprüft.

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Präparation und Aufbewahrung der Gehirnschnitte

Durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (150mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere in tiefe Narkose versetzt. Die Tiefe der Anästhesie wurde durch Applikation mechanischer Schmerzreize an den hinteren Extremitäten überprüft. Sobald Schmerzfreiheit gegeben war, wurde eine transkardiale Perfusion mit eiskalter modifizierter Nährlösung (ACSF) durchgeführt. Die Modifikation bestand in einem Ersetzen des NaCl durch semimolare Saccharose. Ein passiver Chlorideinstrom, der zu einem Anschwellen der Zelle mit nachfolgender Lyse führen kann, wurde damit unterbunden (Aghajanian und Rasmussen, 1989). Durch Verwendung dieser Lösung konnte die Anzahl lebender Neurone in den Hirnschnitten stark erhöht werden. Die Zusammensetzung wurde aus den Arbeiten von Aghajanian und Rasmussen (1989) entnommen und leicht abgewandelt. Sie bestand aus 125 mM Suc, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃, 0.1 mM CaCl₂ und 20 mM D-Glucose. Die Lösung wurde beständig auf eine Temperatur von 4°C abgekühlt und mit 5% CO₂ und 95% O₂ oxygeniert. Das Carbogen diente

einerseits der Sauerstoffversorgung des Gewebes, andererseits durch den CO₂ Anteil aber auch der Aufrechterhaltung des Hydrogencarbonatpuffersystems zur Regulation des pH-Wertes der Nährlösung (pH=7.4). Die Kühlung sollte eine generelle Reduktion der Stoffwechselaktivität des Gewebes bewirken und damit die durch einen akuten Sauerstoffmangel verursachten toxischen Vorgänge reduzieren. Dies ermöglichte insgesamt eine vorsichtigeren Entnahme des Hirngewebes. Darüber hinaus ermöglicht eine Perfusion mit Blick auf eine spätere morphologische Untersuchung eine Reduktion möglicher Artefakte in Form von angefärbten Erythrozyten in Blutgefäßen, die bei mit Neurobiotin gefärbten Neuronen des öfteren zu beobachten sind. Eine Perfusion vor der Dekapitation scheint die elektrophysiologischen Aktivitäten der Schnitte nicht zu verändern. Der Brustraum wurde vorsichtig eröffnet und das Herz freigelegt. Bei guter Sicht wurde eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und durch einen Schnitt mit der Präparierschere der rechte Vorhof eröffnet. Über die Kanüle floß das mit Carbogen gesättigte Perfusionsmedium mittels Schwerkraft (Höhe des Perfusionsgefäßes ca. 150 cm oberhalb der Präparationsfläche) in den Blutkreislauf des Versuchstieres. Nach ca. 2 Minuten war der Austausch des Blutes mit der Flüssigkeit vollzogen und die Perfusion wurde abgebrochen. Unverzüglich wurde das Tier mit einer Kleintierguillotine dekapitiert. Ausgehend vom Rückenmarkskanal wurde mit einer Präparierschere der dorsale Schädelknochen mit nach rostral gerichteten Schnitten von der Schädelbasis abgetrennt. Im Bereich des Os petrosus war besonders darauf zu achten, die Schnitte möglichst flach zu halten, um ein Einschneiden in die Kleinhirnkerne zu vermeiden. Das Schädeldach wurde nun sehr vorsichtig abgehoben, um einen Zug auf das Kleinhirn zu vermeiden, da dies zu einer starken Herabsetzung der Zahl überlebender Neurone führt. Das nun freiliegende Gehirn wurde mit Hilfe eines scharfen Spatels aus der knöchernen Basis gelöst und in ein Gefäß mit oxygenierter, 4°C kalter Nährlösung überführt. Nach einer Ruhezeit von etwa 2 Minuten wurde das Gehirn auf ein mit eiskalter, modifizierter Nährlösung getränktes Filterpapier gelegt. Der Teil des Cerebellum, der die Kleinhirnkerne enthielt, wurde durch zwei frontale Schnitte, einer rostral auf Höhe des Colliculus, der andere unmittelbar kaudal des Kleinhirns, vom Rest des

Gewebes isoliert. Um ein gleichmäßiges Schneiden des Gewebeblockes zu ermöglichen, wurde der Hirnstamm durch einen Schnitt entlang des vierten Ventrikels entfernt. Anschließend wurden die Kleinhirnhemisphären durch einen sagittalen Schnitt voneinander getrennt. Die Gewebelöcke wurden nun mit der Vermisseite nach unten mit Sekundenkleber auf dem Objekthalter eines Vibratoms (VT100s, Leica, Bensheim, Deutschland) fixiert. Zur Stabilisierung diente ein Block aus 3%-igem Agar, der auf der rostralen Seite angebracht wurde, sowie eine vom hinteren Stützblock wegführende, ebenfalls aus Agar bestehende Rampe (45°). Die Rampe ermöglichte eine parasagittale Schnittrichtung. Während der gesamten Präparation wurde das Hirngewebe mit eiskalter modifizierter Nährlösung beträufelt, um ein Austrocknen zu vermeiden und eine möglichst große Anzahl von Neuronen am Leben zu erhalten. Der Objekthalter mit dem darauf befestigten Gewebelock wurde nun in die mit eiskalter, oxygenierter ACSF gefüllte Kammer des Vibratoms überführt und dort mit Schrauben befestigt. Es wurde darauf geachtet, daß die gesamte Prozedur von Dekapitation bis Platzierung des Halters im Vibratom nicht mehr als 3 bis 4 Minuten umfaßte. Mit Hilfe einer zuvor gründlich gereinigten und scharfen Rasierklinge wurden nun im Vibratom 260 – 320 µm dicke, parasagittale Schnitte durch die Kleinhirnerne angefertigt. Die Präparation wurde mit Erreichen der medianen Kleinhirnerne abgebrochen, da die Überlebensrate in diesem Kerngebiet erfahrungsgemäß sehr niedrig und die optische Durchsicht aufgrund der hohen Dichte an Fasern vergleichsweise schlecht war. Die Schnitte enthielten demnach die lateralen und intermediären Kleinhirnerne. Die Schnittdicke wurde unter Berücksichtigung von Fragestellung (Ableitung der Eigenschaften einzelner Zellen), Sichtbarkeit (unter Berücksichtigung des verwendeten optischen Systems des Setups), Überlebensfähigkeit der Schnitte und dem Erhalt neuronaler Netzwerke gewählt. Die angefertigten Gehirnschnitte wurden bei Raumtemperatur in einem Becherglas auf einem mit modifizierter, Carbogen-gesättigter Nährlösung getränkten Filterpapier aufbewahrt. Nach ca. dreißig Minuten wurde mit Hilfe eines Pumpsystems die modifizierte ACSF durch die Kontroll-Lösung („normale“ ACSF) ersetzt. Der Austausch wurde langsam vollzogen (innerhalb ca. 90 min), um evtl.

auftretenden osmotischen Streß möglichst gering zu halten. Diese Zeitspanne wird von den Neuronen mindestens benötigt, um mögliche Verletzungen der Zellmembran, wie etwa die methodisch bedingte Abtrennung von Dendriten, zu kompensieren. Außerdem wurde während dieser Ruhephase der Zellstoffwechsel auf einem „subphysiologischen“ Niveau stabilisiert. Im Hirnschnitt kann die Versorgung des Gewebes nicht mehr durch ein Kapillarsystem erfolgen, daher besteht v.a. für die in der Tiefe liegenden Neurone die Gefahr einer Minderversorgung. Eine niedrigere Stoffwechselaktivität sollte daher die Überlebenszeit des Gewebes erhöhen. Erst unmittelbar vor Beginn des eigentlichen Experiments wurden die Schnitte in die Ableitkammer überführt. Die Zusammensetzung der Experimentierlösung wurde unter leichten Modifikationen aus einer Arbeit von Edwards et al. (1989) übernommen. Sie bestand im Einzelnen aus 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl, 26 mM NaHCO₃, 2mM CaCl₂ und 20 mM D-Glukose, entsprach damit also der physiologischen Ionenkonzentration der cerebrospinalen Flüssigkeit. Eine hohe Glukosekonzentration steigert nach Erfahrung vieler Gruppen, die sich mit der Patch Clamp- Technik befassen, die Wahrscheinlichkeit, einen Giga-Seal zu erreichen. Die Anfertigung von Hirnschnitten birgt entscheidende Vorteile gegenüber einer intrazellulären Ableitung *in vivo*, v.a. bezüglich der Messung kleiner Neurone mit schmalem Durchmesser. Zum einen sind sie frei von „Pulsationen“, (die eine Ableitung unter *in vivo*-Bedingungen erschweren), was eine stabilere Messung erlaubt, zum anderen muß die Ableitelektrode nur einen kurzen Weg durch das Hirngewebe nehmen, während bei *in vivo*-Präparationen die Gefahr einer Verletzung des Gewebes oder der feinen Elektrodenspitze mit zunehmendem Weg zum Zielgebiet ansteigt. Viele neuronale Prozesse werden während des Schneideprozesses verletzt oder gar vollständig zerstört. Erfahrungsgemäß scheint eine Schnittdicke von 260 bis 320 µm die elektrischen Eigenschaften der beobachteten Neurone jedoch nicht negativ zu beeinflussen oder zu verändern. Diese Feststellung stützt sich auf die Beobachtung, daß sich im Vergleich mit *in vivo*- Präparationen das Ruhemembranpotential oder die Aktionspotentiale kaum unterscheiden (Sugimori et al., 1978).

2.2.2 Versuchsaufbau

Alle elektrophysiologischen Experimente wurden auf einem schwingungsgedämpften, durch einen Faraday-Käfig abgeschirmten Tisch durchgeführt. Durch den Faraday-Käfig wurde der empfindliche Patch-Clamp Vorverstärker von elektromagnetischer Interferenz abgeschirmt. Einzelne Kleinhirnschnitte wurden in die Ableitkammer transferiert, deren Inhalt (ca. 1ml) kontinuierlich mit frischer, Carbogen-gesättigter ACSF ausgetauscht wurde. (Austauschrate: 4.5 ml/min). Mit Hilfe eines mit Angelschnur (0.1 mm) im Abstand von jeweils 1 mm bespannten Metallringes (lichte Höhe 400 µm, Innendurchmesser 1 cm) wurden die Hirnschnitte so in der Kammer fixiert, daß sie vollständig untergetaucht waren. Dieser in der Literatur als „submerged chamber“ bekannte Ableitkammertyp („Eintauchkammer“) gewährleistet die bestmögliche Versorgung des Gewebes mit carbogengesättigter Nährlösung sowie ein gleichmäßiges Ein- und Auswaschen von Pharmaka, sowohl unter- als auch oberhalb der Schnitte. Um den Austausch der den Hirnschnitt umgebenden Flüssigkeit nicht zu behindern, wurde eine 0.5 cm breite Öffnung in den Metallring eingefräst und diese dem Zustrom zugewandt. Eine kontinuierliche Überspülung des Gewebes im Sinne dieses submersions-Verfahrens erfordert ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Ein- und Ausstrom der Flüssigkeit, um eine bestmögliche mechanische Stabilität zu erreichen. Die mechanische Stabilität wird zum einen durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit beeinflusst, zum anderen durch störende Schwingungen, die durch Störfaktoren wie Luftblasen im zu- oder abführenden Schlauchsystem oder durch einen abrupten Übergang von einer Lösung zu nächsten entstehen. Eine Reduktion der Oberflächenspannung wurde durch das netzartige Bespannen des Metallringes erreicht. Luftblasen, die in der Lösung selbst oder beim Wechsel des Mediums entstehen, wurden durch das Einbringen einer Vorkammer („bubble trap“) verhindert. Die Schnitte wurden für maximal sieben Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.3 Visualisierung der Hirnschnitte

Die Ableitkammer, bestehend aus Plexiglas mit eingesetztem Glasboden, befand sich auf dem Gestell eines motorisierten aufrechten Stereomikroskops (Zeiss Axioscope FS, Oberkochen, Deutschland), das fest mit der Grundplatte des Setups verbunden war. Der Ableittisch hatte keinen Kontakt mit dem Mikroskop, sodaß es mit Hilfe eines Mikromanipulators (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) unabhängig in x, y, z- Richtung bewegt werden konnte. Die Hirnschnitte wurden mit einer punktförmigen Lichtquelle durchleuchtet. Die Grenzlinien der einzelnen Kleinhirnerne konnten durch das unterschiedliche Verhältnis von Zellsomata und Fasern, der Struktur und Quantität der Fasern und der Dichte der unregelmäßig verteilten Neurone ausgemacht werden. Einzelne Zellen wurden mit Hilfe eines 40x Wasseremulsions-Objektives (Olympus, Lumplan F1/IR NA 0.8) nach optimaler Ausleuchtung durch das Köhler'sche Verfahren beobachtet. Um einen optimalen Kontrast der ungefärbten Neurone zu erhalten, wurde eine von Dodt entwickelte Infrarot-Videomikroskopie- Technik angewandt (Dodt et al., 1998). Diese Technik ermöglicht eine Darstellung von Neuronen, die sich sogar in tieferen Regionen der Schnitte befinden. Die Dodt- Röhre arbeitet nach dem Prinzip der Schrägbeleuchtung. Unter Zuhilfenahme von verstellbaren Spiegeln wird ein Infrarot- Lichtstrahl schräg auf das Präparat gelenkt, sodaß man die Neurone im Zielgebiet als dreidimensionale Struktur erkennen kann. Als Lichtquelle diente eine Halogenlampe (12 V/ 100 W, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). In den Lichtweg wurde ein Infrarotfilter gebracht, der Wellenlängen unterhalb von 780 nm herausfiltert. Durch die Verwendung von Infrarotlicht wurde die Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe erhöht. Das Bild wurde mit einer infrarotsensitiven CCD- Videokamera (Newvicon C2400-07-C Hamamatsu, Japan) aufgenommen und auf einem Videomonitor dargestellt. Nach optimaler Einstellung von Spiegel und Blende der Dodt- Röhre waren Struktur und Größe der Zellsomata deutlich zu erkennen. Neurone, die sich in einer Tiefe von bis zu etwa 100 µm im Gewebeschnitt befanden, konnten auf diese Weise mit ausreichendem Kontrast dargestellt und abgeleitet werden. Zellen mit sog „Spiegeleikonformation“, die

geschwollen aussahen oder ähnliche Zeichen des Zelltodes aufwiesen, wurden verworfen. Beim Ableiten von Neuronen mit schmalem Soma verwendete ich nur Zellen in tieferen Schichten, um ein Herausziehen der Zelle mit der Elektrode nach Abschluß des Experiments zu vermeiden.

2.2.4 Herstellung der Ganzzellkonfiguration

Alle intrazellulären Ableitungen des Membranpotentials wurden mit Glasmikroelektroden (Borosilikatglas, 1.5 mm Außendurchmesser, 1.3 mm Innendurchmesser; Science Products, Deutschland) durchgeführt. Die Elektroden wurden mit einem Flaming- Brown Mikropipetten- Puller (Modell P-97/PC, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) gezogen und die Spitze mit einer Microforge verengt. Die Serienwiderstände lagen bei 7-20 M Ω und wurden kompensiert. Die Elektrodenlösung setzte sich bei Voltage Clamp-Ableitungen im Einzelnen zusammen aus 130 mM CsCl, 5.6 mM NaCl, 10 mM K-HEPES, 5 mM EGTA, 2 mM K-ATP, 0.3 mM Na-GTP, 0.5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ und 5 mM QX-314. Der pH-Wert wurde mit CsOH auf einen Wert von 7.3 eingestellt. Bei Ableitungen im Current Clamp- Modus wurde CsCl durch K-Glukonat ersetzt und QX-314 wurde weggelassen. Während der Ableitung wurden die Neurone intrazellulär mit Neurobiotin gefärbt. Das Neurobiotin wurde iontophoretisch durch die Ableitelektrode injiziert. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Sprudelsteins aus dem Aquarienbedarf begast. Als indifferente Elektrode diente eine Silberchlorid-Knopfelektrode, die in der Ableitkammer befestigt wurde. Die Indifferenz-elektrode hat zwei Funktionen: zum einen erzeugt sie ein stabiles Referenz-potential, zum anderen dient sie als Ableitungsmöglichkeit für Strom, der z.B. beim Applizieren von Strompulsen ins Gewebe oder durch Interferenz versehentlich an irgendeiner Stelle in die Lösung eintritt. Die Patch-Pipette wurde luftdicht in den Pipettenhalter gespannt und mit Hilfe eines Mikromanipulators in Schritten von 5 bis 10 μ m unter Sichtkontrolle in die Nähe der Oberfläche des Hirnschnittes geführt. Durch einen Schlauch am seitlichen Eingang des Pipettenhalters, der in ein Ventil mit Spritze (1 ml) mündete, konnte der Druck im Pipetteninneren kontrolliert

werden. Zunächst wurde ein Überdruck angelegt, damit aus der Pipette kontinuierlich Flüssigkeit ausströmte. Dies verhindert das Verstopfen der Spitze durch Schmutzpartikel in der Badlösung und hilft dabei, die Membranoberfläche von extrazellulärer Matrix zu reinigen. In unmittelbarer Nähe der Zielzelle wurde der Druck in Abhängigkeit von Neurongröße und Öffnungsdurchmesser der Pipette vermindert, um Verletzungen zu vermeiden. Zellen, die durch zu hohen Druck oder Berührung mit der Pipette verletzt wurden, zeigten oft geringe Seal-Widerstände oder atypische elektrische Verhaltensweisen und wurden verworfen. Unter ständiger visueller Kontrolle wurde nun die Spitze der Pipette vorsichtig der Membran des gewählten Neurons angenähert. Während dieses Vorgangs wurden kurze Stromimpulse (10 - 30 pA) gegeben, um Veränderungen des Elektrodenwiderstandes messen zu können. Hatte sich die Pipette soweit der Zelle angenähert, daß die durch den Überdruck ausströmende Flüssigkeit die Zelloberfläche leicht eindrückte (sog. „dimpling“), wurde der Druck auf ein Minimum reduziert, um mechanische Verletzungen der Membran zu vermeiden. Als Zeichen der Annäherung der Pipettenmündung an die Zelloberfläche erhöhte sich der Pipettenwiderstand leicht. Wurde nun der Überdruck vorsichtig von der Pipette genommen, erhöhte sich der Widerstand oft spontan bis zur Ausbildung eines Seal. In den meisten Fällen wurde durch behutsames Saugen, d.h. durch Anlegen eines leichten Unterdruckes, nachgeholfen. Durch den Unterdruck wurde das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung angesaugt und dadurch ein so enger Kontakt zwischen Glas und Membranoberfläche aufgebaut, daß die Pipettenöffnung elektrisch vollständig von der extra-zellulären Umgebung isoliert wurde und ein Stromfluß nur über die Membran möglich war. Während dieses Vorgangs baut sich ein elektrischer Widerstand in einer Größenordnung von mehreren Gigaohm auf. Dieser Zustand wird als „Gigaseal“ oder auch als „Cell- attached- mode“ bezeichnet. Nach der Seal-bildung wurde der Unterdruck abgelassen, um die Membran zu schonen. Nach dem Erreichen des Gigaseal konnte die Membran unterhalb der Pipette durch erneutes vorsichtiges Ansaugen oder durch die Gabe von Stromstößen durchbrochen werden. Der Durchbruch zum Inneren der Zelle wurde angezeigt durch einen plötzlichen Anstieg der kapazitiven

Ladeströme. Dies ist bedingt durch die Tatsache, daß die große Membranfläche einen geringeren Widerstand als der kleine Patch aufweist, so daß gemäß $dU = dl \times R$ der Offsetstrom zunehmen muß. blieb danach der feste Kontakt am Rand der Elektrode mit dem Neuron erhalten, maß man nun das Potential des Zellinnern und nicht mehr das Potential der Membranaußenseite. Dieser Zustand wird als "Ganzzellkonfiguration" bezeichnet. Um ein sicheres Herstellen der Ganzzellkonfiguration zu gewährleisten, wurde während der gesamten Zeit die Entwicklung des Widerstandes am Oszilloskop verfolgt. Da die Pipette nun elektrischen Zugang zum Inneren der Zelle hatte, repräsentierten nach unten weisende Ausschläge per definitionem Einwärtsströme, nach oben gerichtete Ausschläge Auswärtsströme (z.B. Kationen, die in die Zelle fließen oder Anionen, die nach außen strömen).

2.3 Pharmakologie

Die einzelnen Pharmaka wurden aus Stammlösungen mit ACSF auf die in den Experimenten verwendeten Endkonzentrationen verdünnt und mit Carbogen gesättigt. Der Zufluß erfolgte über separate Reservoirs mit derselben Durchflußrate wie die der Standardnährlösung. Zum Vergleich wurden bei jedem Neuron die entsprechenden Messungen sowohl vor der pharmakologischen Manipulation als auch nach dem Auswaschen der Substanzen vorgenommen. Im einzelnen wurden folgende Substanzen verwendet: Kynurensäure in einer Konzentration von 3 - 4 mM (Sigma) zur Antagonisierung ionotroper Glutamatrezeptoren sowie die GABA-Rezeptorantagonisten Bicucullinmethiodid (25 – 30 μ M, Sigma) oder Gabazin (10 – 30 μ M, Sigma). Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve von Glycin wurden Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) und/oder CdCl₂ (200 μ M) dem Badmedium beigefügt.

2.4 Datenerfassung

Die Ableitungen des Membranpotentials wurden mit einem Axoclamp 2B Verstärker (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) im "current clamp" Modus (Stromklemmenmodus) durchgeführt, der die Möglichkeit zum Brückenabgleich und Kapazitätsneutralisation bot. In diesem Modus wurde der Strom durch die Membran fest vorgegeben und das Potential variabel gelassen. Aus den damit gewonnenen Daten lassen sich, einfacher als im „voltage clamp“ Modus (Spannungsklemmenmodus), Rückschlüsse auf das physiologische Erregungsmuster der Zellen ziehen. Das Ausgangssignal des Verstärkers wurde mit einem Tiefpassfilter mit einer Grenzfrequenz von 10 Hz gefiltert. Anschließend wurde es mit einem A/D- Wandler (CED 1401 plus, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) digitalisiert und auf einem PC abgespeichert. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit einer Abtastrate von 20 kHz, um schnelle Veränderungen des Membranpotentials, wie im Falle von Aktionspotentialen, möglichst hochauflösend zu erfassen. Nach Herstellung der Ganzzellkonfiguration wurde zunächst die Spontanaktivität der Neurone aufgezeichnet. Die passiven und aktiven Membraneigenschaften der Zellen wurden durch Gabe von rechteckigen Strompulsen unterschiedlicher Länge und Stärke untersucht. Die Aufzeichnung der Meßwerte erfolgte mit dem Registrierungsprogramm Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Nach der Ableitung wurde die Pipette vorsichtig zurückgezogen, um eine Verletzung der Zellmembran zu vermeiden und zu verhindern, daß kleine Neurone aus dem Hirnschnitt herausgezogen wurden. Nachdem die Ableitpipette erfolgreich zurückgezogen werden konnte, wurden die Schnitte sofort über Nacht in einer phosphatpufferbasierten Lösung fixiert (5% Glutaraldehyd oder eine Mischung aus Paraformalinaldehyd [PFA], Pikrinsäure und Glutaraldehyd).

2.5 Datenauswertung

Die durch das Registrierungsprogramm Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) aufgenommenen relevanten Meßwerte wurden jeweils zunächst als binäre Datei aus Spike 2 in Minianalysis (Synaptosoft Inc.) exportiert. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Sigmaplot und Statistica. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der students t- Test, für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse („one- way ANOVA“) mit anschließendem post- hoc Test nach Dunn bzw., bei Normalverteilung, nach Tukey, angewandt.

Der scheinbare Eingangswiderstand wurde nach dem Ohmschen Gesetz aus der Division von Potentialamplitude und Stromamplitude berechnet. Die Zeitkonstante wurde zum Zeitpunkt, an dem die Membranpotentialveränderung während der Gabe eines Strompulses 63% des Gleichgewichtswertes erreicht hatte, bestimmt. Das Ruhemembranpotential ergab sich aus dem mittleren Membranpotential, das im Interspikeintervall ohne Injektion eines Stromimpulses gemessen wurde. Als Feuerschwelle wurde das Membranpotential bezeichnet, bei dem die Neurone begannen zu feuern. Die momentane Entladungsrate wurde aus dem Kehrwert des Zeitintervalls zwischen den Spitzen zweier aufeinanderfolgender Aktionspotentiale („Interspike- Intervall“) berechnet. Die Aktionspotentialbreite wurde als Zeitdifferenz bei halb- maximaler Aktionspotentialamplitude definiert. Das Ausmaß der Nachhyperpolarisationen wurde relativ zum Membranpotential vor Beginn des Aktionspotentials gemessen. Als „Sag“ oder Potentialrampe wurde die absolute Amplitude des Membranpotentials (ΔV_m) bezeichnet, die durch einen hyperpolarisierenden Stromimpuls hervorgerufen wurde. Die Rebounddepolarisation wurde als absolute Amplitude des Reboundpotentials nach Abschluß eines hyperpolarisierenden Pulses bestimmt. Die durch diese Depolarisation hervorgerufenen Aktionspotentiale wurden in einem Zeitraum von einer Sekunde nach Abschluß des Pulses gemessen. Die Plausibilität der Ergebnisse wurde durch visuelle Kontrolle der Potentialspuren der Aktionspotentiale überprüft.

2.6 Immunhistochemie

Während der Experimente wurden einige Zellen mit Neurobiotin (4mg/ml, Vector Lab, CA, USA) gefüllt, ein Farbstoff, der während der Ableitung in die Zellen diffundiert. Neurobiotin wurde gewählt, weil es keine meßbaren Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften besitzt (Xi et al., 1996). Am Ende der Messung wurde die Elektrode vorsichtig von der Zelle abgezogen. Der Membranfleck, der sich unterhalb der Elektrode befand und beim Anlegen der Ganzzellaufleitung eröffnet wurde, schließt sich aufgrund der Eigenschaften der Lipid- Doppelmembran spontan und der Farbstoff bleibt in der Zelle. Die Schnitte wurden über Nacht in 5% Glutaraldehyd (in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4) fixiert und am nächsten Tag mehrfach mit frischem 0.1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die Hirnschnitte wurden maximal eine Woche bei 4°C in der Pufferlösung aufbewahrt. Für die immunhistochemische Untersuchung kamen polyklonale Antikörper gegen GABA- Glutaraldehyd (Kaninchen, SFRI), gegen Glycin- Glutaraldehyd (Kaninchen, Chemicon) und gegen Glutamat-Glutaraldehyd (Kaninchen, SFRI) zur Anwendung. Die Hirnschnitte wurden zunächst dehydriert und dann in Epoxidharz (Durcupan) eingebettet. Anschließend wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Leica, Bensheim, Deutschland) 1 µm dicke Schnitte hergestellt. Von jedem Hirnschnitt wurden auf diese Art mehrere Serien von semidünnen Schnitten gewonnen. Jeweils acht der Schnitte wurden in festgelegter Reihenfolge auf jeweils drei Objektträger aufgezogen, ein Objektträger für jeden später verwendeten Antikörper. Auf diese Weise ließ sich das betreffende Neuron durch die Schnittfolgen hindurch verfolgen. Das anschließende Färbeprotokoll basiert mit leichten Modifikationen auf Studien von Romijn et al. (1993). Das Prinzip dieser Färbung besteht darin, die antigene Struktur über drei verschiedene Antikörper mit einer Peroxidase zu verbinden, die letztlich mit einem Chromogen reagiert. Die Schnitte wurden zunächst durch Natriumethanolat vom Einbettungsmedium befreit und anschließend in reinem Alkohol gewaschen, bis der pH- Wert auf neutrale Werte zurückgekehrt war. Dann folgte die Rehydratation der Schnitte.

Der Zugang zum Antigen wurde durch eine 20- minütige Behandlung mit Proteinase K bei 37°C erhöht (Böhringer Mannheim, Deutschland). Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch eine einstündige Präinkubation der Schnitte in Rinderserumalbumin (BSA) und Normalserum verhindert. Die Schnitte wurden nun im primären Antikörper (GABA 1:2000; Glutamat: 1:2000; Glycin: 1:1000, Kaninchen) über 72 Stunden bei 4°C auf Plastikblöcken inkubiert, die eine Austrocknung der Schnitte verhindern. Nach dieser Zeit folgte die Inkubation der Schnitte im zweiten Antikörper (Schwein-anti-Kaninchen, 1:50, DAKO, Dänemark) über eine Stunde bei Raumtemperatur. Durch den zweiten Anti- Kaninchen- Antikörper erfolgt eine spezifische Bindung des Fc- Teils des ersten Kaninchen- Antikörpers. Dadurch wird der erste Teil einer „Brücke“ gebildet, die letztlich das Antigen mit einer Peroxidase koppelt. Vervollständigt wurde diese Brücke durch Bindung eines weiteren Kaninchen-Antikörpers während einer dritten Inkubation über denselben Zeitraum (PAP, Kaninchen, 1:1000; DAKO). Dieser Drittantikörper hatte seinerseits Peroxidase als Chromogen gebunden. Alle Antikörperlösungen enthielten Triton- X, um die Permeation durch die Zellmembran zu ermöglichen. Die anschließende Diaminobenzidinfärbung wurde durch eine Silber- und Goldbehandlung intensiviert (Tecler et al., 1997). Die Schnitte wurden nun erneut in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert, in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckelt (Merck, Darmstadt, Deutschland). Bilder wurden mit einem Laser Konfokal Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit 458- oder 488- Laser angefertigt.

2 ERGEBNISSE

3.1 Membranphysiologie

Im Vergleich zu Ableitungen bei Körpertemperatur ist die Festigkeit der Zellmembran bei Raumtemperatur erhöht. Dieser Umstand führt zu einer vereinfachten Herstellung des Gigaseals, weswegen alle elektrophysiologischen Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Die Durchbrechung der Membran zur Herstellung der Ganzzelleableitung führt unausweichlich zu einer zumindest kurzfristigen Verletzung der Zellmembran, deren Integrität jedoch Grundbedingung ist für die realistische Darstellung des Strommusters einer Zelle. Um einen möglichst einheitlichen Standard zu erzielen, wurden an jede Ableitung eine Reihe verschiedener Kriterien gestellt:

- das Neuron sollte innerhalb weniger Minuten nach der Penetration ein stabiles Ruhemembranpotential aufweisen
- Die Stabilität der Ableitung sollte über mehrere Minuten aufrechterhalten sein
- die Zelle sollte fähig sein, Aktionspotentiale zu generieren, entweder spontan oder als Antwort auf eine Stromapplikation
- die Aktionspotentiale sollten eine Amplitude von mindestens 40 mV aufweisen und mit ihrer Spitze ein Membranpotential von 0 mV überschreiten
- der scheinbare Eingangswiderstand sollte mindestens 0.15 G Ω betragen.

Bei allen zur Datenanalyse herangezogenen Messungen wurden diese Kriterien erreicht oder übertroffen. Insgesamt 48 Neurone wurden in die Datenanalyse eingeschlossen. Einige der abgeleiteten Neurone zeigten zu Beginn des Experiments eine ausreichende Erfüllung der Kriterien aber verschlechterten sich nach einigen Minuten. Diese Zellen wurden in die Analyse nicht aufgenommen. Zur Durchführung der Experimente wurden Hirnschnitte von Tieren zum Zeitpunkt P7 bis P23 verwendet. In diesem Zeitrahmen sind die Kleinhirnkerne bereits voll ausgebildet und die Synapsen funktionsbereit (Altman und Bayer 1996). Die starke Myelinisierung bei älteren Tieren

erschwerte die Isolation einzelner Neurone, sodass eine Ableitung nur innerhalb eines umrissenen postnatalen Zeitfensters möglich war.

Nach Gardette (1985a) zeigen Neurone mit steigendem Alter (P0 bis P23) eine Reduktion der Aktionspotentialbreite sowie eine erhöhte Entladungsrate. Die Neurone, die in dieser Studie zur Datenanalyse herangezogen wurden, zeigten keine Altersabhängigkeit bezüglich der untersuchten basalen Membraneigenschaften (abhängige Variable Aktionspotentialbreite: $p > .1$, $R = 0.15$; abhängige Variable mittlere Feuerrate: $p > .1$, $R = 0.24$, $n = 24$).

Die Kleinhirnkerne von Nagetieren sind üblicherweise viergeteilt und bestehen aus einem Nucleus medialis, interpositus anterior und posterior und Nucleus lateralis (Korneliussen 1968). Die zu untersuchenden Neurone waren überwiegend im Nucleus lateralis und Nucleus interpositus anterior gelegen, wobei eine wirklich exakte Trennung beider Kerne schwer zu treffen war. Um die elektrophysiologisch untersuchten Neurone später identifizieren zu können, wurden einige Zellen mit Neurobiotin angefärbt. Dies konnte bei 10 Neuronen des analysierten Datenbestandes erfolgreich durchgeführt werden. Außerdem wurde jede Zelle vor Beginn der Experimente gezeichnet (siehe Kapitel Morphologie). Um den scheinbaren Eingangswiderstand der Neurone zu bestimmen, wurden die Neurone mit einem negativen Haltestrom hyperpolarisiert. Hatte das Neuron das elektrische Niveau erreicht, bei dem keine Spontanaktivität mehr zu beobachten war, wurden Stromimpulse niedriger Amplitude gegeben. Nach dem Ohmschen Gesetz wurde dann der scheinbare Eingangswiderstand berechnet. Unter Einhaltung der oben genannten Kriterien einer stabilen Ableitung zeigten die Kleinhirnkernneurone eine weite Spanne von Eigenschaften. Diese Eigenschaften sind Gegenstand der folgenden Darstellung.

3.1.1 Spontanes Feuerverhalten

Während der Experimente waren einige der Zellen nicht spontanaktiv, erst unter der Gabe von Strompulsen konnte ein regelmäßiges Feuern beobachtet werden. Die Zellen, die Spontanaktivität zeigten ($n = 24$), wiesen im

Ruhezustand, ohne Applikation eines depolarisierenden oder hyperpolarisierenden Haltestromes, eine mittlere Feuerrate von 5.23 Aktionspotentialen pro Sekunde [AP/s] auf (Standardabweichung [SD] = 4.16). Dieser Wert stimmt mit in früheren Studien erhobenen Daten überein (Gardette et al., 1985; Czubayko et al., 2001). Die wichtigsten aktiven und passiven Eigenschaften der Membran sind in Tab. 1 zusammengefasst.

	RMP (mV)	R_i (GΩ)	FS (mV)	Ampl (mV)	t_{1/2} AP (ms)
n	24	24	24	24	24
MW	-50.43	0.99	-36.2	57.17	2.49
SD	7.00	0.49	6.45	12.55	1.23
max	-40.00	1.96	-9.28	86.00	5.52
min	-65.00	0.18	-45.65	37.13	0.96

Tab. 1 | Zusammenfassung der wichtigsten membranphysiologischen Eigenschaften spontan aktiver Kleinhirnkernneurone *in vitro* (RMP: Ruhemembranpotential, R_i: Eingangswiderstand, FS: Feuerschwelle, Ampl: Amplitude, t_{1/2} AP: Aktionspotentialbreite bei halber Amplitude, n = 24)

Nach Zugabe des Glutamatantagonisten Kynurensäure (2 mM) waren alle Neurone der betreffenden Population (n = 16) weiterhin spontanaktiv. Glutamaterge Afferenzen, die die Kleinhirnkernneurone über antidrome Aktivierung kortikaler Kollateralen erreichen, sind in der Lage, ein Feuern dieser Neurone zu verursachen (Llinas und Mühletaler 1988; Mougnot und Gähwiler 1995). Da Kynurensäure diesen exzitatorischen Einfluß antagonisiert, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der beobachteten Spontanaktivität tatsächlich um eine intrinsische Eigenschaft der Kleinhirnkernneurone handelt. Ein Beispiel einer typischen Zelle zeigt Abb.1 A: im Ruhezustand feuerte diese Zelle eine regelmäßige Serie von Aktionspotentialen mit gleichmäßigen Interspike-Intervallen hoher Frequenz.

Unter Applikation eines hyperpolarisierenden Haltestromes durch die Ableitelektrode verlangsamte sich die Feuerrate proportional zur Menge des applizierten Stromes. Darüber hinaus zeigten sich in 19 von 24 Neuronen kurze, spontane Entladungen von Aktionspotentialen. Diese im Folgenden als „Plateaus“ bezeichneten Entladungsmuster traten unter höheren Haltestromamplituden deutlich zutage (Abb.1 A). Der Zyklus eines solchen Plateaus begann mit einer langsamen Depolarisation der Membran. Wurde die Aktivierungsschwelle erreicht ($M = -59.65 \text{ mV}$, $SD = 8.62 \text{ mV}$, $n = 19$), generierten die Neurone ein langanhaltendes Plateaupotential, welches überlagert war von einer Aktionspotentialsalve hoher Frequenz (Salve, Engl. „Burst“). Dieses Entladungsmuster wird im Folgenden als „Burst“ bezeichnet werden, die Neurone, die dieses Verhalten an den Tag legten, als „zyklisch feuernde Neurone“. Die zur Initiierung eines Bursts minimal benötigte Haltestromamplitude variierte von Neuron zu Neuron und betrug -10 bis -70 pA . In 6 zyklisch feuernden Neuronen traten die Plateaupotentiale auch ohne vorherige Hyperpolarisation der Membran auf. Die Dauer der Plateaus variierte von 1.08 bis 8.75 Sekunden (gemessen bei minimaler Stromapplikation, die zur Induktion der Plateaus notwendig war, von Beginn des Bursts bis Beginn der Nachhyperpolarisation) und schwankte unter denselben Ableitbedingungen für ein einzelnes Neuron nur geringfügig. Das Plateau endete mit einer spontanen Hyperpolarisation des Membranpotentials von 400 bis 500 ms Dauer (sog. Nachhyperpolarisation oder AHP), bis der nächste Zyklus mit einer erneuten langsamen Depolarisation startete. Die Amplitude des AHP zeigte interindividuelle Unterschiede und korrelierte signifikant mit der Größe des applizierten Haltestromes (abhängige Variable AHP, $R = .89$, $p < .01$; $n=3$).

In einer anderen Gruppe von Neuronen ($n = 5$) wurde ein anderes spontanes Feuerverhalten beobachtet. Ein beispielhaftes Neuron zeigt Abb. 1 B: auch dieses Neuron zeigte im Ruhezustand eine regelmäßige Entladung von Aktionspotentialen. Sobald jedoch ein hyperpolarisierender Haltestrom appliziert wurde, verlangsamte sich die Feuerfrequenz, bis das Feuern schlussendlich vollständig zum Stillstand gekommen war. Diese Neurone werden im Folgenden als „regelmäßig feuernde Neurone“ bezeichnet.

Auch statistisch zeigten sich Unterschiede zwischen diesen beiden Teilpopulationen. Der t-Test zwischen den Neuronen, die zyklische Entladungen zeigten ($n = 19$) und den regelmäßig feuernenden Zellen ($n = 5$) der beobachteten Teilpopulation ergab signifikante Unterschiede bezüglich der mittleren Feuerrate im Ruhezustand [AP/s] sowie des mittleren Ruhemembranpotentials [RMP]. Die regelmäßig feuernenden Neurone zeigten hierbei ein niedrigeres mittleres RMP (MD = 8.6 mV, $t(19) = 2.6$, $p < .05$) und eine im Mittel langsamere Entladungsfrequenz (MD = 4.6 AP/s, $t(19) = 2.3$, $p < .05$) als die zyklisch feuernenden Neurone. Eingeschlossen in die Analyse wurden nur Neurone, die unter Ruhebedingungen spontan aktiv waren ($n = 24$).

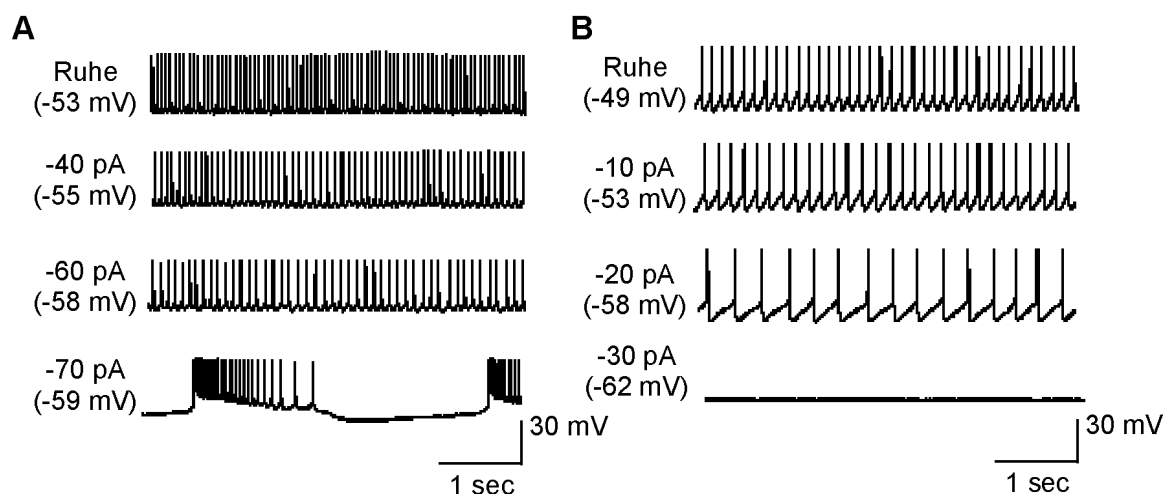


Abb. 1 | Spontane Feuereigenschaften der Kleinhirnkernneurone. *oben:* Ableitung beim RMP, *darunter:* Ableitungen unter hyperpolarisierendem Haltestrom unterschiedlicher Stärke. **A:** Neuron mit Plateaupotentialen. **B:** Regelmäßig feuernendes Neuron. Beide repräsentativen Neuronentypen zeigen mit steigender Amplitude des injizierten Stromes eine Reduktion der Entladungsrate. Die spontane Entladungsrate der regelmäßig feuernenden Neurone ist im Vergleich zu den Neuronen, die Plateaupotentiale zeigen, signifikant geringer.

Die Analyse beinhaltete darüber hinaus das Membranpotential unter Ruhebedingungen, die Feuerschwelle, die spontane basale Feuerrate, die Weite der Aktionspotentiale (gemessen bei halber Amplitude), die Amplitude der Aktionspotentiale, Zeitkonstante und Somagröße und den scheinbaren

Eingangswiderstand. Bei diesen elektrophysiologischen Eigenschaften zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Neuronen.

3.3.2 Feuerverhalten unter Stimulation

3.3.2.1 Depolarisierende Pulse

Unter Applikation eines depolarisierenden Pulses ließ sich in allen Neuronen ein Anstieg der Feuerfrequenz beobachten. Die artifizielle Depolarisation der Membran führte in einigen Fällen, unabhängig ob es sich um zyklisch oder regelmäßig feuernde Zellen handelte, zu einem Membranpotential, wo die Generierung von Aktionspotentialen durch die Inaktivierung von Natriumkanälen vollständig unterbunden wurde ($M = -29.5 \text{ mV}$, $SD = 1.42 \text{ mV}$, $n = 5$). Die Gabe eines erneuten Pulses war in der Lage, diesen sogenannten „Depolarisationsblock“ zu durchbrechen und das Membranpotential zurück zu mehr hyperpolarisierten Werten zu bringen. Beim nächsten einwärts gerichteten Strompuls wurde dann erneut die Feuerschwelle erreicht. Die Stromamplitude, die diesen sogenannten Depolarisationsblock hervorrief, betrug im Mittel 62 pA ($SD = 19.24 \text{ pA}$). Eine Stimulation dicht unterhalb der Feuerschwelle enthüllte eine Einwärtsgleichrichtung in Form einer depolarisierenden Transiente („hump“, Abb.2 B). Der Zeitpunkt, an dem Aktionspotentiale bei gerade überschwelligen Stimulationen ausgelöst wurden, war vom Zeitverlauf dieser depolarisierenden Transiente abhängig. Eine überschwellige Stimulation mit Strompulsen von einer Sekunde Dauer und ansteigenden Stromstärken führte in allen Neuronen zu einem Anstieg der Entladungsrate (Abb.2 A2). Auch unter Beibehaltung derselben Stromamplitude jedoch ansteigender positiver Haltestromapplikation nahm die Zahl der ausgelösten Aktionspotentiale zu (Abb. 2 A1). Diese Zusammenhänge zeigten jedoch keine signifikante Korrelation. Die Erregbarkeit sowohl der zyklisch als auch der regelmäßig feuernden Neurone ist demnach abhängig vom zugrundeliegenden Membranpotential und von der Stromstärke. Die Applikation depolarisierender Strompulse unterschiedlicher Länge (200 ms, 300 ms, 1 Sekunde) und

unterschiedlicher Höhe (10 pA bis 200 pA) rief in allen zyklisch feuernenden Neuronen ($n = 19$) in Abhängigkeit vom Ausgangspotential ein transientes Plateaupotential hervor (Abb.2 C1). Diese evozierten Plateaus hatten einen ähnlichen Zeitverlauf wie die unter Haltestromapplikation beobachteten spontanen Plateaus. Ein Strompuls ausreichender Stärke, um die Feuerschwelle zu erreichen, löste die Plateaus nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip aus, vereinzelte Aktionspotentiale wurden nicht generiert.

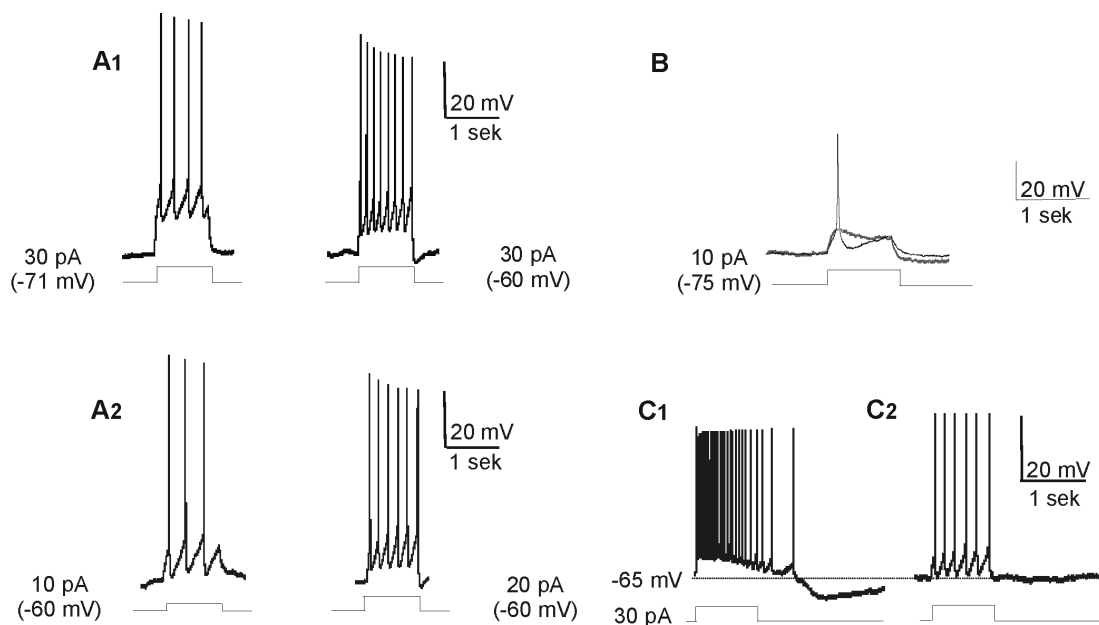


Abb. 2 | Antwort auf depolarisierende Pulse. **A:** Repräsentatives regelmäßig feuernendes Neuron **A1**: eine überschwellige Stimulation derselben Stromstärke bei unterschiedlicher depolarisierender Haltestromapplikation führt zum Anstieg der Entladungsrate. **A2**: eine überschwellige Stimulation mit steigenden Stromstärken führt zum Anstieg der Feuerrate. **B:** eine Stimulation knapp unterhalb der Feuerschwelle bewirkt eine depolarisierende Transiente („hump“). **C:** ein repräsentatives zyklisch feuernendes Neuron zeigt bei depolarisierender Stimulation ein Plateaupotential (**C1**), das repräsentative regelmäßig feuernendes Neuron nicht (**C2**). Die abgebildeten Neurone sind sowohl in der Stimulusstärke als auch im Ausgangsmembranpotential vergleichbar.

Das Pulsende übte weder einen Einfluss auf den Verlauf des Plateaupotentials aus noch auf die momentane Entladungsrate. Die Dauer der Plateaus, gemessen von Beginn der Bursts bis zum Zeitpunkt des erneuten Erreichens

des Ausgangsmembranpotentials, bewegte sich in einem Zeitrahmen von 1.99 bis 7.3 Sekunden und war nicht mit der Stromamplitude korreliert. Wie unter Haltestromapplikation fiel die Dauer der Plateaus jedoch umso kürzer aus je höher die Stromamplitude gewählt wurde, die Feuerfrequenz änderte sich nicht. Es wurden nur Neurone mit vergleichbarem Ausgangsmembranpotential (-55 mV bis -65 mV) und Stimulusstärke (20 pA) gewählt (n = 7). Bei den regelmäßig feuernden Neuronen war ein anderes Verhalten nach Ende des Strompulses zu beobachten: hierbei ging das Membranpotential direkt auf das Ausgangsniveau zurück. Aktionspotentiale nach Ende des Pulses blieben aus (Abb.2 C2). Die Länge der in den Ableitungen verwendeten Stimulationen ist in hohem Maße artifiziell. Unter *in vivo*- Bedingungen können durch hochfrequente erregende synaptische Potentiale deutlich längere Membrandepolarisationen entstehen. Darüber hinaus werden bei kurzen Stimulationen die Auswirkungen langsam oder nicht inaktivierender Leitfähigkeiten nicht erfasst. Um beide Neuronenpopulationen im Hinblick auf ihr „Plateauverhalten“ vergleichen zu können und den oben genannten Limitationen zu entgehen, wurden die Neurone mit langanhaltenden depolarisierenden Strompulsen über einen Zeitraum von fünf Sekunden stimuliert. Während der Stimulation antworteten beide Populationen mit einer anhaltenden Entladung von Aktionspotentialen (s. Abb.3). Die zyklisch feuernden Neurone (n = 6) zeigten hierbei unterschiedliche Entladungsmuster. Am häufigsten fand sich eine Beschleunigungsadaptation. Hierbei startete das Plateau mit hoher Entladungsrate, an die sich eine Phase starker Adaptation anschloß (Abb.3 A1). Bei einem der Neurone war die momentane Entladungsrate am Anfang des Pulses zunächst noch gering, stieg dann im Verlauf des Plateaus jedoch an, um nach Erreichen des Maximalwertes in eine Phase langsamer Adaptation überzugehen (Abb.3 A2). Ein Neuron zeigte einen Übergang der beschriebenen Entladungsmuster (Abb.3 A3): einer Phase der Beschleunigung zu Beginn des Plateaus folgte eine schnelle Adaptation, der sich wiederum eine Phase der erhöhten Entladungsraten anschloß. Daran anschließend setzte eine langsame Adaptation ein.

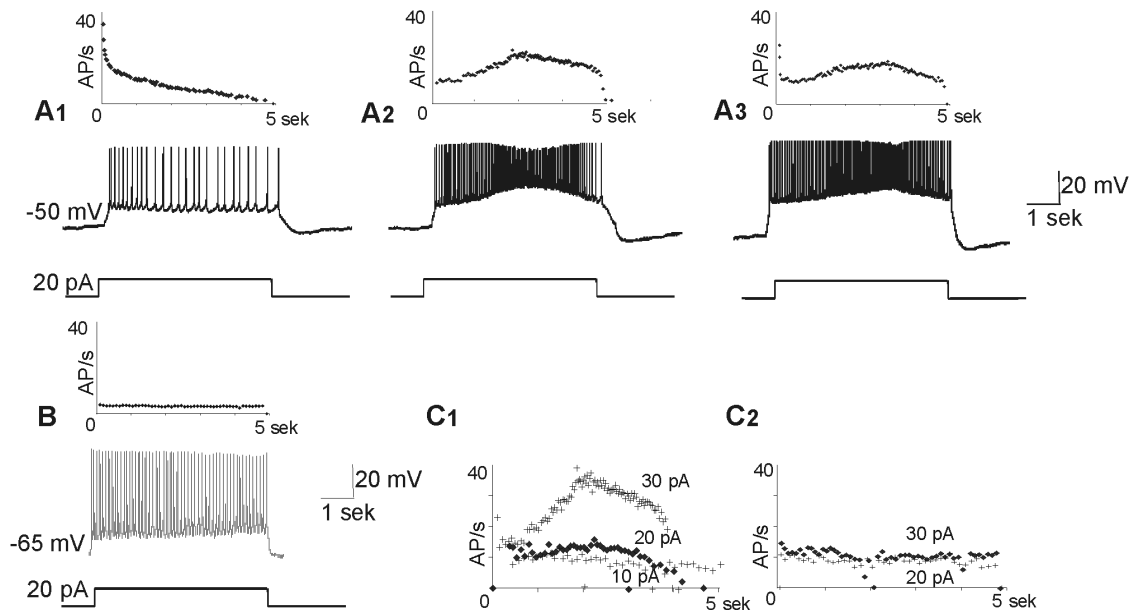


Abb. 3 | Zeitverlauf der Entladungsrate während eines 5 Sekunden dauernden depolarisierenden Strompulses mit vergleichbarer Stimulusstärke und Ausgangspotential. **A:** oben: Zeitpunkt des Auftretens der Aktionspotentiale nach Pulsbeginn; unten: dazugehörige Potentialspur. **A1:** repräsentatives zyklisch feuernes Neuron mit schneller und starker Adaptation nach drei bis vier Aktionspotentialen. **A2:** repräsentatives zyklisch feuernes Neuron mit langsamem Beschleunigungs-Adaptationsmuster. Nach einer Phase der langsamen Beschleunigung folgt eine Phase der langsamen Adaptation. **A3:** repräsentatives zyklisch feuernes Neuron mit einem Nebeneinander von schneller und langsamer Adaptation. Zu Beginn des Plateaus kommt es zu einer hohen Entladungsrate und schneller Adaptation. Diese ist gefolgt von einer erneuten Phase der Beschleunigung mit darauffolgender langsamer Adaptation. **B:** Antwort eines charakteristischen regelmäßig feuernenden Neurons mit nur geringer Adaptation der Entladungsrate zu Beginn des Pulses. **C:** Abhängigkeit des Entladungsmusters von der Stromamplitude. **C1:** zyklisch feuernes Neuron mit langsamer Adaptation der Entladungsrate. Das Beschleunigungsmuster erscheint mit zunehmender Stromstärke in ausgeprägterer Form. **C2:** repräsentatives regelmäßig feuernes Neuron. Das Neuron zeigt nur eine leichte Adaptation der Entladungsrate. Diese ändert sich mit ansteigender Stromapplikation nicht. Es gingen nur Zellen mit vergleichbarer Stimulusstärke (10 - 30pA) und Ausgangspotential (-65 bis -70 mV) in die Analyse ein.

Dieses Neuron war auch das einzige, in dem auch ein Nebeneinander der Entladungsmuster in unterschiedlichen Plateaus zu beobachten war. Das Entladungsmuster zeigte sich unabhängig vom Ausgangspotential. Eine Erhöhung der Entladungsrate war mit einer Reduktion der

Aktionspotentialamplitude um bis zu 40% sowie einer Verbreiterung der Aktionspotentiale um das ca. 1.5-fache verbunden. Die Neurone, die keine Plateaus zeigten, wiesen ein einheitliches Antwortverhalten auf: 2 von 2 getesteten Neuronen zeigten unter den gegebenen Ableitbedingungen ein regelmäßiges Entladungsmuster mit nur leichter Adaptation (Abb.3 B). Im Folgenden wurde untersucht, ob durch eine Veränderung der Stimulusstärke eine Veränderung des Entladungsmusters zu erzielen war. Unter konstantem Ausgangspotential (-50 mV bis -55 mV) und zunehmenden Stimulusstärken (10 pA bis -30 pA) zeigte sich bei den zyklisch feuernenden Neuronen eine Abhängigkeit des Entladungsmusters: je größer der Strompuls desto ausgeprägter erschien das Beschleunigungs-Adaptationsmuster. Dieses Verhalten ließ sich in allen der mit ansteigenden depolarisierenden Pulsen stimulierten Zellen nachweisen (Abb.3 C1). Die regelmäßig feuernenden Neurone zeigten mit zunehmender Stromamplitude einen leichten Anstieg der momentanen Entladungsrate, ein Beschleunigungsadaptationsmuster konnte jedoch nicht induziert werden (Abb.3 C2).

3.3.2.2 Hyperpolarisierende Pulse

Ein hyperpolarisierender Stromimpuls induzierte in allen Neuronen eine vorübergehende Phase der Hyperpolarisation des Membranpotentials. Diese Phase war ca. 100 ms nach Abschluß des Pulses in den meisten Fällen gefolgt von einer sogenannten Rebounddepolarisation (RD), die stark genug war, eine Anzahl von Aktionspotentialen hervorzurufen. Die Aktionspotentiale, die durch den Rebound generiert werden konnten, galten als Index für die Stärke des Rebounds. Die Anzahl der hervorgerufenen Aktionspotentiale korrelierte signifikant mit dem Ausmaß der Rebounddepolarisation: je größer die Depolarisation, desto höher fiel auch die Anzahl der Aktionspotentiale nach Beendigung des hyperpolarisierenden Pulses aus (abhängige Variable evozierte Aktionspotentiale: $R = 0.68$, $p < .05$, $n = 15$).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Rebounddepolarisationen über eine Aktivierung von Calciumkanälen vom T-Typ mit niedriger

Aktivierungsschwelle vermittelt werden (Aizenman und Linden, 1999; Gauck et al., 2001). Eine bekannte Eigenschaft dieser Calciumkanäle ist ihre rasche Inaktivierung in einer zeit- und spannungsabhängigen Weise (Carbone und Lux, 1987). Um diese Inaktivierung aufzuheben ist eine Hyperpolarisation vonnöten. Eine ansteigende Hyperpolarisation würde demnach über die Deaktivierung immer weiterer Kanäle eine umso größere Rebounddepolarisation verursachen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Neurone durch einen hyperpolarisierenden Haltestrom auf einem Level unterhalb der Feuerschwelle gehalten, um eine Spontanaktivität zu unterdrücken (-60 mV bis -70 mV). Gleichzeitig wurden hyperpolarisierende Stromstöße mit ansteigender Amplitude verabreicht. Ein repräsentatives Neuron zeigt Abb.4 A. Die Höhe der Stromamplitude korrelierte signifikant mit dem Ausmaß der Rebounddepolarisation (abhängige Variable RD; $R = 0.921$, $p < .001$). Mit Strompulsen kleiner Amplitude wurde die Feuerschwelle zur Generierung von Aktionspotentialen nicht erreicht, unter Erhöhung der Stromamplitude wurde wie erwartet auch die Rebounddepolarisation größer und es wurden mehr Aktionspotentiale beobachtet. Die Rebounddepolarisation ist demnach ein spannungsabhängiges Phänomen. Das Ausmaß des Rebounds war ebenfalls abhängig vom zugrundeliegenden Membranpotential. Bei einer Hyperpolarisation unterhalb der Feuerschwelle riefen einwärtsgerichtete Strompulse nur eine leichte Rebounddepolarisation hervor. Unter depolarisierendem Haltestrom und Beibehalten der Stärke der Strompulse konnten mehr Aktionspotentiale beobachtet werden und die Rebounddepolarisation am Ende der Pulse war stärker ausgeprägt. Statistisch zeigte sich in der Analyse aller beobachteten Neurone hierbei jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß des Rebounds und dem Membranpotential. Unter hyperpolarisierenden Pulsen von einer Sekunde Dauer zeigten alle Neurone nach ca. 200 ms eine einwärtsgerichtete Gleichrichtung, welche durch die Rückkehr des Membranpotentials zu positiveren Werten bei anhaltend negativer Stromapplikation gekennzeichnet war (sog. „sag“ oder „Potentialrampe“). Die absolute Amplitude ΔV_m dieser Potentialrampe (gemessen von Beginn des hyperpolarisierenden

Stromimpulses bis zu dessen Ende) korrelierte signifikant mit der Größe des applizierten Stromimpulses ($R = 0.41$, $p < .05$, $n = 7$). Es wurden nur Neurone in die Analyse eingeschlossen, die ein ähnliches Ausgangsmembranpotential aufwiesen (-60 mV bis -65 mV). Ein beispielhaftes Neuron zeigt Abb.4 B. In vergleichbaren Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten aufgehoben werden konnte durch die Applikation von Cäsiumchlorid (CsCl). Kinetik, Stromabhängigkeit und die Blockade durch CsCl deuten darauf hin, dass die zu beobachtende Senkung getragen wird von einem Strom mit einwärtsgerichteter Wirkung, der in der Literatur als „I_h“ bezeichnet wird. (McCormick und Pape, 1990). Seine Aktivierung und die damit verbundene Zunahme der Leitfähigkeit setzt verzögert ein. Unterhalb eines Membranpotentials von -65 mV deaktiviert dieser Ionenkanal nicht (Pape et al., 1996). Unter der Gabe von hyperpolarisierenden Pulsen auf einem Potentialniveau unterhalb der Aktivierungsschwelle für Calciumkanäle vom T-Typ (-72 mV, Perez-Reyes et al., 2003) war immer noch eine schmale Rebounddepolarisation zu beobachten, was ebenfalls auf die Existenz von I_h in den hier untersuchten Neuronen hindeutet. Die Aktivierung von I_h könnte bei unterschwelligen Membranpotentialen über eine Aktivierung von Calciumkanälen des T-Typs den Rebound noch verstärken, so wie es in thalamischen Interneuronen beobachtet werden konnte (Pape 1996). Erreichte das Membranpotential während des Rebounds eine bestimmte Schwelle, generierten die zyklisch feuernden Neurone langanhaltende Plateaupotentiale, welche in ihrer Kinetik den spontanen Plateaus bzw. denen nach depolarisierenden Pulsen ähnelten. Regelmäßig feuernde Neurone besaßen eine mittlere Rebounddepolarisation von 1.02 mV (SD = 1.45 mV, $n = 6$) mit wenig Aktionspotentialen niedriger Frequenz ($M = 0.33$, SD = 0.52 AP/s, $n = 6$), während Neurone, die Plateaupotentiale zeigten, größere mittlere Rebounddepolarisationen aufwiesen ($M = 8.9$ mV, SD = 4.83 mV, $n = 9$) mit vielen, hochfrequenten Aktionspotentialen ($M = 8$ AP/s, SD = 1.75 AP/s, $n = 9$).

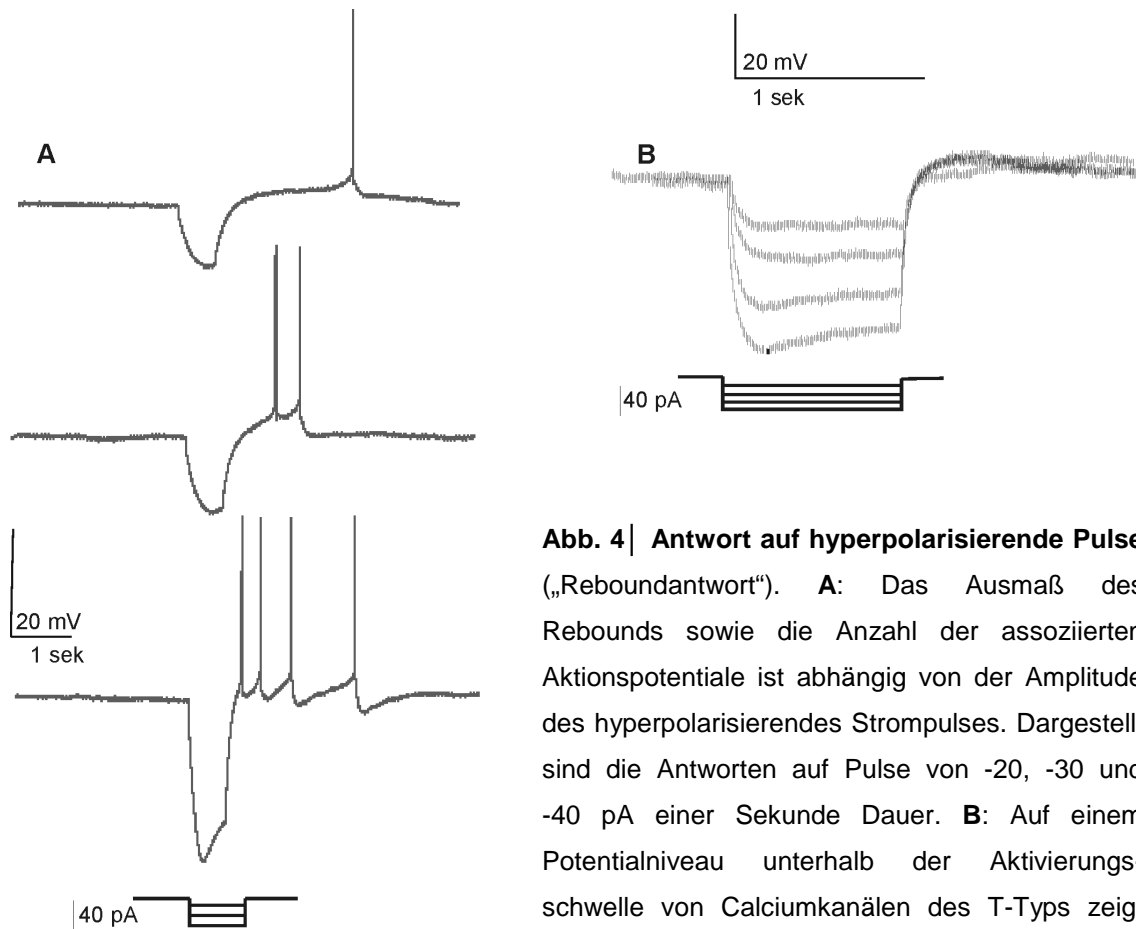


Abb. 4 | Antwort auf hyperpolarisierende Pulse

(„Reboundantwort“). **A:** Das Ausmaß des Rebounds sowie die Anzahl der assoziierten Aktionspotentiale ist abhängig von der Amplitude des hyperpolarisierenden Strompulses. Dargestellt sind die Antworten auf Pulse von -20, -30 und -40 pA einer Sekunde Dauer. **B:** Auf einem Potentialniveau unterhalb der Aktivierungsschwelle von Calciumkanälen des T-Typs zeigt sich weiterhin eine Rebounddepolarisation geringen Ausmaßes. Das repräsentative Neuron

wurde durch Haltestromapplikation bei -75mV stabilisiert und Strompulse steigender Amplitude (-10 bis -40pA , 1 Sekunde) verabreicht. Mit steigender Stromamplitude tritt die Einwärtsgleichrichtung in Form einer „Potentialrampe“ deutlicher zutage.

Der Unterschied zwischen den Neuronengruppen war sowohl für die Anzahl der hervorgerufenen Aktionspotentiale als auch für das Ausmaß des Rebounds signifikant (Aktionspotentiale: $\text{MD} = 7.67 \text{ AP/s}$, $t(13) = 45.42$, $p < .01$; Rebound: $\text{MD} = 7.88 \text{ mV}$, $t(13) = 11.47$, $p < .05$). Den Vergleich zwischen den unterschiedlichen Neuronenpopulationen zeigt Abb. 5.

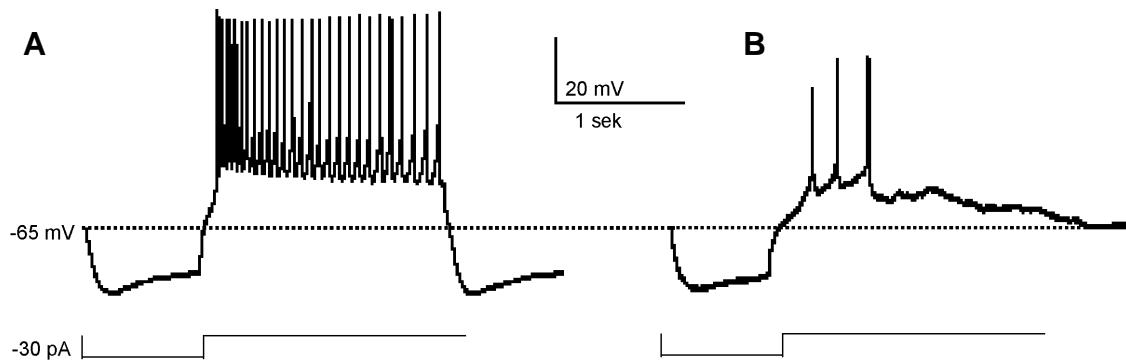


Abb. 5 | Vergleich der „Reboundantwort“ beider Neuronenpopulationen. A: Das zyklisch feuernde Neuron zeigt exemplarisch eine verzögert einsetzende Einwärtsgleichrichtung während eines hyperpolarisierenden Pulses von -30pA und 1 Sekunde Dauer. Nach Ende des Pulses wird eine „Alles oder Nichts“-Entladung in Form eines Plateaus generiert. **B:** Das repräsentative regelmäßig feuernde Neuron zeigt eine gradierte Reboundantwort am Ende eines hyperpolarisierenden Pulses derselben Stärke und Dauer. Auch hier zeigt sich eine nach ca. 100ms einsetzende Einwärtsgleichrichtung.

3.3.3 Aktionspotentialparameter

Wie oben gezeigt, mündeten die Plateaupotentiale in einem Abschwung des Membranpotentials, an den sich eine Nachhyperpolarisation (AHP) anschloß. Auch den einzelnen Aktionspotentialen folgte im Interspike-Intervall eine Nachhyperpolarisation, deren Dauer und Ausmaß abhängig war von der aktuellen Aktivität der Zelle. In Anlehnung an Untersuchungen an Motoneuronen (Kobayashi et al., 1997) lassen sich unter Ruhebedingungen zwei unterschiedliche Nachhyperpolarisationen unterscheiden: das schnelle AHP (fAHP) folgt einem einzelnen Aktionspotential und reflektiert die Leitfähigkeiten, die während der Repolarisation des Membranpotentials aktiviert werden (Lorenzon und Foehring 1993, Pineda et al, 1998). Im Falle der Kleinhirnkernneurone handelt es sich hierbei um eine das Membranpotential repolarisierende calciumaktivierte Kaliumleitfähigkeit (BK-Kanal). Diese scheint, ebenso wie die inaktivierende Natriumleitfähigkeit, zur Generierung von Aktionspotentialen, ubiquitär im zentralen Nervensystem vorhanden zu sein (Velumian et al, 1999). Ein schnelles AHP von 4-5 ms Dauer und einer mittleren

Amplitude von $M = 2.6$ mV (gemessen vom Ruhemembranpotential bis negativstem Ausschlag; $SD = 0.7$ mV, $n = 5$) ließ sich in fünf der Neurone beobachten, die Plateaupotentiale generierten (Abb.6 A1a).

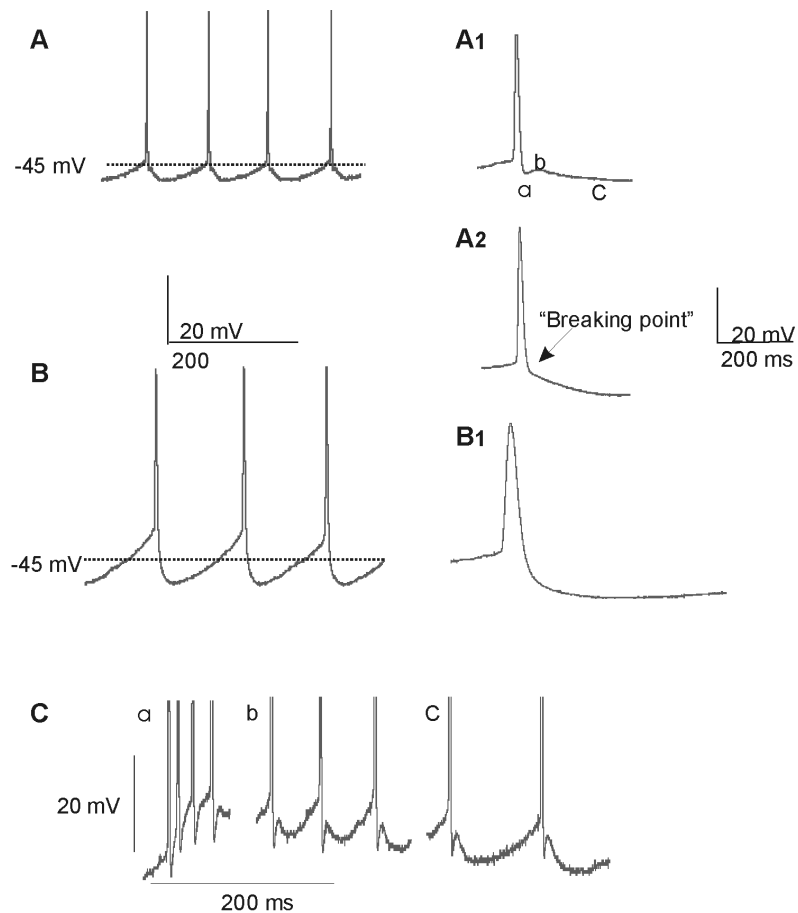


Abb. 6 | Aktionspotentialparameter. **A:** Ein repräsentatives zyklisch feuernendes Neuron zeigt unter Spontanaktivität einen biphasischen Verlauf der Nachhyperpolarisation („AHP-ADP-AHP“-Sequenz, **A1**). Dem schnellen AHP (fAHP, a) folgt ein ADP (b) und eine zweite, flachere und länger andauernde Nachhyperpolarisation (mAHP, c). Einige der zyklisch feuernenden Neurone zeigten einen Stop in der Repolarisationskurve, jedoch keine typische AHP-ADP-AHP-Sequenz (**A2**). **B:** Die Aktionspotentiale des exemplarisch dargestellten nicht-regelmäßig feuernenden Neuron zeigt diese Sequenz von Nachpotentialen nicht. Die Repolarisationskurve wird nicht unterbrochen (**B2**). **C:** Die Form der Nachpotentiale ist abhängig von der Lage der Aktionspotentiale im „Burst“. Während hoher Entladungsraten zu Beginn des Bursts zeigt sich keine deutliche Sequenz. Während der daran anschließenden Phase tritt das fAHP in den Vordergrund, das mit seiner Amplitude das mAHP übersteigt. Dieses Verhältnis kehrt sich zu Beginn der Adaptation um.

Nach dem fAHP ließ sich ein Aufschwung des Membranpotentials beobachten (ADP, Abb.6 A1b). Bei dieser Depolarisation handelte es sich weniger um ein aktives depolarisierendes Geschehen als um eine Fortsetzung der Repolarisation, die in ihrem Ausmaß nicht zur Auslösung weiterer Aktionspotentiale beitrug. Im Anschluß daran folgte in Anlehnung an Villalobos et al. (2004) ein sogenanntes mittellanges AHP (mAHP) größerer Amplitude ($M = 4.1 \text{ mV}$, $SD = 0.3 \text{ mV}$, $n = 5$) und weitaus längerer Dauer von 30 – 40 ms ($n = 5$), das in das nächste Aktionspotential mündete (Abb.6 A1c). In weiteren vier zyklisch feuernenden Neuronen ließ sich vor Beginn des mAHP ein Stop in der Repolarisationskurve nachweisen, jedoch kein eindeutiges schnelles AHP. Dies wird im Folgenden als „Breaking Point“ bezeichnet werden (Abb.6 A2). Die Aktionspotentiale der regelmäßig feuernenden Neurone zeigten diese Sequenz von Nachpotentialen nicht. Ihre Repolarisationskurve verlief in allen untersuchten Neuronen ohne Unterbrechung. Während eines Plateaus war die Form der Nachpotentiale abhängig von der Lage der Aktionspotentiale. Während hoher Entladungsraten zu Beginn des Plateaus zeigten die Nachpotentiale keinen deutlich biphasischen Verlauf (Abb.6 Ca). Während der zweiten Beschleunigungsphase war das fAHP von höherer Amplitude als das mAHP (Abb.6 Cb). Mit Beginn der Adaptation (Abb.6 Cc) kehrte sich dieses Verhältnis um und das mAHP trat deutlicher zutage.

3.3.4 Analyse unterschiedlicher Neuronentypen

Die untersuchten Kleinhirnkernneurone unterschieden sich elektrophysiologisch durch das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Plateaupotentialen und Bursts, der Art ihrer Reboundantwort sowie hinsichtlich der Form der Aktionspotentiale und ihrer Nachhyperpolarisationen. Die Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone erlaubte die Differenzierung der Gesamtpopulation in sogenannte zyklisch feuernende oder regelmäßig feuernende Neurone. Innerhalb der Gruppe der zyklisch feuernenden Neurone fanden sich jedoch Zellen, die sich in der Breite ihrer Aktionspotentiale und ihrer unterschiedlichen Nachhyperpolarisationen von den übrigen Neuronen dieser

Gruppe unterschieden. In diesen Parametern glichen sie eher den regelmäßig feuernenden Neuronen, obwohl sie dennoch transiente, langanhaltende Plateaupotentiale generierten. Diese Neurone mit überlappenden Eigenschaften könnten zu einer dritten Klasse von Neuronen gehören und werden im Folgenden als „Mix“- Neurone bezeichnet ($n = 13$). In Anlehnung an eine kürzlich veröffentlichte Studie von Czubayko et al. (2001) werden die übrigen zyklisch feuernenden Neurone im Folgenden als „Typ I“ ($n = 9$), die regelmäßig feuernenden als „Typ II“- Neurone ($n = 12$) bezeichnet.

Um die beobachteten Unterschiede zwischen den Neuronen zu quantifizieren und die Hypothese zu erhärten, dass es sich tatsächlich um drei unterschiedliche Neuronengruppen handeln könnte, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one- way ANOVA) für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Parameter durchgeführt. Alle Parameter wurden zuvor auf Normalverteilung getestet (Kolmogorov- Smirnov-Test). Um zu überprüfen, welche Gruppen sich signifikant unterschieden, wurden anschließend Post-hoc-Tests durchgeführt. Sofern die Daten normalverteilt waren wurde der Tukey-Test oder der Bonferroni t-Test angewandt. Sofern der Test auf Normalverteilung scheiterte, wurde eine ANOVA „on ranks“ nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Zur Testung der Signifikanz zwischen den Gruppen kam in diesem Fall anschließend Dunn´s Methode zur Anwendung. Die folgenden Abschnitte stellen die Ergebnisse dieser Analyse dar.

Plateaupotentiale

Unter Injektion eines hyperpolarisierenden Haltestromes generierten die Typ I- ($n = 9$) und Mix- Neurone ($n = 13$) langanhaltende Plateaupotentiale. Bei den Typ II- Neuronen ($n = 12$) blieb dieses Verhalten aus. Die Aktivierungsschwelle zur Generierung von Plateaupotentialen lag bei den Typ I- Neuronen signifikant höher als bei der Subpopulation der Mix-Zellen (Mix: $M = -63.67$ mV, $SD = 6.33$ mV, $n = 9$; Typ I: $M = -51.6$ mV, $SD = 8.47$ mV; $MD = -12.07$, $t(12) = -3.04$, $p < .05$, $n = 5$; Bonferroni t-Test). Die durch depolarisierende Pulse von 200 ms bzw. einer Sekunde Dauer evozierten Plateaus ähnelten in ihrem Verlauf den unter Spontanaktivität beobachteten. Eine genauere Analyse des

Entladungsmusters enthüllte ein verstärktes Auftreten eines Entladungsmusters mit schneller Adaptation in der Gruppe der Mix- Neurone (Abb. 7 C2). Bei diesen Neuronen ließ sich vermehrt ein Plateau mit niedriger Aktivierungsschwelle nachweisen ($M = -74$ mV, $SD = 4,47$ mV, $n = 7$; Abb. 7 A2). Typ I- Neurone zeigten vermehrt ein Plateau mit hoher Aktivierungsschwelle ($M = 46.6$ mV, $SD = 6.73$ mV, $n = 5$; Abb. 7 A1) und ein langsames Adaptationsmuster der Entladungsrate (Abb. 7 C1).

Plateau-Nachhyperpolarisationen

Typ I- Neurone zeigten nach Beendigung eines depolarisierenden Pulses eine langsame Nachhyperpolarisation des Membranpotentials. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei den Mix- und Typ II- Neuronen beobachtet werden. Das Ausmaß der Nachhyperpolarisation war in allen Neuronenpopulationen abhängig vom Membranpotential. So konnte sowohl in Typ I- als auch in den Mix- und Typ II- Neuronen mit sinkenden Potentialen eine verstärkte Nachhyperpolarisation ausgelöst werden. Bei den Typ II- Neuronen ließ sich erst bei Membranpotentialen unter -70 mV eine Nachhyperpolarisation nachweisen. Bei diesen Werten war ein Feuern von Aktionspotentialen jedoch nicht mehr möglich. Bei den Typ I- und Mix- Neuronen fiel die Nachhyperpolarisation bei einem Membranpotential unterhalb von -70 mV höheramplitudig aus, war jedoch auch oberhalb dieser Werte immer noch nachweisbar (Abb. 7 C). Die Varianzanalyse zwischen den Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Nachhyperpolarisationen bei einem Membranpotential von -80 mV (Typ I: $M = 15.82$ mV, $SD = 0.96$ mV, $n = 3$; Mix: $M = 13.44$ mV, $SD = 0.66$ mV, $n = 3$; Typ II: $M = 6.07$ mV, $SD = 0.38$ mV, $n = 3$; $F(1, 9) = 8.12$, $p = 0.17$).

Bei einem Membranpotential von -60 mV waren die mittleren Amplituden der Nachhyperpolarisation zwischen den Typ I- und Mix- Neuronen signifikant unterschiedlich (Typ I: $M = 13.35$ mV, $SD = 0.64$ mV, $n = 3$; Mix: $M = 2.15$ mV, $SD = 0.35$ mV, $n = 3$; $F(1, 6) = 10.56$, $p < .05$).

Reboundpotentiale

Der Unterschied zwischen zyklisch und regelmäßig feuernenden Neuronen bezüglich des Ausmaßes der Rebounddepolarisation (RD) und der dadurch hervorgerufenen Aktionspotentiale war signifikant. Wie oben aufgeführt, zeigten regelmäßig feuernende Typ II- Neurone ($n = 6$) eine abgeschwächte Form des Rebounds mit geringer Depolarisation und wenigen Aktionspotentialen, während Neurone, die Plateaupotentiale zeigten ($n = 9$), größere RDs aufwiesen mit vielen, hochfrequenten, Aktionspotentialen. Dieses Verhalten war in allen beobachteten Neuronen konsistent. Die post-hoc Analyse aller drei Subpopulationen mittels t-Test nach Bonferroni ergab, dass sowohl Typ I - ($n = 2$) als auch Mix- Neurone ($n = 7$) zu diesem Unterschied beitrugen, Typ I- Neurone jedoch in höherem Ausmaß (Typ I vs. Typ II: MD = 12.22 mV, $t(8) = 4.3$, $p < .01$; Mix vs. Typ II: MD = 6.64 mV, $t(13) = 3.40$, $p < .05$). Unter denselben Ableitbedingungen (Ausgangsmembranpotential -60 bis -65 mV; Strompuls von -20 pA) zeigte der Bonferroni t-Test, dass die Anzahl der durch den Rebound evozierten Aktionspotentiale bei den Typ I- Neuronen signifikant über dem Ergebnis der Typ II- Neurone lag (Typ I vs. Typ II: MD = 22.17 AP/s, $t(8) = 3.46$, $p < .05$). Die Mix- Neurone zeigten im Vergleich mit den Typ II- Neuronen kein signifikantes Ergebnis (Mix vs. Typ II: MD = 7.67 AP/s, $t(13) = 1.76$, $p > .05$). Der Unterschied zwischen den beiden zyklisch feuernenden Subpopulationen war sowohl bezüglich des Ausmaßes der Rebounddepolarisation als auch der Anzahl der hervorgerufenen Spikes nicht signifikant (RD: Typ I vs. Mix: MD = 5.58 mV, $t(9) = 1.98$, $p > .05$; evozierte Spikes: Typ I vs. Mix: MD = 14.50 AP/s, $t(9) = 2.31$, $p > .05$). Das Ausmaß der Einwärtsgleichrichtung, repräsentiert durch die Potentialrampe („sag“), war zwischen den drei Neuronengruppen (Typ I: $M = 2.85$ mV, $SD = 1$ mV, $n = 3$; Mix: $M = 6.51$ mV, $SD = 4.2$ mV, $n = 3$; Typ II: $M = 8.95$ mV, $SD = 2.8$ mV, $n = 3$) nicht signifikant unterschiedlich ($F(1, 9) = 5.57$, $p > .05$). In die Analyse gingen nur Neurone mit vergleichbarem Ausgangspotential (-60 mV) und demselben Ausmaß der applizierten Stromamplitude ein (-30 pA).

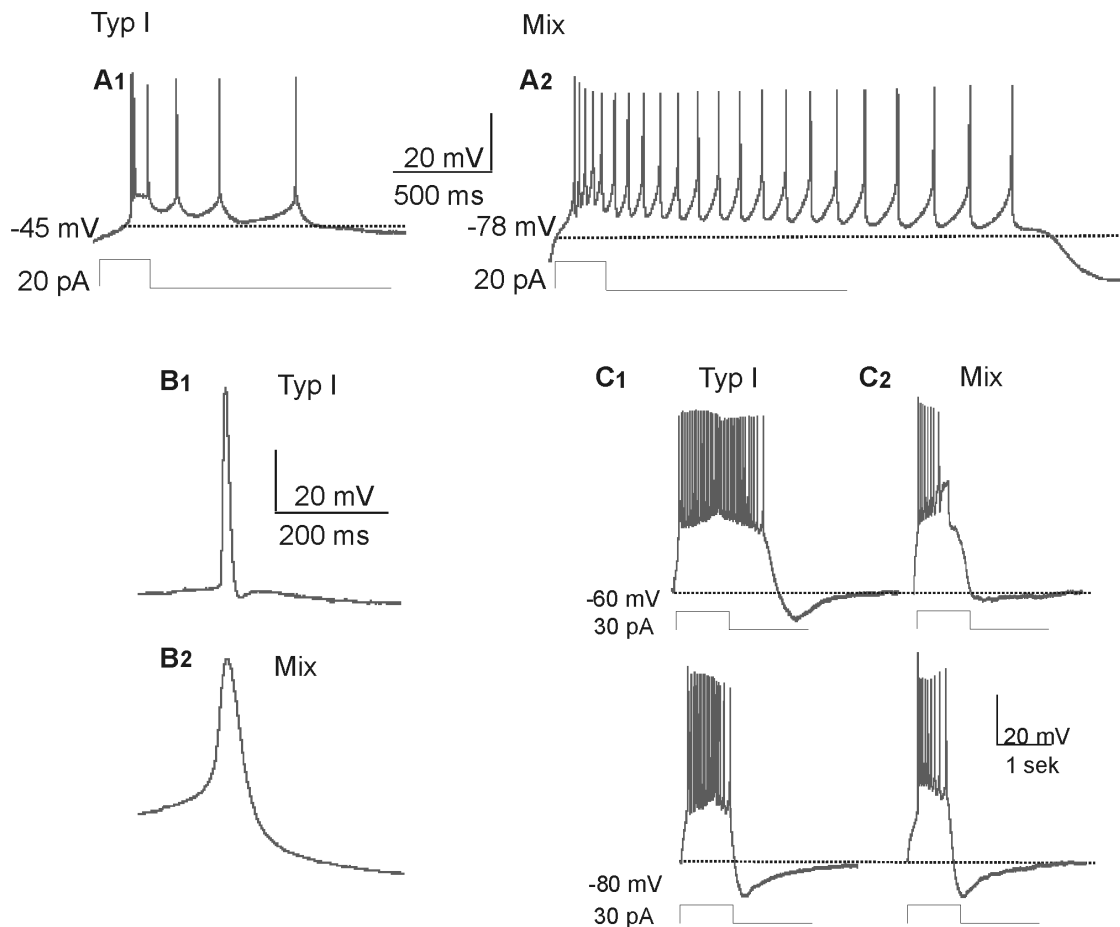


Abb.7 | Zwei Typen zyklisch feuender Neurone. **A1:** Typ I- Neurone zeigen ein vermehrtes Auftreten von Plateaus mit langsamer Adaptation der Feuerrate (**C1**) und hoher Aktivierungsschwelle (hier: -45 mV). **A2:** Bei Mix - Neuronen lassen sich vermehrt Plateaus mit schnellem Adaptationsmuster und niedriger Aktivierungsschwelle nachweisen. **B1:** exemplarisches Aktionspotential eines Typ I- Neurons. Im Vergleich zu den Mix - Neuronen (**B2**) zeigt sich die typische AHP- ADP- AHP- Sequenz und ein schmaleres Aktionspotential. **C:** beide zyklisch feuenden Neuronentypen zeigen mit steigender Hyperpolarisation ein zunehmendes AHP (**C1**, **C2**, unten), bei den Typ I- Neuronen fällt die AHP - Amplitude bei einem Membranpotential von -60 mV jedoch signifikant höher aus (**C1**, oben). Die Leitfähigkeiten, die dem AHP der Mix- Neuronen zugrunde liegen, scheinen bei diesen Werten kaum aktiviert zu sein (**C2**, oben).

Aktionspotentialparameter

Die Parameter, die untersucht wurden, waren der *scheinbare Eingangswiderstand*, die *Membranzeitkonstante*, die *Aktionspotentialamplitude*, die *Aktionspotentialbreite*, die *Aktivierungsschwelle* der Aktionspotentiale, die

Amplitude der Nachhyperpolarisation, das Ausgangsmembranpotential sowie die momentane Entladungsrate. Alle Parameter wurden unter Ruhebedingungen ohne Haltestromapplikation bestimmt. Alle untersuchten Aktionspotentialparameter waren normalverteilt. Außer den Unterschieden im Entladungsmuster und den Plateaupotentialen wiesen insbesondere die Typ I- und Typ II- Neurone deutliche Unterschiede hinsichtlich der Form ihrer Aktionspotentiale und der darauf folgenden Nachhyperpolarisationen auf. Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 2. In die Analyse gingen nur Neurone unter Ruhbedingungen ohne Stromapplikation ein (Typ I: n = 9; Typ II: n = 12; Mix: n = 13). Der post-hoc Test nach Tukey ergab eine signifikant höhere spontane Entladungsrate der getesteten Typ I- Neurone im Vergleich mit den Typ II- Neuronen (MD = 6.02 AP/s, q = 4.28, p < .05). Die Entladungsrate von Typ I- bzw. Typ II- Neuronen unterschied sich nicht signifikant von der Feuerrate, die bei den Mix- Neuronen nachweisbar war. Die Aktionspotentialamplitude (gemessen von der Spitze des Aktionspotentials bis zum negativsten Punkt der Nachhyperpolarisation) war zwischen allen drei Subpopulationen nicht signifikant unterschiedlich, ihre Breite (gemessen bei halber Amplitude) war jedoch sowohl zwischen Typ I - und II - Neuronen als auch zwischen Typ I- und Mix- Neuronen signifikant unterschiedlich (Typ II vs. Typ I: MD = 1.64 ms, q = 7.71, p < .001; Mix vs. Typ I: MD = 1.33, q = 6.13, p < .001, Tukey-Test). Die mittlere momentane Entladungsrate unterschied sich beim Tukey-Test nur im Vergleich zwischen Typ I- und Typ- II- Neuronen signifikant (MD = 6.02, q = 4.28, p < .05). Die Mix- Neurone lagen in ihrer Entladungsrate zwischen Typ I- und Typ II- Neuronen, diese Unterschiede lagen jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus (Tab.2). Unterschiede in der Feuerschwelle zur Auslösung von Aktionspotentialen lagen ebenfalls unterhalb des Signifikanzniveaus (s.Tab.2). Die Zeitkonstante unterschied sich im Tukey-Test nur im Vergleich zwischen den Werten von Typ I- und Mix- Neuronen signifikant (MD = 42.71, q = 5.23, p < 0.05). Unterschiede zu den Werten der Typ II- Neuronen waren nicht signifikant (Tab.2). Das Ausgangsmembranpotential unter Kontrollbedingungen lag bei Typ I- Neuronen signifikant unter dem der Typ II- Neurone, MD = -11.48 mV, q = 4.99, p < .01. Die Mix-Neurone lagen hierbei

wiederum dazwischen, jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus (Tab.2). Der scheinbare Eingangswiderstand korrelierte mit den Somagrößen der Neurone ($R = .87$, $p < 0.01$) und war im Vergleich zwischen Typ I- und Typ II- Neuronen signifikant unterschiedlich ($MD = 0.52$, $q = 3.80$, $p < .05$, Tukey-Test). Die Werte der Mix- Neurone lagen zwischen den anderen beiden Populationen, Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Tab.2). Typ I- Neurone zeigten eine komplexere Form der Nachhyperpolarisationen als die übrigen Populationen. Wie oben dargestellt zeigte sich bei 5 von 9 beobachteten Typ I- Neuronen ein sogenanntes schnelles AHP (fAHP), gefolgt von einer Depolarisation und einer anschließenden zweiten Nachhyperpolarisation, dem sog. mAHP, dessen Amplitude die des fAHP überstieg (Abb. 7 B1). In vier Typ I- Neuronen war kein eindeutiges fAHP zu erkennen jedoch ein Stop der Repolarisationskurve („breaking point“). Im Falle der Typ II- und Mix- Neurone zeigte sich während des Interspikeintervalls keine schnelle Nachhyperpolarisation, nur ein vergleichbares mAHP. Lediglich eins von acht Mix-Neuronen zeigte einen Abbruch der Repolarisationskurve. Die komplexen Nachhyperpolarisationen der Typ I- Neurone traten sowohl unter Spontanaktivität als auch während der Plateaupotentiale auf, waren in ihrem Ausmaß hierbei jedoch abhängig von ihrer Lage im Plateau. Zum Zeitpunkt höchster Entladungsraten zu Beginn des Bursts waren die fAHPs nicht nachweisbar. Die Form der Nachhyperpolarisationen der Typ II- und Mix- Neurone ohne „breaking point“ war im Gegensatz dazu immer einförmig: nach anfänglicher Hyperpolarisation folgte eine langsame Depolarisation, bis die Aktivierungsschwelle zur Auslösung des nächsten Aktionspotentials erreicht war (Abb. 7 B2). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mAHPs der drei Subpopulationen (Tab. 2). Zusätzlich wurde überprüft, ob die untersuchten Parameter vom Entwicklungszustand der Zellen abhängig waren. Die Lineare Regression mit den untersuchten Aktionspotentialparametern als abhängige und dem Alter als unabhängige Variable ergab jedoch keine signifikante Korrelation.

	Typ I	Typ II	Mix	ANOVA p-Wert	post-hoc p-Wert
N	9	12	13		
Alter [Tage]	13.89 ± 2.5	13.92 ± 1.4	13.18 ± 2.8	0.81	–
Eingangswiderstand [GΩ]	0.74 ± 0.5	1.26 ± 0.4	1.07 ± 0.5	0.039	0.031 * I vs. II 0.234 I vs. Mix 0.56 II vs. Mix
Zeitkonstante τ [ms]	69.87 ± 24.1	35.71 ± 14.6	27.17 ± 28.5	0.004	0.053 I vs. II 0.004 * I vs. Mix 0.808 II vs. Mix
AP - Breite [ms]	1.42 ± 0.4	3.07 ± 0.7	2.75 ± 0.8	< 0.001	<0.001* I vs. II <0.001 * I vs. Mix 0.526 II vs. Mix
Feuerschwelle [mV]	-35.98 ± 5.53	-39.17 ± 9.04	-34.71 ± 6.16	0.569	–
AP - Amplitude [mV]	55.44 ± 3.8	64.64 ± 7.4	57.69 ± 3.9	0.305	–
Mittlere momentane Feuerrate [AP/s]	8.23 ± 5.2	2.20 ± 1.1	4.22 ± 1.9	0.014	0.018 * I vs. II 0.068 I vs. Mix 0.575 II vs. Mix
mAHP [mV]	-16.9 ± 7.4	-17.34 ± 12.5	-16.59 ± 10.1	0.445	–
Ausgangsmembran- potential [mV]	-45.21 ± 5.2	-57.00 ± 7.0	-51.72 ± 5.7	0.006	0.006 * I vs. II 0.086 I vs. Mix 0.26 II vs. Mix
Calciumpotentiale mit niedriger und hoher Schwelle	+ ++	- -	++ +		–
Verzögerte Einwärtsgleichrich- tung	+	+	+		–
AHP-ADP-AHP- Sequenz	+	-	-		–

Tabelle 2 | Klassifikation der Kleinhirnkerneurone. Zusammenfassung der elektrophysiologischen Parameter. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < .05$ mit * gekennzeichnet.

3.4 Morphologie

Anatomisch lassen sich mit Blick auf die verwendeten Neurotransmitter und Projektionsziele drei unterschiedliche Klassen von Kleinhirnkernneuronen unterscheiden (Batini, 1992, Chen und Hillman, 1993, Aizenman und Linden, 2003). Ob sich diese anatomisch definierten Neuronentypen auch hinsichtlich ihrer elektrischen Membraneigenschaften unterscheiden, ist bisher nur unzureichend bekannt und war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Wie oben gezeigt, unterschieden sich die untersuchten Kleinhirnkernneurone elektrophysiologisch hinsichtlich des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins von Plateaupotentialen, dem Ausmaß ihrer Reboundantwort nach Beendigung hyperpolarisierender Strompulse sowie hinsichtlich der Form der Aktionspotentiale und ihrer Nachhyperpolarisationen. Zwei unterschiedliche Neuronengruppen, die zyklisch und die regelmäßig feuern, ließen sich durch diese Charakteristika klar voneinander abgrenzen. Innerhalb der Gruppe der Neurone, die Plateaupotentiale entluden, zeigten sich Neurone mit überlappenden Eigenschaften. Um herauszufinden, ob die elektrophysiologische Einteilung der Neurone in Typ I-, Mix- und Typ II- Neurone möglicherweise in der unterschiedlichen Morphologie dieser Neurone ihre Entsprechung findet, wurde der Neurotransmittergehalt der abgeleiteten Neurone bestimmt. Alle drei Neuronengruppen wiesen eine große Variabilität der Somagrößen auf (Angabe als Oberflächenareal in μm^2 oder als Quer- x Längsdurchmesser in μm). Die Größe der Typ I- Neurone ($M = 106.59 \mu\text{m}^2$, $SD = 82.77 \mu\text{m}^2$, $n = 9$) variierte von maximal $428.04 \mu\text{m}^2$ (entspricht $25.6 \times 21.3 \mu\text{m}$) bis minimal $62.17 \mu\text{m}^2$ (entspricht $12 \times 6.6 \mu\text{m}$), umfasste damit also das gesamte Spektrum an Kleinhirnkernneuronengrößen, das anhand der Golgi- Färbetechnik von Chan - Palay (1977) ermittelt wurde. Das Spektrum der Typ II- Neurone ($M = 66.56 \mu\text{m}^2$, $SD = 56.73 \mu\text{m}^2$, $n = 12$) umfasste Zellen mit einer Somagröße von maximal $97.10 \mu\text{m}^2$ (entspricht $13.3 \times 9.3 \mu\text{m}$) bis minimal $41.45 \mu\text{m}^2$ (entspricht $8 \times 6.6 \mu\text{m}$). Die Mix- Neurone lagen mit einer Somagröße von maximal $150.72 \mu\text{m}^2$ ($12 \times 16 \mu\text{m}$) bis minimal $54.92 \mu\text{m}^2$ ($10.6 \times 6.6 \mu\text{m}$) zwischen den Typ I und Typ II- Neuronen, $M = 85.41 \mu\text{m}^2$, $SD = 67.89 \mu\text{m}^2$, $n = 13$. Die Kruskal-

Wallis one way ANOVA on ranks zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Somagrößen der Neurone. Wie der Post-hoc Test nach Dunn´s Methode zeigte, lag hierbei jedoch nur der Unterschied zwischen den Somagrößen der Typ I und Typ II- Neurone oberhalb des Signifikanzniveaus (MD = 10.75, $q = 2.60$, $p < .05$). Die Zeichnungen, die vor der Ableitung angefertigt wurden, zeigten sowohl bipolare als auch multipolare Neurone. Tendenziell zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen bipolarer Neurone in der Gruppe der Typ II- Zellen. Eine genaue Zuordnung der verschiedenen Morphologien zu den einzelnen Neuronentypen war jedoch aufgrund der Lage im Hirnschnitt und der sich daraus ergebenden Schwierigkeit, die Morphologie der Zellen genau einzufangen, nicht zu treffen. Während der elektrophysiologischen Ableitungen wurden 10 unterschiedlich große Neurone des in diese Studie einbezogenen Datensatzes mit Neurobiotin gefüllt. Es erwies sich als äußerst schwierig, kleinere Neurone beim Entfernen der Elektrode nicht aus dem Hirnschnitt herauszuziehen. Aus diesem Grund und aufgrund von Färbeartefakten, die eine eindeutige Identifikation der abgeleiteten Zelle unmöglich machten, war lediglich in zwei Kleinhirnschnitten das betreffende Soma klar zu erkennen. Hierbei handelte es sich jeweils um Typ I- Neurone mit einem Durchmesser von $16 \times 12 \mu\text{m}$ bzw. $20 \times 22.6 \mu\text{m}$. Die Form der Dendriten war in den angefärbten Neuronen nicht klar zu erkennen, in einem der beiden Neurone ließ sich jedoch ein dicker, proximaler Dendrit ausmachen (Abb.8 A1).

Die anschließende immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen GABA- Glutamat- und Glycin- Glutaraldehyd lieferte kein eindeutiges Resultat. Bei den beiden Neuronen, die erfolgreich mit Neurobiotin gefüllt werden konnten, zeigte sich ein weder für GABA noch für Glutamat eindeutig positives Färbeergebnis. Bei dem in Abb. 8 B2 dargestellten Neuron ist das Ergebnis für Glutamat im Vergleich mit anderen gefärbten Zellen schwach positiv. In Anbetracht der Variabilität und Vielzahl der schwach positiven Strukturen könnte dieses Resultat jedoch auch auf eine unspezifische Hintergrundfärbung zurück-zuführen sein. Die Glycinfärbung fiel in beiden Fällen im Bereich der Kerne so schwach aus, dass das betreffende Neuron nicht von Färbeartefakten zu differenzieren war. Die Schwierigkeit, ein positives Färberesultat zu erzielen

war lokal auf die Kleinhirnerne beschränkt, da im Kleinhirncortex derselben Semidünnschnitte glutamaterge, GABAerge und sogar glycinpositive Zellen nachzuweisen waren (Abb.8 D).

Nichtsdestotrotz fiel das Färberesultat in einigen, hier nicht gezeigten, Hirnschnitten so schwach aus, dass Neurone nicht nur in den Kleinhirnerne sondern auch im Kleinhirncortex nur schwer zu identifizieren waren. Ein möglicher Grund für das schwache Färberesultat der abgeleiteten Neurone könnte auf die verwendete Ableitetechnik zurückzuführen sein. Bei der Ableitung in der Ganzzellkonfiguration findet ein Austausch der Transmittermoleküle mit der Pipettenlösung statt. Eine Reduktion der Ableitungszeit könnte demnach das Färbeergergebnis möglicherweise verbessern. Eine Reduktion der Ableitungszeiten auf die für die elektrophysiologische Charakterisierung der Neurone notwendige Mindestzeit von fünf Minuten änderte jedoch nichts am qualitativ enttäuschenden Färberesultat.

Auch Kreuzreaktionen mit der Fixierlösung können das Färbeergergebnisse verschlechtern. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Fixative und ihre Auswirkung auf das Färberesultat untersucht. Zur Anwendung kamen die Standardlösung (5%iges Glutaraldehyd), die mit einer Lösung bestehend aus 4% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd und 0.2% Pikrinsäure sowie einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd, 0.5% Glutaraldehyd und 0.2% Pikrinsäure verglichen wurde. Die oben genannten Änderungen der Fixativlösung führten im Vergleich zur Standardlösung jedoch nicht zur erhofften Verbesserung der Färbung.

Untersuchungen zur glycinergen synaptischen Übertragung der Kleinhirnerne bildeten einen besonderen Schwerpunkt dieser Arbeit. Für den Nachweis glycinerner Boutons wurden Semidünnschnitte von Kleinhirnerneuronen unterschiedlichen Alters (P 7 bis P 21) in einer gesonderten Färbereihe ohne vorherige Ableitung mit Glycin- Glutaraldehyd behandelt. Da eine elektrophysiologische Charakterisierung der Neurone entfiel, erhielten die Tiere vor der Entnahme des Gehirns eine Fixativperfusion mit 5%igem Glutaraldehyd.

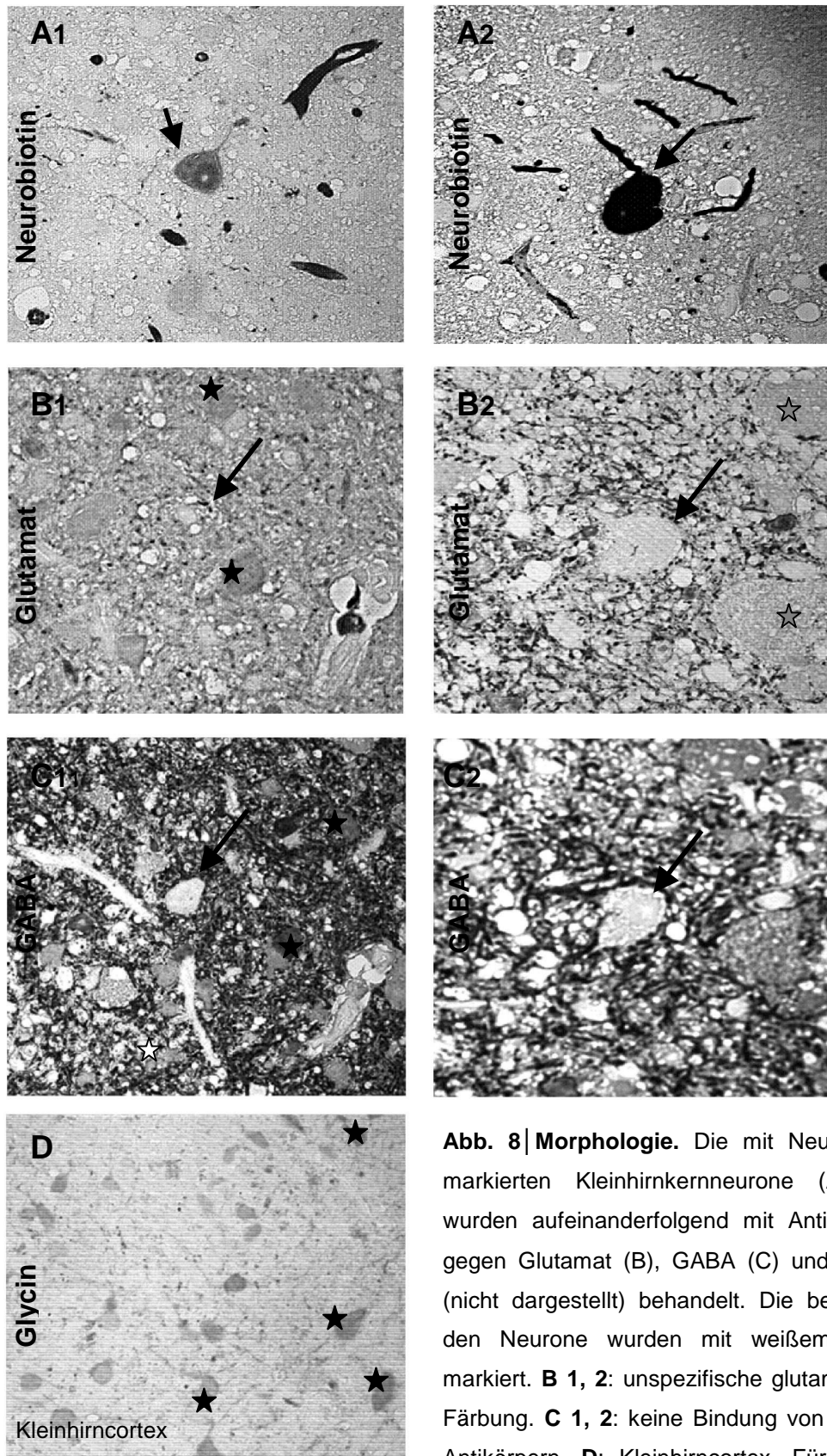


Abb. 8 | Morphologie. Die mit Neurobiotin markierten Kleinhirnkernneurone (A 1,2) wurden aufeinanderfolgend mit Antikörpern gegen Glutamat (B), GABA (C) und Glycin (nicht dargestellt) behandelt. Die betreffenden Neurone wurden mit weißem Stern markiert. **B 1, 2:** unspezifische glutamaterge Färbung. **C 1, 2:** keine Bindung von GABA-Antikörpern. **D:** Kleinhirncortex. Für Glycin

positive Zellen wurden exemplarisch mit Stern markiert. Das glycinerge Färberegebnis der mit Neurobiotin gefüllten Neurone in den Kleinhirnkernen war zu schwach und nicht zu beurteilen.

Wie bei den oben beschriebenen Neuronen fiel das Färberesultat für Glycin auch ohne vorherige Ableitung erneut zu schwach aus, um einzelne Neurone identifizieren zu können. Auch unter Verdoppelung der Konzentration des Antikörpers in folgenden Färbeserien wurde keine Verbesserung des Färberesultates erzielt.

3.3 Clusteranalyse

Um zu überprüfen, ob sich die Neurone aufgrund rein statistischer Unterschiede ebenfalls in drei Subpopulationen aufteilen lassen und ob diese Aufteilung möglicherweise mit der zuvor anhand von groben Kriterien (Plateaupotentiale, Aktionspotentialbreite, Nachhyperpolarisation) fest-gestellten übereinstimmt, wurde eine Clusteranalyse des gesamten Datensatzes durchgeführt. Mit der Clusteranalyse werden die durch die untersuchten Parameter beschriebenen Neurone so gruppiert, dass die Unterschiede zwischen den Objekten einer Gruppe bzw. eines „Clusters“ möglichst gering und die Unterschiede zwischen den Clustern möglichst groß sind. Mittels des nicht-hierarchischen k-means Verfahrens nach MacQueen (1967) wird hierzu zunächst eine Anfangspartition mit k Clustern erzeugt. Beginnend mit dem 1. Objekt im 1. Cluster werden für alle Objekte die euklidischen Distanzen zu allen Clusterschwerpunkten ermittelt. Trifft man auf ein Objekt, das zu dem Schwerpunkt des eigenen Clusters eine größere Distanz aufweist als zum Schwerpunkt eines anderen Clusters, wird dieses Objekt in dieses Cluster verschoben und die Schwerpunkte der veränderten Cluster neu berechnet. Dies wird so lange wiederholt, bis sich jedes Objekt in einem Cluster befindet, zu dessen Schwerpunkt es im Vergleich zu den übrigen Clustern die geringste Distanz aufweist. Die Cluster werden in diesem Verfahren also durch ihre Schwerpunkte (Mittelpunkte) repräsentiert.

Bei der Clusteranalyse des Datensatzes dieser Studie wurden der schnellen Nachhyperpolarisation sowie dem „breaking point“ numerische Werte zugeordnet (fAHP = 1, breaking point = 0.5). Somagröße, Alter der Neurone und alle Parameter, die zuvor unter Ruhebedingungen bestimmt wurden, flossen in die Analyse ein. Eine Testung mittels k-means-Verfahren auf drei

mögliche Subpopulationen ergab eine leichtgradig abweichende Aufteilung der Neurone innerhalb der bestimmbareren größeren Untergruppen: jeweils zwei der zuvor als Typ I bzw. als Typ II bezeichneten Neurone wurden aufgrund ihrer statistischen Werte der Gruppe der Mix-Neurone zugeordnet. Eines der Mix-Neurone wurde wiederum den Typ I- und eines den Typ II- Neuronen zugeordnet. In der Varianzanalyse wurde in absteigender Reihenfolge der Nachhyperpolarisation, der Zeitkonstante und der Aktionspotentialbreite die größte Bedeutung zur Unterscheidung der Neurone beigemessen. Die im Vergleich zur zuvor getroffenen Einteilung in der Clusteranalyse unterschiedlich zugeordneten Neurone wiesen bezüglich dieser Parameter jeweils Werte nahe der Grenze der zuvor bestimmten Mittelwerte (s. Tab.2) auf. Im Einzelnen zeigten die beiden zuvor als Typ I klassifizierten Neurone kein klares fAHP sondern nur einen Stop der Repolarisationskurve. Ihre Aktionspotentialbreite lag mit $M = 1.96 \text{ ms}$ ($SD = 0.42$) resp. $M = 2.0 \text{ ms}$ ($SD = 0.74$) nahe der Grenze zu den Mix- Neuronen. Die Zeitkonstante lag bei 46 ms resp. 38 ms . Die zuvor als Typ II- Neurone bezeichneten Zellen zeigten in der Clusteranalyse im Mittel eine Aktionspotentialbreite von $M = 2.12 \text{ ms}$ ($SD = 0.81$) resp. $M = 4.36 \text{ ms}$ ($SD = 1.02$) und eine Zeitkonstante von 24.69 ms resp. 17.87 ms . Ein fAHP war in keinem der Fälle zu beobachten. Im ersten Fall führte demnach am wahrscheinlichsten das grenzwertig schmale Aktionspotential, im zweiten Fall die kurze Zeitkonstante zu einer Zuordnung der Zellen zu den Mix-Neuronen. Unter den zuvor als Mix bezeichneten Neuronen wurde eines aufgrund eines vorhandenen „breaking points“ den Typ I- Neuronen zugeordnet, das zweite am ehesten aufgrund seiner Aktionspotentialbreite, die mit 4.36 ms im Bereich der Typ II- Neurone lag. Nichtsdestotrotz wies dieses Neuron Plateaupotentiale auf. Die Mittelpunkte der einzelnen Variablen innerhalb der Cluster sowie die euklidischen Distanzen zwischen den Clustern zeigt Abb. 9 A. Anschließend wurde eine Clusteranalyse mit Testung auf zwei Subpopulationen durchgeführt. Diese Analyse ergab eine eindeutigere Aufteilung. Die zuvor als Typ I klassifizierten Neurone stimmten hierbei mit einer der ermittelten Untergruppen überein. Die als Mix bezeichneten Neurone wurden bis auf eines der zweiten Gruppe zugeordnet, die die gesamte Population der Typ II- Zellen enthielt. Das

Mix- Neuron, das den Typ I- Zellen zugeordnet wurde war jenes, das aufgrund des Vorhandenseins eines „breaking points“ auch in der Analyse zuvor diesen Neuronen zugeordnet wurde. Die Mittelpunkte der einzelnen Variablen innerhalb der Cluster sowie die euklidischen Distanzen zwischen den Clustern zeigt Abb. 9B.

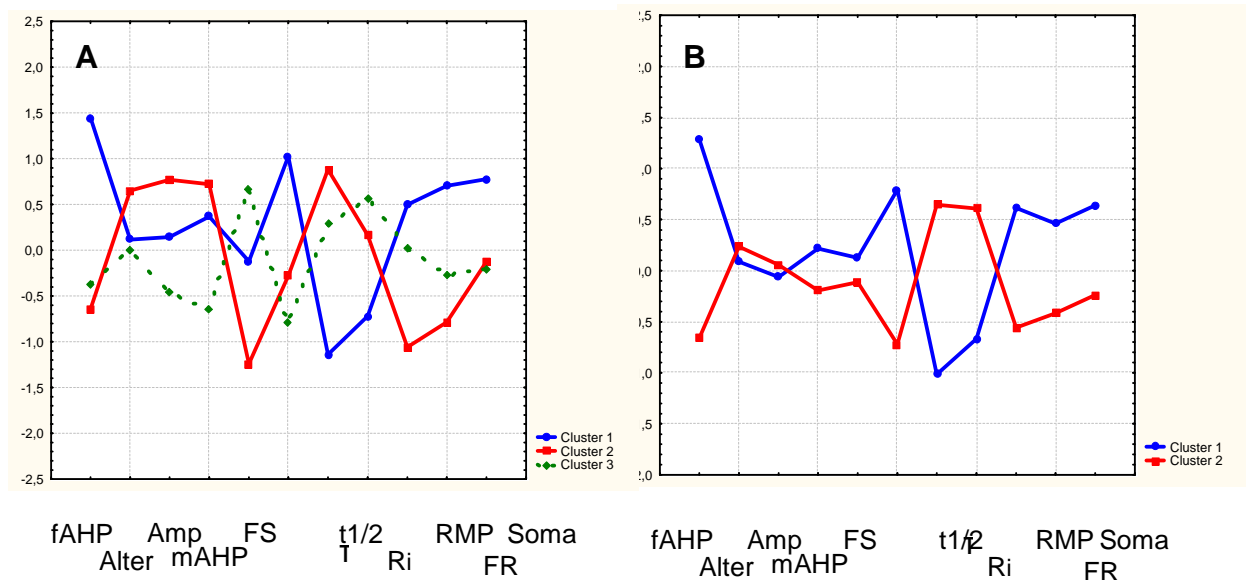


Abb. 9 | Clusteranalyse (fAHP = schnelle Nachhyperpolarisation; Amp = Amplitude; mAHP = mittlere Nachhyperpolarisation; FS = Feuerschwelle; τ = Zeitkonstante; t1/2 = Aktionspotentialbreite; Ri = Eingangswiderstand; RMP = Ruhemembranpotential; FR = Feuerrate; Soma= Somagröße). **A:** Testung auf drei mögliche Subpopulationen. Im Cluster 1 (blau) befindet sich der Hauptteil der Typ I- Neurone, im Cluster 2 (rot) der Großteil der Typ II- Neurone. Dem dritten Cluster (grün) wurden sowohl die Mix- Neurone als auch jeweils zwei der zuvor als Typ I bzw. Typ II klassifizierten Neurone zugeordnet, während jeweils ein Mix- Neuron aufgrund der Lage der Werte nahe den Mittelwertgrenzen den beiden anderen Clustern zugeordnet wurde. Der Kurvenverlauf macht deutlich, dass während der Analyse sowohl dem Vorhandensein einer biphasischen Nachhyperpolarisation als auch der Zeitkonstante und Aktionspotentialbreite die größte Bedeutung zur Unterscheidung der Neurone beigemessen wurde. **B:** Testung auf zwei mögliche Subpopulationen. Der hierbei ermittelte erste Cluster (blau) umfasst die gesamte Population der zuvor als Typ I klassifizierten Neurone. Zusätzlich wurde dieser Gruppe ein grenzwertiges Mix- Neuron zugeordnet, das einen breaking point der Repolarisationskurve zeigte. Die übrigen Mix- Neurone wurden zusammen mit der Gesamtheit der Typ II- Neurone dem zweiten Cluster (rot) zugeordnet.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Aktionspotentialparameter der Mix-Neurone tatsächlich so von den Typ I- Neuronen unterscheiden, dass sie sich hierbei unter besonderer Gewichtung der Mittelpunkte von fAHP, Zeitkonstante und Aktionspotentialbreite eher den Typ II- Neuronen zuordnen lassen. Nichtsdestotrotz entluden diese Neurone Plateaupotentiale und zeigten andere, zu den Typ II- Neuronen unterschiedliche Charakteristika, die in diese Clusteranalyse nicht eingeschlossen wurden. Der Kurvenverlauf der euklidischen Distanzen in Abb. 9A zeigt, dass es auch bezüglich der Parameter Feuerschwelle, Aktionspotentialamplitude und mAHP größere Distanzen zwischen den ermittelten Clustern der Mix- und Typ II- Neuronen gab, die bei größerem Power der Studie vielleicht signifikante Ergebnisse in der Varianzanalyse ergeben würden.

6.4 Glycinerge synaptische Transmission in den Kleinhirnkernneuronen

Die Bedeutung von Glycin als synaptischer Neurotransmitter ist für Regionen wie Rückenmark, Hirnstamm und Retina wohlbekannt. (Werman et al, 1967, Wu und Ortel, 1986; Cunningham et al. 1980). Seine Rolle in den Kleinhirnkernen ist bisher weitestgehend unbekannt. Immunhistochemische Studien belegten das Vorhandensein glycinergere Neurone kleinen Somadurchmessers in allen drei Kernanteilen. Darüber hinaus fanden sich glycinerge bzw. gemischt glycinerg/GABAerge Boutons, die ausschließlich große, vermutlich glutamaterge Neurone, kontaktierten. (Chen und Hillman, 1993; De Zeeuw et al., 1995; Bährle et al., 1997; Sultan et al., 2001). Die Kleinhirnkernneurone exprimieren mRNA für den Glycintransporter GLYT2 (Luque et al., 1995). Darüber hinaus bestätigten in- situ Hybridisationsstudien das Vorhandensein von β - und $\alpha 1$ - Untereinheiten des Glycinrezeptors (Fujita et al., 1991; Sato et al., 1991; Malosio et al., 1992). Zusätzlich zu diesen Daten beschrieb eine kürzlich erschienene Studie von Kawa et al. (2003) die glycinerge Inhibition in neonatalen und unausgereiften Kleinhirnkernneuronen. Bisher unbekannt ist jedoch, ob diese Synapsen auch in ausgereiften Neuronen

vorhanden sind und, falls dies der Fall ist, welchen Veränderungen sie während ihrer funktionellen Ausreifung unterliegen.

Im zweiten Teil dieser Studie wurde das Vorhandensein glycinerner Rezeptoren und Synapsen in den Kleinhirnkernneuronen neonataler, jugendlicher und jung-adulter Ratten (P7 bis P23) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass glycinerge Synapsen in neonatalen und jung- adulten Neuronen (> P17) vorhanden und funktional sind, während sie im jugendlichen Alter (P13 - P17) eine vorübergehende nicht- funktionale Phase (sogenannte „silent phase“) aufweisen. Diese könnte eine normale Phase während der Ausreifung glycinerner Verbindungen darstellen (Pedroarena et al., 2001).

6.4.1 Glycin bewirkt Einwärtsströme in den Kleinhirnkernneuronen

Zunächst wurde untersucht, ob Glycinrezeptoren in den Kleinhirnkernen jugendlicher sowie jung- adulter Ratten vorhanden sind und welche Eigenschaften diese aufweisen. Die Zellen wurden im „Spannungsklemmenmodus“ (voltage clamp) abgeleitet und die Stromantworten nach Zugabe von Glycin zum Badmedium gemessen. Die Zugabe von Glycin in Konzentrationen über 10 μM rief in allen beobachteten Neuronen Einwärtsströme hervor. Ein repräsentatives Neuron zeigt Abb. 10 A. Die Charakteristika der glycinvermittelten Ströme wurden in Neuronen mit großem Somadurchmesser (>16 μm) untersucht, bei denen es sich vermutlich um glutamaterge Projektionsneurone handelt. Hierbei zeigte sich, dass Zeitverlauf und Amplitude der Ströme von der Glycinkonzentration abhängig waren. Konzentrationen unter 100 μM führten zu einer langsam ansteigenden Stromantwort, die anschließend einen Gleichgewichtszustand erreichte, der über einen Zeitraum von ca. 50 Sekunden aufrechterhalten wurde. Anzeichen einer Desensitisation zeigten sich in diesem Falle nicht. Konzentrationen über 100 μM bewirkten Stromantworten, die in weniger als einer Sekunde ein Maximum erreichten, um dann über mehrere Sekunden bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes abzufallen. Die Dosis- Wirkungskurve (Abb. 10 B), bei der die durch unterschiedliche Glycinkonzentrationen hervorgerufenen

maximalen Ströme gemessen wurden ($n = 6$), zeigte ein schrittweises Ansteigen der Werte in Abhängigkeit von der Glycinkonzentration, bis ein Sättigungswert erreicht war. Die normalisierten und gemittelten Daten wurden am besten mit folgender Gleichung erfasst: $f = I_{\max}/(1+(EC_{50}/C)^{nH})$, wobei I_{\max} die maximale Wirkung und C die Glycinkonzentration bezeichnet.

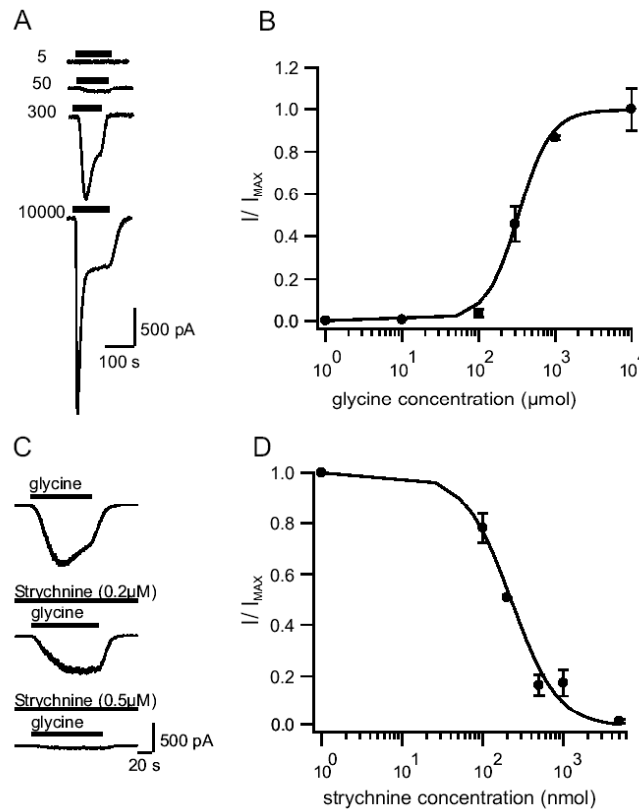


Abb. 10 | Glycineffekte in großen Kleinhirnkernneuronen. **A:** Unterschiedliche Konzentrationen von Glycin (in µM) rufen einwärts gerichtete Ströme hervor. Je höher die Konzentration, desto ausgeprägter der Effekt. Die Lösung enthielt Kynurensäure (3mM), Gabazin (10µM), TTX (1µM) und CdCl₂ (200µM). Der Zeitpunkt der Glycinapplikation wird durch den Balken über der jeweiligen Stromspur angedeutet. **B:** Dosis-Wirkungskurve für Glycin. Der Plot stellt den jeweiligen Anteil des maximalen Stromes dar, der durch unterschiedlich hohe Glycinkonzentrationen hervorgerufen wurde ($n=9$). Die durchgehende Linie repräsentiert den Fit zur Hill-Gleichung. **C:** Der blockierende Effekt von Strychnin ist dosisabhängig. Die obere Stromspur verdeutlicht den Strom, der allein durch Glycin (300 µM) hervorgerufen wurde. Die Ableitbedingungen waren dieselben wie unter A. Die mittlere und untere Spur zeigt den Effekt von 0.2 und 0.5µM Strychnin unter derselben Glycinkonzentration. **D:** Dosis-Wirkungskurve für Strychnin ($n=8$) unter denselben Ableitbedingungen wie in A.

EC₅₀ ist die Konzentration von Glycin, die einen halb-maximalen Strom verursacht, n_H ist der Hill-Koeffizient. Die Gleichung erzielte Werte (n_H = 2.0; EC₅₀ = 329 μM), die vergleichbar waren mit Resultaten früherer Studien (Kaneda et al., 1995; Jonas et al., 1998; Chattipakorn und McMahon, 2002; Kawa, 2003). Die durch Glycin hervorgerufenen Ströme reagierten auf die Zugabe von Strychnin zum Badmedium mit einer Suppression des durch Glycin hervorgerufenen Stromes (Abb. 10 C). Die Empfindlichkeit der Neurone auf Strychnin wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antagonisten und anschließender Messung der Amplitude der glycinergen Ströme untersucht (Abb. 10 D, n = 8). Zu diesem Zwecke wurde der Hirnschnitt über mehrere Sekunden mit Strychnin überspült, bevor Glycin zum Badmedium hinzugefügt wurde, um sicherzustellen dass eine ausreichende Konzentration von Strychnin im Hirnschnitt erreicht wurde. Die normalisierten und gemittelten Daten wurden am besten mit folgender Gleichung erfasst: $f = I_{max}/(1+(C/IC_{50})^{n_H})$, wobei I_{max} die maximale Amplitude des Stromes in Abwesenheit des Antagonisten und C die Strychninkonzentration bezeichnet. IC₅₀ ist die Konzentration von Strychnin, die zur Supprimierung eines halb- maximalen Stromes notwendig ist und n_H ist der Hill-Koeffizient. Dies erzielte für IC₅₀ einen Wert (223 nM), der im Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien eine spezifische Blockade von Glycinrezeptoren vermuten lässt (Jonas et al., 1998). In Übereinstimmung mit der Annahme, dass die Ströme, die durch Glycin hervorgerufen wurden, hauptsächlich von Chloridionen getragen wurden, kehrten sich die abgeleiteten Ströme bei einem Membranpotential um 0 mV um, ein Wert, der sich dem Nernst Gleichgewichtspotential für Chloridionen unter den gegebenen Ableitbedingungen annähert (1 mV). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Kleinhirnkernneurone großen Somadurchmessers von jugendlichen und jung- adulten Ratten funktionell aktive, strychninempfindliche Glycinrezeptoren aufweisen.

6.4.2 Glycinerge synaptische Aktivität ist in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen nicht nachweisbar

Anschließend wurde überprüft, ob jene nachweisbaren Glycinrezeptoren über synaptisch ausgeschüttetes Glycin aktiviert werden können. Eine erste Serie von Experimenten wurde an Hirnschnitten jugendlicher Ratten eines Alters von P12 bis P17 durchgeführt. Wie in früheren Studien beschrieben wurde, zeigten die Kleinhirnkernneurone unter Glutamatrezeptorenblockern (4 mM Kynurensäure) spontane synaptische Ereignisse (IPSCs), die vollständig und reversibel durch Zugabe von GABA_A-Antagonisten geringer Konzentration (3 μ M Bicucullin bzw. 300 nM Gabazin) blockiert werden konnten (Anchisi et al., 2001; Telgkamp und Raman, 2002; Linnemann et al. 2003; Pedroarena und Schwarz, 2003). Die beobachteten synaptischen Ereignisse können demnach auf eine Aktivierung GABAerger Synapsen zurückgeführt werden (Abb. 11 A). Andere Studien zeigten, dass synaptisch freigesetzte Neurotransmitter extrasynaptische Rezeptoren über ein sogenanntes „Spillover“ („Überlaufen“) zu angrenzenden Synapsen aktivieren konnten, was an der Postsynapse zu einem tonischen Antwortpotential mit langsamer Kinetik führte (Kullmann, 2000). Die möglicherweise adaptive Bedeutung dieser Form der Signaltransduktion ist bisher nicht vollständig bekannt.

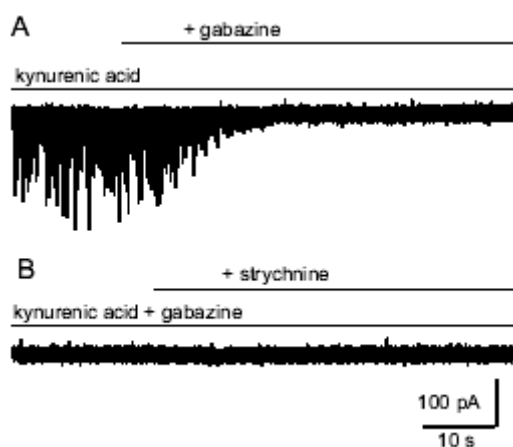


Abb. 11 | Spontane inhibitorische post-synaptische Ströme (IPSCs). Die in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen nachgewiesenen IPSCs sind GABAerg. **A:** Exemplarische Ableitung eines jugendlichen Neurons (P16) zeigt die Blockade aller spontanen inhibitorischen synaptischen Ströme durch den GABA_A-Rezeptorenblocker Gabazin (10 μ M). Während der gesamten Ableitung wurde Kynurensäure (3 mM) dem Badmedium beigefügt. **B:** Dasselbe Neuron wie in A vor und nach der Applikation von Strychnin (1 μ M). Kynurensäure (3 mM) und Gabazin (10 μ M) wurden während der gesamten Ableitung dem Badmedium beigefügt. Die Applikation von Strychnin verursachte keine Veränderung der Stromspur.

Glycin könnte in den Kleinhirnkernneuronen demnach statt schneller postsynaptischer Potentiale über die Aktivierung extrasynaptischer Glycinrezeptoren ein langsames, tonisches Antwortpotential auslösen. Um diese Vorstellung zu überprüfen wurde untersucht, ob die Zugabe des Glycinantagonisten Strychnin ($1 - 2 \mu\text{M}$) zum Badmedium eine Änderung des Haltestromes bewirkt. Unter Zugabe von Strychnin zum Badmedium zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der abgeleiteten Stromspur ($n=3$). Extrasynaptische Glycinrezeptoren wurden durch ein Spillover von spontan ausgeschüttetem Glycin demnach nicht oder nur unzureichend aktiviert (Abb. 11 B). Das Fehlen glycinerge IPSCs könnte darin begründet sein, dass diese Potentiale nur sehr vereinzelt auftreten. Aus diesem Grunde wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens durch Anwendungen erhöht, die erwiesenermaßen die Ausschüttung von Neurotransmittern begünstigen. In Anlehnung an Kawa et al. (2003) wurde das Auftreten strychninsensitive IPSCs unter ACSF mit einer hohen Konzentration von Kalium in neonatalen (P7) und jugendlichen Kleinhirnkernneuronen (P14 bis P15) untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kawa et al. (2003) konnten auf diese Weise strychninsensitive IPSCs in neonatalen Kleinhirnkernneuronen hervorgerufen werden (Abb. 12 A links). Im Gegensatz dazu wurden in jugendlichen Neuronen (P14 bis P15, $n = 3$) keine postsynaptischen Ereignisse beobachtet, die unempfindlich waren gegenüber GABA_A - und Glutamatrezeptorenblockern (Abb. 12 A rechts). In einem zweiten Versuch, auch in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen glycinerge IPSCs hervorzurufen, wurden Kaliumkanalblocker eingesetzt. Über eine Erhöhung der Ausschüttungswahrscheinlichkeit der Vesikel an der Präsynapse wird hierüber die Frequenz spontaner postsynaptischer Potentiale erhöht (Southan und Robertson, 1998; Tan und Llano, 1999). Nach Zugabe von 4-Aminopyridin ([4-AP], $250 \mu\text{M}$) zum Badmedium im Beisein von Glutamatantagonisten wurde erfolgreich die Frequenz postsynaptischer Potentiale erhöht (Abb. 12 B oben). Ein ähnliches, jedoch leicht abgemildertes, Ergebnis wurde nach der Zugabe von Tetraethylammonium TEA erzielt ($1-5 \text{ mM}$, nicht gezeigt). Wurden GABA_A -Antagonisten appliziert (Gabazin $10 \mu\text{M}$) zeigte nur eines von insgesamt zwölf

Neuronen weiterhin spontan auftretende IPSCs (Abb. 12 B, unten). Dies zeigt, dass die durch den Kaliumkanalblocker induzierte spontane postsynaptische Aktivität in den meisten Fällen auf eine Aktivierung von GABA_A- Rezeptoren zurückzuführen war. Die Ableitung des einzig positiven Neurons zeigt Abb. 12 C.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob unter den beschriebenen Bedingungen erhöhter Spontanaktivität extrasynaptische Glycinrezeptoren durch Spillover von synaptisch ausgeschüttetem Glycin aktiviert werden können. Unter Applikation von Strychnin (1 - 2 μ M) war jedoch keine Veränderung des abgeleiteten Stromes festzustellen (n= 5), was darauf hinweist, dass auch extrasynaptische Glycinrezeptoren unter diesen Bedingungen nicht signifikant aktiviert wurden. Das Ausbleiben glycinerg IPSCs unter Zusatz von Kaliumkanalblockern könnte auf eine unzureichende Empfindlichkeit der glycinergen Präsynapse gegenüber diesen Stoffen zurückzuführen sein. Aus diesem Grunde wurden im nächsten Schritt glycinerge synaptische Endigungen über extrazelluläre elektrische Stimulation direkt aktiviert. Während der Ableitung wurden GABA_A- und Glutamatrezeptorantagonisten dem Badmedium beigefügt. Unter Anwendung dieses Prozederes konnten einwärtsgerichtete postsynaptische Ströme abgeleitet werden, die sich bei 0 mV umkehrten, jedoch nicht durch Strychnin (1-2 μ M) blockierbar waren (Abb. 12 D). Im Gegenteil wurden diese Antworten durch GABA_A- Rezeptorenblocker unterdrückt. Diese Ströme waren demnach nicht auf glycinerge sondern vielmehr auf GABA_A- Rezeptoren zurückzuführen. Falls durch dieses Paradigma trotzdem nur ein kleiner Anteil glycinerg Terminalien aktiviert werden konnte und/oder die ausgeschüttete Transmittermenge nur gering war, könnten diese Ergebnisse auch auf die Schwierigkeit zurückzuführen sein, quantitativ und qualitativ geringe synaptische Ereignisse ausfindig zu machen. Aus diesem Grunde kamen in der folgenden Serie von Experimenten hypertone Lösungen zur Anwendung. Nach Rosenmund und Stevens (1996) bewirken diese die Ausschüttung aller neurotransmittertragenden Vesikel der Präsynapse. Zu diesem Zwecke wurde der normalen ACSF Saccharose beigefügt, um die Osmolarität auf 550 mOsm

zu erhöhen. Auch unter dieser Behandlung konnten jedoch keine synaptischen Ströme nachgewiesen werden, die resistent waren gegenüber GABA_A- oder Glutamatrezeptorenblockern (n=3, Abb. 12 E). Zusammenfassend scheinen diese Experimente darauf hinzudeuten, dass funktionelle glycinerge Synapsen in den Kleinhirnkernneuronen jugendlichen Alters nicht vorhanden sind. Dies wird komplementiert von der Beobachtung, dass unter Anwendung oben beschriebener Lösungen in den Neuronen neonataler Tiere sehr wohl glycinerge Ströme nachgewiesen werden konnten.

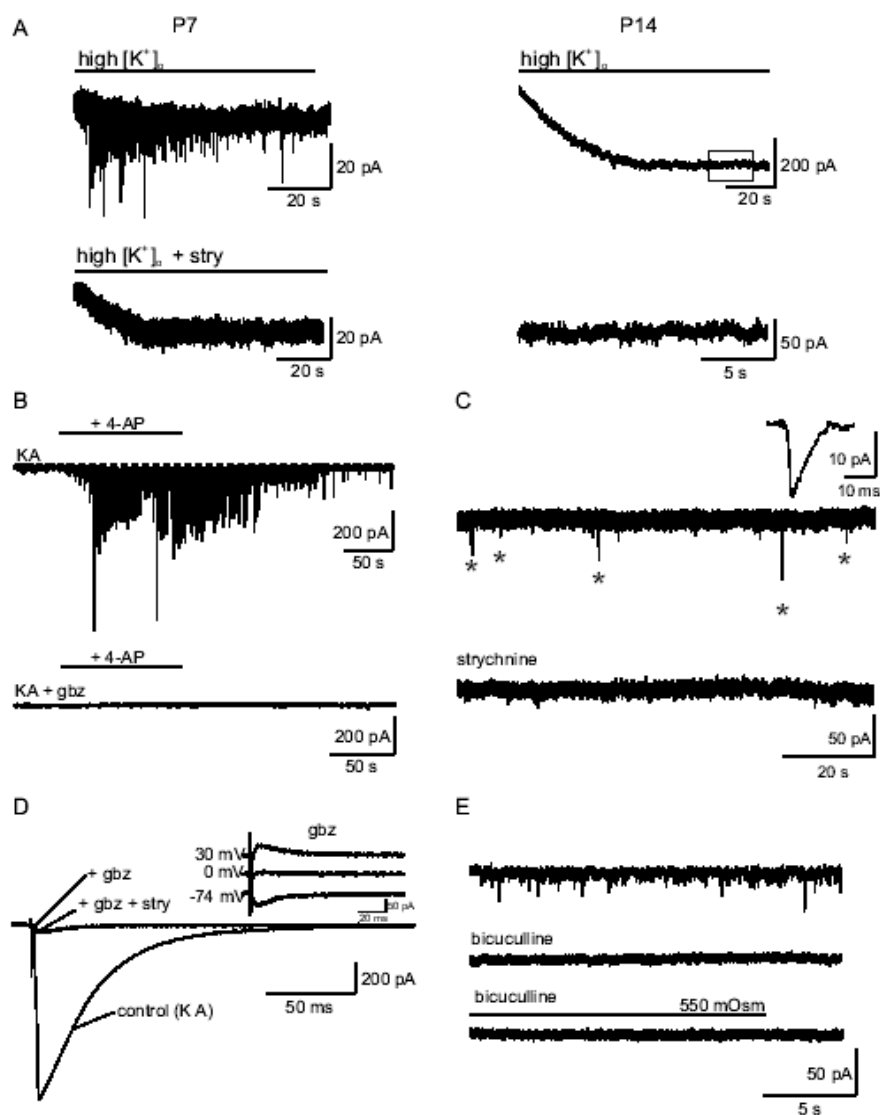


Abb. 12 | Trotz Erhöhung der Neurotransmitterausschüttung lassen sich keine glycinergen IPSCs in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen beobachten. A: Eine erhöhte

Kaliumkonzentration bewirkt strychninsensitive Ströme in neonatalen Neuronen. In Zellen jugendlichen Alters bleibt diese Antwort aus. *Links oben*: Ableitung eines neonatalen Kleinhirnkernneurons (P7) unter Applikation von 22.5 mM K⁺-ACSF, 3 mM Kynurensäure und 40 µM Bicucullin. Die synaptischen Ereignisse sind einem langsamen einwärtsgerichteten Strom überlagert. *Links unten*: Dieselbe Anwendung unter Zugabe von 2 µM Strychnin löst keine synaptischen Ereignisse aus (Haltepotential: -50 mV). *Rechts oben*: Antwortspur eines jugendlichen Kleinhirnkernneurons (P14) unter Applikation von 40 mM K⁺-ACSF, 3 mM Kynurensäure und 10µM Gabazin. Das markierte Areal ist darunter noch einmal vergrößert dargestellt. Synaptische Ereignisse fehlen völlig (Haltepotential: -71 mV). **B**: Die Zugabe des Kaliumkanalblockers resultiert in einem Anstieg der inhibitorischen synaptischen Aktivität jugendlicher Kleinhirnkernneurone. Diese Ereignisse werden jedoch vollständig durch GABA_A-Antagonisten geblockt. *Oben*: Ableitungen jugendlicher Kleinhirnkernneurone (P16) nach und während der Applikation von 250 µM 4-AP und 2.5 mM TEA unter Beisein von 3 mM Kynurensäure. *Unten*: Ableitungen desselben Neurons unter denselben Bedingungen mit zusätzlicher Applikation von 10 µM Gabazin. **C**: In einem einzigen Fall (P16) verursacht der Kaliumkanalblocker eine strychninsensitive, Glutamat- und GABA_A- Antagonisten gegenüber resistente, synaptische Aktivität. *Oben*: synaptische Aktivität (*), die über die Applikation von 250 µM 4-AP und 2.5 mM TEA ausgelöst wurde im Beisein von 3 mM Kynurensäure und 10 µM Gabazin. Das Inset zeigt den gemittelten Wert der beobachteten IPSCs. Es zeigt sich eine schnelle Kinetik (Aktionspotentialbreite [t_{1/2}] M = 5.2 ms, Zeit bis zum 20 – 80%igen Abfall M = 4.53 ms). Die postsynaptischen Ströme treten mit geringer Frequenz auf (0.15 Hz). *Unten*: Nach der Applikation von Strychnin (1µM) ließ sich kein IPSC mehr ableiten. **D**: Mittels extrazellulärer Stimulation ließen sich in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen keine strychninsensitiven IPSCs mehr ableiten. Die übereinandergelagerten Stromspuren zeigen 1) die Antworten jugendlicher Kleinhirnkernneurone (P15) durch extrazelluläre Stimulation unter Kontrollbedingungen (4 mM Kynurensäure). Die Ableitung zeigt einen schrittweisen Anstieg der Steigung der Stromkurve und eine relativ lange Dauer, vermutlich aufgrund einer asynchronen Aktivierung mehrerer Boutons. 2) Der Hauptteil der Antworten wurde unter Zugabe von 10 µM Gabazin [gbz] unterdrückt. 3) Die Applikation von 2 µM Strychnin [stry] unterdrückt die restliche Antwort nicht. Das Inset verdeutlicht die umgekehrte Stromantwort, die trotz einer Blockade durch Gabazin verbleibt. **E**: Die Applikation hypertoner Lösungen (550 mOsm) ruft in jugendlichen Neuronen keine glycinergen synaptischen Ströme hervor. *Oben*: Ableitung eines Neurons (P14) unter Kontrollbedingungen (3 mM Kynurensäure). Die Zugabe von Bicucullin (*Mitte*, 20µM) supprimiert die synaptische Aktivität. *Unten*: Die Applikation hypertoner Lösungen (angezeigt durch den Balken „550 mOsm“) induziert keine weitere Änderung der spontanen Aktivität.

6.4.3 Glycinerge synaptische Aktivität in Kleinhirnkernneuronen jung-adulter Ratten

Glycinerge Synapsen unterliegen während der ersten postnatalen Wochen einer Vielzahl entwicklungsbedingter Veränderungen. Vor diesem Hintergrund könnte das Fehlen glycinergere Synapsen während des Zeitraums von P13 - P17 auf ein vorübergehendes Phänomen zurückzuführen sein, das während des physiologischen Reifungsprozesses dieser Synapsen auftritt. Um diese Vorstellung zu überprüfen, wurden glycinerge synaptische Ströme in Kleinhirnkernneuronen höheren Alters (> P17) abgeleitet. In den meisten dieser Experimente, die an Neuronen großen Somadurchmessers jung-adulter Ratten (P18 - P23) durchgeführt wurden, konnte eine Spontanaktivität durch Glutamat und GABA_A- Rezeptorantagonisten vollständig unterdrückt werden, vergleichbar mit dem Resultat jugendlicher Neurone (Abb. 13 A). Im Gegensatz zu den Ableitungen dieser Neurone führte die Applikation von Kaliumkanalblockern unter Beisein von Glutamat und GABA_A- Antagonisten bei jung-adulter Tieren jedoch tatsächlich zu synaptischen Strömen, die reversibel durch den Glycinrezeptorantagonisten Strychnin supprimiert werden konnten (1 - 2 μ M, 6 von 7 Neuronen, Abb. 13 B - D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass funktionelle glycinerge Synapsen in ausgereiften Kernneuronen tatsächlich vorhanden sind und stützen die Hypothese einer entwicklungsbedingten Veränderung dieser Synapsen im Bereich der zweiten Lebenswoche. Diese Veränderungen könnten für die Funktionalität der glycinergen Neurotransmission von großer Bedeutung sein. Im nächsten Schritt wurden diese entwicklungsbedingten Veränderungen genauer untersucht, die mit dem Fehlen einer glycinergen Neurotransmission in jugendlichen Neuronen verknüpft sein könnten.

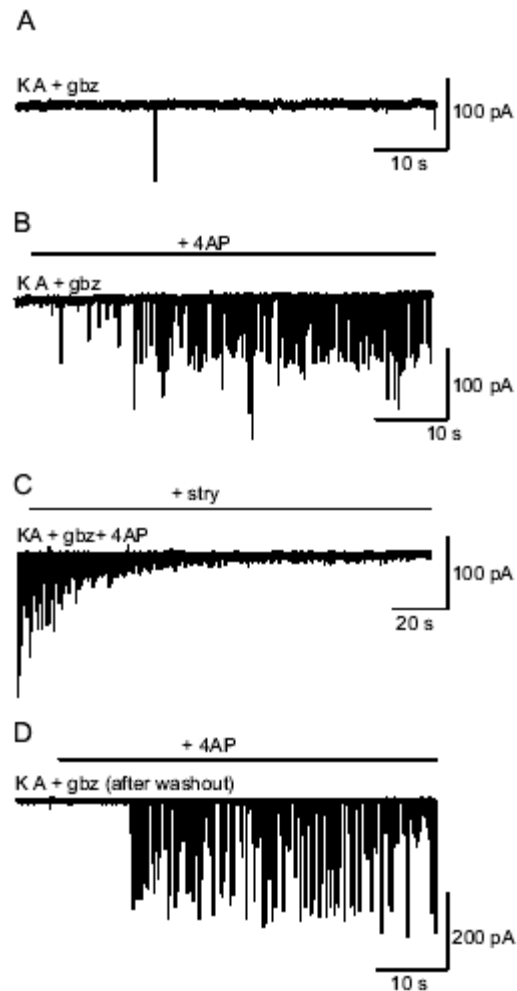


Abb. 13 | Strychninsensitive synaptische Ströme unter Applikation von K⁺-Kanalblockern in jung- adulten Kleinhirnkernneuronen. **A:** Repräsentative Ableitung eines adulten Neurons (P19) unter Zusatz von Glutamat- und GABA_A-Rezeptorantagonisten (4mM Kynurensäure, 10 μ M Gabazin). **B:** Die zusätzliche Applikation von 4-AP (250 μ M) führt zu einem starken Anstieg der spontanen synaptischen Aktivität im Gegensatz zum Ergebnis jugendlicher Neurone (siehe Abb. 12). **C:** Unter zusätzlicher Applikation von 2 μ M Strychnin wurde eine synaptische Aktivität vollständig unterdrückt. **D:** Nach dem Auswaschen (20 Minuten in Kontroll- ACSF) rief die Applikation des K⁺-Kanalblockers (250 μ M) im Beisein von 4 mM Kynurensäure und 10 μ M Gabazin erneut einen Anstieg der synaptischen Aktivität hervor. Alle Ableitungen wurden an demselben Neuron durchgeführt.

6.4.4 Auswirkungen von Pikrotoxin

Eine der entwicklungsbedingten Veränderungen, die sich an glycinergen Synapsen während der ersten postnatalen Wochen beobachten lässt, besteht in einer abweichenden Zusammenstellung der Untereinheiten des Glycinrezeptors (GlyR). Hierbei kommt es zu einem Wechsel von der homomeren, vermutlich extrasynaptisch lokalisierten, Form (bestehend aus fünf α - Untereinheiten) zur heteromeren, vermutlich synaptisch lokalisierten, Form (bestehend aus drei α - und 2 β - Untereinheiten). Darüber hinaus kommt es zu einem Wechsel der von der bei Geburt vorherrschenden $\alpha 2$ - zur $\alpha 1$ - Untereinheit (Akagi und Miledi, 1988; Becker et al., 1988; Malosio et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Singer et al., 1998; Ye, 2000; Mangin et al., 2002). Das Vorhandensein der β - Untereinheit macht den Glycinrezeptor unempfindlich gegenüber einer Blockade durch Pikrotoxin (Pribilla et al., 1992). Pikrotoxin, eigentlich bekannt als GABA_A- Antagonist, supprimiert ebenso die Antwort des Glycinrezeptors auf Glycin. Hierbei wird sowohl die mittlere Öffnungszeit des Kanals als auch die relative Frequenz seiner Öffnung vermindert. Der Antagonist verdrängt Strychnin nicht aus seiner Rezeptorenbindung (Legendre 2001). Die unterschiedliche Blockierbarkeit der Glycinrezeptoren durch Pikrotoxin in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung von Untereinheiten wurde in zahlreichen Studien genutzt, um über die Bindungsfähigkeit dieses Stoffes auf die vorhandenen Untereinheiten des betreffenden Rezeptors zu schließen (Kaneda et al., 1995, Legendre, 1997; Kungel und Friauf, 1997; Ye, 2000; McCool und Farroni, 2001; Chattipakorn und McMahon, 2002).

Vor diesem Hintergrund wurden die Auswirkungen von Pikrotoxin auf glycinabhängige Ströme in jugendlichen und jung- adulten Kleinhirnkernneuronen untersucht. Darüber hinaus wurde der Effekt von Pikrotoxin auf glycinerge IPSCs in jung- adulten Neuronen untersucht (Abb. 14). Die Ergebnisse zeigen, dass Pikrotoxin (40 μ M) die Amplitude glycinabhängiger Ströme in Hirnschnitten jugendlicher Ratten im Mittel lediglich um 27% supprimieren konnte (n = 3). In ausgereiften Neuronen wurde das Ausmaß glycinerges Ströme nur um 13% vermindert (n = 3). Basierend auf dem

dokumentierten IC_{50} -Wert für Pikrotoxin von 6 μ M für rekombinante homomere Rezeptoren und 300 bis >1000 μ M für die heteromere Form (Pribilla et al., 1992) legt dieses Ergebnis nahe, dass die homomere Form des Glycinrezeptors in den Kleinhirnkernen jugendlicher und jung- adulter Ratten praktisch nicht vorhanden sein kann.

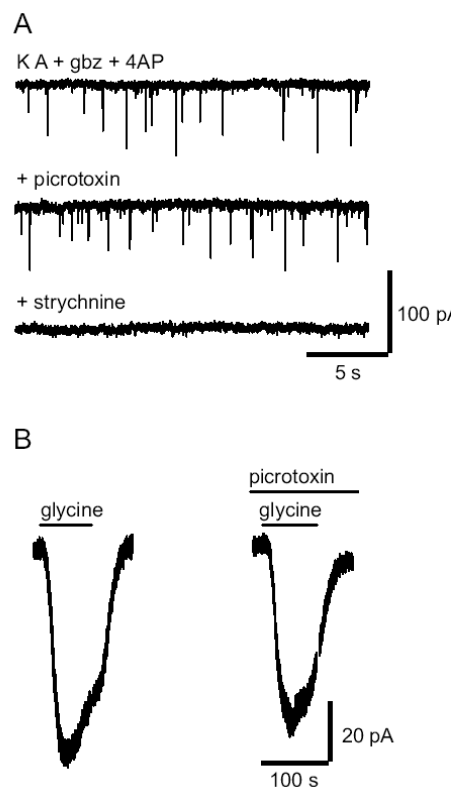


Abb. 14| Auswirkungen von Pikrotoxin auf glycinerge Ströme. **A:** Auswirkung von Pikrotoxin auf glycinvermittelte Ströme eines repräsentativen jung- adulter Neurons (P18). *Ober:* glycinerge synaptische Aktivität unter 250 μ M 4-AP. *Mitte:* dasselbe Neuron unter zusätzlicher Applikation von 40 μ M Pikrotoxin. Es sind keine Unterschiede festzustellen. *Unten:* Vollständige Suppression des glycinergen Stromes unter 2 μ M Strychnin. **B:** Auswirkungen von Pikrotoxin auf glycinvermittelte Ströme eines repräsentativen adulten Neurons (P21). *Links:* Ableitung unter 100 μ M Glycin (Kontrolle). *Rechts:* Ableitung unter zusätzlicher Applikation von 40 μ M Pikrotoxin. Während der gesamten Ableitung wurden 4 mM Kynurensäure und 10 μ M Gabazin dem Badmedium beigelegt.

Der leichtgradige Unterschied der Sensitivität zwischen jugendlichen und jung-adulten Neuronen könnte auf den Wechsel der α -Untereinheiten zurückzuführen sein, da Glycinrezeptoren, die die neonatale $\alpha 2$ -Form aufweisen empfindlicher auf Pikrotoxin reagieren als jene, die die Erwachsenenform $\alpha 1$ enthalten (IC_{50} : 300 vs. >1000 , Pribilla et al., 1992). Die Auswertung der Effekte von Pikrotoxin auf glycinerge IPSCs jung- adulter Neurone zeigte, dass die mittlere Amplitude der IPSCs, die vor und nach Applikation des Stoffes ermittelt wurde nicht signifikant unterschiedlich war (23.2 vs. 23.8 pA und 38.0 vs. 40.1 pA). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Glycinrezeptoren, die in ausgereiften Neuronen synaptisch aktiviert wurden, am ehesten heteromer waren und am wahrscheinlichsten die $\alpha 1$ -Untereinheit enthielten. Dies wurde in anschließenden Experimenten näher untersucht.

6.4.5 Kinetik glycinерger IPSCs

Bekanntermaßen unterliegt die Kinetik glycinерger IPSCs entwicklungsbedingten Veränderungen. In diesem Sinne weisen die IPSCs junger Neurone längere Abklingzeitkonstanten auf als jene von ausgereiften Neuronen (Takahashi et al., 1992; Singer et al., 1988). Dieser Effekt lässt sich mit dem Wechsel der Untereinheiten von $\alpha 2$ zu $\alpha 1$ begründen (Takahashi et al., 1992, Singer et al., 1998). Vor diesem Hintergrund wurde die Kinetik glycinерger IPSCs jung- adulter Kleinhirnkernneurone untersucht und mit den Werten, die auf ein Vorhandensein $\alpha 1$ -enthaltener GlyR hindeuten, verglichen. Die glycinergen IPSCs wurden automatisch erfasst und ihr Kurvenverlauf unter Zuhilfenahme geeigneter Software (Minianalysis, Synptosoftware, Inc.) analysiert. Unter Blockade von Kaliumkanälen sowie Glutamat- und GABA_A- Rezeptoren wurden folgende Werte ermittelt: Anstiegszeit [RT]: M = 1.2 ms, SD = 0.15 ms, halbe Aktionspotentialbreite [$t_{1/2}$ AP]: M = 5.5 ms, SD = 1.08 ms, Zeitkonstante [τ]: M = 6.1 ms, SD = 1.3 ms, n = 7. Diese Werte deuten darauf hin, dass es sich bei den glycinergen IPSCs jung- adulter Neurone um Ereignisse mit schneller Kinetik handelt. Das Resultat ist vergleichbar mit Werten anderer

Studien, die für ausgewachsene Tiere ermittelt wurden (Takahashi et al, 1992; Singer et al, 1998). Glycinrezeptoren jung- adulter Kernneurone enthalten demnach bereits eine $\alpha 1$ - Untereinheit. Ein Wechsel der Untereinheiten muß demzufolge vor Erreichen dieses Alters ($< P18$) stattgefunden haben. Erkenntnisse über die Kinetik dieser synaptischen Potentiale können darüber hinaus Aufschluß geben über mögliche funktionelle Auswirkungen der IPSCs auf die Zielzellen. In früheren Studien an anderen Geweben konnte gezeigt werden, dass glycinerge und GABAerge IPSCs in ihrer Funktionalität einander komplementär sind. Diese Beobachtung lässt Rückschlüsse auf die mögliche Funktion dieser beiden Neurotransmitter zu (Jonas et al, 1998; O'Brien und Berger, 1999; Donato und Nistri, 2000; Dumoulin et al., 2001; Russier et al., 2001). Um der möglicherweise komplementären Funktion dieser beiden Neurotransmitter auf den Grund zu gehen, wurden am jeweils demselben adulten Neuron sowohl die Kinetik GABAerger IPSCs als auch diejenige glycinerger synaptischer Ströme ermittelt. Die spontanen synaptischen GABAergen Ströme, die nur im Beisein von Glutamatantagonisten abgeleitet werden konnten, wurden mit Hilfe des Analyseprogrammes Minianalysis ausgewertet. Die Auswertung führte zu folgenden Ergebnissen: Anstiegszeit [RT]: $M = 1.4$ ms, $SD = 0.18$ ms, halbe Aktionspotentialbreite [$t_{1/2}$ AP]: $M = 8.6$ ms, $SD = 1.21$ ms, Zeitkonstante [τ]: $M = 8.8$ ms, $SD = 1.68$ ms ($n = 6$). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen glycinerger IPSCs ($p > 0.05$), was den Schluß zuläßt, dass die Kinetik GABAerger und glycinerger IPSCs in den Kleinhirnkernen einander nicht komplementär ist.

6.4.6 Glycin hat einen inhibitorischen Effekt auf alle Typen von Kleinhirnkernneuronen

In den Kleinhirnkernen können drei Hauptklassen von Neuronen unterschieden werden: große, exzitatorische Projektionsneurone (mittlerer Durchmesser ca. $20\mu\text{m}$), eine Gruppe mittelgroßer GABAerger Neurone, die zur inferioren Olive projizieren (mittlerer Durchmesser ca. $10\mu\text{m}$) und kleine, örtlich auf die Kerne beschränkte Interneurone, denen eine inhibitorische Funktion zugeschrieben

wird ($< 10\mu\text{m}$). Einige dieser Interneurone kolokalisieren GABA und Glycin als Neurotransmitter (Batini et al. 1992, De Zeeuw und Berrebi, 1995). Unter Verwendung elektrophysiologischer Ableitungen im Spannungs- und Stromklemmenmodus wurden in einer Reihe von Experimenten die Auswirkungen von dem Badmedium beigefügten Glycin auf Kleinhirnkernneurone unterschiedlicher Größe untersucht. Zunächst wurde die Antwort großer Zellen ($> 14\mu\text{m}$) im Stromklemmenmodus („Current Clamp“) ermittelt.

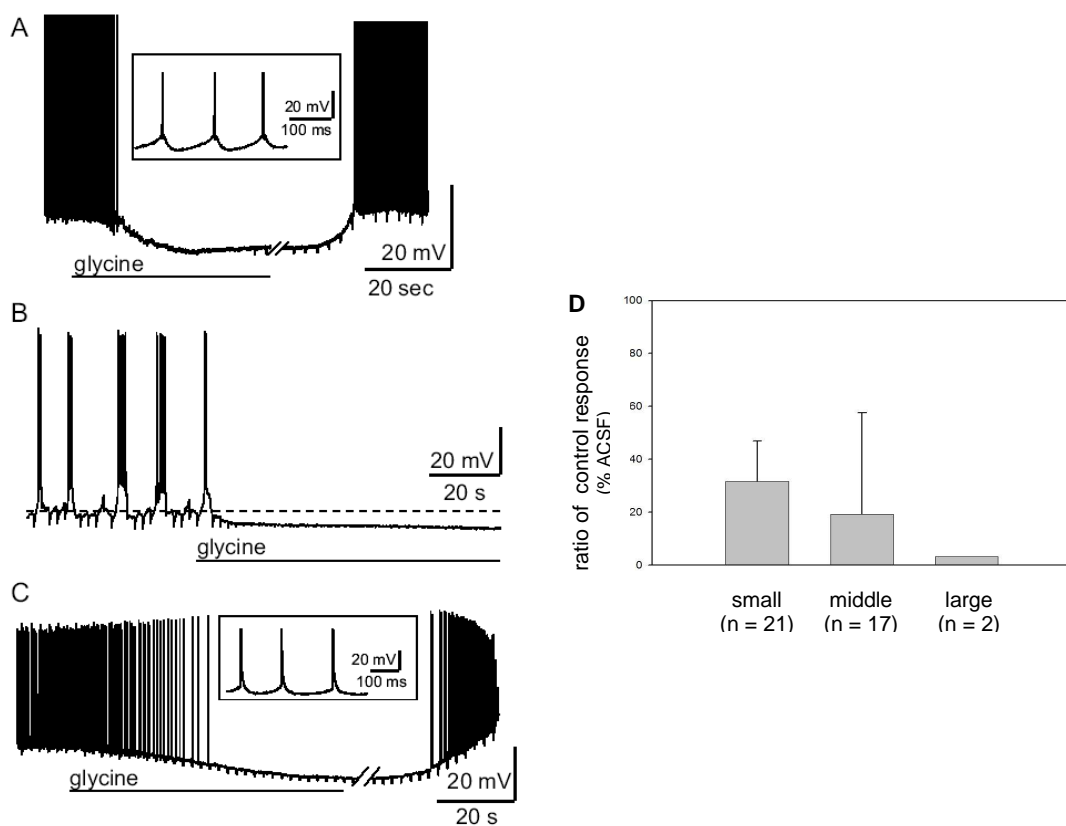


Abb. 15 | Inhibitorische Effekte von Glycin auf Kleinhirnkernneurone unterschiedlicher Somagröße.

A: Ableitung eines repräsentativen großen Neurons ($20\mu\text{m}$ Längsdurchmesser) im „Current Clamp“- Modus vor, während und nach der Applikation von Glycin ($400\mu\text{M}$). Das Inset zeigt das regelmäßige Feuern der Neurone vor der Glycinapplikation und verdeutlicht noch einmal den typischen biphasischen Verlauf der Nachhyperpolarisation dieser Neurone. Während der Ableitung wurden Strompulse kleiner Amplitude (-30 pA) verabreicht, um Änderungen des Eingangswiderstandes feststellen zu können. **B:** Ableitung eines großen Kleinhirnkernneurons, das spontane Plateaupotentiale generierte. Glycin induzierte sowohl eine Hyperpolarisation als auch eine deutliche Verminderung des Eingangswiderstandes (verdeutlicht durch den Rückgang der Antwort auf Strompulse von -30 pA). **C:** Ableitungen

eines kleinen Kleinhirnkernneurons vor, während und nach der Applikation von 400 μ M Glycin. Auch hier zeigt sich eine Hyperpolarisation und ein Rückgang des Eingangswiderstandes. Das Inset zeigt die glatte Repolarisationskurve dieser Neurone (Czubayko et al, 2001). Während aller Ableitungen wurde Kynurensäure (3 mM) und Bicucullin (30 μ M) oder Gabazin (10 μ M) dem Badmedium zugefügt. **D:** Ausmaß des glycinergen Effektes in unterschiedlichen Neuronen als Anteil der Kontrollantwort in Prozent. Der stärkste inhibitorische Effekt wurde bei den Neuronen mit großem Somadurchmesser erzielt.

Wie im ersten Abschnitt ausführlich beschrieben, zeigen diese Neurone spontan generierte Plateaupotentiale (Czubayko et al., 2001). Die gesamte Neuronenpopulation zeigte unter der Applikation von Glycin (100 – 400 μ M) einen das Membranpotential hyperpolarisierenden, einwärts gerichteten, Strom (Abb. 15 A, n = 15). Das mittlere Membranpotential während des tonischen Feuerns betrug $M = -49$ mV, $SD = 5.6$ mV (n = 6). Die Applikation von Glycin (400 μ M) im Beisein von Glutamat- und GABA_A- Rezeptorantagonisten verursachte eine mittlere Hyperpolarisation von $M = 11$ mV ($SD = 5.3$ mV). Der inhibitorische Effekt blieb nach Blockade der synaptischen Übertragung durch CdCl₂ (200 μ M) bestehen. Der zu beobachtende glycinerge Effekt könnte demnach tatsächlich auf eine Bindung von Glycin an die entsprechenden Rezeptoren der Postsynapse zurückzuführen sein. Unabhängig vom zuvor bestehenden Feuermodus war die Hyperpolarisation in allen untersuchten Neuronen mit einer Abnahme der mittleren Entladungsfrequenz bzw. einem vollständigen Sistieren des Feuerns verbunden (Abb. 15 A - C).

Um Veränderungen des Eingangswiderstandes festzustellen, wurden Strompulse kleineren Ausmaßes (-20 pA) verabreicht, während das Membranpotential bei -75 mV gehalten wurde. Der Eingangswiderstand nahm unter 400 μ M Glycin im Mittel um 30% des Kontrollwertes ab (Abb. 15 B). Glycin bewirkt demnach nicht nur einen Shuntingeffekt, sondern besitzt auch einen direkten Einfluß auf das Membranpotential. Wenn das Membranpotential bei Werten unter -75 mV das Nernst Gleichgewichtspotential für Chloridionen (-74 mV) erreichte, wurden depolarisierende Antworten auf Glycin beobachtet. Dies bestätigt die Annahme, dass die Applikation von Glycin an der Postsynapse zu einer chloridionenvermittelten Leitfähigkeit führt. Alle

beschriebenen glycinergen Ströme konnten durch die Applikation des Glycinantagonisten Strychnin in einer dosisabhängigen Weise supprimiert werden. Im nächsten Schritt wurde der Effekt untersucht, den eine glycinerge Inhibition auf mittelgroße und kleine Neurone haben könnte. Überraschenderweise induzierte Glycin bei 9 von 9 mittelgroßen Zellen (Somadurchmesser 10 bis 14 μm) und bei 7 von 11 kleinen Zellen (Somadurchmesser $< 10 \mu\text{m}$) ebenso einen inhibitorischen Effekt: die Kleinhirnkernneurone antworteten mit einer durch den Einwärtsstrom verbundenen Hyperpolarisation (bei einem Membranpotential $\geq -70\text{mV}$) und einer Verminderung des Eingangswiderstandes (Abb. 15 C).

Die one- way ANOVA zeigte signifikante Unterschiede des inhibitorischen Einflusses von Glycin in den mittelgroßen, kleinen und großen Neuronen, gemessen als Anteil der Kontrollantwort in Prozent. Der Bonferroni t- test enthüllte einen signifikant stärker ausgeprägten glycinergen Effekt in den mittelgroßen Neuronen als bei den Neuronen mit kleinem Somadurchmesser, (kleine Neurone: $M = 33.3 \%$, $SD = 14.8 \%$, $n = 7$; mittelgroße Neurone: $M = 19.6 \%$, $SD = 16 \%$, $n = 9$, $MD = 13.65 \%$, $t = 2.4$, $p < .05$). Die stärkste Antwort auf Glycin fand sich bei den großen Neuronen ($M = 4.37 \%$, $SD = 1.17 \%$, $n = 3$), sie unterschied sich im Bonferroni t-Test signifikant von der glycinergen Wirkung auf Neurone kleinen Somadurchmessers ($MD = 28.93 \%$, $t = 3.3$; $p < .01$). Abb. 15 D zeigt eine Übersicht des Ausmaßes der glycinergen Inhibition in Neuronen unterschiedlicher Somagröße. In der linearen Regression zeigte sich keine Korrelation der Somagröße mit dem Ausmaß des inhibitorischen Effektes von Glycin ($R = 0.02$, $p > .05$). Zwischen den Neuronenpopulationen, die im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben wurden (Typ I: $M = 32.4 \%$, $SD = 35.81 \%$, $n=3$; Mix: $M = 23.39 \%$, $SD = 11.68 \%$, $n=5$; Typ II: $M = 43.39 \%$, $SD = 26.97 \%$, $n = 5$ [Angaben in % des Kontrollwertes]), ergab die one- way ANOVA keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Glycinantwort ($F(1, 13) = 1.81$, $p > .05$).

Die glycinerge Hyperpolarisation konnte auch in mittelgroßen und kleinen Neuronen durch 1 - 2 μm Strychnin blockiert werden (Abb. 16 A, B). Die antagonistische Wirkung von Strychnin erreichte im Mittel 95.9 % der

Kontrollantwort (SD = 3.5 %, n = 4; Abb. 16 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch Zellen dieser Größe funktionelle Glycinrezeptoren aufweisen.

Ableitungen im Spannungsklemmenmodus („Voltage Clamp“) von mittelgroßen (n = 2) und kleinen (n = 2) Kleinhirnkernneuronen bestätigten dieses Ergebnis: alle Neurone antworteten auf eine Glycinapplikation unter Beisein von TTX, Glutamat- und GABA_A- Antagonisten mit einem einwärts gerichteten Strom (Haltepotential -70mV).

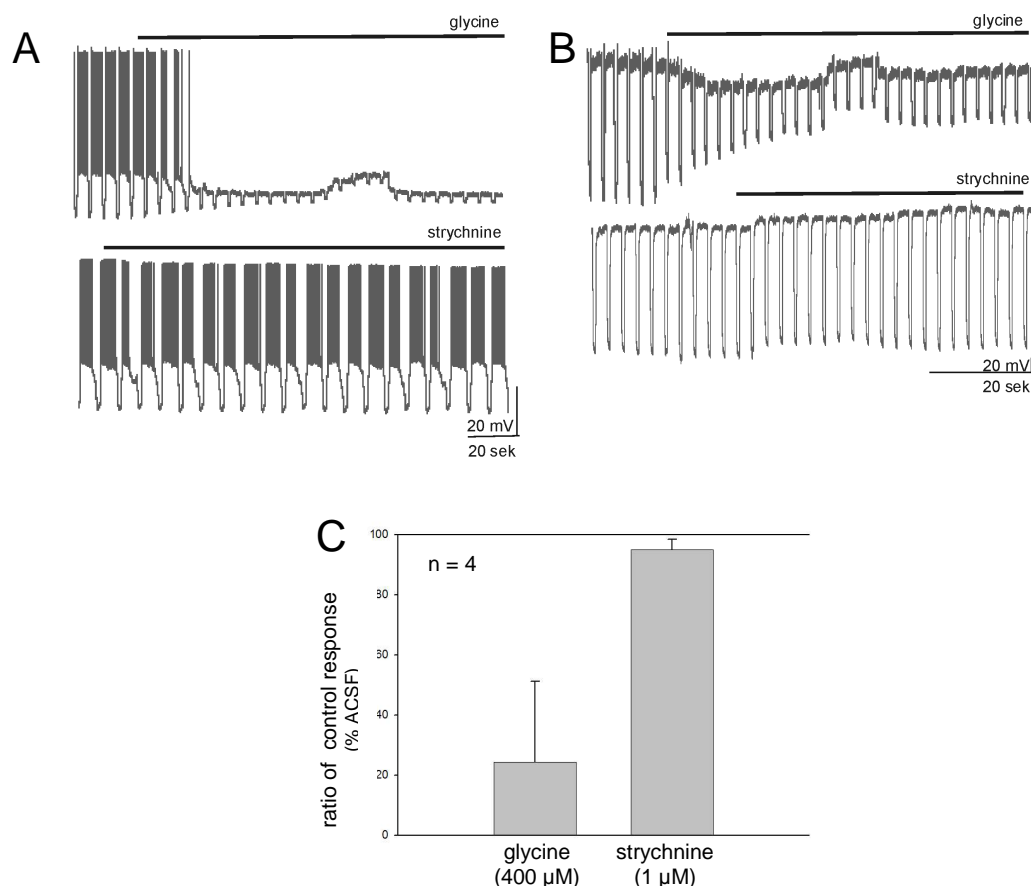


Abb.16 | Antagonisierender Effekt von Strychnin. **A:** Repräsentatives Neuron mittleren Somadurchmessers (12 x 9.3 μm). Die durch Glycin hervorgerufene Hyperpolarisation sowie die Reduktion des Eingangswiderstandes wird durch Strychnin vollständig supprimiert. **B:** Repräsentatives Neuron kleiner Somagröße (8 x 6.6 μm). Auch hier supprimiert Strychnin die Antwort des Neurons auf Glycin vollständig. Die Ableitungen wurden unter 30 μM Bicucullin und 3mM Kynurensäure durchgeführt, was auf eine spezifische Blockierung von GlyR durch Strychnin hinweist. **C:** Antagonisierender Effekt von Strychnin in Prozent der Hyperpolarisation unter Kontrollbedingungen (ACSF).

Im Gegensatz zu den Resultaten großer Zellen zeigten die Ableitungen mittelgroßer und kleiner jugendlicher Kleinhirnkernneurone jedoch keine strychninsensitiven IPSCs, weder unter Kontrollbedingungen noch unter Bedingungen erhöhter synaptischer Aktivität durch die Applikation des Kaliumkanalblockers 4-AP (250 μ M, n = 5). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass auch kleine und mittelgroße Kleinhirnkernneurone funktionelle GlyR exprimieren, glycinerge Synapsen auf diesen Neuronen jedoch nicht vorhanden sind.

4 DISKUSSION

4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung unterschiedlicher Neuronentypen in den Kleinhirnkernen

Da alle Ableitungen unter Sichtkontrolle und mit Aufzeichnung der Somagrößen durchgeführt wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass tatsächlich von morphologisch unterschiedlichen Neuronen abgeleitet wurde. Die Kleinhirnkernneurone waren spontanaktiv und zeigten unter Ruhebedingungen ein Kontinuum zwischen weniger aktiven, regelmäßig feuernenden Zellen und stark aktiven Zellen mit hoher Feuerfrequenz. Unter hyperpolarisierendem Haltestrom zeigten sich jedoch weitere Unterschiede: so generierten die Neurone mit hoher Feuerfrequenz langanhaltende Plateaupotentiale, die überlagert waren von einer Salve von Aktionspotentialen („Burst“). Auch durch die Applikation depolarisierender Strompulse konnten in diesen Neuronen Plateaupotentiale induziert werden, die in ihrem Zeitverlauf den zuvor beschriebenen gleichgestellt waren. Aufgrund ihrer Fähigkeit, spontane oder durch depolarisierende Strompulse evozierbare langanhaltende Plateaupotentiale zu generieren, verbunden mit der Tendenz zu zyklischen Entladungen des Membranpotentials, ließ sich zunächst eine Unterscheidung treffen von „zyklisch feuernenden“ bzw. „regelmäßig feuernenden“ Neuronen. Czubyko et al. (2001) charakterisierte in den Kleinhirnkernen der Ratte zwei unterschiedliche Typen von Neuronen. Die Neurone vom Typ I waren gekennzeichnet durch langanhaltende Plateaupotentiale, verbunden mit der Tendenz zu zyklischen Entladungen des Membranpotentials. Die Neurone vom Typ II zeigten diese Potentiale nicht. Die zyklisch feuernenden Neurone der vorliegenden Studie, die in ihren Eigenschaften den Neuronen der zuvor zitierten Studie glichen, wurden in Anlehnung als Typ I- Neurone bezeichnet, die regelmäßig feuernenden Neurone dementsprechend als Typ II. Während der Plateaugenerierung zeigten sich jedoch auch innerhalb der Gruppe der hier vorgestellten zyklisch feuernenden Typ I- Neurone Unterschiede: eine Teilpopulation zeigte vorwiegend Plateaupotentiale mit niedriger

Auslöseschwelle sowie ein Entladungsmuster mit schneller Adaptation, während die andere Teilpopulation Plateaus mit hoher Auslöseschwelle und langsamer Adaptation zeigte. Nach pharmakologischen Untersuchungen von Czubyko et al. (2001) liegen den Plateaupotentialen mit niedriger Auslöseschwelle am ehesten „low- threshold“ oder T- Typ Calciumionenkanäle zugrunde. Bei einem in den Kleinhirnkernen typischerweise vorliegenden Membranpotential von -60 bis -65 mV sind diese Kanäle typischerweise deaktiviert. Bei einer Hyperpolarisation der Membran (Schwellenwert in cerebellären Neuronen ca. -72 mV, Perez- Reyes, 2002) kommt es zur „Deinaktivierung“ dieser Kanäle und einer Depolarisation, die ausreicht, um das Membranpotential zurück in die Nähe der Feuerschwelle für Aktionspotentiale zu bringen. Im Gegensatz hierzu könnten den Plateaupotentialen mit hoher Auslöseschwelle „high- threshold“ oder L, Q, P- Typ Calciumkanäle mit langsamer Inaktivierung zugrundeliegen (Czubyko et al., 2001). Die Öffnung von Calciumkanälen führt in beiden Fällen zu einem Einstrom von Calciumionen in die Zelle und einer Aktivierung von spannungs- und calciumabhängigen Kaliumkanälen unterschiedlicher Kinetik (I_{K-Ca} , I_{Ks} , Czubyko et al., 2001; I_{AHP} , Tanabe et al., 1998). Der korrespondierende KaliumEinstrom bewirkt dann eine Reduktion der Feuerfrequenz und eine Adaptation der Entladungsrate wie hier beobachtet (Douglas et al., 1995).

Auch hinsichtlich ihrer Aktionspotentialparameter zeigten sich Unterschiede innerhalb der Gruppe der zyklisch feuernenden Neurone: so wies eine Teilpopulation ein signifikant breiteres Aktionspotential, eine niedrigere Zeitkonstante sowie eine einfachere Nachhyperpolarisation ohne AHP- ADP- AHP- Sequenz auf als die andere. Nur in einem zyklisch feuernenden Neuron dieser Teilpopulation zeigte sich ein Stop der Repolarisationskurve, ein sogenannter „breaking point“. In den zu den Typ I- Neuronen unterschiedlichen Eigenschaften ähnelten diese Zellen eher den regelmäßig feuernenden Typ II- Neuronen und wurden somit als Mix- Neurone bezeichnet. Der AHP-ADP-AHP- Sequenz der Typ I- Neurone liegen wahrscheinlich calciumabhängige Kaliumströme durch SK- Kanäle zugrunde (Czubyko et al., 2001; Villalobos et

al., 2004). Diese Kanäle scheinen in den Typ I- Neuronen demnach stärker exprimiert zu werden als in den Mix- und Typ II- Neuronen.

Die Clusteranalyse der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kleinhirnkernneurone unterstützte die Hypothese einer möglichen weiteren Unterteilung der zyklisch feuernenden Neurone in Typ I- und Mix- Neurone. Trotz der Tatsache, dass die Mix- Neurone Plateaupotentiale entluden, wiesen sie bezüglich ihrer Aktionspotentialparameter eher Überschneidungspunkte zu den Typ II- Neuronen auf. Auch die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) des Datensatzes wies in diese Richtung und ergab bezüglich aller untersuchter Parameter einen tendenziell größeren Unterschied der zuvor anhand grober Kriterien ermittelten Mix- Neurone zu den Typ I- Neuronen als zu den Typ II- Neuronen. Der Unterschied zwischen den untersuchten Typ I- und Mix- Neuronen lag hinsichtlich der Aktionspotentialbreite und Zeitkonstante oberhalb des Signifikanzniveaus. Die Typ II- Neurone unterschieden sich in keinem der Fälle signifikant von den Mix- Neuronen. Eine genauere Betrachtung der euklidischen Distanzen der Clusteranalyse lässt jedoch die Vermutung zu, dass sich durch den Einschluß einer größeren Anzahl von Neuronen und einer erhöhten statistischen Aussagekraft der Studie auch zwischen den Typ II- und Mix- Neuronen signifikante Unterschiede zeigen könnten.

Die signifikant kleinsten Zellen der Population mit Blick auf die Größe ihrer Somata zeigten in keinem der Fälle langanhaltende calciumabhängige Plateaupotentiale. Im Unterschied zu den Typ I- und Mix- Neuronen zeigten sie auch in keinem der Fälle eine komplexe Nachhyperpolarisation oder einen Stop der Repolarisationskurve. Ihre Aktionspotentialbreite war ähnlich wie die der Mix- Neurone signifikant breiter, ihr Ausgangsmembranpotential signifikant negativer und ihre spontane mittlere Entladungsrate signifikant niedriger als dies bei den Typ I- Neuronen der Fall war.

Nach Beendigung depolarisierender Pulse war in allen Typ I- und Mix- Neuronen ein AHP zu beobachten, das mit sinkenden Potentialen stärker ausgeprägt war. Bei den Typ II- Neuronen war erst unterhalb von -70 mV ein AHP nachweisbar. Der verstärkte Aktivierungsradius zwischen -70 bis -80 mV lässt auf das Vorliegen von I_h schließen (Bal und McCormick, 1997).

Pharmakologische Studien von Czubyko et al. (2001) bestätigen und ergänzen diese Vermutung: durch die Zugabe von Cäsium zum Badmedium wurde im Falle der Typ II- Neurone das AHP vollständig unterdrückt. In diesen Neuronen ist demnach vorwiegend die verzögert einsetzende Einwärtsgleichrichtung I_h für die Entstehung des AHP verantwortlich. Bei einem Membranpotential zwischen -50 und -60 mV war dieser Strom kaum aktiviert und hatte somit keinen Einfluß auf das Membranpotential. Den AHPs der Typ I- und Mix- Neurone könnte ein Zusammenspiel calciumabhängiger Kaliumleitfähigkeiten und I_h unterschiedlichen Ausmaßes zugrunde liegen (Villalobos et al., 2004; Czubyko et al., 2001).

Ein hyperpolarisierender Stromimpuls war in allen Neuronen gefolgt von einer Rebounddepolarisation (RD), die eine Anzahl von Aktionspotentialen hervorrief. Das Ausmaß dieser Depolarisation war in den Typ I- Neuronen signifikant höher als bei den Typ II- Neuronen. Wie durch pharmakologische Studien gezeigt werden konnte, wird die RD im Falle der zyklisch feuernenden Neurone wahrscheinlich durch das Zusammenspiel von Calciumkanälen niedriger Aktivierungsschwelle und I_h vermittelt (Aizenman und Linden, 1999; Gauck et al., 2001; Czubyko et al., 2001; Llinas und Mühlethaler 1988). Im Falle der abgeschwächten, „gradierten“, Reboundantwort der Typ II- Neurone konnte keine Calciumabhängigkeit nachgewiesen werden. Hier basiert die zu beobachtende Reboundantwort wahrscheinlich lediglich auf I_h (Czubyko et al., 2001).

Purkinjellen bilden sowohl mit glutamatergen als auch mit GABAergen Projektionsneuronen Synapsen aus (De Zeeuw und Berrebi, 1995, Teune et al., 1998). Die in Typ I- und Mix- Neuronen festgestellten Plateaupotentiale könnten ein Mittel sein, der inhibitorischen Purkinjellprojektion zu begegnen und Hinweis darauf sein, dass es sich bei diesen Neuronen um Projektionsneurone handeln könnte. Die Unterschiede zwischen den Typ I- und Mix- Neuronen hinsichtlich ihrer Aktionspotentialparameter könnten darauf hinweisen, dass es sich bei den Mix- Neuronen um eine gesonderte Neuronenklasse innerhalb der Gruppe der Projektionsneurone handeln könnte mit langsamerer Kinetik. Neurone jüngeren Alters besitzen unter anderem ebenfalls eine geringere

Feuerfrequenz und breitere Aktionspotentiale (Aizenman und Linden, 2003). Eine Korrelation der untersuchten Parameter mit dem postnatalen Alter konnte jedoch in allen Neuronen ausgeschlossen werden. In Anbetracht der elektrophysiologischen Ergebnisse und unter Berücksichtigung ihrer Somagröße ist nicht auszuschließen, daß es sich bei den Mix- Neuronen um GABAerge Projektionsneurone handeln könnte, die zur inferioren Olive ziehen. Bei den hier elektrophysiologisch ermittelten Typ I- Neuronen könnte es sich in Übereinstimmung mit den hier genannten Studien (Czuabyko et al., 2001; Aizenman und Linden, 2003) um glutamaterge Projektionsneurone handeln. Die Unterteilung der Neurone, die Plateaupotentiale generieren, in Typ I- und Mix- Neurone sollte anhand pharmakologischer Studien und der Ermittlung spezifischer Leitfähigkeiten objektiviert werden. Bei den regelmäßig feuernden Neuronen dieser Studie könnte es sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Czubayko et al. (2001) und Aizenman und Linden (2003) um Interneurone handeln. Die signifikant langsamere Feuerrate dieser Neurone könnte einen Mechanismus darstellen, die allgemeine Erregbarkeit dieser Zellen zu reduzieren. Dies wäre insbesondere bei Interneuronen von Bedeutung, die tatsächlich eine Vielzahl synaptischer Eingänge erhalten.

4.2 Morphologie unterschiedlicher Neuronentypen in den Kleinhirnkernen

Die vorgestellten elektrophysiologischen Daten geben Hinweis darauf, dass es sich um Ableitungen vermutlich dreier unterschiedlicher Neuronenpopulationen handeln dürfte. Die sich an die elektrophysiologische Charakterisierung anschließende morphologische Untersuchung der Kleinhirnkernneurone hatte zum Ziel, diesen Befund mittels genauer Feststellung der Somagrößen und verwendeten Transmittersysteme weiter zu objektivieren. Es existieren bisher nur wenige Untersuchungen, die eine auf elektrophysiologischen und morphologischen Kriterien basierende Unterscheidung der Kleinhirnkernneurone treffen. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass in diesen Studien vorwiegend konventionelle Mikroelektroden benutzt wurden, die ohne Sichtkontrolle in den Hirnschnitt eingebracht wurden (Gardette et al.,

1985a,b; Jahnsen 1986a,b; Llinas und Mühlethaler, 1988; Aizenman und Linden 1999a,b). Aus diesem Grunde wurde vermutlich nur von großen Neuronen abgeleitet. Raman und Mitarbeiter (2000) führte „Voltage Clamp“ - Ableitungen an isolierten Neuronen der Kleinhirnkern durch. Die beobachteten scheinbaren Eingangswiderstände entsprechen jedoch ebenfalls denen der großen Zellen ($\sim 0.63 \text{ G}\Omega$). Wiederum eine andere Studie leitete von morphologisch unterschiedlichen Neuronen ab (mittelgroße und große), traf jedoch keine Differenzierung unterschiedlicher elektrophysiologischer Charakteristika (Aizenman et al, 2003).

Die Kleinhirnkern der Ratte bestehen aus einer heterogenen Gruppe exzitatorischer und inhibitorischer Projektions- und Interneurone (Batini et al., 1992, Chen und Hillman, 1993; Teune et al., 1995). Der Großteil der exzitatorischen Neurone ist von großem Somadurchmesser ($22.3 \pm 4.8 \mu\text{m}$, De Zeeuw et al., 1995; $23.6 \pm 1 \mu\text{m}$, Aizenman et al., 2003; $10 - 35 \mu\text{m}$, Batini et al., 1992; $358 \mu\text{m}^2$ [Oberflächenareal], Sultan et al., 2003) und verwendet Glutamat und/oder Aspartat als Neurotransmitter. Ihre Projektionsgebiete liegen in den Motorzentren des Hirnstammes, des Mesencephalon und im Thalamus und üben einen direkten Einfluß auf die Motorkontrolle aus (Courville, 1966; Angaut et al. 1985; Orioli und Strick, 1989, Teune et al., 1995). Die inhibitorischen Neurone sind meist mittelgroß bis klein und gebrauchen GABA und/oder Glycin als Neurotransmitter (Batini 1992, Chen und Hillman, 1993). Die GABAergen Projektionsneurone besitzen mittelgroße bis kleine Somata ($11 \pm 2.6 \mu\text{m}$ im Querdurchmesser, De Zeeuw et al., 1995; $164.4 \mu\text{m}^2$ Oberfläche, Sultan et al., 2003; $5 - 22 \mu\text{m}$, Batini et al., 1992) und liefern einen GABAergen Feedback zur inferioren Olive (De Zeeuw et al., 1989), einige dieser Zellen entsenden jedoch auch Projektionen zum cerebellären Cortex oder zur Brücke (Batini et al 1992). Die Aktivität dieser Neurone wird über den Neuromodulator Serotonin beeinflusst (Chan-Palay, 1977; DiMauro et al., 2003; Voutsinos et al., 1998), der die inhibitorischen Effekte von GABA verstärkt (Kitzman et al., 1997). Die dritte Neuronenpopulation der Kleinhirnkern umfasst Zellen mit den kleinsten Somata, die bisher in den Kleinhirnkernen gefunden wurden (minimale Neuronoberfläche $50 \mu\text{m}^2$, Chan-Palay, 1977; 130 und $150 \mu\text{m}^2$, Czubayko et

al., 2001; 69 μm^2 , Sultan et al., 2003). Diese Neurone exprimieren sowohl GABA als auch Glycin als Neurotransmitter (Chen und Hillman, 1993; Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1997). Trotz der GABAergen Kolokalisation konnte bei keinem dieser Neurone eine Projektion zur inferioren Olive nachgewiesen werden (De Zeeuw et al., 1994). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass zumindest ein Teil der glycinergen synaptischen Boutons von diesen Neuronen selbst gebildet werden. Schon Chan- Palay beschrieb 1977 Neurone, deren Axonterminalien ausschließlich in den Kleinhirnkernen selbst lagen. Es kann daher vermutet werden, daß es sich bei diesen Zellen mit den kleinsten Somata um lokale Interneurone handelt (Teune et al, 1998).

Die Zeichnung der Neurone vor der elektrophysiologischen Ableitung erlaubte die Ermittlung der Somagröße dieser Zellen. Die Füllung der Neurone mit Neurobiotin erwies sich als äußerst schwierig aufgrund der Gefahr, kleinere Neurone beim Entfernen der Elektrode aus dem Hirnschnitt herauszuziehen. Hinzu kamen in einigen Neuronen Färbeartefakte, sodaß lediglich in zwei Typ I-Neuronen das betreffende Soma klar zu erkennen war. Beide Somagrößen bewegten sich im Bereich großer und mittelgroßer Neurone. Insgesamt umfassten die Somagrößen der hier vorgestellten zyklisch feuernenden Neurone die gesamte Bandbreite an Somagrößen, die in den Kleinhirnkernen gefunden wurden (Chan- Palay, 1977; Batini et al., 1992; Chen und Hillman, 1993; Aizenman et al., 2003, Sultan et al., 2002). Da sich die Somagröße der Typ I-Neurone jedoch im Mittel im Bereich der größten Zellen bewegte, von denen in dieser Studie abgeleitet wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Teil der Typ I- Neurone um glutamaterge Projektionsneurone handelte. Die Mix-Neurone lagen hinsichtlich ihrer Somagröße zwischen den Typ I- und Typ II-Zellen. Über die Zuordnung der mittelgroßen und kleineren Typ I- und Mix-Neurone lässt sich unter Betrachtung der Somagröße nur spekulieren, hierbei könnte es sich jedoch um GABAerge Projektionsneurone handeln. Es existiert bisher keine bekannte Studie der Kleinhirnkernneurone, die eine eindeutige elektrophysiologische Unterscheidung innerhalb der Gruppe der Projektionsneurone trifft. Oft werden beide derselben Gruppe von Neuronen zugeordnet. (Anchisi et al., 2001, Czubayko et al., 2001). Nichtsdestotrotz

scheinen sich beide durch die kleinere Somagröße der GABAergen Projektionsneurone zu unterscheiden (Teune et al., 1993, De Zeeuw et al., 1989). Die Gruppe der hier vorgestellten Typ II- Neurone umfasste Zellen mit gegenüber den Typ I- Neuronen signifikant kleinstem Durchmesser und dementsprechend signifikant höherem Eingangswiderstand. Darüber hinaus zeigte sich tendenziell ein erhöhtes Vorkommen bipolarer Neurone. Diese Beobachtung ist jedoch aufgrund der methodischen Bedingungen nur bedingt als korrekt zu werten. Für die Möglichkeit, dass es sich bei diesen Zellen tatsächlich um Interneurone handelt, spricht jedoch auch die Seltenheit dieser Neurone im Vergleich zur Gesamtheit der zyklisch feuernenden Neurone. Auch die oben erwähnte Schwierigkeit, die kleinsten Neurone nicht mit der Ableitelektrode aus dem Hirnschnitt herauszuziehen oder die Membran bei der Ableitung nicht so zu verletzen, dass eine Färbung mit Neurobiotin nicht mehr möglich war, spricht für das Vorliegen kleiner Neurone mit einem kleinen Dendritenbaum, der die Zelle nicht genügend im Hirnschnitt verankern kann (Czubayko et al., 2001). Solch eine Dendritenmorphologie würde nach Chan-Palay (1977) für das Vorliegen von Interneuronen sprechen. Anhand der elektrophysiologischen Eigenschaften und Somagrößen allein lässt sich eine eindeutige Identifizierung unterschiedlicher Neuronenklassen jedoch nicht treffen, da die Neurone bezüglich ihrer anatomischen und elektrophysiologischen Parameter teilweise miteinander überlappen (Batini et al., 1993; Chen und Hillman, 1993, Czubayko et al., 2001). Leider lieferte die anschließende immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen GABA- Glutamat- und Glycin- Glutaraldehyd kein eindeutiges Resultat. In einem der Neurone war das Ergebnis für Glutamat im Vergleich mit anderen Neuronen schwach positiv, was jedoch auch auf eine unspezifische Hintergrundfärbung zurückgeführt werden könnte. Im anderen Neuron war das Resultat weder für GABA noch für Glutamat eindeutig positiv. Die Glycinfärbung war in beiden Fällen nicht von Färbeartefakten zu differenzieren. Das schlechte Färberesultat war hierbei jedoch lokal auf die Kleinhirnkerne beschränkt, da im Kleinhirncortex derselben Hirnschnitte eindeutig positive glutamaterge, GABAerge und sogar glycinpositive Neurone nachzuweisen waren. Ein Grund

für dieses schwache Färberesultat könnte in der Natur der Ganzzelleableitung liegen, die zu einem Austausch der Transmittermoleküle mit der Pipettenlösung führt. Aus diesem Grunde wurde die Ableitungszeit auf die für die elektrophysiologische Charakterisierung der Neurone notwendige Mindestzeit von fünf Minuten reduziert. Dies änderte jedoch nichts am schlechten Färberesultat. Insbesondere die glycinerge Antikörperfärbung der Kleinhirnkernneurone fiel sehr schwach aus, selbst ohne vorherige Ableitung und unter Verdoppelung des Antikörpers ließ sich keine Verbesserung erzielen. Trotz identischer Behandlung und hoher Selektivität der Antigen-Antikörperreaktionen waren Schwankungen im Färbeergebnis nicht zu vermeiden. Ein Faktor, durch den das Ergebnis entscheidend beeinflusst wird, ist die Qualität der Fixierung. Selbst wenn sämtliche kontrollierbaren Parameter wie Konzentration und Volumen der Fixierlösung sowie Fixierzeit konstant gehalten werden, existieren zahlreiche Parameter, die kaum beeinflussbar sind. Dazu zählen beispielsweise die Dauer der Gewebehypoxie oder eine Thrombenbildung der Gefäße. Auch Kreuzreaktionen mit der Fixierlösung können das Färbeergebnis verschlechtern. Änderungen der Zusammensetzung des Fixativs führten im Vergleich zur Standard-Glutaraldehydlösung (5%) jedoch nicht zu einer Verbesserung des Färbeergebnisses.

Das insgesamt enttäuschende Ergebnis der immunhistochemischen Färbung lieferte leider keinen weiteren Hinweis über die Richtigkeit der Hypothese, dass es sich bei den elektrophysiologisch ermittelten Gruppen tatsächlich um unterschiedliche Neuronenklassen handelt. Die unterschiedlichen elektrophysiologischen Resultate und die Tatsache, dass es sich im Falle der Typ I- und Typ II- Neurone um signifikant unterschiedlich große Zellen handelt, widersprechen aber nicht der These unterschiedlicher Neuronentypen. Basierend auf den unterschiedlichen Somagrößen und elektrophysiologischen Charakteristika könnte es sich bei den Zellen mit dem größten Somadurchmesser von $>20 \mu\text{m}$ am ehesten um glutamaterge Projektionsneurone, die zu prämotorischen Zentren projizieren und Purkinjelleingang erhalten. Ein Überlappen mit größeren GABAergen

Projektionsneuronen, die zur inferioren Olive projizieren, ist nicht auszuschließen. Die Mix- Neurone könnten dieser Gruppe von Neuronen zuzuordnen sein. Mit Blick auf ihre signifikant kleinste Somagröße und ihre intrinsischen Eigenschaften könnten die hier vorgestellten Typ II- Neurone als mögliche Interneurone einen Beitrag zur Informationsverarbeitung innerhalb der Kleinhirnerne leisten.

4.3 Glycinerge Neurotransmission in den Kleinhirnerneuronen

Studien zu cerebellären Mausmutanten (*pcd*, *lurcher*) verweisen auf eine besondere Rolle inhibitorischer Mechanismen in den Kleinhirnerneuronen. Unter Bedingungen geschwächter Purkinjezellafferenz könnte insbesondere lokalen inhibitorischen Interneurone eine besondere Bedeutung zukommen. Die Wiederherstellung verlorengangener Inhibition durch erhöhte Aktivität intrinsischer inhibitorischer Neurone bewirkt in der *pcd*- Mutante eine partielle Besserung motorischer Fähigkeiten (Bäurle et al., 1997). Insbesondere glycinerger Neurone kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu (Sultan et al., 2002; Bäurle et al., 1997). Bisher existieren jedoch nur wenige Arbeiten, die sich mit der Bedeutung der glycinerger Inhibition in den Kleinhirnerneuronen befassen. Vor diesem Hintergrund wurde die Rolle von Glycin in der inhibitorischen synaptischen Transmission der Kleinhirnerneuronen untersucht unter besonderer Berücksichtigung der Frage, ob Glycin an verschiedenen Kleinhirnerneuronen tatsächlich als Neurotransmitter fungiert und welche Eigenschaften diese glycinerge Transmission hat. Für eine Rolle von Glycin als Neurotransmitter sprechen Befunde anatomischer Studien. So wurden glycinerge Boutons vorwiegend um das Soma großer, glutamaterger Kleinhirnerneuronen gefunden (Chen und Hillman, 1993; De Zeeuw und Berrebi, 1995; Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1997; Sultan et al., 2002). Darüber hinaus konnten GlyR vornehmlich auf Kleinhirnerneuronen großen Somadurchmessers gefunden werden (Fujita et al., 1991; Malosio et al., 1991). Diese Befunde sprechen für eine Inhibition der großen Projektionsneurone durch kleine, glycinerge Zellen. Diese Vorstellung wurde durch die Ableitung glycinermittelter Ströme näher untersucht. Die Applikation von Glycin zum

Badmedium rief jedoch nicht nur in großen Neuronen ($> 180 \mu\text{m}^2$ Somafläche), sondern auch in kleinen ($<70 \mu\text{m}^2$ Somafläche) und mittelgroßen (71 bis $179 \mu\text{m}^2$ Somafläche) Neuronen einen strychninsensitiven, chloridvermittelten Einwärtsstrom hervor, hinweisend darauf, dass auch diese Zellen über GlyR verfügen. Spontane und evozierte strychninsensitive IPSCs konnten jedoch nur in großen Neuronen nachgewiesen werden. In den kleinen und mittelgroßen Neuronen konnten IPSCs weder unter Kontrollbedingungen noch unter Bedingungen erhöhter synaptischer Aktivität gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Rolle von Glycin als Neurotransmitter in den Kleinhirnkernen, zum anderen sind sie Hinweis darauf, dass, obwohl kleine und mittelgroße Neurone funktionelle GlyR exprimieren, glycinerge Synapsen auf diesen Neuronen jedoch nicht vorhanden sind. Diese Vermutung findet eine Übereinstimmung in anatomischen Studien der Kleinhirnerne. Diese zeigten, dass glycinerge Boutons hauptsächlich um große, vermutlich glutamaterge, Projektionsneurone gruppiert waren. Der fehlende Nachweis glycinerner Synapsen kleiner und mittelgroßer Neurone könnte darin begründet sein, dass die GlyR extrasynaptisch lokalisiert sind. Untersuchungen zeigten, dass extrasynaptische GlyR von Neuronen exprimiert werden, bei denen eine glycinerge Präsynapse nicht nachgewiesen werden konnte. Dies war vor allem im Vorderhirn zu beobachten (Flint et al., 1998; Ye, 2000; Mangin et al., 2002). Der Einfluß dieser Rezeptoren auf die glycinerge Inhibition ist jedoch bisher unbekannt. Die Daten dieser Studie zeigen, dass extrasynaptische GlyR von allen Neuronentypen der Kleinhirnerne exprimiert werden, unabhängig vom Vorhandensein glycinerner Eingänge. Weitere elektrophysiologische Experimente sollten durchgeführt werden, um die Funktion dieser Rezeptoren weiter zu beleuchten.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie beschrieb Kawa (2003) die glycinerge Inhibition in neonatalen Kleinhirnerneuronen. Es ist bekannt, dass während der ersten postnatalen Wochen eine Ausreifung glycinerner Synapsen stattfindet, die den Wechsel der Untereinheiten des GlyR (Akagi und Mikedi, 1988; Becker et al., 1988; Malosio et al., 1991), eine Vergrößerung der postsynaptischen Rezeptorencluster (Colin et al., 1998; Geiman et al., 2000)

sowie die Reorganisation der Postsynapse umfaßt (Zundert et al., 2003). Neben diesen strukturellen Veränderungen kommt es auch zu funktionellen Veränderungen wie z.B. eine Beschleunigung der IPSC- Kinetik (Takahashi et al., 1992; Singer et al., 1998). Um der Frage auf den Grund zu gehen, welchen Veränderungen glycinerge Synapsen während ihrer funktionellen Reifung unterliegen und ob sie im erwachsenen Tier überhaupt noch vorhanden sind, wurden Kleinhirnkernneurone unterschiedlichen Alters (P 7 – P 23) auf das Vorhandensein glycinerner Rezeptoren und Synapsen untersucht. In einer Bestätigung und Ergänzung der Ergebnisse von Kawa et al. (2003) konnten strychninsensitive IPSCs in Kleinhirnkernneuronen des neonatalen und jungadulten Alters gefunden werden. Während der jugendlichen Altersphase (P13 – P 17) waren keine cholidvermittelten IPSCs nachweisbar. Dieses Ergebnis veranlaßt zu der Vermutung, dass die Anhäufung von Glycin in präsynaptischen Boutons während der jugendlichen Altersphase (P13 - P17) nicht begleitet ist von der Expression glycinerner strychninsensitiver Rezeptoren im Bereich der Postsynapse. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen glycinerner synaptischer Ströme in diesen Neuronen könnte eine unzureichende Entwicklung glycinerner Synapsen während dieses Alters sein. Diese Möglichkeit kann jedoch in Anbetracht der Tatsache, dass bereits in neonatalen Kleinhirnkernneuronen glycinerge postsynaptische Potentiale abgeleitet werden können, ausgeschlossen werden. Das Fehlen glycinerner IPSCs während des jugendlichen Alters könnte weniger durch die synaptische Struktur sondern eher durch eine Änderung ihrer Funktion verursacht werden. Inhibitorische Synapsen, bei denen eine synaptische Struktur nachweislich vorhanden jedoch nicht funktional ist, werden in der Literatur als „stille Synapsen“ bezeichnet. Diese wurden für GABAerge Verbindungen im unausgereiften Hippocampus und in neuronalen Kulturen des Cortex beschrieben (Gubellini et al., 2001; Kilman et al., 2002) sowie für glycinerge Verbindungen in den Mauthnerzellen des Goldfisches (Korn und Faber, 1990). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten zum einen darauf hin, dass glycinerge „stille Synapsen“ auch im Säugetiergehirn vorhanden sein könnten, und darüber hinaus, dass diese nicht-funktionale, „stille“, Phase vornehmlich während der ersten postnatalen Wochen

auftritt, vergleichbar mit GABAergen und glutamatergen „stillen“ Verbindungen (Durand et al., 1996; Isaac et al., 1997; Gubellini et al., 2001). Ihr Vorkommen in Kleinhirnkernneuronen jugendlichen Alters könnte auf eine mögliche Rolle dieser Synapsen in der Modulation und Feinabstimmung des sich entwickelnden glycinergen Netzwerkes hindeuten. Doch warum sind glycinerge Synapsen während dieser Zeit nicht funktional? Obwohl der zugrundeliegende Mechanismus „stillen“ Synapsen insbesondere an exzitatorischen Verbindungen intensiv untersucht wurde, ist man von der Beantwortung der Frage nach der Funktion dieser Synapsen weit entfernt. Auf der Seite der Postsynapse könnte eine kleine Anzahl bzw. das vollständige Fehlen postsynaptischer Rezeptoren die Nicht-Funktionalität dieser Synapsen erklären (Isaac, 2003). Alternativ wurden präsynaptische Mechanismen, wie z.B. eine Unreife des Systems zur Anhäufung von Neurotransmittern in den Vesikeln („low quantum“) oder eine geringe Wahrscheinlichkeit, diese Vesikel zu entleeren, vorgeschlagen (Isaac, 2003; Voronin und Cherubini, 2003). Im Falle der jugendlichen, glycinergen, Kleinhirnkernsynapsen lässt sich das Auftreten nicht-funktionaler Synapsen wahrscheinlich nicht auf eine Unreife präsynaptischer Strukturen zurückführen, da in früheren Stadien der Entwicklung bereits glycinerge synaptische Ströme abgeleitet werden konnten (Kawa et al., 2003 und Ergebnisse dieser Studie). Darüber hinaus ließen sich trotz der Anwendung von Verfahren, die eine Erhöhung der Neurotransmitterausschüttung bewirken (hypertone Lösungen und Kaliumkanalblocker), keine glycinergen IPSCs in jugendlichen Neuronen ableiten. Eine ineffektive oder ungenügende Ausschüttung von Neurotransmittern kann demnach die transiente Phase silenter Synapsen nicht erklären. Im Gegenteil machen die beschriebenen Beobachtungen eine Veränderung auf Seiten der Postsynapse wahrscheinlich.

Die Amplitude inhibitorischer IPSCs hängt von der Anzahl der postsynaptischen Rezeptoren ab (Nusser et al., 1997; Singer und Berger, 1999). Ein Rückgang postsynaptischer GlyR in einem Ausmaß, das ein Sinken der Amplitude postsynaptischer Ströme unter die messbare Schwelle bewirkt, könnte die Synapse praktisch „stilllegen“. Eine mögliche Erklärung für den Rückgang synaptischer GlyR während des jugendlichen Alters könnte eine geringere

Exprimierung dieser Rezeptoren aufgrund eines Wechsel ihrer α -Untereinheiten sein (Mangin et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass während des jugendlichen Alters ein solcher Wechsel stattfindet. Zum einen unterschieden sich durch Glycin evozierte Ströme in Kleinhirnkernneuronen jugendlichen und jung- adulten Alters in ihrer Sensitivität auf Pikrotoxin, wie es bei einem Wechsel der Untereinheiten von $\alpha 2$ zu $\alpha 1$ zu erwarten wäre (Pribilla et al., 1992). Zum anderen deutete der Kurvenverlauf glycinergere IPSCs jung- adulter Neurone auf eine schnelle Kinetik dieser synaptischen Ströme hin. Da glycinergere IPSCs mit schneller Kinetik wahrscheinlich von der Aktivierung von GlyR abhängen, die die $\alpha 1$ -Untereinheit enthalten (Takahashi et al., 1992), lässt sich vermuten, dass ein Wechsel von der $\alpha 2$ zur $\alpha 1$ - Untereinheit sehr wahrscheinlich vor P17 stattgefunden haben muß. Da glycinergere IPSCs in Kleinhirnkernneuronen von Ratten im Alter von P12 oder jünger längere Abklingzeitkonstanten aufweisen, folgt daraus, dass ein Wechsel der α - Untereinheiten vermutlich zwischen P12 und P17 stattfindet. Malosio et al. (1991) konnten zeigen, daß eine Exprimierung der $\alpha 1$ -Untereinheit im lateralen Kleinhirnkern im Vergleich mit der im Rückenmark verzögert stattfindet. Ein nachweisbares Niveau von Transkripten, die für diese Untereinheit kodieren, wird erst nach P15 erreicht. Auch dies unterstützt die Vermutung, dass ein Wechsel der α - Untereinheiten des Glycinrezeptors wahrscheinlich während des jugendlichen Alters (P13 -P17) stattfindet. Das zeitgleiche Auftreten der Änderung der Untereinheitenkomposition des Glycinrezeptors und der Nicht- Funktionalität glycinergere Synapsen könnte Hinweis darauf sein, dass der Wechsel der α - Untereinheiten zu einer Umorganisation der Postsynapse führen könnte (van Zundert et al., 2004), die wiederum einen vorübergehenden Rückgang synaptischer Glycinrezeptoren bewirken und damit das Vorkommen stiller Synapsen in diesen Neuronen erklären könnte. Eine weitere Erklärung für eine Herunterregulation postsynaptischer Glycinrezeptoren wäre ein aktivitätsabhängiger Mechanismus. Wie für glutamaterge Synapsen gezeigt, können auch inhibitorische nicht-funktionale GABAerge Synapsen durch eine erhöhte synaptische Aktivität in funktionale Synapsen umgewandelt werden (Charpier et al., 1995; Gubellini et

al., 2001). Ein Anstieg der Anzahl stiller Synapsen könnte demnach durch die Supprimierung von Aktivität oder eine Änderung der Anzahl postsynaptischer Rezeptoren hervorgerufen werden. Dies wurde von Kilman et al. (2002) in Neuronenkulturen des Neocortex gezeigt. Entwicklungsbedingte Veränderungen des Aktivitätsniveaus in den Kleinhirnkernneuronen könnte somit zur einer Stilllegung glycinerges Synapsen beitragen. Daß es entwicklungsbedingt tatsächlich zu einer Veränderung der Aktivität der Kernneurone kommt, wurde in früheren Studien gezeigt (Gardette et al., 1985; Aizenman et al., 2003).

4.4 Methodische Überlegungen

Es besteht die Frage, ob die unterschiedlichen Spontanaktivitäten der Neurone und ihre unterschiedliche Neigung, Plateaupotentiale zu zeigen, tatsächlich einen unterschiedlichen Zelltyp anzeigen, oder ob es sich um Ableitungen eines einzigen Zelltyps handelte, der womöglich unterschiedlichen modulatorischen Einflüssen unterlegen war. Daß es sich bei den beschriebenen elektrophysiologischen Befunden um tatsächliche Charakteristika der Zellen handelt und nicht um ein Artefakt der Patch Clamp- Technik lässt sich an verschiedenen Beobachtungen festmachen: zum einen zeigten die Neurone ihre typischen Eigenschaften bereits unmittelbar nach Herstellung der „Ganzzell- Konfiguration“, zum anderen konnte in keinem der Fälle ein Übergang vom zyklisch entladenden zum regelmäßig entladenden Verhalten beobachtet werden. Der umgekehrte Fall, dass ein schneller Austausch des intrazellulären Mediums mit der Elektrodenlösung das regelmäßige Feuerverhalten der Typ II- Neurone in die Generierung von Plateaupotentiale überführen könnte, ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse pharmakologischer Studien eher unwahrscheinlich. Ein burstartiges Entladungsmuster der Kleinhirnkernneurone, wie in dieser Studie beschrieben, wurde bisher nur in einer Studie, die mit konventionellen Mikroelektroden arbeitete, beschrieben und auch nur in einem kleinen Teil der Population (7%), obwohl durch das blinde Einbringen der Elektroden wahrscheinlich hauptsächlich von großen Neuronen abgeleitet wurde (Aizenman und Linden,

1999a). Im Vergleich zu Standard- Mikroelektroden zeichnet sich die Patch-Clamp Technik durch das Erreichen sehr hoher Eingangswiderstände aus (in dieser Studie 5 - 7 G Ω vs. ca. 45 M Ω , Aizenman und Linden, 1999a, b; Llinas und Mühlethaler, 1988). Auf diese Weise könnte es durch die Patch Clamp-Technik möglicherweise zu einem stärkeren Wirkungsgrad selbst schwacher Membranströme kommen und demnach Plateaus leichter auszulösen sein als bei Ableitungen mit Standard- Mikroelektroden. In anderen Studien, die Standard- Mikroelektroden verwendeten, wurden ähnliche Eigenschaften wie z.B. eine hohe Spontanaktivität und die Beteiligung von Natrium- und Calciumleitfähigkeiten bei der Generierung von Plateaupotentialen beschrieben (Gardette et al., 1985a,b; Jahnsen 1986a,b). Im Hippocampus der Ratte und im Spinalganglion gelang der Nachweis eines burstartigen Entladungsmusters jedoch auch mittels konventioneller Mikroelektroden (Cobb et al., 1999, Amir et al., 1997). Diese Argumente sprechen dafür, daß die hier beobachteten zyklischen Plateaus allgemein unter *in vitro* Bedingungen auftreten können und nicht Folge der Patch Clamp- Technik sind.

Neben Schwankungen im Färbeergebnis war dieses in einigen Serien sowohl für den Kleinhirncortex als auch für die Kleinhirnkerne insgesamt zu schwach, um einzelne Neurone identifizieren zu können. Das nicht einheitliche Färbeergebnis einiger Schnittserien könnte auf das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren zurückzuführen sein, darunter die Dauer und Art der Gewebeentnahme und Schnitthanfertigung, das Alter der Schnitte, die Qualität der Fixierung oder Unterschiede bei der Anwendung des Färbeprotokolls. Darüber hinaus birgt die Anwendung eines Färbeprotokolls, das die Verwendung eines Einbettungsmediums auf Harzbasis vorsieht, verschiedene Nachteile. Zum einen ist die Entfernung des Harzes durch Natronlauge ein kritischer Schritt, der durch unzureichende Freilegung der Antigenität zu einer abgeschwächten Antikörperbindung führen kann, zum anderen kann es bei der Verwendung von Hirnschnitten kleiner Dicke (wie es die Elektrophysiologie erfordert) während der Einbettung trotz vorsichtiger Handhabung zu einem Reißen der Schnitte kommen. Diese Nachteile ließen sich durch die

Anwendung anderer Verfahren, z.B. der Verwendung von Gefrierschnitten, verhindern.

In dieser Arbeit wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Ableitung von Neuronen mit mittelgroßem und kleinem Soma gelegt. Wie bereits angedeutet, birgt dies jedoch einige technische Schwierigkeiten. So kam es nach Beendigung der Ableitung oft dazu, dass die Zelle mit der Elektrode aus dem Schnitt gezogen wurde oder eine Füllung der Zelle mit Neurobiotin nicht möglich war, da die Membran während der Ableitung verletzt wurde. Dieser Tatbestand machte eine spätere Identifikation der Zellen unmöglich. Wie in Abschnitt 4.2 dargestellt, zeigte sich in den während der Ableitung erfolgreich mit Neurobiotin gefüllten Neuronen in der anschließenden immunohistochemischen Färbung weder ein eindeutig positives Färberesultat für Glutamat, GABA noch Glycin. Dies könnte darin begründet sein, dass es bei der konventionellen Ganzzelleableitung zu einem Austausch der intrazellulären Transmittermoleküle mit der Pipettenlösung kommt. Um diesen Austausch so gering wie möglich zu halten, wurde die Ableitungszeit reduziert. Dies führte jedoch nicht zu einem verbesserten Resultat. Ein weiterer Nachteil der Ganzzelleableitung besteht in einer Unterbrechung des ionischen Gleichgewichts der Zelle. Insbesondere chloridvermittelte Antwortpotentiale, die bei der Untersuchung der glycinergen Übertragung von besonderer Bedeutung sind, können somit nur unter artifiziellen Bedingungen untersucht werden. Eine Möglichkeit, die genannten Komplikationen zu umgehen, bestünde in der Anwendung des „perforierten Patch“. Bei dieser Methode wird das Membranstück unter der Ableitpipette mit artifiziell verursachten Poren durchlöchert (z.B. durch Gramicidin A). Dadurch erhält man eine niederohmige Verbindung zum Cytoplasma, durch die jedoch keine größeren Moleküle diffundieren können. Durch den Einbau solcher sogenannter Porenbildner erreicht man Leitfähigkeiten zwischen Pipetten- und Zellinnerem, die denen der normalen Ganzzellkonfiguration ähneln. Im Gegensatz zu Nystatin und Amphotericin B sind die von Gramicidin A gebildeten Poren für Anionen impermeabel, sodaß hierbei die physiologische intrazelluläre Chloridkonzentration und chloridabhängige Second Messengersysteme

unverändert bleiben (Kyrozis und Reichling, 1995). Auf diese Weise könnte ein naturgetreueres Abbild der tatsächlichen Leitfähigkeiten erzielt werden. Um die Zelle nach der elektrophysiologischen Charakterisierung mit einem Farbstoff, wie z.B. Neurobiotin, zu füllen, könnte kurzzeitig zur Ganzzellkonfiguration übergewechselt werden. Beim Entfernen der Elektrode sollte darauf geachtet werden, eine Verletzung der Membran so gering wie möglich zu halten. Der Austausch der Transmittermoleküle mit der Pipettenlösung wäre hierbei minimal und ein positives Färberesultat wahrscheinlicher. Ein Nachteil der Anwendung des „perforierten Patch“ ist die Stabilität der Substanz, die sämtliche Lösungen und Geräte leicht kontaminiert, was zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann.

Die immunhistochemische Färbung der Kleinhirnkerne war in einigen Serien insgesamt zu schwach, um einzelne Neurone identifizieren zu können. Insbesondere die glycinerge Färbung stellte sich sowohl für zuvor abgeleitete als auch nicht abgeleitete Neurone als sehr diffizil heraus, was auch durch die Verdoppelung der Antikörperkonzentration von 1:1000 auf 1:500 nicht zu lösen war. Eine andere Möglichkeit, den Transmittergehalt elektrophysiologisch charakterisierter Neurone zu bestimmen, bestünde in der Verwendung eines lipophilen, fluoreszierenden Farbstoffes, wie z.B. Di-I, in Verbindung mit der Methode des „perforierten Patch“. Der Farbstoff diffundiert hierbei durch die Zellmembran und breitet sich in der Zelle, ähnlich wie native Lipide, durch passive laterale Diffusion entlang des Konzentrationsgefälles aus (Kageyama et al., 1993). Die hydrophilen Anteile der Membran wirken als Diffusionsbarriere. Als Konsequenz werden die Zellen in ihrer Gesamtheit angefärbt (Köbber et al., 2000). Durch Anwendung dieser Methode wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine erfolgreiche Verbindung geschaffen zwischen der Physiologie, Morphologie und Neurohistochemie einzelner identifizierter Neurone im Bulbus olfactorius (Puche et al., 2004).

Die hier vorgestellten Mix- Neurone bildeten hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften innerhalb der Gruppe der zyklisch feuernenden Neurone eine gesonderte Gruppe mit langsamerer Kinetik. Bezüglich ihrer Somagröße lagen sie zwischen den Typ I- und Typ II- Neuronen. Aufgrund

ihrer Größe und ihrer depolarisierenden Potentiale könnte es sich bei diesen Neuronen um GABAerge Projektionsneurone handeln. Leider konnte diese Hypothese mittels der hier angewandten immunohistochemischen Methoden noch nicht bestätigt werden. Eine andere Möglichkeit, GABAerge Neurone gezielt nachzuweisen und gleichzeitig die Schwierigkeiten der immunohistochemischen Färbung der Kleinhirnkernneurone zu umgehen, bestünde in der Zuhilfenahme transgener Mäuse. Bei der GAD67- GFP knock-in Maus wird, unter der Kontrolle des endogenen GAD (GAD67)- Promotors, grünes fluoreszierendes Protein (GFP) in GABAergen Neuronen exprimiert (Tamamaki et al., 2003). Mittels Zweiphotonenmikroskopie lassen sich die GABAergen Neurone visualisieren (Denk et al., 1994). Diese Methode könnte kombiniert werden mit elektrophysiologischen Ableitungen der Neurone und anschließender intrazellulärer Füllung mit Neurobiotin oder Biocytin, um die morphologischen Eigenschaften der Neurone genauer zu untersuchen (Ono et al., 2005). In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Zeilhofer et al. (2005) wurde dies auch für glycinerge Neurone beschrieben. Hierbei wurde GFP unter der Kontrolle des Promotors für das Gen des Glycintransporters GLYT2 exprimiert. GLYT2 stellt einen zuverlässigen Marker glycinerges Neurone dar (Poyatos et al., 1997). Auf diese Weise konnten im Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn glycinpositive Neurone nachgewiesen werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass Glycin als Neurotransmitter die großen, glutamatergen Projektionsneurone inhibiert. Wahrscheinlichste Quelle dieser Synapsen sind die lokalen Interneurone. An kleinen und mittelgroßen Kleinhirnkernneuronen konnten keine glycinergen Synapsen nachgewiesen werden, hier könnten die nachweislich vorhandenen Glycinrezeptoren extrasynaptisch lokalisiert sein. Weitere elektrophysiologische Experimente sollten die Kinetik dieser Rezeptoren und möglicher Subtypen, d.h. die Aktivierungs-, Desensitivierungs- und Deaktivierungszeiten der Rezeptorströme weiter untersuchen. Weiteren Aufschluß über die mögliche Funktion dieser Rezeptoren könnten vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen dieser Rezeptorströme in cerebellären Mausmutanten liefern.

Die Resultate dieser Studie sprechen dafür, dass das Auftreten nicht-funktionaler Synapsen in jugendlichen Kleinhirnkernneuronen eher auf Veränderungen der Postsynapse zurückzuführen ist als auf eine Unreife präsynaptischer Strukturen. Um diese These zu erhärten ist der Nachweis glycinergender Endigungen in Kleinhirnkernneuronen, insbesondere des jugendlichen Alters, vonnöten. Auch hierzu könnte der Nachweis des Glycintransporters GLYT2 dienen. Unter Verwendung eines an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten Markers für GLYT2 und anschließender konfokaler Lasermikroskopie könnten die so markierten Strukturen sichtbar gemacht werden (Lee et al., 2005; Poyatos et al., 1997). Mittels doppelter Immunofluoreszenz ließen sich gleichzeitig Glycinrezeptoren oder Glycin selbst lokalisieren (Lee et al., 2005; Poyatos et al., 1997).

4.5 Funktionelle Überlegungen

Wie oben beschrieben, findet der Hauptteil der Synapsen der Kleinhirnkernneurone seinen Ursprung in den GABAergen Purkinjezellen. Diese machen etwa 75% der Gesamtheit synaptischer Eingänge der Kleinhirnerne aus (De Zeeuw und Berrebi, 1995). Vor dem Hintergrund der ohnehin massiven Inhibition ist die Bedeutung weiterer inhibitorischer Einheiten in den Kleinhirnkernen fraglich. Anatomische Daten weisen jedoch darauf hin, dass im Schaltkreis der Kleinhirnkernneurone neben GABA auch Glycin eine Rolle in der inhibitorischen synaptischen Transmission spielen könnte. So wurden kleine glycinerge Neurone nachgewiesen, bei denen es sich um Interneurone handeln könnte. Darüber hinaus zeigte sich eine Anordnung synaptischer Boutons, die Glycin und/oder GABA enthielten, um die großen Kernneurone herum (Chen und Hilman, 1993). In großen Kleinhirnkernneuronen jung-adulter Tiere konnten strychninsensitive IPSCs nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass eine glycinerge Inhibition in ausgereiften Kernneuronen tatsächlich vorhanden ist. Der wahrscheinlichste Ursprung dieser glycinergen IPSCs sind die kleinen Kleinhirnkernneurone. Eine andere Quelle glycinergender Fasern im Nucleus interpositus und lateralis, von wo die hier gezeigten Ableitungen

stammen, ist nicht bekannt. Diese Entdeckung wirft die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieser inhibitorischen Eingänge auf. Frühere Untersuchungen legten eine mögliche komplementäre Funktion von GABA und Glycin nahe. Hierbei wurden Glycin inhibitorische Effekte mit schneller Kinetik zugewiesen, während GABA für die langsame Inhibition verantwortlich gemacht wurde (Jonas et al., 1998; Donato und Nistri, 2000). Wie hier gezeigt war die Kinetik glycinерger und GABAerger IPSCs in ausgereiften Kleinhirnkernneuronen jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die funktionelle Rolle dieser beiden inhibitorischen Eingänge wird demnach nicht von Unterschieden ihrer zeitlichen Eigenschaften bestimmt. Stattdessen könnten diese Unterschiede auf räumliche Faktoren zurückzuführen sein. Rolle und Bedeutung der glycinergen Inhibition könnte von der Lokalisation kleiner Neurone in den Kleinhirnkernen bestimmt werden, wo sie einer unterschiedlichen Kontrolle und Neuromodulation, im Vergleich zu GABA, unterliegen. Dies könnte zur Flexibilität des nucleären Systems beitragen. Das geringe Auftreten glycinерger IPSCs könnte auf die insgesamt eher knappe Anzahl glycinерger Synapsen in den Kleinhirnkernen zurückzuführen sein. Glycinerge Synapsen machen nur etwa 10% der Gesamtzahl von Synapsen in den Kernneuronen aus (Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1997; De Zeeuw und Berrebi, 1995). Nichtsdestotrotz zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass glycinerge Inhibition in den Kleinhirnkernen unter bestimmten Bedingungen eine bedeutende Rolle spielen könnte: zum einen war die Glycinaktivität unter Einsatz von Kaliumkanalblockern erhöht, was nahe legt, dass glycinerge Eingänge unter *in vivo*- Bedingungen durch Neuromodulatoren, die über dieselbe präsynaptische Kaliumleitfähigkeit wirksam werden, reguliert werden könnten. Klinische Studien weisen darauf hin, dass der Neuromodulator Serotonin das Potential besitzt, die Symptome bei spinocerebellären Ataxien zu verbessern. Dementsprechend wurde berichtet, dass die glycinerge Neurotransmission im Kleinhirncortex über Serotonin beeinflusst werden kann (Dieudonne und Dumoulin, 2000). Serotonin verursacht hierbei über die Modulation von depolarisationsaktivierten Kaliumkanälen und dem hyperpolarisationsaktivierten Kationenstrom I_h (Wang et al., 1992; Li et al.,

1993) eine erhöhte Aktivität der den Golgizellen vorgeschalteten Lugarozellen. Dies führt in den Golgizellen zu einer erhöhten Frequenz glycinerner IPSCs. In den Kleinhirnkernneuronen könnte eine verstärkte Aktivität der Interneurone durch Serotonin zu einer verstärkten Inhibition der nachgeschalteten Projektionsneurone führen. Pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen sollten folgen, um einen möglichen modulatorischen Effekt von Serotonin auf die glycinerge Neurotransmission in den Kleinhirnkernneuronen zu bestimmen.

Es ist wahrscheinlich, dass die Projektionsneurone unter *in vivo*- Bedingungen synaptische Verbindungen mit einer Vielzahl von Interneuronen eingehen, und dass die kombinierte inhibitorische Wirkung dieser Eingänge eine signifikante Hyperpolarisation der Zielzellen verursachen kann. In Abhängigkeit von der dendritischen Lokalisation glycinerner Synapsen könnte die Wirkung der Interneurone auch in einem Shuntingeffekt exzitatorischer Eingänge bestehen oder in der zeitlichen Kontrolle der Aktionspotentialentladungen. Die Purkinjellaxone bilden vorwiegend Synapsen auf den distalen Dendriten der Kleinhirnkernneurone (Aizenman et al., 2003). Falls die möglichen Interneurone an proximalen Dendriten oder am Soma ihrerseits Synapsen bilden und Glycin eine stark hyperpolarisierende Wirkung auf das Membranpotential ausübt, könnten die Interneurone möglicherweise eine Übererregung, ausgelöst durch massiv erregende Eingänge der Moos- und Kletterfaserkollateralen, vermeiden, bevor ein Purkinjelleingang die Kleinhirnkernneurone hemmen würde. Für ein tieferes und umfassenderes Verständnis der Funktion der Kleinhirnkernneurone sollten Einzelaktivitätsableitungen durch funktionelle Netzwerkanalysen mittels Multielektrodenableitungen im wachen, sich verhaltenden Tier, ergänzt werden. Die Multielektroden- Ableittechnik bietet den Vorteil, dass zahlreiche Neurone in einem zweidimensionalen Ausschnitt eines neuronalen Netzes zeitgleich beobachtet werden können. Hierdurch kann die Aktivität des Einzelneurons im Kontext der Netzwerkeigenschaften erfasst und interpretiert werden. Eine Schwierigkeit dieser Methode bestünde in der Erfassung von Neuronen mit kleiner Somagröße, ähnlich zu den oben vorgestellten Untersuchungen mit scharfen Elektroden an Hirnschnittpräparaten. Ergebnisse der Studien im

Wildtyp könnten später mit Untersuchungen an cerebellären *lurcher*- oder *pcd*-Mutanten verglichen werden.

Die vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass glycinerge Synapsen eine „stille“, nicht- funktionale, Phase durchlaufen können. Dies ermöglicht zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Veränderung der Anzahl aktiver Synapsen durch Aktivität oder andere Bedingungen (Charpier et al., 1995; Gubellini et al., 2001). Ruhende glycinerge Synapsen könnten somit eine Art Reservoir bilden, das, sobald die Notwendigkeit besteht, aktiviert werden kann. Studien zum konditionierten Blinkreflex zeigen einen Anstieg des Glycinniveaus während der Phase der Konditionierung. Dies war in der Phase der Habituation und Extinktion nicht zu beobachten (Jimenez-Diaz et al., 2002).

Schlussendlich unterstützen unsere Ergebnisse die Vermutung, dass eine Zunahme der glycinergen Inhibition unter Bedingungen einer Purkinjelldegeneration, wie es bei Mausmodellen der spinocerebellären Ataxie zu beobachten ist, einen wirkungsvollen Kompensationsmechanismus für den Verlust der GABAergen Eingänge darstellen kann (Bäurle und Grüsser-Cornehls, 1997; Sultan et al., 2002). Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen für den Fall einer unzureichenden oder gestörten Inhibition eine therapeutische Möglichkeit auf, über die Modulation der glycinergen Inhibition bzw. die direkte Aktivierung synaptischer oder extrasynaptischer GlyR der Kleinhirnkernneurone regulierend ins cerebelläre System einzugreifen (Chattipakorn und McMahon, 2003).

Die dargestellten Ergebnisse erklären nicht, warum die Kleinhirnkernneurone über eine Fülle intrinsischer Leitfähigkeiten verfügen. Das Wissen über die Verarbeitung synaptischer Potentiale im Zusammenspiel mit diesen Eigenschaften unter *in vivo*- Bedingungen ist bisher nicht ausreichend, um ein abschließendes Urteil zu fällen. Auch eine Korrelation mit morphologischen Daten ist schwierig zu treffen. Es existieren nur sehr wenige Studien, die dies versuchten und auch hierbei konnte nur ein unklares Verhältnis zwischen der Anatomie der Kleinhirnkernneurone und ihrer intrinsischen elektrischen Erregbarkeit aufgezeigt werden (Czubayko et al, 2001; Aizenman und Linden, 2003). Auch die anatomischen Ergebnisse dieser Studie führten zu keinem

eindeutigen Ergebnis. Die vorgestellten Daten deuten zum einen auf eine Rolle von Glycin als Neurotransmitter in den Kleinhirnkernneuronen hin, zum anderen auf eine nicht- funktionale Phase dieser glycinergen Synapsen als Folge einer entwicklungsbedingten Umorganisation der postsynaptischen Region. Ein Nachweis, dass Glycin während dieser Zeit tatsächlich ausgeschüttet wird, steht aus.

Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit ergeben sich für weitere Studien vielfältige Ansatzpunkte, die die Untersuchung der Konnektivität der Kleinhirnkernneurone zum Inhalt haben und zu einem tieferen Verständnis der Funktion der Kleinhirnkernkerne beitragen können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Informationen aus dem Kleinhirnkortex erreichen nur unter Vermittlung der Kleinhirnkerne die nachgeschalteten Zentren des Hirnstammes, des Mittelhirns und des Thalamus. Obwohl die efferenten und afferenten Verbindungen der Kerne wohl bekannt sind, bestehen nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Konnektivität der Kleinhirnkernneurone selbst befassen. Üblicherweise unterscheidet man in den Kleinhirnkernen, mit Blick auf die verwendeten Neurotransmitter und Projektionsziele, drei unterschiedliche Klassen von Neuronen. Ob sich diese anatomisch definierten Neuronentypen auch hinsichtlich ihrer elektrischen Membraneigenschaften unterscheiden, ist bisher nur unzureichend bekannt und war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten elektrophysiologische Untersuchungen zur Rolle von Glycin in der inhibitorischen synaptischen Transmission der Kleinhirnkerne. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden Kleinhirnkernneurone unterschiedlichen Alters und Größe mittels Patch Clamp- Technik in der Ganzzellkonfiguration unter Sichtkontrolle abgeleitet. Für die Bestimmung des Neurotransmittergehaltes der zuvor charakterisierten Neurone kamen immunhistochemische Methoden zur Anwendung. Um zu garantieren, dass von Neuronen unterschiedlicher Größe abgeleitet wurde, wurden die Neurone vor der Ableitung gezeichnet und ihre Somagröße ermittelt. Die untersuchten Kleinhirnkernneurone unterschieden sich elektrophysiologisch hinsichtlich des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins von Plateaupotentialen, dem Ausmaß ihrer Reboundantwort nach Beendigung hyperpolarisierender Strompulse sowie hinsichtlich der Form ihrer Aktionspotentiale und Nachhyperpolarisationen. Die genauere Analyse der elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften der Neurone erlaubte in Anlehnung an Czubayko et al. (2001) die Differenzierung der Gesamtpopulation in sogenannte Typ I- oder Typ II- Neurone. Zusätzlich zu dieser Einteilung fanden sich Neurone mit überlappenden Eigenschaften, die als Mix- Neurone bezeichnet wurden. Obwohl diese Zellen Plateaupotentiale generierten waren sie hinsichtlich ihrer Kinetik eher mit den Typ II- Neuronen

vergleichbar. Die Clusteranalyse der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kleinhirnkernneurone unterstützte die Hypothese einer möglichen weiteren Unterteilung der zyklisch feuernden Neurone in Typ I- und Mix- Neurone. Aufgrund der geringen Größe, ihrer Seltenheit und der starken Verletzbarkeit der Typ II- Neurone, was im Zusammenspiel mit der erhöhten Gefahr, die Neurone mit der Elektrode aus dem Hirnschnitt zu ziehen, auf einen schmalen Dendritenbaum hinweisen könnte, könnte es sich bei den Typ II- Neuronen um Interneurone der Kleinhirnerne handeln. Die morphologisch heterogene Gruppe der Typ I- und Mix- Neurone könnte sowohl glutamaterge als auch GABAerge Projektionsneurone umfassen. Leider lieferte die anschließende immunhistochemische Färbung keinen weiteren Hinweis über die Richtigkeit der Hypothese, dass es sich bei den elektrophysiologisch ermittelten Gruppen tatsächlich um unterschiedliche Neuronenklassen handeln könnte.

Die Untersuchung der Funktion von Glycin als synaptischer Neurotransmitter in den Kleinhirnkernen zeigte, dass glycinerge Synapsen in neonatalen und jungadulten Neuronen vorhanden und funktional sind, während sie während des jugendlichen Alters (P13 bis P17) eine vorübergehende, nicht- funktionale, Phase durchlaufen. Zum Badmedium beigefügtes Glycin induzierte in Neuronen jeden Alters und Größe einen strychninsensitiven, einwärtsgerichteten Strom, was auf das Vorhandensein funktionaler inhibitorischer Glycinrezeptoren während der gesamten untersuchten Altersphase hindeutet. Strychninsensitive IPSCs waren jedoch nur in neonatalen und jungadulten Neuronen nachweisbar und auch nur in Neuronen mit großen Somata. Die wahrscheinlichste Quelle dieser IPSCs sind die glycinergen Neurone der Kleinhirnerne, bei denen es sich vermutlich um Interneurone (und hierbei möglicherweise um die zuvor gezeigten Typ II-Neurone), handelt. Der fehlende Nachweis glycinerner Synapsen kleiner und mittelgroßer Neurone könnte auf eine extrasynaptische Lokalisation der GlyR hindeuten. Das Fehlen strychninsensitiver IPSCs in Kleinhirnkernneuronen jugendlichen Alters spricht für das Vorliegen nicht- funktionaler, „stiller“, Synapsen. Eine Analyse der IPSC-Kinetik sowie der Blockierbarkeit der Glycinrezeptoren durch Pikrotoxin lieferte Hinweise für einen Wechsel der α - Untereinheit des Glycinrezeptors während

der Phase stiller Synapsen im jugendlichen Alter. Diese nicht- funktionale Phase glycinerner Synapsen könnte eine Folge der Umorganisation der postsynaptischen Region während der Ausreifung von Glycinrezeptoren sein. Die Ergebnisse dieser Studie tragen zum Verständnis der funktionellen Bedeutung einer glycinergen Neurotransmission in den Kleinhirnkernen bei, eine Bedeutung, die bislang unterschätzt wurde. Glycin könnte unter physiologischen und pathologischen Gegebenheiten im sich entwickelnden als auch im ausgereiften Nervensystem eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der cerebellären Funktion spielen. Darüber hinaus geben diese Ergebnisse erstmalig einen Hinweis für das Vorhandensein stiller Synapsen im sich entwickelnden glycinergen System und veranlassen zu der Vermutung, dass diese Synapsen nicht nur eine wichtige Rolle in der Feinabstimmung des neuronalen Netzwerkes der Kleinhirnkerns sondern darüber hinaus auch in anderen Hirnarealen spielen könnten.

6 LITERATUR

- Aizenman CD, Huang EJ and Linden DJ.** Morphological correlates of intrinsic electrical excitability in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 89: 1738-1747, 2003.
- Aizenman CD, Huang EJ, Manis PB and Linden DJ.** Use-dependent changes in synaptic strength at the Purkinje cell to deep nuclear synapse. *Prog Brain Res* 124: 257-273, 2000.
- Aizenman CD and Linden DJ.** Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *J Neurophysiol* 82: 1697-1709, 1999.
- Akagi H and Miledi R.** Heterogeneity of glycine receptors and their messenger RNAs in rat brain and spinal cord. *Science* 242: 270-273, 1988.
- Akagi H, Patton DE and Miledi R.** Discrimination of heterogenous mRNAs encoding strychnine-sensitive glycine receptors in *Xenopus* oocytes by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8103-8107, 1989.
- Altman J and Bayer SA.** Time of origin and distribution of a new cell type in the rat cerebellar cortex. *Exp Brain Res* 29: 265-274, 1977.
- Anchisi D, Scelfo B and Tempia F.** Postsynaptic currents in deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 85: 323-331, 2001.
- Batini C, Buisseret-Delmas C, Corvisier J, Hardy O and Jassik-Gerschenfeld D.** Brain stem nuclei giving fibers to lobules VI and VII of the cerebellar vermis. *Brain Res* 153: 241-261, 1978.
- Batini C, Compoin C, Buisseret-Delmas C, Daniel H and Guegan M.** Cerebellar nuclei and the nucleocortical projections in the rat: retrograde tracing coupled to GABA and glutamate immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 315: 74-84, 1992.
- Baurle J and Grusser-Cornehls U.** Differential number of glycine- and GABA-immunopositive neurons and terminals in the deep cerebellar nuclei of normal and Purkinje cell degeneration mutant mice. *J Comp Neurol* 382: 443-458, 1997.
- Baurle J, Helmchen C and Grusser-Cornehls U.** Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in Purkinje cell

degeneration mutant mice: a possible compensatory mechanism. *J Comp Neurol* 384: 580-596, 1997.

Becker CM, Hoch W and Betz H. Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J* 7: 3717-3726, 1988.

Brodal P and Brodal A. The olivocerebellar projection in the monkey. Experimental studies with the method of retrograde tracing of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 201: 375-393, 1981.

Caddy KW and Biscoe TJ. Preliminary observations on the cerebellum in the mutant mouse Lurcher. *Brain Res* 91: 276-280, 1975.

Caston J, Jones N and Stelz T. Role of preoperative and postoperative sensorimotor training on restoration of the equilibrium behavior in adult mice following cerebellectomy. *Neurobiol Learn Mem* 64: 195-202, 1995.

Caston J, Vasseur F, Stelz T, Chianale C, haye-Bouchaud N and Mariani J. Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Brain Res Dev Brain Res* 86: 311-316, 1995.

Chan CY, Hounsgaard J and Midtgaard J. Excitatory synaptic responses in turtle cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 409: 143-156, 1989.

Chan-Palay V. Fine structure of labelled axons in the cerebellar cortex and nuclei of rodents and primates after intraventricular infusions with tritiated serotonin. *Anat Embryol (Berl)* 148: 235-265, 1975.

Chan-Palay V, Palay SL and Wu JY. Gamma-aminobutyric acid pathways in the cerebellum studied by retrograde and anterograde transport of glutamic acid decarboxylase antibody after in vivo injections. *Anat Embryol (Berl)* 157: 1-14, 1979.

Chen K, Li HZ, Ye N, Zhang J and Wang JJ. Role of GABA(B) receptors in GABA and baclofen-induced inhibition of adult rat cerebellar interpositus nucleus neurons in vitro. *Brain Res Bull* 67: 310-318, 2005.

Chen S and Hillman DE. Colocalization of neurotransmitters in the deep cerebellar nuclei. *J Neurocytol* 22: 81-91, 1993.

Chen WY, Wang JJ and Yu QX. [Effects of dorsal raphe stimulation on activities of cerebellar nuclear neurons in the rat]. *Sheng Li Xue Bao* 48: 132-140, 1996.

-
- Cheng SS and Heintz N.** Massive loss of mid- and hindbrain neurons during embryonic development of homozygous lurcher mice. *J Neurosci* 17: 2400-2407, 1997.
- Cull-Candy SG, Brickley SG, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A and Farrant M.** NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology* 37: 1369-1380, 1998.
- Czubayko U, Sultan F, Thier P and Schwarz C.** Two types of neurons in the rat cerebellar nuclei as distinguished by membrane potentials and intracellular fillings. *J Neurophysiol* 85: 2017-2029, 2001.
- De Zeeuw CI and Berrebi AS.** Postsynaptic targets of Purkinje cell terminals in the cerebellar and vestibular nuclei of the rat. *Eur J Neurosci* 7: 2322-2333, 1995.
- De Zeeuw CI, Gerrits NM, Voogd J, Leonard CS and Simpson JI.** The rostral dorsal cap and ventrolateral outgrowth of the rabbit inferior olive receive a GABAergic input from dorsal group Y and the ventral dentate nucleus. *J Comp Neurol* 341: 420-432, 1994.
- De Zeeuw CI, Holstege JC, Ruigrok TJ and Voogd J.** Ultrastructural study of the GABAergic, cerebellar, and mesodiencephalic innervation of the cat medial accessory olive: anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 284: 12-35, 1989.
- De Zeeuw CI, Van Alphen AM, Koekkoek SK, Buharin E, Coesmans MP, Morpurgo MM and van den BJ.** Recording eye movements in mice: a new approach to investigate the molecular basis of cerebellar control of motor learning and motor timing. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 193-203, 1998.
- De SE.** Cerebellar cortex: computation by extrasynaptic inhibition? *Curr Biol* 12: R363-R365, 2002.
- Denk W, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW and Yuste R.** Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *J Neurosci Methods* 54: 151-162, 1994.
- Denk W and Svoboda K.** Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18: 351-357, 1997.

-
- Dieudonne S.** Submillisecond kinetics and low efficacy of parallel fibre-Golgi cell synaptic currents in the rat cerebellum. *J Physiol* 510 (Pt 3): 845-866, 1998.
- Dieudonne S and Dumoulin A.** Serotonin-driven long-range inhibitory connections in the cerebellar cortex. *J Neurosci* 20: 1837-1848, 2000.
- Donato R and Nistri A.** Relative contribution by GABA or glycine to Cl(-)-mediated synaptic transmission on rat hypoglossal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* 84: 2715-2724, 2000.
- Earle AM and Matzke HA.** Efferent fibers of the deep cerebellar nuclei in hedgehogs. *J Comp Neurol* 154: 117-131, 1974.
- Endo T, Yanagawa Y, Obata K and Isa T.** Characteristics of GABAergic neurons in the superficial superior colliculus in mice. *Neurosci Lett* 346: 81-84, 2003.
- Flint AC, Liu X and Kriegstein AR.** Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20: 43-53, 1998.
- Ford E and Russell GV.** Connections of the cerebellum. I. Cortical Projections to the deep cerebellar nuclei. *Tex Rep Biol Med* 22: 492-516, 1964.
- Fukushima K.** Roles of the cerebellum in pursuit-vestibular interactions. *Cerebellum* 2: 223-232, 2003.
- Gardner EP and Fuchs AF.** Single-unit responses to natural vestibular stimuli and eye movements in deep cerebellar nuclei of the alert rhesus monkey. *J Neurophysiol* 38: 627-649, 1975.
- Garin N and Escher G.** The development of inhibitory synaptic specializations in the mouse deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* 105: 431-441, 2001.
- Garin N, Hornung JP and Escher G.** Distribution of postsynaptic GABA(A) receptor aggregates in the deep cerebellar nuclei of normal and mutant mice. *J Comp Neurol* 447: 210-217, 2002.
- Gauck V and Jaeger D.** The control of rate and timing of spikes in the deep cerebellar nuclei by inhibition. *J Neurosci* 20: 3006-3016, 2000.
- Gauck V and Jaeger D.** The contribution of NMDA and AMPA conductances to the control of spiking in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J Neurosci* 23: 8109-8118, 2003.

-
- Gauck V, Thomann M, Jaeger D and Borst A.** Spatial distribution of low- and high-voltage-activated calcium currents in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J Neurosci* 21: RC158, 2001.
- Geurts FJ, De SE and Dieudonne S.** Unraveling the cerebellar cortex: cytology and cellular physiology of large-sized interneurons in the granular layer. *Cerebellum* 2: 290-299, 2003.
- Green JT.** Using eyeblink classical conditioning as a test of the functional consequences of exposure of the developing cerebellum to alcohol. *Integr Physiol Behav Sci* 38: 45-64, 2003.
- Heck, D. and Sultan, F.** Das unterschätzte Kleinhirn. Spektrum der Wissenschaft 10: 36-44. 2001.
- Heckroth JA and Abbott LC.** Purkinje cell loss from alternating sagittal zones in the cerebellum of leaner mutant mice. *Brain Res* 658: 93-104, 1994.
- Helmchen C, Mohr C, Erdmann C, Petersen D and Nitschke MF.** Differential cerebellar activation related to perceived pain intensity during noxious thermal stimulation in humans: a functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett* 335: 202-206, 2003.
- Helmchen C, Rambold H, Erdmann C, Mohr C, Sprenger A and Binkofski F.** The role of the fastigial nucleus in saccadic eye oscillations. *Ann N Y Acad Sci* 1004: 229-240, 2003.
- Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K and Nakahara H.** Central mechanisms of motor skill learning. *Curr Opin Neurobiol* 12: 217-222, 2002.
- Hilber P and Caston J.** Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging. *Neuroscience* 102: 615-623, 2001.
- Imamizu H, Miyauchi S, Tamada T, Sasaki Y, Takino R, Putz B, Yoshioka T and Kawato M.** Human cerebellar activity reflecting an acquired internal model of a new tool. *Nature* 403: 192-195, 2000.
- Ito M.** A new physiological concept on cerebellum. *Rev Neurol (Paris)* 146: 564-569, 1990.
- Ito M.** The modifiable neuronal network of the cerebellum. *Jpn J Physiol* 34: 781-792, 1984.
- Ito M.** Historical Review of the Significance of the Cerebellum and the Role of Purkinje Cells in Motor Learning. *Ann NY Acad Sci* 978: 273-288, 2002.

-
- Jahnsen H.** Extracellular activation and membrane conductances of neurones in the guinea-pig deep cerebellar nuclei in vitro. *J Physiol* 372: 149-168, 1986.
- Jahnsen H.** Electrophysiological characteristics of neurones in the guinea-pig deep cerebellar nuclei in vitro. *J Physiol* 372: 129-147, 1986.
- Jimenez-Castellanos J, Jr. and Reinoso-Suarez F.** Topographical organization of the afferent connections of the principal ventromedial thalamic nucleus in the cat. *J Comp Neurol* 236: 297-314, 1985.
- Jonas P, Bischofberger J and Sandkuhler J.** Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281: 419-424, 1998.
- Jueptner M and Weiller C.** A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain* 121 (Pt 8): 1437-1449, 1998.
- Kawa K.** Glycine receptors and glycinergic synaptic transmission in the deep cerebellar nuclei of the rat: a patch-clamp study. *J Neurophysiol* 90: 3490-3500, 2003.
- Kawa K.** Glycine facilitates transmitter release at developing synapses: a patch clamp study from Purkinje neurons of the newborn rat. *Brain Res Dev Brain Res* 144: 57-71, 2003.
- Kobayashi M, Inoue T, Matsuo R, Masuda Y, Hidaka O, Kang Y and Morimoto T.** Role of calcium conductances on spike afterpotentials in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 77: 3273-3283, 1997.
- Laine J and Axelrad H.** Morphology of the Golgi-impregnated Lugaro cell in the rat cerebellar cortex: a reappraisal with a description of its axon. *J Comp Neurol* 375: 618-640, 1996.
- Lalonde R.** Motor learning in lurcher mutant mice. *Brain Res* 639: 351-353, 1994.
- Lalonde R and Botez MI.** Exploration and habituation in nervous mutant mice. *Behav Brain Res* 17: 83-86, 1985.
- Lalonde R, Botez MI and Boivin D.** Spontaneous alternation and habituation in a t-maze in nervous mutant mice. *Behav Neurosci* 100: 350-352, 1986.
- Lalonde R, Filali M, Bensoula AN and Lestienne F.** Sensorimotor learning in three cerebellar mutant mice. *Neurobiol Learn Mem* 65: 113-120, 1996.

-
- Lalonde R and Strazielle C.** Motor performance and regional brain metabolism of spontaneous murine mutations with cerebellar atrophy. *Behav Brain Res* 125: 103-108, 2001.
- LeDoux MS, Hurst DC and Lorden JF.** Single-unit activity of cerebellar nuclear cells in the awake genetically dystonic rat. *Neuroscience* 86: 533-545, 1998.
- Lee SC, Zhong YM and Yang XL.** Expression of glycine receptor and transporter on bullfrog retinal Muller cells. *Neurosci Lett* 387: 75-79, 2005.
- Legendre P.** The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58: 760-793, 2001.
- Levi S, Logan SM, Tovar KR and Craig AM.** Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 207-217, 2004.
- Levi S, Vannier C and Triller A.** Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. *J Cell Sci* 111 (Pt 3): 335-345, 1998.
- Li SJ, Wang Y, Strahlendorf HK and Strahlendorf JC.** Serotonin alters an inwardly rectifying current (I_h) in rat cerebellar Purkinje cells under voltage clamp. *Brain Res* 617: 87-95, 1993.
- Linnemann C, Sultan F, Pedroarena CM, Schwarz C and Thier P.** Lurcher mice exhibit potentiation of GABA(A)-receptor-mediated conductance in cerebellar nuclei neurons in close temporal relationship to Purkinje cell death. *J Neurophysiol* 91: 1102-1107, 2004.
- Llinas R and Muhlethaler M.** Electrophysiology of guinea-pig cerebellar nuclear cells in the in vitro brain stem-cerebellar preparation. *J Physiol* 404: 241-258, 1988.
- Llinas R and Muhlethaler M.** An electrophysiological study of the in vitro, perfused brain stem-cerebellum of adult guinea-pig. *J Physiol* 404: 215-240, 1988.
- Llinas R, Ribary U, Contreras D and Pedroarena C.** The neuronal basis for consciousness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1841-1849, 1998.
- Llinas RR.** The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242: 1654-1664, 1988.

-
- Lorenzon NM and Foehring RC.** The ontogeny of repetitive firing and its modulation by norepinephrine in rat neocortical neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 73: 213-223, 1993.
- Lynch JW.** Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84: 1051-1095, 2004.
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J and Betz H.** Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10: 2401-2409, 1991.
- Mangin JM, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D and Legendre P.** Functional glycine receptor maturation in the absence of glycinergic input in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *J Physiol* 542: 685-697, 2002.
- Martin JH, Cooper SE, Hacking A and Ghez C.** Differential effects of deep cerebellar nuclei inactivation on reaching and adaptive control. *J Neurophysiol* 83: 1886-1899, 2000.
- McCormick DA and Pape HC.** Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431: 291-318, 1990.
- McCormick DA and Thompson RF.** Cerebellum: essential involvement in the classically conditioned eyelid response. *Science* 223: 296-299, 1984.
- Middleton FA and Strick PL.** Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 236-250, 2000.
- Middleton FA and Strick PL.** Cerebellar output channels. *Int Rev Neurobiol* 41: 61-82, 1997.
- Mouginot D and Gahwiler BH.** Presynaptic GABAB receptors modulate IPSPs evoked in neurons of deep cerebellar nuclei in vitro. *J Neurophysiol* 75: 894-901, 1996.
- Mullen RJ, Eicher EM and Sidman RL.** Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 208-212, 1976.
- Norman DJ, Fletcher C and Heintz N.** Genetic mapping of the lurcher locus on mouse chromosome 6 using an intersubspecific backcross. *Genomics* 9: 147-153, 1991.

-
- Ono M, Yanagawa Y and Koyano K.** GABAergic neurons in inferior colliculus of the GAD67-GFP knock-in mouse: electrophysiological and morphological properties. *Neurosci Res* 51: 475-492, 2005.
- Ottersen OP and Storm-Mathisen J.** Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229: 374-392, 1984.
- Ouardouz M and Sastry BR.** Activity-mediated shift in reversal potential of GABA-ergic synaptic currents in immature neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 2005.
- Ouardouz M and Sastry BR.** Mechanisms underlying LTP of inhibitory synaptic transmission in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 84: 1414-1421, 2000.
- Pedroarena CM and Schwarz C.** Efficacy and short-term plasticity at GABAergic synapses between Purkinje and cerebellar nuclei neurons. *J Neurophysiol* 89: 704-715, 2003.
- Pineda JC, Waters RS and Foehring RC.** Specificity in the interaction of HVA Ca²⁺ channel types with Ca²⁺-dependent AHPs and firing behavior in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 79: 2522-2534, 1998.
- Poyatos I, Ponce J, Aragon C, Gimenez C and Zafra F.** The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 49: 63-70, 1997.
- Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J and Betz H.** The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* 11: 4305-4311, 1992.
- Raymond JL, Lisberger SG and Mauk MD.** The cerebellum: a neuronal learning machine? *Science* 272: 1126-1131, 1996.
- Rogers RF, Fender AF and Steinmetz JE.** The cerebellum is necessary for rabbit classical eyeblink conditioning with a non-somatosensory (photic) unconditioned stimulus. *Behav Brain Res* 104: 105-112, 1999.
- Russier M, Kopysova IL, Ankri N, Ferrand N and Debanne D.** GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro. *J Physiol* 541: 123-137, 2002.
- Sastry BR, Morishita W, Yip S and Shew T.** GABA-ergic transmission in deep cerebellar nuclei. *Prog Neurobiol* 53: 259-271, 1997.

-
- Selimi F, Doughty M, haye-Bouchaud N and Mariani J.** Target-related and intrinsic neuronal death in Lurcher mutant mice are both mediated by caspase-3 activation. *J Neurosci* 20: 992-1000, 2000.
- Singer JH, Talley EM, Bayliss DA and Berger AJ.** Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 80: 2608-2620, 1998.
- Sotelo C and varado-Mallart RM.** Growth and differentiation of cerebellar suspensions transplanted into the adult cerebellum of mice with heredodegenerative ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1135-1139, 1986.
- Strick PL.** The influence of motor preparation on the response of cerebellar neurons to limb displacements. *J Neurosci* 3: 2007-2020, 1983.
- Sultan F.** Exploring a critical parameter of timing in the mouse cerebellar microcircuitry: the parallel fiber diameter. *Neurosci Lett* 280: 41-44, 2000.
- Sultan F and Bower JM.** Quantitative Golgi study of the rat cerebellar molecular layer interneurons using principal component analysis. *J Comp Neurol* 393: 353-373, 1998.
- Sultan F, Czubayko U and Thier P.** Morphological classification of the rat lateral cerebellar nuclear neurons by principal component analysis. *J Comp Neurol* 455: 139-155, 2003.
- Sultan F, Konig T, Mock M and Thier P.** Quantitative organization of neurotransmitters in the deep cerebellar nuclei of the Lurcher mutant. *J Comp Neurol* 452: 311-323, 2002.
- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F and Akagi H.** Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9: 1155-1161, 1992.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K and Kaneko T.** Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467: 60-79, 2003.
- Tarnecki R, Lupa K, Niechaj A, Tarnecka D and Stumplo D.** [Interaction between cerebellar neurons]. *Postepy Hig Med Dosw* 56: 281-292, 2002.

-
- Teune TM, van der BJ and Ruigrok TJ.** Cerebellar projections to the red nucleus and inferior olive originate from separate populations of neurons in the rat: a non-fluorescent double labeling study. *Brain Res* 673: 313-319, 1995.
- Thier P, Dicke PW, Haas R and Barash S.** Encoding of movement time by populations of cerebellar Purkinje cells. *Nature* 405: 72-76, 2000.
- Tolbert DL, Massopust LC, Murphy MG and Young PA.** The anatomical organization of the cerebello-olivary projection in the cat. *J Comp Neurol* 170: 525-544, 1976.
- Triarhou LC, Norton J and Ghetti B.** Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res* 66: 577-588, 1987.
- Triarhou LC, Zhang W and Lee WH.** Amelioration of the behavioral phenotype in genetically ataxic mice through bilateral intracerebellar grafting of fetal Purkinje cells. *Cell Transplant* 5: 269-277, 1996.
- van ZB, Alvarez FJ, Tapia JC, Yeh HH, Diaz E and Aguayo LG.** Developmental-dependent action of microtubule depolymerization on the function and structure of synaptic glycine receptor clusters in spinal neurons. *J Neurophysiol* 91: 1036-1049, 2004.
- Villalobos C, Shakkottai VG, Chandy KG, Michelhaugh SK and Andrade R.** SKCa channels mediate the medium but not the slow calcium-activated afterhyperpolarization in cortical neurons. *J Neurosci* 24: 3537-3542, 2004.
- Voogd J.** The human cerebellum. *J Chem Neuroanat* 26: 243-252, 2003.
- Voogd J and Glickstein M.** The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21: 370-375, 1998.
- Voogd J and Ruigrok TJ.** The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern. *J Neurocytol* 33: 5-21, 2004.
- Voronin LL and Cherubini E.** "Presynaptic silence" may be golden. *Neuropharmacology* 45: 439-449, 2003.
- Wang WH and Lovick TA.** Excitatory 5-HT₂-mediated effects on rostral ventrolateral medullary neurones in rats. *Neurosci Lett* 141: 89-92, 1992.

Wassef M, Simons J, Tappaz ML and Sotelo C. Non-Purkinje cell GABAergic innervation of the deep cerebellar nuclei: a quantitative immunocytochemical study in C57BL and in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res* 399: 125-135, 1986.

Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bosl MR and Fritschy JM. Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 482: 123-141, 2005.

Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ and Heintz N. Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388: 769-773, 1997.

Publikationen, die während der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation veröffentlicht wurden:

Pedroarena CM, Kamphausen S, Schwarz C. Patch clamp recordings of currents activated by glycine in neurons of the deep cerebellar nuclei. *Soc Neurosci Abstr* 27: 293.3, 2001

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. P. Thier für seine Fürsprache und freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation bedanken.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen wissenschaftlichen Betreuern Dr. Christine Pedroarena und PD Dr. Cornelius Schwarz für ihren vielseitigen fachlichen Rat, ihre Geduld und ihre Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit.

Dr. Fahad Sultan danke ich für seine Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Ute Großhennig für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung auf dem langen Weg zu dieser Dissertation.

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner gesamten Familie, deren Rückhalt, Geduld und Lebenserfahrung mir über viele Schwierigkeiten in den letzten Jahren hinweggeholfen hat.

Ohne diese Dissertation wäre ich wohl nie nach Tübingen gekommen, und so wie der Beginn meiner Arbeit den Beginn meiner Zeit in Tübingen kennzeichnet, so markiert ihr Abschluß auch deren Ende.

Für ihre Anteilnehmende, aufbauende, erkenntnisreiche, humorvolle und ausdauernde Unterstützung danke ich aus vollem Herzen den Menschen, die ich in Tübingen kennengelernt habe, insbesondere Maik, Jonathan, Bettina und Karin.

DANKE

