

Die Rolle von GABA- und Glyzinrezeptoren während der  
radialen Migration kortikaler Neurone in der pränatalen Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Denise Gabrielle Denter  
geboren am 09.03.1980 in Bad Soden am Taunus

Mainz 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2010

# Danksagung

Die Realisierung der vorliegenden Dissertation wäre ohne die Hilfe zahlreicher Menschen undenkbar gewesen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater dafür bedanken, dass ich in diesem Labor meine Doktorarbeit durchführen und als Kollegiatin am Graduiertenkolleg teilnehmen konnte. Vielen Dank für die Unterstützung und die Diskussion, für die vielfältigen Impulse und Anregungen.

Ebenfalls danke ich der zweiten Berichterstatteerin für die freundliche und problemlose Übernahme meiner Zweitkorrektur und -betreuung.

Vielen Dank an meinen ersten Betreuer für die Etablierung des Forschungsthemas und für die gute Einführung in den wissenschaftlichen Hintergrund und in die Methoden.

Genese und Entwicklung des Forschungsvorhabens waren eng verknüpft mit dem zweiten Betreuer. Mit seiner kritischen Analyse war er stets ein konstruktiver und wohlwollender Wegbegleiter. Dafür danke ich ihm herzlich.

Den technischen Assistentinnen möchte ich für die hervorragende technische Assistenz danken.

Vielen herzlichen Dank meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für die angenehme Atmosphäre und für die Geduld, die Höhen und Tiefen einer „gestressten“ Doktorandin zu begleiten. Vielen Dank für die aufmunternden Gespräche.

Der benachbarten Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Abschließender Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die enorme Unterstützung und für die sprachlichen Rückmeldungen, denen naturgemäß eine intensive Lektüre der Arbeit vorausgehen musste.

Meiner Mutter widme ich diese Dissertation!

Mainz, im Dezember 2009

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	S. I
Abkürzungsverzeichnis	S. VII
Abbildungsverzeichnis	S. X
Tabellenverzeichnis	S. XII
<b>1. Einleitung</b>	<b>S. 1</b>
1.1 Entwicklung des Zentralen Nervensystems	S. 1
1.2 Aufbau und Funktion des zerebralen Kortex	S. 2
1.3 Entwicklung des zerebralen Kortex bei Säugetieren	S. 5
1.3.1 Proliferation in der Ventrikulären und Subventrikulären Zone des pränatalen Kortex	S. 5
1.3.2 Radiale Migration	S. 7
1.3.3 Tangentiale Migration	S. 9
1.4 Regulation der radialen Migration	S. 11
1.4.1 Die Rolle von Mikrotubuli- und Aktinnetzwerken während der radialen Migration	S. 11
1.4.2 Modulation der radialen Migration durch extrazelluläre Signale	S. 14
1.4.3 Modulation der Migration durch intrazelluläres Kalzium	S. 15



1.5	Die Rolle von GABA-Rezeptoren während der radialen Migration	S. 16
1.6	Die Rolle von Glyzinrezeptoren während der radialen Migration	S. 19
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>S. 20</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien</b>	<b>S. 22</b>
3.1	Chemikalien	S. 22
3.2	Enzyme	S. 24
3.3	Antikörper und Fluorochrome	S. 25
3.4	Nukleinsäuren	S. 25
3.5	Kits	S. 26
3.6	Verbrauchsmaterialien	S. 26
3.7	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	S. 27
3.8	Geräte	S. 28
3.9	Computerprogramme	S. 30
3.10	Medien und Pufferlösungen	S. 30
3.10.1	Migrationsanalyse	S. 30
3.10.2	Antikörperfärbungen	S. 31
3.10.3	Kalziumabhängige Fluoreszenzmessung	S. 31
3.10.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung	S. 32
3.10.5	PCR	S. 33

3.10.6 Western-Blot	S. 33
<b>4. Methoden</b>	<b>S. 34</b>
4.1 Migrationsanalyse	S. 34
4.1.1 Die Methode der BrdU- basierten <i>in vitro</i> Migrationsanalyse	S. 34
4.1.2 Herstellung koronaler Schnittkulturen des präfrontalen Kortex	S. 35
4.1.3 BrdU-Antikörperfärbung für die Migrationsanalyse	S. 36
4.1.4 Mikroskopie und Auswertung der Migrationsanalyse	S. 36
4.1.5 Kontrollfärbungen zur Überprüfung der BrdU-Antikörperfärbung	S. 38
4.1.5a Kontrollfärbung zur Überprüfung der Spezifität der beiden Antikörper	S. 38
4.1.5b Überprüfung der Kernfärbung	S. 39
4.1.5c Überprüfung der BrdU-gefärbten Zelltypen	S. 41
4.1.6 Mikroskopie der Kontrollfärbungen	S. 44
4.2 Fluoreszenzmessung des neuronalen Kalzium-Einstroms	S. 45
4.2.1 Die Methode der kalziumabhängigen Fluoreszenz- messung	S. 45
4.2.2 Durchführung der Fluoreszenzmessung	S. 45
4.2.3 Analyse der Fluoreszenzmessung	S. 46

4.3	Pharmakologie	S. 47
4.3.1	Pharmakologie der GABA-Rezeptoren	S. 47
4.3.2	Pharmakologie der Glyzinrezeptoren	S. 48
4.3.3	Pharmakologische Manipulation der Migration	S. 48
4.3.4	Pharmakologische Manipulation der Ca <sup>2+</sup> -Antworten während der Fluoreszenzmessung	S. 50
4.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung	S. 51
4.4.1	Die Methode der <i>in situ</i> -Hybridisierung mit dem Tyramid-signal-Amplifikationssystem	S. 51
4.4.2	Herstellung der Sonden für die <i>in situ</i> - Hybridisierungsexperimente	S. 52
4.4.3	Durchführung der <i>in situ</i> -Hybridisierung	S. 53
4.5	Weitere molekularbiologische Methoden	S. 55
4.5.1	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	S. 55
4.5.2	Western Blot Analyse	S. 56
4.6.	Bildverarbeitung, statistische Analyse und Textverarbeitung	S. 58
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>S. 59</b>
5.1	Expression von GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren im immaturren Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration	S. 59
5.1.1	Expression der GABA <sub>C</sub> -Rezeptor-mRNA und des	

Rezeptorproteins	S. 59
5.1.2 Funktioneller Nachweis von GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren in der IZ	S. 62
5.1.3 Unterschiedliche Funktionen von GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren während der radiale Migration	S. 67
5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Teils	S. 71
5.2 Einfluss der Glyzinrezeptoren auf die radiale Migration und ihre Aktivierung durch einen endogenen Liganden	S. 72
5.2.1 Förderung der radialen Migration durch Glyzin- rezeptoren	S. 72
5.2.2 Die Rolle von Taurin als endogener Ligand der Glyzinrezeptoren	S. 75
5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Teils	S. 78
<b>6. Diskussion</b>	<b>S. 79</b>
6.1 Expression von GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren im immaturren Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration	S. 79
6.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 79
6.1.2 Expression der GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene im pränatalen Kortex	S. 79
6.1.3 Funktionelle Expression von GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren in der IZ	S. 80

6.1.4	Die Rolle von GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren während der radialen Migration	S. 82
6.1.5	Potentielle Funktionen und Interaktionen der GABA <sub>C</sub> -Rezeptoren	S. 84
6.1.6	Wie kann die Aktivierung der GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>C</sub> - Rezeptoren gegensätzliche Migrationssignale induzieren?	S. 85
6.1.7	Modifikation des Gradienten-Modells von Behar	S. 86
6.2	Einfluss der Glyzinrezeptoren auf die radiale Migration und ihre Aktivierung durch einen endogenen Liganden	S. 89
6.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 89
6.2.2	Die Rolle von Glyzinrezeptoren während der radialen Migration	S. 89
6.2.3	Die Rolle von Glyzin als endogener Ligand	S. 90
6.2.4	Die Rolle von Taurin als endogener Ligand	S. 91
6.2.5	Potentielle weitere Funktionen von Taurin	S. 93
6.3	Ist Taurin oder GABA der endogene Modulator der Migration?	S. 94
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S. 96</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>S. 98</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>S. 118</b>
	<b>Versicherung gemäß §11 Abs. 3d der Promotionsordnung</b>	<b>S. 120</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\rho$	rho
$\varnothing$	Durchmesser
%	Prozent
$\lambda_{\text{ex}}$	Wellenlänge der Extinktion
$\lambda_{\text{em}}$	Wellenlänge der Emmission
°C	Grad Celsius
$\mu$	Mikro
ACSF	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (englisch <i>artificial cerebrospinal fluid</i> )
Abb	Abbildung
ALX 1393	O-[(2-Benzoyloxy-phenyl-3-fluorophenyl) methyl]-L-Serin
ALX 5407	N-[(3R)-3-([1,1'-Biphenyl]-4-yloxy)-3-(4-fluorophenyl)propyl]-N-methylglyzin-Hydrochlorid
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	(-)-Bicucullinmethiodid
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (englisch <i>bovine serum albumine</i> )
$\text{Ca}^{2+}$	Kalzium-Ion
CACA	<i>cis</i> -4-Aminocrotonsäure
CCD	Ladungskopplungsspeicher (englisch <i>charge-coupled device</i> )
cDNA	copyDNA
$\text{Cl}^-$	Chlorid-Ion
CP	kortikale Platte (englisch <i>cortical plate</i> )
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Cy	Cyanin

---

DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleosidtriphosphat
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl	englisch
EtOH	Ethanol
f	femto
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GES	Guanidino-Ethansulfonat
GFAP	Saures Gliafaserprotein (englisch <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
HRP	Merrettich-Peroxidase (englisch <i>horseradish peroxidase</i> )
IZ	Intermediärzone
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
Konz	Konzentration
<i>KpnI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	Liter
LGE	Laterale ganglionische Eminenz
M	Molar
m	Meter
MAP1B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B
MGE	Mediale ganglionische Eminenz
mRNA	messenger RNA
MZ	Marginalzone
NB	Neurobasal
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül (englisch <i>neural cell adhesion molecule</i> )
NeuN	neuronaler Zellkern (englisch <i>neuronal nuclei</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter, Isoform 1

---

NTE	Natrium-Tris-EDTA
OB	<i>Bulbus olfactorius</i>
P	Postnatales Stadium
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PNS	Peripheres Nervensystem
PP	Präplatte
PTX	Picrotoxin
<i>PstI</i>	Restriktionsenzym aus <i>Providencia stuartii</i> 164
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (englisch <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SP	Subplatte
SSC	Salz-Natrium-Zitrat (englisch <i>sodium chloride sodium citrate</i> )
SVZ	Subventrikulärzone
TACA	<i>trans</i> -4-Aminocrotonsäure
TBST	Tris-gepufferte Saline mit 0,1% Tween-20
TNB	TNT-Puffer mit <i>Blocking</i> -Reagenz
TNT	Tris-Natrium-Tween
TPMPA	(1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)methyl-Phosphinsäure
TSA	Tyramidsignal-Amplifikationssystem
UV	Ultraviolett
V	Volt
VZ	Ventrikulärzone
ZNS	Zentrales Nervensystem



---

# Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Schema der vertikalen und laminaren Struktur des Kortex.	S. 4
Abb.2	Zeitrafferaufnahme asymmetrischer Teilungen einer Gliazelle.	S. 6
Abb.3	Migration und Schichtenbildung während der Kortexentwicklung.	S. 10
Abb.4	Modell des GABA-Gradienten während der Entwicklung des Kortex.	S. 18
Abb.5	Darstellung der ungefähren Positionen der kortikalen Schichten in den drei ausgewählten Regionen der Schnittkulturen.	S. 37
Abb.6	Kontrollfärbung ohne BrdU-Inkubation und ohne anti-BrdU-Erstantikörper.	S. 39
Abb.7	BrdU-Propidiumiodid-Doppelfärbung.	S. 40
Abb.8	BrdU-MAP2-Doppelfärbung.	S. 41
Abb.9	BrdU-NeuN-Doppelfärbung.	S. 42
Abb.10	BrdU-GFAP-Doppelfärbung.	S. 44
Abb.11	Schema eines Sondensignals mit dem Tyramidsignal-Amplifikationssystem.	S. 51
Abb.12	Gelelektrophorese zur Überprüfung der RT-PCR zur Herstellung einer $\rho_2$ -Sonde.	S. 52
Abb.13	Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte.	S. 60
Abb.14	Lichtmikroskopische Aufnahme der <i>in situ</i> -Hybridisierung mit einer $\rho_2$ -Sonde.	S. 60

- 
- Abb.15 Western Blot-Analyse des GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Proteins in E17- S. 61  
Kortizes und im adulten Gesamthirn.
- Abb.16 GABA und CACA-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Neuronen der IZ. S. 62
- Abb.17 Effekt von TPMPA auf die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten S. 63  
in Neuronen der IZ.
- Abb.18 Effekt von BMI auf den GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in S. 64  
Neuronen der IZ.
- Abb.19 GABA- und CACA-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Neuronen der S. 65  
CP.
- Abb.20 Effekt von TPMPA und BMI auf die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>- S. 66  
Transienten in Neuronen der CP.
- Abb.21 Effekt von PTX und BMI auf die radiale Migration. S. 68
- Abb.22 Effekt von TPMPA und TPMPA plus BMI auf die radiale S. 69  
Migration.
- Abb.23 Effekt von CACA auf die radiale Migration. S. 70
- Abb.24 Effekt von Strychnin auf die radiale Migration. S. 73
- Abb.25 Effekt von Glyzin und von Glyzintransporter-Inhibitoren auf S. 74  
die radiale Migration.
- Abb.26 Effekt von Taurin auf die radiale Migration. S. 76
- Abb.27 Effekt von GES auf die radiale Migration. S. 77
- Abb.28 Position der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im embryonalen Kortex und ihre S. 88  
Rolle während der radialen Migration.

# Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1    Genetische Mutationen, die zu humanen Fehlbildungen    S. 13  
                  aufgrund neuronaler Migrationsdefekte führen.
- Tabelle 2    Auflistung der zur Migrationsanalyse verwendeten    S. 49  
                  Antagonisten und Agonisten.
- Tabelle 3    Auflistung der bei der kalziumabhängigen Fluoreszenz-    S. 50  
                  messung verwendeten Antagonisten und Agonisten.

# 1. Einleitung

## 1.1 Entwicklung des Zentralen Nervensystems

Alle Wirbeltiere durchlaufen eine Reihe ähnlicher Entwicklungsstadien. Nach der Befruchtung kommt es als erstes zur Furchung der Zygote und anschließend zur Gastrulation, bei der die Keimblätter an die richtige Position für die folgende Entwicklung wandern (Wolpert et al., 1999). Die Neurogenese beginnt mit der Bildung der Neuralplatte, einer Ansammlung ektodermaler Zellen, in der dorsalen Oberfläche des frühen Embryos (Wolpert et al., 1999; Greene und Copp, 2009). Im Laufe der Neurulation bilden sich aus der Neuralplatte in einem zweistufigen Prozess erst die Neuralrinne und dann das Neuralrohr, aus dem sich später das Gehirn und das Rückenmark entwickelt (Bronner-Fraser, 1994; Copp et al., 2003). Neuralleistenzellen verlassen das Neuralrohr und bilden die sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems, Gesichtsknorpel, Pigmentzellen und neuroendokrine Zellen (Bronner-Fraser, 1994; Wolpert et al., 1999). Durch Einschnürungen des Neuralrohres entstehen am rostralen Ende zuerst drei und später fünf Vesikel, die sich zum Telenzephalon, Dienzephalon, Mesenzephalon, Metenzephalon und Myelenzephalon weiterentwickeln (Kandel et al., 1996; Wolpert et al., 1999). Das Telenzephalon teilt sich in einen rechten und linken Vesikel (Monuki und Walsh, 2001). Aus den dorsalen Anteilen der Vesikel entsteht anschließend der zerebrale Kortex. Der ventrale Teil des Telenzephalons differenziert sich zu den Basalganglien aus (Götz und Sommer, 2005).

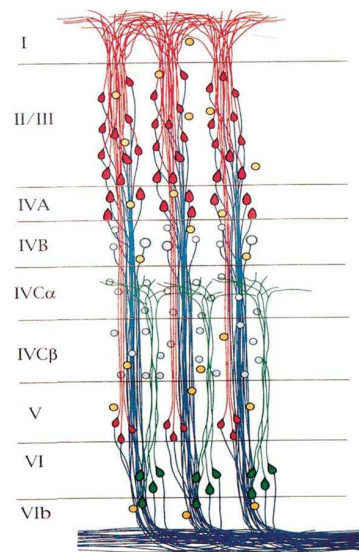
## 1.2 Aufbau und Funktion des zerebralen Kortex

Der zerebrale Kortex ist eine hochspezialisierte Gehirnregion, die sich aus dem dorsalen Telenzephalon entwickelt und deren diskrete Untereinheiten für bestimmte Aspekte der Empfindung, Bewegung und Wahrnehmung des Menschen verantwortlich sind (Sur und Rubenstein, 2005; Nguyen et al., 2006). Der zerebrale Kortex des menschlichen Gehirns besteht aus 10 Milliarden Neuronen und setzt sich aus dem Neokortex, dem Paläokortex (Piriformer Kortex) und dem Archikortex (Hippokampus) zusammen, die jeweils noch in Subdomänen unterteilt sind (Sur und Rubenstein, 2005). Der zerebrale Kortex beinhaltet zwei Hauptgruppen an Neuronen: Pyramidalzellen und Interneurone (Nguyen et al., 2006). Die glutamatergen Pyramidalzellen machen etwa 75% der kortikalen Neuronen aus und besitzen typischerweise einen dreieckig geformten Zellkörper und einen apikalen Dendriten (Lewis, 2004). Die anderen Neuronen des Kortex sind überwiegend Interneurone. Sie sind GABAerg und ihre Axone bilden lokale Verknüpfungen aus (Lewis, 2004).

Der adulte Neokortex ist im Prinzip in sechs horizontale Schichten unterteilt, die anhand ihrer unterschiedlichen Zelltypen und Verknüpfungen voneinander unterschieden werden können (Sur und Cowey, 1995; O'Leary et al., 2007). Die Schichten können in den verschiedenen Kortexarealen entsprechend der funktionellen Anpassung unterschiedlich ausgeprägt sein (Zilles und Rehkämper, 1993). Die Lamina I (oder Molekularschicht) ist die außen liegende Schicht des Kortex und enthält neben wenigen Perikaryen überwiegend horizontal verlaufende Axone und die apikalen Dendriten der Pyramidalzellen. Die Lamina I entwickelt sich aus der Marginalzone (MZ), in der sich während der Entwicklung die transienten Cajal-Retzius-Zellen befinden (Creutzfeldt, 1983; Waldeyer, 2002). Die Lamina II (oder äußere Körnerschicht) beinhaltet dicht gepackte kleine Pyramidalzellen und kleine bedornete Sternzellen, die ebenfalls glutamaterg sind. In der Lamina III (oder äußere Pyramidalschicht) befinden sich vor allem kleinere und mittelgroße Pyramidenzellen, deren apikale Dendriten bis in die Lamina I reichen. Die Lamina IV (oder innere Körnerzellschicht) ist besonders im sensorischen Kortex stark ausgeprägt und besitzt größere, primär afferente Sternzellen, die Projektionen

aus anderen Hirnarealen erhalten (Creutzfeldt, 1983; Waldeyer, 2002). Für die Lamina V (oder innere Pyramidalschicht) sind große Pyramidalzellen typisch. Ihre apikalen Dendriten reichen bis zur Kortexoberfläche und bilden Lateraldendriten und einen Kranz aus Basaldendriten aus. Die Lamina VI (oder multiforme Schicht) enthält nur wenige große Pyramidalneurone, viele kleine spindelförmige Pyramidalzellen, multiforme Neurone und zahlreiche Interneurone (Creutzfeldt, 1983; Waldeyer, 2002). Unterhalb der multiformen Schicht befindet sich die weiße Substanz. Sie besteht aus den Fasersystemen der Projektions-, Assoziations- und Kommissuralfasern (Waldeyer, 2002). Die Laminae II und IV werden als die afferenten Schichten des Neokortex bezeichnet und sind besonders stark in den primär sensorischen Arealen ausgebildet (Waldeyer, 2002). Die Lamina IV erhält thalamische und kortikale Eingänge (Watakabe, 2009). Thalamische Projektionsneurone sind vor allem in der Lamina VI zu finden, wohingegen subkortikale Projektionsneurone in Lamina V lokalisiert sind. Die Laminae II und III projizieren in andere kortikale Bereiche (Watakabe, 2009).

Vertikal ist der Kortex in sogenannte Minikolumnen (Abb.1), in enge Ketten aus Neuronen unterteilt, die sich im rechten Winkel zur pialen Oberfläche durch die zellulären Schichten II bis IV ausdehnen (Mountcastle, 1997). Die Minikolumnen entstehen durch die iterative Teilung kleiner Gruppen von Vorläuferzellen. Viele Minikolumnen werden durch kurze horizontale Verknüpfungen zu kortikalen Kolumnen oder Säulen verbunden (Mountcastle, 1997). Eine einzige Säule im somatosensorischen Kortex ist beispielsweise für eine spezifische Modalität und für die Stimulation eines rezeptiven Feldes zuständig (Rakic, 1988).



**Abb.1: Schema der vertikalen und laminaren Struktur des Kortex.** Die glutamatergen Pyramidalzellen der Schichten II/III (rot), der Schicht VI (grün) und die GABAergen Interneurone (blau) sind säulenartig organisiert. Ihr Auftreten und ihre Verknüpfungen unterscheiden sich in den sechs horizontalen Schichten (verändert nach Mountcastle, 1997).

Darüberhinaus ist der Kortex in größere, zytoarchitektonische Areale unterteilt (Rakic, 1988; O'Leary et al., 2007), die sich in ihren zellulären, biochemischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden. Sie werden als die basalen funktionellen Untereinheiten des Kortex bezeichnet (Rakic, 1988; Mountcastle, 1997; Sur und Rubenstein, 2005). Beim Menschen bearbeiten bestimmte zytoarchitektonische Areale spezifische sensorische Informationen, andere kontrollieren präzise Bewegungen oder sind in die komplexen kognitiven Funktionen der Sprache, Gesichtserkennung oder der räumlichen Orientierung involviert (Rakic, 1988).

## **1.3 Entwicklung des zerebralen Kortex bei Säugetieren**

Die Entwicklung des Kortex und die grundlegenden Eigenschaften der unreifen kortikalen Netzwerke sind während der Säugetierevolution hochkonserviert (Khazipov und Luhmann, 2006). Der murine Kortex stellt ein gutes Modell für die Kortexentwicklung dar, insbesondere für die frühe elektrische Aktivität und Plastizität (Lewis, 2004). Mausmodelle ermöglichen bedeutende Einblicke in die grundlegenden Ereignisse der Kortex-Entwicklung, des -Aufbaus und der Organisation und wurden deshalb als Versuchsobjekte im Rahmen dieser Dissertation verwendet.

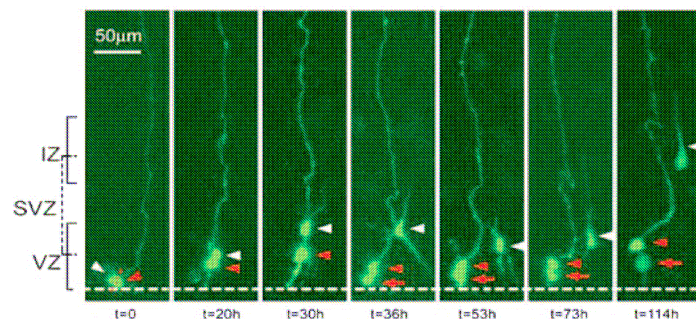
Die glutamaterge Pyramidalneurone und GABAergen Interneurone werden nicht an ihrem Bestimmungsort gebildet (Wolpert et al., 1999; Parnavelas, 2000). Die Vorläufer der glutamatergen Neurone entstehen in einem pseudo-stratifizierten Epithel der dorsolateralen Ventrikelwand, das als Ventrikuläre Zone (VZ) bezeichnet wird (Wolpert et al., 1999; Parnavelas, 2000; Nadarajah et al., 2001), und wandern radial zu ihrer finalen Position im Kortex. Die GABAergen Interneurone stammen überwiegend aus dem ventralen Telenzephalon und wandern tangential in den Kortex ein (Marín und Rubenstein, 2001; Komuro et al., 2001). Für die Entwicklung des zerebralen Kortex aus dem embryonalen Neuroepithelium sind eine präzise Proliferation und Migration von großer Bedeutung.

### **1.3.1 Proliferation in der Ventrikulären und Subventrikulären Zone des pränatalen Kortex**

Für die Neurogenese ist eine Kombination aus drei Arten von Zellteilungen entscheidend: Zum einen finden symmetrische Zellteilungen in Vorläuferzellen statt, um die Anzahl der neuralen Vorläuferzellen zu erhöhen. Zum anderen erfolgen asymmetrische Vorläuferzellteilungen, die zu einem Neuron und zu einer weiteren Vorläuferzelle führen sowie symmetrische Teilungen, bei denen sich eine Vorläuferzelle endgültig zu zwei Neuronen teilt (Takahashi et al., 1996).



Lange wurde angenommen, dass es sich bei glialen und neuronalen Zellen um verschiedene, räumlich getrennte Zelllinien handelt (Bentivoglio und Mazzarello, 1999). Inzwischen setzt sich die Auffassung durch, dass radiale Gliazellen neuronale Stammzellen sind, die sich selbst erneuern und sowohl Neurone als auch adulte Gliazellen hervorbringen (Noctor et al., 2001; Kriegstein und Noctor, 2004; Noctor et al., 2004; Kriegstein, 2005). Die VZ embryonaler Nager besteht größtenteils aus radialen Gliazellen, die sich überwiegend asymmetrisch teilen (Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2002; Noctor et al., 2004) und eine neue radiale Gliazelle und eine Tochterzelle bilden, die aus der VZ heraus migriert (Abb.2). Eine Minderheit der Zellteilungen ist symmetrisch und bildet zwei radiale Gliazellen, wobei diese Art der Teilung vor allem in frühen Stadien der kortikalen Neurogenese stattfindet (Noctor et al., 2004). Die Tochterzellen, die nach der asymmetrischen Teilung die VZ verlassen, bilden die darüber liegende Subventrikulärzone (SVZ), in der sie sich symmetrisch teilen (Götz und Huttner, 2005). Die Zellteilungen in der SVZ sind meist terminal und führen zu zwei identischen, postmitotischen Zellen, die anschließend in die kortikale Platte (CP) migrieren (Noctor et al., 2004).



**Abb.2: Zeitrafferaufnahme asymmetrischer Teilungen einer Gliazelle.** Eine radiale Gliazelle durchläuft eine Reihe asymmetrischer Teilungen. Nach jeder Teilung fällt die Zelle auf die Ventrikel-Oberfläche zurück und teilt sich wieder. Die Tochterzelle migriert aus der VZ in die SVZ (aus Noctor et al., 2004).

Die kortikale Neurogenese endet bei Ratten erst kurz vor der Geburt (Kriegstein, 2005). Lange wurde diskutiert, ob eine sogenannte „Protomap“ in der proliferativen Zone bereits der funktionellen Karte des Kortex vorangeht, d.h. ob bereits die proliferierenden Neurone ihre spätere Bestimmung kennen (Götz, 1995; Rakic et al.,

2009), oder ob komplett gleichartige, proliferierende Neurone erst nach Erreichen ihrer Position im Kortex ihre phänotypische Spezialisierung erhalten (Götz, 1995). Inzwischen wird angenommen, dass die Grundlagen des kortikalen Phänotyps und der positionellen Identität zum Zeitpunkt der letzten Teilung festgelegt wird (Rakic et al., 2009). Diese basale „Protomap“ wird jedoch durch Interaktionen mit äußeren Faktoren modifiziert und verfeinert (Rakic et al., 2009).

### **1.3.2 Radiale Migration**

Die radiale Migration ist eine der Hauptwege, um laminierte Strukturen des Zentralen Nervensystems zu bilden (Ayala et al., 2007). Sowohl die zerebralen und zerebellaren Kortizes als auch das Rückenmark, das Striatum und der Thalamus werden durch radiale Migration gebildet. Etwa 80-90% aller kortikalen Neurone migrieren radial, um ihren Platz im Kortex zu erreichen (Ayala et al., 2007).

Während der Migration besitzen die bipolaren Neurone einen führenden Fortsatz mit einem Wachstumskegel (engl. „*leading process*“) und einem nachfolgenden Fortsatz (engl. „*trailing process*“). Das generelle Modell für die neuronale Bewegung beinhaltet drei repetitive Schritte: Zunächst wird der führende Fortsatz, der mit Hilfe von Filopodien und Lamellipodien die zelluläre Umgebung untersucht, verlängert (Lambert de Rouvroit und Goffinet, 2001; Ayala et al., 2007). Attraktanten und Repellanten werden über die Plasmamembran wahrgenommen und beeinflussen das periphere Mikrofilament des Fortsatzes (Lambert de Rouvroit und Goffinet, 2001). Als zweiter Schritt erfolgt die Nukleokinese (Morris et al., 1998), die mit der Stabilisierung des Hauptzellfortsatzes beginnt; meistens mit einem gleichzeitigen Anschwellen des proximalen Endes des Neuriten (Ayala et al., 2007). Dabei werden das Zentrosom und der Nukleus in den Neuriten gezogen (Lambert de Rouvroit und Goffinet, 2001; Ayala et al., 2007), so dass das Soma dem leitenden Fortsatz folgt. Der dritte Schritt besteht aus dem Einziehen des nachfolgenden Fortsatzes.

Während der Kortextentwicklung der Maus entsteht zuerst oberhalb der proliferativen Zone (VZ/SVZ) durch hineinwachsende Axone die Intermediäre Zone (IZ). Die ersten axonalen Ausläufer sind ab dem Zeitpunkt des murinen Embryonalstadiums

(E) 8,5 zu sehen und die ersten Axonkanäle ab E10 (Hatten, 1999). Diese Axone stellen die primären Verbindungen zwischen dem Kortex und dem Thalamus dar (Squire et al., 2003). Ab etwa E11 wandert eine Welle postmitotischer Neurone aus der Proliferationszone durch die IZ und bildet die Präplatte (PP) (Hatten, 1999). Weitere Wellen migrierender Neurone ab circa E13 spalten die PP in zwei Regionen, in die Marginale Zone (MZ), die spätere Schicht I, und in die Subplatte (SP), um in der Mitte die ersten Neuronen der Schicht VI der CP zu bilden (Squire et al., 2003; Ayala et al., 2007) (Abb.3). Bei dieser frühen Form der Migration handelt es sich um somale Translokation, bei der die Neurone eine bipolare Form annehmen, ihren langen und verzweigten Fortsatz an der pialen Oberfläche verankern und den Zellkörper in diese Richtung nachziehen (Nadarajah et al., 2001).

Die darauf folgenden Wellen migrierender Neurone wandern durch die zuvor gebildeten Schichten und formen die Schichten VI, V, IV und II/III der CP. Die radiale Migration findet hierbei vorwiegend durch Lokomotion entlang radialer Gliazellen statt (Kandel et al., 1996; Squire et al., 2003). Die während der Proliferation entstehenden Gliazellen bilden ein System aus Fortsätzen in vertikaler Ebene aus (Rakic, 1990; Misson et al., 1991), indem sie ihre Zellkörper in der VZ positionieren und einen Fortsatz ausbilden, der zur pialen Oberfläche reicht und an der basalen Membran verankert wird. Die über Lokomotion migrierenden Neurone haben eine bipolare Form mit einem kurzen Fortsatz und wandern entlang der radialen Gliazellen in Richtung der pialen Oberfläche (Rakic, 1972). Manche Neurone wechseln von der Lokomotion wieder zur somalen Translokation, wenn ihr Fortsatz die piale Oberfläche erreicht (Nadarajah et al., 2001). Die Festlegung der Schicht, in der die Neurone ihre finale Position finden, ist an den Zeitpunkt gebunden, wenn sich die Vorläuferzelle zum letzten Mal teilt (Ayala et al., 2007). Neurone, die früher postmitotisch werden, finden ihren Platz in tieferen Schichten als jene, die in späteren Stadien postmitotisch werden. Neurone, die später geboren werden, wandern also an älteren Neuronen, die bereits ihren Bestimmungsort im Kortex gefunden haben, vorbei; die Organisation des Kortex kommt also durch eine von innen nach außen gerichtete Abfolge zustande (Squire et al., 2003; Marín und Rubenstein, 2003). Im Kortex befinden sich daher in der Lamina II die zuletzt

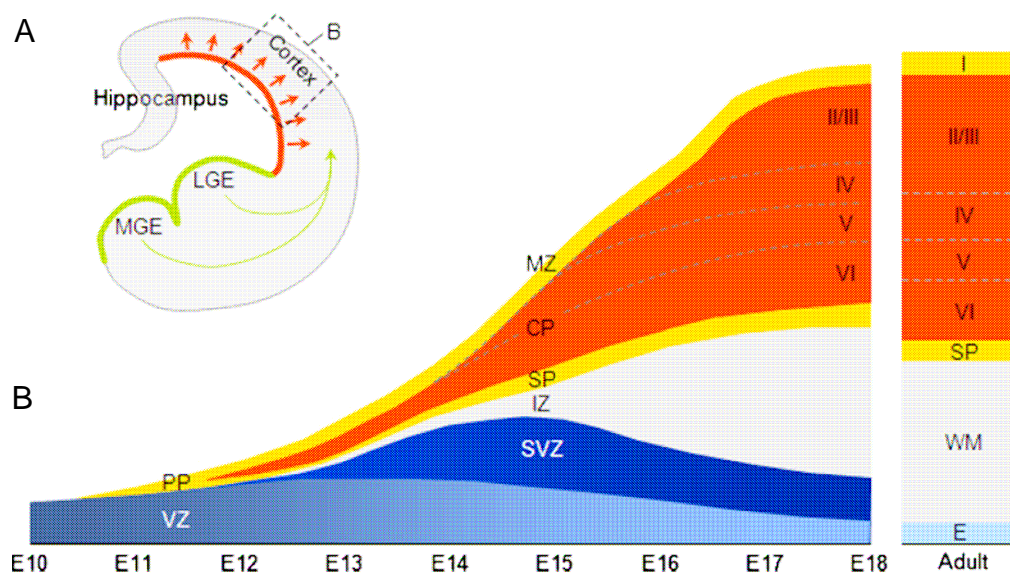
geborenen Neurone, wohingegen die innerste Schicht (Lamina VI) die ältesten Neurone beinhaltet (Squire et al., 2003).

Nur wenige Neurone migrieren geradewegs nach der Neurogenese in die CP (Tabata und Nakajima, 2003; Kriegstein und Noctor, 2004; Noctor et al., 2004). Die meisten Neurone durchlaufen stattdessen vier verschiedene Migrationsphasen. Während der ersten Phase nehmen die neu geborenen Neurone eine bipolare Form an und wandern in die SVZ (Noctor et al., 2004). In der zweiten Phase stoppen die Tochterzellen ihre Migration in der SVZ und verbleiben dort bis zu 24 Stunden, wobei sie eine multipolare Morphologie annehmen. Dabei zeigen sie ein sehr dynamisches Verhalten: Sie verändern ihre Orientierung und bilden vorübergehend Fortsätze in unterschiedliche Richtungen. Die Zellen wechseln ihre Migrationsrichtung und -geschwindigkeit und springen tangential zwischen den radialen Gliazellen (Tabata und Nakajima, 2003; Noctor et al., 2004). Anschließend geht die Mehrzahl der Tochterzellen in eine dritte Phase der Migration über, die durch eine retrograde Bewegung in Richtung Ventrikel gekennzeichnet ist (Kriegstein und Noctor, 2004; Noctor et al., 2004). Nachdem der Zellkörper der Neurone den Ventrikel berührt hat, gehen die Neurone in die vierte Phase der Migration über; sie erhalten eine in Richtung Pia gerichtete, bipolare Morphologie und migrieren in die CP.

### **1.3.3 Tangentiale Migration**

Die Mehrzahl der GABAergen Interneurone entstehen in der medialen und lateralen ganglionischen Eminenz (MGE und LGE) des basalen Vorderhirns und migrieren tangential in den Kortex (Nadarajah und Parnavelas, 2002; Kriegstein und Noctor, 2004) (Abb.3). Die Migration der Interneurone findet größtenteils in zwei verschiedenen Strömen statt, die durch die kortikale MZ und durch die IZ-SVZ verlaufen. Wenn die durch die IZ-SVZ migrierenden Interneurone ihre Zielregion erreicht haben, migrieren sie meist erst zum Ventrikel, pausieren dort für eine gewisse Zeit und nehmen dann ihre radiale Wanderung in die CP auf (de Carlos et al., 1996; Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Jimenez et al., 2002). Radial und tangential migrierende Neurone, die zur gleichen Zeit geboren werden, wandern auch

in die gleiche Schicht (Ayala et al., 2007). Beide sind in der Lage, die Schichten festlegenden Determinanten aus der zellulären Umgebung im Kortex wahrzunehmen (Marín und Rubenstein, 2003).



**Abb.3: Migration und Schichtenbildung während der Kortexentwicklung.** **A** Haupttrouten der neuronalen Migration während der Kortexentwicklung. Die kortikalen Projektionsneurone proliferieren in der VZ der dorsolateralen Ventrikelwand (roter Strich) und migrieren radial in den Kortex (rote Pfeile). Kortikale Interneurone stammen aus subpallialen Strukturen der LGE und MGE (grüne Striche) und migrieren tangential in den Kortex (grüne Pfeile). **B** Zeitschema der Migration kortikaler Projektionsneurone und der Ausbildung kortikaler Schichten (verändert nach Merot et al., 2009)

Die Migration aller neuronaler Vorläuferzellen erfüllt zweierlei Funktionen: Zum einen ist sie für die Ausbildung der Identität einiger Neurone von Bedeutung, zum anderen kann sie die funktionellen Eigenschaften und künftigen Verschaltungen der Neurone bestimmen (Kandel et al., 1996).

## 1.4 Regulation der radialen Migration

Die Migration von Neuronen erfordert das Zusammenspiel verschiedener molekularer Ereignisse wie die Interaktion der Neurone mit extrazellulären Substraten und Signalmolekülen, die die Komponenten des Zytoskeletts beeinflussen. Ebenso finden Zell-Zell-Kontakte zwischen verschiedenen Neuronen statt (Yacubova und Komuro, 2003; Komuro und Kumada, 2005). Die genauen Mechanismen der Signalwege sind noch nicht vollständig verstanden. Jedoch sind inzwischen einige Gene entdeckt worden, deren Proteine die radiale und tangentielle Migration beeinflussen (Metin et al., 2008). Mutationen in diesen Genen führen zu humanen neurologischen Fehlentwicklungen wie zu Lissenzephalie, zu kortikalen Heterotopien oder zu Mikrozephalie (Yacubova und Komuro, 2003; Komuro und Kumada, 2005; Metin et al., 2008).

### 1.4.1 Die Rolle von Mikrotubuli- und Aktinnetzwerken während der radialen Migration

Viele Signalwege, die die neuronale Migration regulieren, interagieren mit den Mikrotubuli- und Aktinnetzwerken des Zytoskeletts (Ayala et al., 2007).

Die Störung des Aktinnetzwerkes kann die neuronale Migration komplett inhibieren. Das Protein Filamin1 beispielsweise vernetzt das Aktinnetzwerk und interagiert mit diversen Transmembran- und Signalproteinen, die das Neuritenwachstum und die neuronale Migration steuern (Luo, 2000; Dhavan und Tsai, 2001; Stossel et al., 2001). Die Mutation des Gens *filamin1* führt zu periventrikulären Heterotopien. Andere Aktin-regulierende Proteine, die die Migration beeinflussen, sind das evolutionär konservierte Ena/VASP-Protein, das auf die Fibroblastenbewegung einwirkt (Krause et al., 2003) und das nicht-muskuläre MyosinII, welches für die Nukleokinese von Bedeutung ist (Bellion et al., 2005; Schaar und McConnell, 2005).

Auch Mikrotubuli-Proteine und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) können die Migration beeinflussen. Zu den klassischen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen

gehören MAP1A, MAP1B, MAP2 und Tau, deren Hauptaufgabe die Stabilisierung der Mikrotubuli ist, die aber auch Schlüsselfunktionen bei der Neuriten-Initiation, Neuronen-Morphologie und neuronalen Migration einnehmen (Dehmelt und Halpain, 2004). Die „nicht-klassischen“ Mikrotubuli-assoziierten Proteine Lis1 und DCX, stabilisieren ebenfalls Mikrotubuli, regulieren das Aktinzytoskelett und beeinflussen dadurch die Nukleokinese (Ayala et al., 2007). Menschen mit einer hemizygoten Deletion des Gens, welches für Lis1 kodiert, leiden an der Krankheit Lissenzephalie Typ1. Die Lissenzephalie manifestiert sich durch eine glatte Gehirnoberfläche, abnormale Schichtung des Kortex, vergrößerte Ventrikel und neuronale Heterotopien. Mutationen im *dcx*-Gen führen beim Menschen zu einer X-gekoppelten Lissenzephalie bei Männern und einer subkortikalen Heterotopie bei Frauen (Lambert de Rouvroit und Goffinet, 2001). Wie die klassischen MAPs interagiert DCX mit dem Zytoskelett, kann jedoch auch mit Lis1 wechselwirken und hat höchstwahrscheinlich eine ähnliche Funktion wie Lis1 (Caspi et al., 2000) (Tabelle1).

Gene	Krankheit beim Menschen	Betroffene Loci	Symptome	Referenzen
Reelin	Lissenzephalie mit zerebellarer Hypoplasie	7q22	Entwicklungsverzögerung, zerebellarer Hypoplasie, Epilepsie, Kurzsichtigkeit	Hong et al., 2000
Lis1	Isolierte Lissenzephalien und Miller-Dieker-Syndrom	17p13.3	Entwicklungsverzögerung, Epilepsie, Tod vor Geburt, Miller-Dieker-Syndrom, kraniofaziale Missbildungen	Reiner et al., 1993; Ozmen et al., 2000
14-3-3 ε	Miller-Dieker-Syndrom	17p13.3	Kraniofaziale Missbildungen	Toyo-oka et al., 2003
DCX	Isolierte Lissenzephalien bei Männern, subkortikale Bandheterotopien oder Double-Kortex-Syndrom bei Frauen	Xq22.3-23	Entwicklungsverzögerung, Epilepsie, durch X-Chromosom-Inaktivierung bei Frauen oft weniger stark	Lambert de Rouvroit und Goffinet, 2001
Filamin A	Periventrikuläre Heterotopie	Xq28	Epilepsie, Herzfehler und Gerinnungsstörungen	Fox et al., 1998
Fukutin	Fukuyama-Typ, kongenitale muskulöse Dystrophie	9q31	Entwicklungsverzögerung, Epilepsie, muskuläre Dystrophie	Gressens, 2005
PomGnT1	Muscle-Eye-Brain-Erkrankung	1p32-34	Entwicklungsverzögerung, starke Kurzsichtigkeit, grüner Star, muskuläre Dystrophie	Yoshida et al., 2001
Disc-1	Schizophrenie	1q42.1	Schizophrenie	Millar et al., 2000; Kamiya et al., 2005

**Tabelle 1: Genetische Mutationen, die zu humanen Fehlbildungen aufgrund neuronaler Migrationsdefekte führen** (verändert nach Ayala et al., 2007).



#### 1.4.2 Modulation der radialen Migration durch extrazelluläre Signale

Eine große Anzahl an Molekülen wirken als extrazelluläre Signale auf migrierende Neurone. Diese Moleküle unterscheiden sich stark in ihren physikalischen Eigenschaften und biologischen Funktionen und können in Wegweisemoleküle, die über lange Distanzen auf die Migration wirken (indem sie beispielsweise einen Gradienten ausbilden), in Wegweisemoleküle, die über kurze Distanzen wirken und in Zelladhäsions-Moleküle unterteilt werden (Ayala et al., 2007).

Bei Reelin handelt es sich um ein extrazelluläres Matrixmolekül, das unter anderem von den Cajal-Retzius-Zellen in der MZ synthetisiert wird (Forster et al., 2006; Frotscher et al., 2009) und das bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine entscheidende Rolle spielt. Es wird nicht nur für die Bildung der kortikalen Schichten, sondern auch für ihr Fortbestehen im Erwachsenenstadium benötigt (Frotscher et al., 2009). Eine verringerte Reelin-Expression in einem Mausmodell führt zum Verlust der granulären Zellschicht und im Kortex zu einer verdrehten horizontalen Schichtung, da die neu gebildeten Neurone nicht in die PP einwandern, sondern sich unterhalb sammeln (Frotscher, 1997; Frotscher et al., 2009). Das menschliche Reelin-Gen kodiert ein 388 kDa großes Protein, dessen Mutationen beim Menschen zu Lissenzephalie mit zerebellarer Hypoplasie führt (Hong et al., 2000) (Tabelle 1).

Zu den Faktoren, die über kürzere Distanz wirken, zählen sekretierte Faktoren wie der „*brain-derived neurotrophic*“-Faktor (BDNF) und NT4. Beide gehören zu der Familie der Neurotrophine und fördern die Migration von Kortexneuronen und zerebellaren granulären Neuronen (Behar et al., 1997). Auch von einigen Neurotransmittern ist bekannt, dass sie endogen durch Depolarisation der Neurone ihre Migration beeinflussen (Komuro und Rakic, 1993; Behar et al., 1996; Behar et al., 1998; Behar et al., 1999; Heck et al., 2007).

### 1.4.3 Modulation der Migration durch intrazelluläres Kalzium

Neue Studien zeigen, dass Kalzium-abhängige Signalwege und die intrazelluläre Kalziumkonzentration eine große Rolle während der neuronalen Migration spielen (Lee et al., 1999). Intrazelluläres Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) wird unter anderem für die Regulation der Struktur und für die Dynamik des Aktinzytoskeletts sowie für die Modulation der Zelladhäsion benötigt (Strohmeier und Bereiter-Hahn, 1984; Citi und Kendrick-Jones, 1987; Hartwig und Yin, 1988; Rees et al., 1989; Condeelis, 1993; Lawson und Maxfield, 1995; Sjaastad und Nelson, 1997). Auch die Aktivierung von Cdc42 (ein Regulator der Zellpolarität) durch Lis1 ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig (Ridley et al., 2003; Kholmanskikh et al., 2006). Überdies stimulieren BDNF und NT4 die Beweglichkeit der kortikalen Zellen durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismus (Behar et al., 1997). Es wird angenommen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  unter anderem aus intrazellulären Speichern ausgeschüttet wird und sich zum Nukleus ausbreitet, wo es die Genexpression beeinflusst (Owens et al., 2000).

Eine Korrelation zwischen der Migration und dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wird vor allem bei der Migration von zerebellaren Granularzellen deutlich (Komuro und Rakic, 1998). Die Granularzellen starten ihre radiale Migration erst nach der Expression von N-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Die Änderungen in der Amplitude und Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beeinflussen direkt das Migrationsverhalten der Granularzellen. Die Zellen bewegen sich während einer Phase der  $\text{Ca}^{2+}$ -Zunahme nach vorne und bleiben während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abnahme stehen. Die tonische Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt jedoch zu einem Halt der Migration (Komuro und Rakic, 1998). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten verschwinden zehn Minuten bevor die Granularzellen ihre Migration beenden (Komuro und Kumada, 2005). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten werden durch NMDA-Rezeptoren und N-Typ spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vermittelt, die durch endogenes Glutamat im Extrazellulärraum aktiviert werden (Komuro und Kumada, 2005). Auch L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermitteln  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, die die radiale und tangentielle Migration kortikaler Neuronen (unveröffentlichte Ergebnisse von Dr. Nicolas Heck; Bortone und Polleux, 2009) und

die Migration postnataler Neuronen in den *Bulbus olfactorius* (Darcy und Isaacsson, 2009) beeinflussen.

## **1.5 Die Rolle von GABA-Rezeptoren während der radialen Migration**

Im Gegensatz zu NMDA-Rezeptoren gehören GABA- und Glyzinrezeptoren zu den klassischen inhibitorischen Rezeptoren des adulten Nervensystems (Kaila, 1994). Während der frühen Entwicklung jedoch induziert die Aktivierung von ionotropen GABA- und Glyzinrezeptoren eine depolarisierende Membran-Antwort (Ben-Ari et al., 1989; Luhmann und Prince, 1991; Kaila, 1994; Owens et al., 1996; Flint et al., 1998; Okabe et al., 2004; Achilles et al., 2007; Dresbach et al., 2008; Kilb et al., 2008). Im Gegensatz zu adulten Neuronen ist die intrazelluläre Chlorid-Konzentration in den prä- und frühen postnatalen Neuronen stark erhöht (Kaila, 1994). Der Grund dafür ist die Expression des Chlorid-Transporter NKCC1, der Chlorid in die Neuronen hinein transportiert und dadurch einen Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle vermittelt (Owens et al., 1996; Achilles et al., 2007). Seine Expression ist während der frühen Entwicklung des Nervensystems stark erhöht (Clayton et al., 1998; Marty et al., 2002) und nimmt nach der Geburt ab (Plotkin et al., 1997; Yamada et al., 2004).

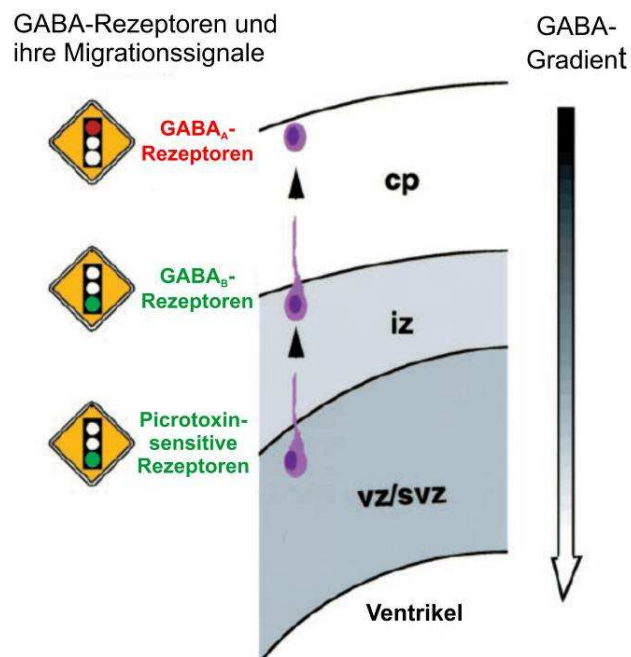
Der Neurotransmitter GABA spielt eine wichtige Rolle während der radialen Migration kortikaler Neuronen. Sein Effekt ist sowohl von der GABA-Konzentration als auch von der Expression der verschiedenen GABA-Rezeptoren abhängig. Allgemein sind drei verschiedene GABA-Rezeptor-Typen bekannt: Die ionotropen GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren, die Cl<sup>-</sup>-Kanäle ausbilden, und die metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, die über G-Protein-gekoppelte Proteine an Ca<sup>2+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Kanäle binden (Bormann, 2000). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren variieren während der Kortexentwicklung stark in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung, die zeit- und ortsspezifisch exprimiert werden (Laurie et al., 1992; Behar et al., 1996; Behar et al., 2000). Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in Neuronen der VZ haben eine wesentlich höhere Affinität zu GABA als die der CP und sind relativ insensitive gegenüber Desensitivierung (Behar et al., 1998; Owens et al., 1999). In dissoziierten neokortikalen

Neuronen von E16-Rattenembryonen löst eine femtomolare GABA-Konzentration Chemotaxis, also die Wanderung entlang eines Gradienten aus, wohingegen mikromolare GABA-Konzentrationen Chemokinese auslösen (Behar et al., 1996). Dieser konzentrationsabhängige Effekt auf die Migration kann auch durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten Muscimol, den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisten Baclofen und den GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Agonisten CACA hervorgerufen werden (Behar et al., 1998; Owens und Kriegstein, 1998). Die Expression von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren wurde in der VZ und in der IZ von E17-Rattenembryonen nachgewiesen (Behar et al., 2001).

Da verschiedene GABA-Rezeptoren unterschiedlich hohe Affinitäten gegenüber GABA besitzen, können sie die Migration kortikaler Neurone unterschiedlich regulieren (Behar et al., 2000; Wang und Kriegstein, 2009). Der Einfluss verschiedener GABA-Rezeptoren wurde unter Verwendung spezifischer Antagonisten in organotypischen Schnittkulturen untersucht (Behar et al., 2000). Die Blockade der Picrotoxin-sensitiven GABA-Rezeptoren durch Picrotoxin und der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren durch Saclofen führt zu einer verringerten Migration (Behar et al., 2000). Im Gegensatz dazu verstärkt *in vitro* und *in vivo* der spezifische GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist (-)-Bicucullinmethiodid (BMI) die Migration (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). Durch die Aktivierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kommt es zur Unterdrückung spontaner Ca<sup>2+</sup>-Transienten, die wahrscheinlich für die neuronale Migration von Bedeutung sind (Heck et al., 2007).

Behar und ihre Kollegen (Behar et al., 2000) entwickelten ein Modell des sich entwickelnden Kortex, in dem ein GABA-Gradient die radiale Migration bestimmt (Abb.4). Die GABA-Konzentration ist in den äußeren Schichten, also in der Zielregion der migrierenden Neuronen, am höchsten und in der Proliferationszone am niedrigsten. Die Voraussetzung für dieses Modell ist, dass sich in den unteren Regionen des Kortex GABA-Rezeptoren mit einer höheren Affinität befinden als in der oberen Region. GABA signalisiert den neu gebildeten Neuronen in der VZ, durch Aktivierung der Picrotoxin-sensitiven Rezeptoren, in die IZ zu wandern. Zu den Picrotoxin-sensitiven GABA-Rezeptoren zählen die GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren, wobei die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren zehnmals sensitiver sind als GABA<sub>A</sub>-

Rezeptoren (Bormann und Feigenspan, 1995; Bormann, 2000). In der IZ bewirkt GABA durch Aktivierung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren eine Wanderung in die CP. In der CP werden durch die hohe GABA-Konzentration die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aktiviert, die für ein Anhalten der Migration sorgen (Behar et al., 2000).



**Abb.4: Modell des GABA-Gradienten während der Entwicklung des Kortex.** GABA-Rezeptoren modulieren die Wanderung embryonaler Neurone entlang von Migrationsrouten. GABA wird nahe des Migrationsziels der Neurone exprimiert und diffundiert durch das Gewebe, so dass sich ein Gradient bildet. Die Aktivierung der PicROTOXIN-sensitiven Rezeptoren veranlasst die Neurone aus der VZ/SVZ in die IZ zu migrieren (untere, grüne Ampel). In der IZ fördert die Aktivierung Saclofen-sensitiver Rezeptoren die Wanderung in die CP (mittlere, grüne Ampel). In der CP führt die Aktivierung der BMI-sensitiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu einem Migrationsstop (obere, rote Ampel; verändert nach Behar et al., 2000).

## 1.6 Die Rolle von Glyzinrezeptoren während der radialen Migration

Die funktionelle Expression von Glyzinrezeptoren wurde während der Kortexentwicklung bei pränatalen und neonatalen Ratten in Cajal-Retzius Zellen, in Neuronen der SP und CP und in migrierenden Neuronen der IZ nachgewiesen (Flint et al., 1998; Kilb et al., 2002; Okabe et al., 2004; Kilb et al., 2008). Glyzinrezeptoren sind während der frühen Kortexentwicklung exzitatorisch und Strychnin-sensitiv und setzen sich aus den  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammen (Kilb et al., 2002; Okabe et al., 2004; Kilb et al., 2008).

Bei dem Glyzinrezeptor-aktivierenden endogenen Liganden handelt es sich wahrscheinlich um Taurin, das, im Gegensatz zu Glyzin, in großen Mengen während der frühen Entwicklung im Kortex vorhanden ist (Aprison et al., 1969; Agrawal et al., 1971; Sturman et al., 1977; Flint et al., 1998). Taurin kann im immaturren Kortex durch KCl-induzierte Depolarisation (Collins und Topiwala, 1974; Clark und Collins, 1976; Oja und Saransaari, 1992), tetanische elektrische Stimulation (Collins und Topiwala, 1974; Kubo et al., 1992) oder hypoosmotischen Schock (Oja und Saransaari, 1992) ausgeschüttet werden. Taurin beeinflusst die korrekte neuronale Proliferation, Migration und Differenzierung (Sturman et al., 1985a; Palackal et al., 1986; Altshuler et al., 1993; Sturman et al., 1994; Maar et al., 1995). Die Migration von Granularzellen im Zerebellum von Katzen ist *in vivo* bei Reduktion der Taurinkonzentration extrem gestört (Sturman et al., 1985a; Sturman et al., 1985b) und auch während der Migration zerebellarer Neurone in dissoziierten Kulturen spielt Taurin eine wichtige Rolle (Maar et al., 1995).

Obwohl vieles über die Expression und Funktionalität von Glyzinrezeptoren während der pränatalen Entwicklung des Kortex in migrierenden Neuronen bekannt ist, ist die Rolle der Glyzinrezeptoren bei der radialen Migration in kortikalen Schnittkulturen bislang nicht untersucht worden.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Für die Entwicklung des zerebralen Kortex ist die radiale Migration von Neuronen an ihren Bestimmungsort von elementarer Bedeutung. Für diese radiale Migration sind extrazelluläre Signale, die mit den Neuronen interagieren und über intrazelluläre Signalwege eine Umgestaltung des Zytoskeletts vermitteln, notwendig (Ayala et al., 2007). Neben vielen genetischen Faktoren ist auch die spontane und die durch sensorische Information beeinflusste neuronale Aktivität für die neuronale Differenzierung und Migration von Bedeutung (Khazipov und Luhmann, 2006; Wang und Kriegstein, 2009). Zu den extrazellulären Signalen gehört auch der Neurotransmitter GABA, der über Depolarisation der Neurone einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermittelt und dadurch die Modulation der Migration über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege ermöglicht (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). Der GABA-vermittelte Effekt auf die Migration ist konzentrations- und ortsabhängig. GABA ist graduell im pränatalen Kortex verteilt, wobei die GABA-Konzentration in den höchsten Schichten am größten und in der untersten Region am niedrigsten ist. Dort werden Picrotoxin-sensitive Rezeptoren aktiviert, die die Migration in die IZ fördern (Behar et al., 2000). Es wird angenommen, dass es sich bei den Picrotoxin-sensitiven Rezeptoren im unteren Kortexbereich um  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren handelt. Bislang hat jedoch niemand gezielt die Expression von  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren während der Kortexentwicklung und die Rolle von  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren während der radialen Migration untersucht.

Der erste Teil der hier vorliegenden Dissertation beinhaltet die Untersuchung der Expression von  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren im immaturren Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration.

Zur Erreichung dieses Zieles wurde

1. die GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Expression im Kortex auf RNA- und Proteinebene, unter Verwendung der RT-PCR-, der *in situ* Hybridisierungs- und der Westernblot-Methode nachgewiesen.
2. die funktionelle Expression durch Messung der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-induzierten Depolarisation unter Verwendung der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung überprüft.
3. die Rolle von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren während der radialen Migration unter Verwendung der BrdU-basierten Migrationsanalyse und der spezifischen GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten untersucht.

Im Gegensatz zu GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren ist die Expression von Glyzinrezeptoren in radial migrierenden Neuronen bereits beschrieben worden (Flint et al., 1998). Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass der Glyzin- und GABA-Rezeptor-Agonist Taurin die neuronale Migration beeinflusst (Maar et al., 1995). Inwiefern jedoch die Aktivierung von Glyzinrezeptoren durch einen endogenen Liganden auf die radiale Migration wirkt, wurde bislang nicht untersucht.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation wurde deshalb die Funktion von Glyzinrezeptoren während der Migration untersucht.

Zur Erreichung dieses Zieles wurde

1. die Rolle von Glyzinrezeptoren während der radialen Migration unter Verwendung der BrdU-basierten Migrationsanalyse und der spezifischen Glyzinrezeptor-Antagonisten untersucht.
2. die Funktionalität der Liganden Glyzin und Taurin mit Hilfe der BrdU-basierten Migrationsanalyse überprüft. Dabei fanden die Glyzinrezeptor-Agonisten Glyzin und Taurin und Inhibitoren der Glyzin- und Taurin-Transporter Verwendung.



## 3. Materialien

### 3.1 Chemikalien

5-Bromo-2'-desoxyuridin	Sigma, Steinheim
100 bp Ladder Sharp DNA Marker	UBI Life Sciences, Saskatoon, SK, Canada
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Azetanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim
B27	Gibco, Karlsruhe
<i>Blocking</i> -Puffer (TSA Biotin System)	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA
<i>Blocking</i> -Reagenz	Roche Applied Science, Mannheim
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, Karlsruhe
Calcium Green-1	Molecular Probes, Karlsruhe
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Dextranulphat	Sigma, Steinheim
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanol (abs. vergällt)	NeoLab, Heidelberg
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma, Steinheim
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Formamid	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim

---

Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES (Natriumsalz)	Sigma, Steinheim
HRP-Substrat ( <i>Immobilon Western Chemiluminescent</i> )	Millipore, Schwalbach
Hybrisierungspuffer	Sigma, Steinheim
Iodazetamid	Fisher Scientific, Nidderau
Ionenaustauschharz <i>Mixed bed ion-exchange resin</i>	Bio-Rad, München
<i>Jung Tissue freezing-Medium</i>	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Leica Microsystems, Nussloch
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumphosphat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver (Sucofin)	Merck, Darmstadt
MEM	TSI, Zeven
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	Gibco, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Monohydrat	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-L-Glutamat	Sigma, Steinheim
Natriumzitat	Sigma, Steinheim
Neurobasalmedium	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Pluronsäure	Sigma, Steinheim
Poly-L-Ornithinhydrobromid	Molecular Probes, Karlsruhe
Polyvinyl-Pyrrolidon	Sigma, Steinheim
Precision Plus Protein Marker ( <i>Dual Colour Stand</i> )	Sigma, Steinheim
	Biorad, München

Probenpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Rinderserumalbumin (IgG- und Protease-frei)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
SeaKem LE Agarose, FMC	Bioproducts, Rockland, Maine, USA
SybrGold	Molecular Probes, Karlsruhe
TNB-Blocking-Puffer (TSA Biotin System)	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA
Triethanolamin (pH 8,0)	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma, Steinheim
Tween-20	Sigma, Steinheim
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Wide Range Marker	Sigma, Steinheim

### 3.2 Enzyme

Proteinase K	Roche Applied Science, Mannheim
RNA freie DNase I	Roche Applied Science, Mannheim
RNAsin	Promega, Mannheim
T3-RNA Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim
T7-RNA Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim

### 3.3 Antikörper und Fluorochrome

<i>Anti-BrdU</i> (aus Maus)	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
<i>Anti-DIG</i> Antikörper (aus Schaf)	Roche Applied Science, Mannheim
<i>Anti-GABA<sub>C</sub></i> -Rezeptor (aus Kaninchen)	Prof. H. Wässle (Max-Planck- Institut, Frankfurt a.M.)
<i>Anti-Maus Alexa-Fluor568/red</i> (aus Ziege)	Molecular Probes, Karlsruhe
<i>Anti-Kaninchen</i> (biotinyliert) (aus Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotin-markiertes Tyramid	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA
Meerrettich-Peroxidase konjugiert mit <i>Anti-Kaninchen</i> (aus Ziege)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
Streptavidin-alkaline Phosphatase	Roche Applied Science, Mannheim
Streptavidin-Cy3	Jackson Immunosearch Labora- tories, West Grove, USA

### 3.4 Nukleinsäuren

<i>pBluescript</i> -Vektor	Stratagene, CA, USA
<i>RNA labeling mix</i>	Roche Applied Science, Mannheim
tRNA	Roche Applied Science, Mannheim
UTPs	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA

### 3.5 Kits

<i>BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagenz</i>	Thermo Scientific, Bonn
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>High Pure RNA Tissue Kit</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>RNeasy Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>SuperScriptIII Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq PCR Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Vector Red Kit</i>	Vector Laboratories, CA, USA

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Mikrotiterplatte	Nunc, Wiesbaden
48-Loch-Mikrotiterplatte	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen (18x18 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser (Ø 50 mm)	Menzel, Braunschweig
Eppendorf-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Falconröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekleber (Permabond)	Engineering Winchester, UK
Handfärbereihe	Medite Medizintechnik, Nunningen, Schweiz
Handschuhe (Manoera)	Josef F. Müller AG, München
Handschuhe (Neolab)	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Handschuhe ( <i>rotiprotect</i> Latex)	Roth, Karlsruhe
Kosmetiktücher	IGEFA, Ahrensfelde OT Blumberg

Kulturgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten (UV-Küvette Mikro)	Brand, Wertheim
Linsen-Reinigungspapier	Kodak, Rochester, NY, USA
Millicell Nitrozellulose-Membranen	Millipore, Schwalbach
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (35x10 mm)	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen (100x20 mm; 150x22 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (10 und 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe
Quadriperm-Schalen	Merck, Darmstadt
Schraubdeckelgläser	Roth, Karlsruhe
Schutzbrillen	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Sterilfilter (Filtropur S 0,2 µm)	Fluka, Steinheim
Skalpellschlingen	Bayha, Tuttlingen
SuperFrost Plus slides	Menzel, Braunschweig
Vibratomklingen ( <i>Valet Blades</i> )	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Whatman-Papier (Ø 55 mm)	Whatmann International, Maidstone, England, UK

### 3.7 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Mäuse	C57BL/6
Käfigtyp	Makrolon Typ III A Bodenfläche 810 cm <sup>2</sup> Bodenmaße 383x 221 mm Höhe 150 mm Wanddicke 3 mm
Einstreu	grobe Holzspäne

Wasser	pH neutral, ohne Zusätze
Zuchtfutter	Altromin 1314-Panacur; versetzt mit Fenbendazol und Haferflocken

### 3.8 Geräte

Analysenkammer ( <i>recording chamber</i> )	Luigs & Neumann, Ratingen
Analysenwaage (JL-200)	Chyo Balance Corp., Tokio, Japan
Autoklav (Systech 65)	Systech, Wetttenberg
Badheizung	Luigs & Neumann, Ratingen
Binokular	Zeiss, Jena
CCD-Kamera	Roper Scientific, Trenton, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator (HeraCell 240)	Kendro, Wien, Österreich
Eismaschine (AF 20)	Scotsman, Mailand, Italien
Eisschrank (Herafreeze)	Kendro, Wien, Österreich
Filterapparatur ( <i>Bottletop System</i> )	Hartenstein, Würzburg
Fotokamera Gel-Dokumentation	Epson, Meerbusch
Kryostat (HM 560 <i>Cryo-Star</i> )	Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Kühlschrank (Liebherr profiline)	Liebherr, Lindau
LAS3000 imaging system	Fujifilm, Düsseldorf
Laser	Laser Physics, West Jordan, USA
Luftobjektiv (4x/340)	Olympus, Tokio, Japan
Mikroskop (BX51WI)	Olympus, Tokio, Japan
Millipore ( <i>Synergy</i> )	Millipore, Schwalbach
Nipkow spinning disk confocal system (QLC100)	Visitech International, Sundeland, UK
pH-Meter	InoLab, Weinheim
Piezo	Piezosystem, Jena
Pinzetten	Medicon, Tuttlingen

Pipette ( <i>Research</i> )	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe ( <i>Easypet</i> )	Eppendorf, Hamburg
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Quecksilberbrenner (HBO103W/2)	Osram, München
Schere (Mikro 2000)	Medicon, Tuttlingen
Schütteltisch (Titramax1000)	Heidolph Instruments, Schwabach
Skalpell (Mikroskalpell)	Medicon, Tuttlingen
Spektrophotometer (UV1402)	Shimadzu, Duisburg
Sterilwerkbank ( <i>Herasafe HS15, Heraguard</i> )	Kendro, Wien, Österreich
Temperaturregler	Luigs & Neumann, Ratingen
Temperaturregler (TC02)	Multi Channel Systems, Reutlingen
Thermomixer ( <i>Comfort</i> )	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Qualitron, Korea
Tischzentrifuge ( <i>Minispin plus</i> )	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Kendro, Wien, Österreich
UV-Lampe für Geldokumentation ( <i>Syngene</i> )	Synoptics, Cambridge, UK
Vakuumpumpe	KNF Laboport, Freiburg
Vibratom (HR2)	Sigmann Elektronik, Hüffenhardt
Vorschaltgerät für Quecksilberbrenner (URFL-T)	Olympus, Tokio, Japan
Vortex	Cenco Instruments, Breda, Niederlande
Vortex (Vibrofix VF1)	IKA, Staufen
Waage	Kern und Sohn, Ballingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserimmersionsobjektiv (20x/0,5, 60x/0,9)	Olympus, Tokio, Japan
Wippschüttler (Mini-Rocker, MR-1)	PEQLAB, Erlangen
Zentrifuge (5415R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 1.0R Rotor 2252)	Kendro, Wien, Österreich
Zentrifuge (Sorvall SS34)	Kendro, Wien, Österreich



### 3.9 Computerprogramme

Bilddokumentation ( <i>Metamorph</i> )	Universal Imaging Corporation, Sunnyvale, USA
Bildverarbeitung ( <i>Adobe Photoshop</i> Version 7.0)	Adobe Systems Inc., München
Graphiklayout ( <i>CorelDraw!</i> Version 12)	Corel Corporation, Unterschleiß- heim
Referenzverwaltung ( <i>Reference Manager</i> Version 10)	ISI ResearchSoft, Philadelphia, USA
Statistik ( <i>GraphPad Prism</i> Version 3,02)	La Jolla, CA, USA
Statistik ( <i>Systat</i> 11)	Point Richmond, CA, USA
Tabellenkalkulation ( <i>Excel MS Office</i> 2003)	Microsoft, Redmond, USA
Textverarbeitung ( <i>Word MS Office</i> 2003/2007)	Microsoft, Redmond, USA

### 3.10 Medien und Pufferlösungen

#### 3.10.1 Migrationsanalyse

Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF)	1,8 mM CaCl <sub>2</sub>
	25 mM Glukose
	10 mM HEPES
	5,3 mM KCl
	0,812 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	51,3 mM NaCl
	26 mM NaHCO <sub>3</sub>
0,9 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	
Agarose ( <i>low melt</i> )	2% in H <sub>2</sub> O
NB/B27	2% B27
	2 mM Glutamax
	10 µg/mL PEST

### 3.10.2 Antikörperfärbungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl <sub>2</sub> 7 mM KCl 12 mM H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
0,1% Triton	0,1% Triton-X 100 in H <sub>2</sub> O
3% BSA/PBS	3% BSA in 0,01 M PBS
2N HCl	1:6 Verdünnung der 12N HCl mit H <sub>2</sub> O

### 3.10.3 Kalziumabhängige Fluoreszenzmessung

ACSF für Akutschnitte	siehe Kapitel 3.10.1
ACSF für <i>in vitro</i> Schnitte	51 mM NaCl 26 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,9 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>5</sub> 0,8 mM MgCl <sub>2</sub> 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> 5.3 mM KCl 25 mM Glucose 11 mM HEPES
Calcium-Green	1,25 mM Ca-Green 0,01% Pluronsäure in ACSF
20% Pluronsäure	0,1 g in 1 mL DMSO

### 3.10.4 *In situ*-Hybridisierung

4 M Ammoniumacetat	4M NH <sub>4</sub> OAc in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Für 250 mL 77,1 g NH <sub>4</sub> OAc in H <sub>2</sub> O mit DEPC-behandeln, autoklavieren
0,1 M Triethanolamin (pH 8,0)	0,1 M Triethanolamin in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> mit 5 M HCl auf pH 8,0; autoklavieren
1x NTE-Puffer	0,5 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA, autoklavieren
20x SSC (pH 7,4)	175,3 g NaCl 88,2 g Na <sub>3</sub> Citrat, -2H <sub>2</sub> O auf 1 L mit H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> auffüllen mit 1M HCl auf pH 7,4 einstellen mit DEPC behandeln, autoklavieren
Formamid (deionisiert)	10 g <i>Mixed Bed Resin</i> pro 100 mL Formamid 30 Minuten rühren, filtern
Hybridisierungskammer-Fluid	75 mL Formamid 15 mL 20x SSC 60 mL H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
Hybridisierungsmix	50% Formamid (deionisiert) 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,3 M NaCl 5 mM EDTA, pH 8,0 10% Dextranulphat 0,02% Ficoll 400 0,02% Polyvinylpyrrolidon 0,02% BSA 0,5 mg/mL tRNA 0,2 mg/mL Carrier DNA 200 mM DTT

TNT-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl 0,05% Tween-20
Waschpuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,05% Tween-20

### 3.10.5 PCR

Agarosegel	1% Agarose in 0,5x TBE Puffer
TBE-Puffer	89 mM Tris/Borat pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
SybrGold	0,08% SybrGold in 0,5x TBE

### 3.10.6 Western-Blot

Blockierungslösung	4% Magermilchpulver in TBST
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton-X 100
TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl Mit HCl auf pH 7,6 einstellen
TBST	50 mM Tris 150 mM NaCl Mit HCl auf pH 7,6 einstellen 0,1% (v/v) Tween-20
Transferpuffer	24 mM Tris 192 mM Glyzin 20% Ethanol abs.

## 4. Methoden

### 4.1 Migrationsanalyse

#### 4.1.1 Die Methode der BrdU-basierten *in vitro* Migrationsanalyse

Ziel der Migrationsanalyse war, mit Hilfe eines *in vitro* Systems die radiale Migration kortikaler Neuronen verfolgen zu können.

Die Entdeckungen, dass Neurone in koronalen Schnitten des präfrontalen Kortex bei guter Kultivierung weiterhin wandern und dass das Thymidin-Analogon 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA proliferierender Zellen inkorporiert wird und damit zur Analyse der Proliferation und Migration verwendet werden kann, waren für die hier beschriebene Migrationsanalyse grundlegend (Miller und Nowakowski, 1988). 1993 wurde zum ersten Mal die Zellmigration in kortikalen Schnittkulturen von neonatalen Frettchen beschrieben und somit ein *in vitro* System etabliert, bei dem Neurone in einer annähernd normalen Umgebung in Rollerflaschenkulturen migrierten (Roberts et al., 1993). In dieser Dissertation wurde die Kulturmethode nach Stoppini verwendet, bei der die Schnitte auf Membranen im Übergang zwischen Luft und Kulturmedium verbleiben (Stoppini et al., 1991). Die *in vitro* Migrationsanalyse wurde von Dr. Nicolas Heck und Therese Riedemann im Labor der AG Luhmann Mainz etabliert. Die Ergebnisse der Migrationsanalysen unter Verwendung der Antagonisten Picrotoxin, (-)-Bicucullinmethiodid und (1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)methyl-Phosphinsäure entstanden in Zusammenarbeit mit Dr. Nicolas Heck und Therese Riedemann.

#### 4.1.2 Herstellung koronaler Schnittkulturen des präfrontalen Kortex

Der erste Schritt der Migrationsanalyse bestand in der Präparation embryonaler Gehirne aus C57BL/6-Mäusen, um 300 µm dicke, koronale Schnitte des Telenzephalons herzustellen. Dazu wurden E16- bis E18-Mausembryonen verwendet. Die Muttermaus wurde mit Isofluran anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend holte man die Embryonen aus dem Mutterleib und isolierte die Gehirne in eiskalter, mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begaster, artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF). Das Kleinhirn wurde abgetrennt und das Telenzephalon mit der Schnittfläche nach unten mit dem Gewebekleber Permabond auf den Schlitten des Vibratoms geklebt. Anschließend wurden die Gehirne mit lauwarmer Agarose übergossen und der Schlitten des Vibratoms mit eiskaltem ACSF gefüllt. Dann erfolgte das Schneiden der 300 µm dicken, koronalen Schnitte des oberen Bereichs des Telenzephalons. Diese wurden mit dem breiten Ende einer Pasteurpipette aufgenommen und in eiskaltem ACSF gesammelt. Mit einem Skalpell wurden die Gehirnhälften voneinander getrennt und mit Pinzetten die Hirnhäute entfernt. Unter einer Sterilbank wurden die Millicell-Membranen in Petrischalen (35x10 mm) gegeben, die mit je 1 mL NB/B27 gefüllt waren und die Schnitte auf die Millicell-Membranen verteilt. Dabei wurden bis zu sechs Schnitte auf eine Membran aufgebracht. Die Membranen mit den Schnitten verbrachten vier Stunden in einem Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft. Anschließend wurde dem Medium 10 µM BrdU hinzugefügt und die Schnitte weitere drei Stunden im Inkubator belassen. Danach wurde das Medium durch BrdU-freies NB/B27 ausgetauscht und diesem eine definierte Konzentration an Rezeptor-Antagonisten oder -Agonisten beigefügt. Die Kontrollkulturen wurden mit dem gleichen Volumen an Lösungsmittel (Wasser oder DMSO) behandelt. Die DMSO-Konzentration war in allen Ansätzen nie höher als 0,1%. Bei einer Agonisten-Applikation erfolgte nach 24 Stunden nochmals ein Mediumwechsel und der Agonist wurde erneut appliziert. Insgesamt wurden die Schnitte 48 Stunden nach Antagonist- bzw. Agonistenzugabe im Inkubator belassen und anschließend vorsichtig mit 4% Paraformaldehyd (PFA) von den Membranen gelöst. Die Schnitte von je einer Millicell-Membran wurden in eine Vertiefung einer unbeschichteten 48-Lochplatte überführt, 30 Minuten lang in PFA fixiert, drei Mal in 0,1 M PBS gewaschen und bis zur Antikörperfärbung in PBS aufbewahrt.

### 4.1.3 BrdU-Antikörperfärbung für die Migrationsanalyse

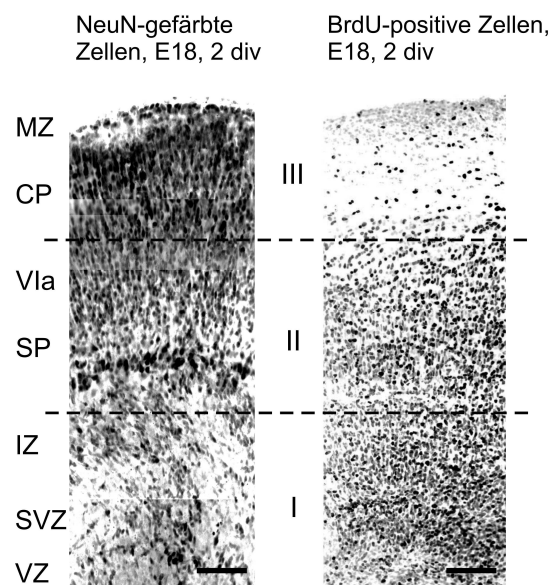
Der nächste Schritt der Migrationsanalyse bestand darin, mit den fixierten Schnitten eine Antikörperfärbung gegen BrdU durchzuführen. Die proliferierenden Neurone, die das BrdU in die neu synthetisierte DNA inkorporiert haben, wurden durch diese Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

Die Antikörperfärbung wurde auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die fixierten Schnitte zuerst für 30 Minuten in 0,1% TritonX-100 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS für je mindestens fünf Minuten, wurden die Schnitte anderthalb Stunden in 2N HCl inkubiert und anschließend wieder drei Mal für je fünf Minuten in 0,1 M PBS gewaschen. Daraufhin wurde der anti-BrdU-Erstantikörper (1:100 in 3% BSA/PBS verdünnt, aus der Maus) auf die Schnitte gegeben und über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag inkubierten die Schnitte nach dreimaligem Waschen für je fünf Minuten in 0,1 M PBS in dem Alexa Fluor 568-Sekundärantikörper (1:800 in 3% BSA/PBS verdünnt, anti-Maus, aus der Ziege) abgedunkelt für zwei Stunden. Nachdem die Schnitte weitere drei Male im Dunkeln mit 0,1 M PBS gewaschen wurden, wurden sie mit dem breiten Ende einer Pasteurpipette aufgenommen und mit Hilfe des Einbettmediums, Fluoromount-G, auf einen Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden abgedeckt über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend im Kühlschrank bis zum Zeitpunkt des Fotografierens aufbewahrt.

### 4.1.4 Mikroskopie und Auswertung der Migrationsanalyse

Die BrdU-positiven Koronalschnitte der embryonalen Mäuse wurden mit einem Nipkow *Spinning Disk* konfokalen System an einem aufrechten Mikroskop betrachtet. Die rote Fluoreszenz wurde durch einen Krypton/Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 568 nm angeregt. Unter dem 4-fachen Luftobjektiv wurde anhand der Form und der Fluoreszenz eines Schnittes der Objektträger so gedreht, dass der dorsolaterale Teil des präfrontalen Kortex im Sichtfeld unten lag. Unter dem 20-fachen Wasserimmersionsobjektiv wurde der Schnitt genauer ausgerichtet, bis sich

der Ventrikel des präfrontalen Kortex in einer geraden Linie im unteren Sichtfeld befand. Eine Region innerhalb des präfrontalen Kortex wurde durch eine Fotosequenz mit einer CCD-Kamera bei einer Belichtungszeit von 1000 ms und halbmaximaler Laser-Intensität dokumentiert. Die Fotosequenz begann auf Höhe des Ventrikels und endete auf Höhe der Pia. Die Bilder des zerebralen Kortex wurden mit Hilfe des Metamorph-Programms zusammengesetzt, so dass sie unten mit der VZ und oben mit der Pia abschlossen. Zur Analyse der Migration wurde das Bild in drei gleichgroße Regionen aufgeteilt. In der unteren Region (Region I) befanden sich die VZ, SVZ und ein Teil der IZ. Die mittlere Region (Region II) umfasste den äußeren Bereich der IZ, sowie die SP und einen unteren Teil der sich entwickelnden CP (VIa). Die obere Region (Region III) schloss den oberen Bereich der CP und der MZ ein (Abb.5).



**Abb.5: Darstellung der ungefähren Positionen der kortikalen Schichten in den drei ausgewählten Regionen der Schnittkulturen.** Eine BrdU-gefärbte Schnittkultur wurde mit einer NeuN-gefärbten Schnittkultur verglichen, um die ungefähre Position der kortikalen Schichten innerhalb der festgelegten Regionen I, II und III identifizieren zu können (Maßstab = 100 µm).

Zur Auswertung der Migrationsanalyse erfolgte eine Auszählung der BrdU-positiven Zellen in jeder Region für jeden Schnitt mit Hilfe des Metamorph-Programms. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen innerhalb einer Region wurde durch die Gesamtanzahl der BrdU-positiven Zellen in allen Regionen geteilt und damit die



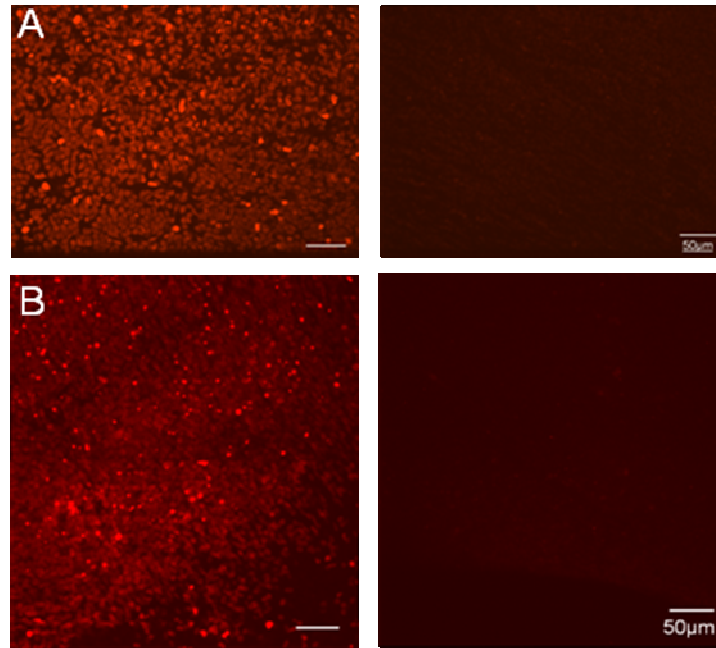
relative Anzahl innerhalb einer Region ermittelt. Die relative Anzahl der BrdU-positiven Zellen in den einzelnen Regionen war ein Maß für die Verteilung der BrdU-positiven Zellen in den Schnitten und somit für die Migration der Neurone. Die Verteilung der BrdU-positiven Zellen in den Kontrollschnitten wurde mit der Verteilung in den behandelten Schnitten verglichen. Befanden sich, im Vergleich zu den Kontrollschnitten, signifikant mehr Neurone in der untersten Region (Region I), war dies ein Anzeichen für eine verringerte Migration. Befanden sich in der obersten Region (Region III) mehr Zellen, waren auch mehr Neurone gewandert. Anhand des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests (Systat) wurde für jede Region bestimmt, ob sich die relative Anzahl der Zellen der behandelten Schnitte signifikant von den Kontrollschnitten unterscheidet.

#### **4.1.5 Kontrollfärbungen zur Überprüfung der BrdU-Antikörperfärbung**

Zur Überprüfung der Spezifität der BrdU-Antikörperfärbung erfolgten verschiedene Kontrollfärbungen. Zum einen wurde überprüft, ob die ersten und zweiten Antikörper der BrdU-Antikörperfärbung spezifisch binden, zum anderen, ob mit der BrdU-Färbung ausschließlich Zellkerne und Neurone gefärbt wurden.

##### **4.1.5a Kontrollfärbung zur Überprüfung der Spezifität der beiden Antikörper**

In den ersten Kontrollexperimenten wurde eine Antikörperfärbung an Schnitten, denen keine BrdU zugesetzt wurde (Abb.6A) und eine Färbung ohne Zugabe des ersten Antikörpers (Abb.6B) durchgeführt. Beide Kontrollfärbungen zeigten weder artifizielle Färbeartefakte, noch eine starke Hintergrund-Fluoreszenz. Mit diesen Kontroll-Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, dass der anti-BrdU-Erstantikörper spezifisch BrdU und der Alexa Fluor 568-Zweitantikörper spezifisch den ersten Antikörper bindet.



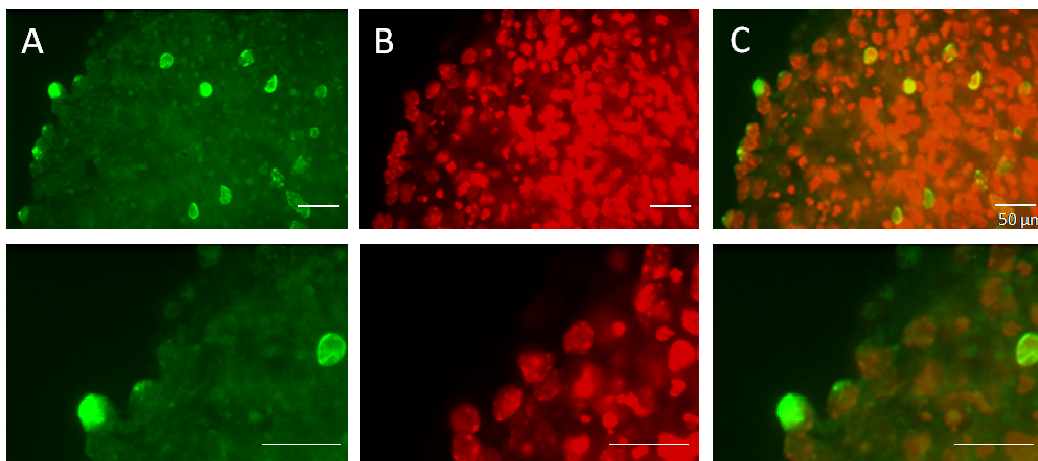
**Abb.6: Kontrollfärbung ohne BrdU-Inkubation und ohne anti-BrdU-Erstantikörper.** **A** BrdU-Antikörperfärbung mit Zugabe von 10 µM BrdU- (links) und ohne BrdU-Zugabe (rechts). **B** BrdU-Antikörperfärbung mit anti-BrdU-Erstantikörper (links) und ohne (rechts).

#### 4.1.5b Überprüfung der Kernfärbung

Das Ziel der folgenden Doppelfärbungen war zu überprüfen, ob die BrdU-Färbung ausschließlich in Zellkernen von Neuronen zu finden ist. Da BrdU ein Thymidin-Analogon ist, sollte bei der BrdU-Antikörperfärbung ausschließlich DNA angefärbt werden. Um dies zu kontrollieren, wurde eine Doppelfärbung mit dem Fluorochrom Propidiumiodid durchgeführt. Bei Propidiumiodid handelt es sich um ein interkalierendes Agens, das ebenfalls ausschließlich DNA anfärbt. Für die BrdU-Propidiumiodid-Doppelfärbung wurden die Schnitte am ersten Tag so behandelt, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Am zweiten Tag erfolgten zuerst drei aufeinanderfolgende Waschschrte mit 0,1 M PBS. Anschließend wurde ein grün fluoreszierender Cy2-Sekundärantikörper hinzugegeben (Fab IgG, 1:50 in 3% BSA/PBS verdünnt, anti-Maus, aus der Ziege) und zwei Stunden im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS für je fünf Minuten im Dunkeln wurde Propidiumiodid (1:100 in 0,1 M PBS verdünnt) zugefügt. Nach zehn Minuten wurde das Propidiumiodid entfernt und die Schnitte

erneut drei Mal in 0,1 M PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit Fluoromount eingedeckelt, über Nacht getrocknet und fotografiert.

Bei der BrdU-Propidiumiodid-Doppelfärbung war zu erkennen, dass alle grün fluoreszierenden, BrdU-gefärbten Punkte ebenfalls rot fluoreszieren, also auch Propidiumiodid-gefärbt sind (Abb.7). Daraus konnte man schließen, dass die BrdU-Färbung ausschließlich DNA anfärbt.

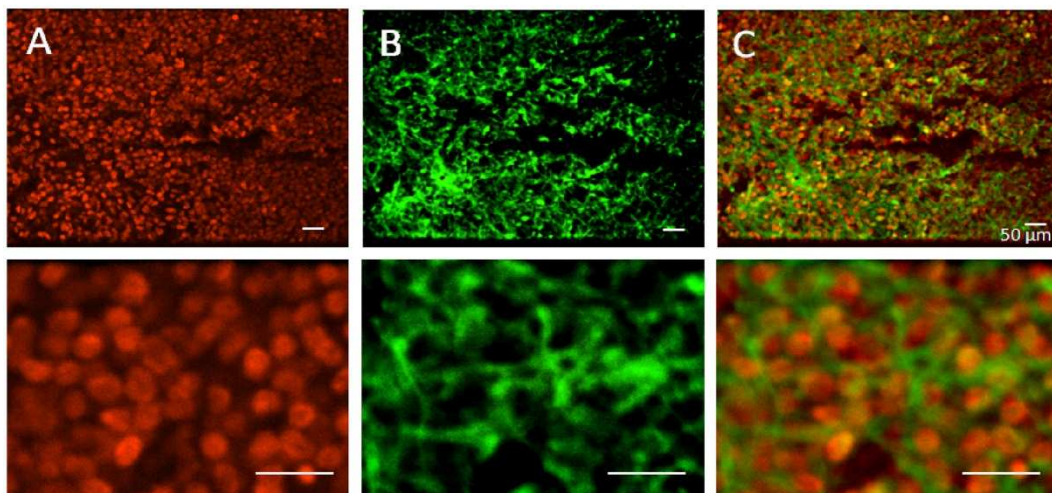


**Abb.7: BrdU-Propidiumiodid-Doppelfärbung.** BrdU-Antikörperfärbung mit Cy2-Sekundärantikörper (A), Propidiumiodidfärbung (B), Überlagerung (C). In der Vergrößerung (untere Reihe) ist zu sehen, dass alle grün gefärbten BrdU-positiven Zellkerne auch mit Propidiumiodid gefärbt wurden.

Ein weiteres Kontrollexperiment stellte die Doppelfärbung mit einem MAP2-Antikörper dar, der an das neuronale MAP2-Protein bindet. Bei dieser Doppelfärbung erfolgte die Zugabe des Primär- und des Sekundärantikörpers wie bei der, in Kapitel 4.1.3 beschriebenen, BrdU-Antikörperfärbung. Nach Zugabe des ersten Sekundärantikörpers und dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS wurden die Schnitte für 3,5 Minuten in 4% PFA/PBS fixiert. Anschließend wurden diese nochmals drei Mal mit 0,1 M PBS gewaschen und dann der MAP2-Primärantikörper (1:200 in 3% BSA/PBS verdünnt, aus der Maus) hinzugegeben. Die Inkubation der Schnitte mit dem Antikörper erfolgte über Nacht bei Zimmertemperatur. Am dritten Tag der Antikörperfärbung wurden die Schnitte wieder drei Mal in 0,1 M PBS gewaschen und dann mit dem Cy2-Sekundärantikörper (Fab IgG, 1:50 in 3% BSA/PBS verdünnt, anti-Maus, aus der Ziege) zwei Stunden inkubiert. Nach

dreimaligem Waschen für je fünf Minuten in 0,1 M PBS wurden die Schnitte mit Fluoromount-G auf Objektträgern eingebettet, über Nacht getrocknet und fotografiert.

Die BrdU-positiven Zellkerne wurden von den MAP2-positiven Zytoskelettproteinen umrundet, aber es waren kaum Überlappungen von BrdU- und MAP2-gefärbten Bereichen zu sehen. Mit der Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass mit der BrdU-Antikörperfärbung keine Zytoskelettproteine gefärbt wurden (Abb.8).

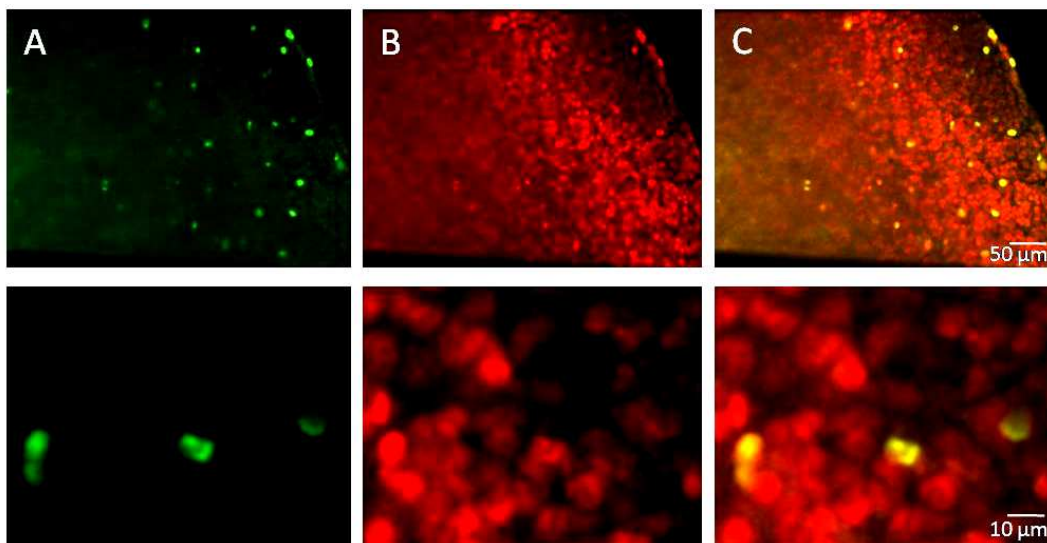


**Abb.8: BrdU-MAP2-Doppelfärbung.** BrdU-Antikörperfärbung mit Alexa Fluor-Sekundärantikörper (A), MAP2-Färbung mit Cy2-Sekundärantikörper (B), Überlagerung (C). In der Vergrößerung (untere Reihe) erkennt man kaum Überlagerung der Grün- und Rotfärbung.

#### 4.1.5c Überprüfung der BrdU-gefärbten Zelltypen

Zur Überprüfung der BrdU-positiv gefärbten Zelltypen, wurde zuerst eine Doppelfärbung mit einem NeuN-Antikörper durchgeführt. Der NeuN-Antikörper bindet spezifisch an das DNA-gebundene Neuronen-spezifische Protein NeuN, welches in fast allen neuronalen Zellen des ZNS und PNS von Vertebraten zu finden ist (Mullen et al., 1992). Der erste Tag der Doppelfärbung entsprach der, in Kapitel 4.1.3 beschriebenen, BrdU-Antikörperfärbung. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zwei Stunden mit dem Cy2-Sekundärantikörper (Fab IgG, 1:100 in 5% BSA/PBS verdünnt, anti-Maus, aus der Ziege) im Dunkeln inkubiert. Nach dem dreimaligen

Waschen mit 0,1 M PBS wurden die Schnitte erneut für 20 Minuten in 4% PFA fixiert, anschließend drei Mal mit 0,1 M PBS ausgewaschen und dann mindestens 90 Minuten in einer 5% BSA/PBS-Lösung blockiert. Danach wurden die Schnitte über Nacht mit dem anti-NeuN-Erstantikörper (1:100 in 5% BSA/0,1% Triton/PBS-Lösung verdünnt, aus der Maus) inkubiert. Am dritten Tag wurde, nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS, der Alexa Fluor 568-Sekundärantikörper (1:800 in 5% BSA+0,1% Triton/PBS verdünnt, anti-Maus, aus der Ziege) hinzugegeben und zwei Stunden inkubiert. Nachdem die Schnitte weitere drei Mal mit 0,1 M PBS gewaschen wurden, wurden sie auf Objektträger mit Fluoromount-G eingebettet, über Nacht getrocknet und fotografiert. Bei der Überlagerung der BrdU- und NeuN-Färbung konnte man sehen, dass alle grün-fluoreszierenden, BrdU-gefärbten Punkte ebenfalls rot fluoreszieren, also auch NeuN-Antikörper angefärbt wurden (Abb.9). Dies deutet darauf hin, dass die BrdU-Färbung ausschließlich Zellkerne von Neurone anfärbt.



**Abb.9: BrdU-NeuN-Doppelfärbung.** BrdU-Antikörperfärbung mit Cy2-Sekundärantikörper (A), NeuN-Färbung mit Alexa Fluor-Sekundärantikörper (B) und Überlagerung (C). In einem vergrößerten Ausschnitt (untere Reihe) erkennt man, dass alle grün gefärbten BrdU-positiven Zellkerne auch NeuN-positiv sind.

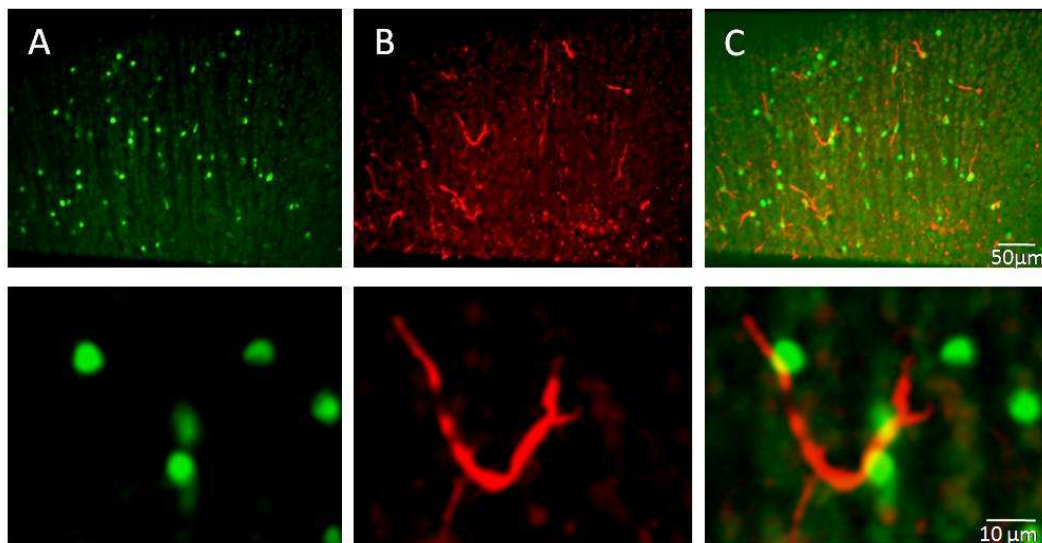
Um das Ergebnis der BrdU-NeuN-Doppelfärbung zu untermauern, wurde zusätzlich eine Doppelfärbung mit einem GFAP-Antikörper durchgeführt. Der GFAP-

Antikörper bindet an das saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP), das als Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen (vor allem Astrozyten, aber auch reiferen Radialgliazellen) exprimiert wird (Woodhams et al., 1981).

Die Doppelfärbung mit BrdU und GFAP war bis zur Inkubation im Cy2-Sekundärantikörper mit der BrdU-NeuN-Doppelfärbung identisch. Ein weiterer Fixierschritt war jedoch nicht notwendig. Nach der Inkubation mit dem ersten Zweitantikörper und den drei Waschschritten in 0,1 M PBS wurden die Schnitte mindestens 90 Minuten in einer 5% BSA/PBS-Lösung blockiert. Anschließend folgte über Nacht die Inkubation in dem anti-GFAP-Erstantikörper (1:200 in 5% BSA/0,1% Triton/PBS verdünnt, aus dem Kaninchen). Der nächste Tag begann mit dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS und mit einer anschließenden zweistündigen Inkubation der Schnitte mit einem biotinylierten Zweitantikörper (1:400 in 5% BSA/0,1% Triton/PBS verdünnt, anti-Kaninchen, aus Ziege). Nach weiteren drei Waschschritten in 0,1 M PBS wurden die Schnitte für eine halbe Stunde mit Cy3-markiertem Streptavidin (1:400 in 5% BSA/0,1% Triton/PBS verdünnt) inkubiert. Die Schnitte wurden drei Mal in 0,1 M PBS gewaschen, auf Objektträger mit Fluoromount-G eingebettet, über Nacht getrocknet und fotografiert.

Die BrdU-Färbung zeigte weder Überlagerungen mit der GFAP-Färbung, noch eine Umrandung durch die GFAP-Färbung, so dass man davon ausgehen kann, dass mit der BrdU-Färbung keine Astrozyten gefärbt wurden (Abb.10).





**Abb.10: BrdU-GFAP-Doppelfärbung.** BrdU-Antikörperfärbung mit Cy2-Sekundärantikörper (A), mit Streptavidin gefärbtes MAP2 (B), Überlagerung (C). In der Vergrößerung (untere Reihe) erkennt man kaum Überlagerung der Grün- und Rotfärbung.

#### 4.1.6 Mikroskopie der Kontrollfärbungen

Alle Kontrollfärbungen wurden mit einem Nipkow *Spinning Disk* konfokalen System mit Hilfe einer Laserquelle an einem aufrechten Mikroskop betrachtet. Die rote Fluoreszenz wurde durch einen Krypton/Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 568 nm angeregt und die grüne Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 488 nm. Mit dem 4-fachen Luftobjektiv wurde anhand der Form und Fluoreszenz eines Schnittes der Objektträger so gedreht, dass der dorsolaterale Teil des präfrontalen Kortex im Sichtfeld unten lag. Eine Region innerhalb des präfrontalen Kortex wurde durch das 20-fache oder 60-fache Wasserimmersionsobjektiv betrachtet. Bei den Doppelfärbungen wurde ein Bereich im oberen Drittel der CP ausgewählt. Fotografiert wurde mit einer CCD-Kamera, wobei die Belichtungszeit und Laserintensität (1000 ms bei halbmaximaler Laserintensität) bei allen Färbekonditionen gleich war. Die Bilder wurden mit dem Metamorph-Programm betrachtet und übereinander gelegt.

## 4.2 Fluoreszenzmessung des neuronalen Kalzium-Einstroms

### 4.2.1 Die Methode der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung

Die Methode der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung bot die Möglichkeit, *in vitro* die Depolarisation von Neuronen und den Anstieg des intrazellulären Kalziums anhand einer Fluoreszenzänderung zu messen. Dafür wurde der Farbstoff *Calcium Green-1*, ein hochaffiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator mit geringer Fototoxizität (Paredes et al., 2008) verwendet. Die Neurone der kortikalen Schnitte nahmen das schwach grün fluoreszierende *Calcium Green* auf, dessen größte Extinktion bei etwa  $\sim 490$  nm und dessen Hauptemission bei  $\sim 530$  nm liegt (Paredes et al., 2008). Durch Depolarisation der Neurone kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Das intrazelluläre *Calcium Green*, dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ( $K_d$ )  $\sim 190$  nM beträgt, bindet das  $\text{Ca}^{2+}$ , wodurch sich die Emission um etwa das Hundertfache verstärkt und sich die Wellenlänge jedoch nur minimal verändert (Paredes et al., 2008). Dr. Ileana Hanganu-Opatz untersuchte mit dieser Technik die Acetylcholin-abhängigen Kalzium-Antworten im somatosensorischen Kortex der Ratte (Hanganu et al., 2009). Für diese Dissertation wurde ihr *Calcium Green Loading*-Protokoll verwendet.

### 4.2.2 Durchführung der Fluoreszenzmessung

Die Präparation der Gehirne und die Herstellung der  $300 \mu\text{M}$  dicken, koronalen Schnitten wurden, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Schnitte wurden akut oder einen Tag *in vitro* für die Messungen verwendet. Im Anschluss an die Präparation fand das Auftragen eines Teils der Akutschnitte auf Linsen-Reinigungspapier statt. Die Schnitte für den nächsten Tag wurden auf Millicell-Membranen übertragen, die in, mit 1 mL NB/B27-gefüllten, Petrischalen im Inkubator bei 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luft verblieben. Alle Schnitte inkubierten vor Beginn des Experimentes mindestens eine Stunde im  $37^\circ\text{C}$  warmen und mit 95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$  begasten ACSF. Ein Schnitt wurde für 15 bis 20 Minuten in  $1,25 \mu\text{M}$  *Calcium Green* mit 0,01% Pluronsäure inkubiert und anschließend 20 Minuten in



einer mit ACSF durchspülten Kammer unter dem konfokalen Lasermikroskop ausgewaschen. Zur Befestigung des Schnittes wurde entweder das Filterpapier mit einem Platindraht oder der Schnitt mit einem Gitter aus Nylonfäden fixiert. Die Temperatur der Kammer betrug 32°C und die Durchflussrate des ACSFs circa 3 mL pro Minute. Im 20-fachen Wasserimmersionsobjektiv wurde der Schnitt beobachtet und eine Region innerhalb der IZ oder innerhalb des oberen Drittels der CP im präfrontalen Kortex ausgesucht. Mit einer Belichtungszeit von 250 msec wurden für insgesamt 300 Sekunden alle 3 Sekunden ein Bild aufgenommen. Der GABA-Rezeptor-Agonist GABA oder der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Agonist CACA wurden immer für insgesamt eine Minute per Badapplikation appliziert, wobei 15 Sekunden gewartet wurde, bevor die Aufnahmen begannen. Das Einwaschen der Antagonisten erfolgte 10 Minuten vor der Agonisten-Applikation und endete mit Ende der jeweiligen Aufnahme. Am Ende eines jeden Versuches, der zu einer kompletten Blockade der GABA-Rezeptoren führte, wurden 4 mM Natrium-L-Glutamat oder 50 mM K<sup>+</sup> appliziert, um das Überleben der Neurone zu überprüfen.

#### 4.2.3 Analyse der Fluoreszenzmessung

Für die Analyse der Zeitreihen wurden mit dem Metamorph-Programm Regionen um die grün gefärbten Neurone gelegt und die durchschnittliche Fluoreszenz und Fluoreszenzänderung innerhalb dieser Regionen bestimmt. In einem Excel-Dateiblatt wurde die Hintergrundfluoreszenz von der Fluoreszenzänderung abgezogen und auf die Grundlinie (durchschnittliche Fluoreszenz vor der Agonisten-Applikation) normiert. Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom konnte dadurch als Änderung der Fluoreszenzintensität des *Calcium Greens* im Vergleich zur Grundlinie dargestellt werden (F/F<sub>0</sub>). Untypische oder durch Bewegung des Schnittes im Fokus verschobene Fluoreszenzantworten wurden aus der Analyse ausgeklammert. Nur Änderungen in der Fluoreszenz, die vier Mal größer als die Standardabweichung der Grundlinie waren, wurden als Ca<sup>2+</sup>-Einströme gewertet. Für die statistische Analyse wurden der Wilcoxon-Rangsummentest und der zweiseitige *Fisher's Exact Test* verwendet. Die Signifikanz-Level wurde folgendermaßen dargestellt: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, ns = p > 0,05.

## 4.3 Pharmakologie

### 4.3.1 Pharmakologie der GABA-Rezeptoren

Alle GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden durch GABA, das Struktur analogon Muscimol (Macdonald und Olsen, 1994) und durch Taurin (Jia et al., 2008) aktiviert. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden kompetitiv durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin und Gabazin blockiert (Macdonald und Olsen, 1994) und besitzen modulatorische Bindestellen für Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden und Ethanol. Die ebenfalls ionotropen GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren bestehen aus  $\rho$ -Untereinheiten (Feigenspan und Bormann, 1994; Bormann, 2000; Hartmann et al., 2004), sind insensitiv gegenüber Bicucullin und werden spezifisch durch den kompetitiven Antagonisten (1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)methylphosphinsäure (TPMPA) inhibiert (Feigenspan und Bormann, 1994). Benzodiazepine und Barbiturate haben keinen Einfluss auf GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin (PTX), 2-(3-Carboxypropyl)-3-amino-6-(4-methoxyphenyl)-Pyridazinium-Bromid und  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexan reduzieren jedoch die Antworten der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren (Feigenspan und Bormann, 1994). GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren werden durch die GABA-Analoga *cis*-Aminocrotonsäure (CACA) und *trans*-Aminocrotonsäure (TACA) aktiviert, wobei CACA der selektivere Ligand für GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren ist (Johnston, 1996). Die metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren werden selektiv durch Baclofen aktiviert und reagieren nicht auf die bekannten Modulatoren der ionotropen GABA-Rezeptoren. Blockiert werden GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren durch Saclofen (Behar et al., 2000; Behar et al., 2001) und CPG 35348 (Olpe et al., 1990; Sutor und Luhmann, 1998).

### **4.3.2 Pharmakologie der Glyzinrezeptoren**

Glyzinrezeptoren werden durch Glyzin, Taurin (2-Amino-Ethansulfonsäure) und  $\beta$ -Alanin aktiviert und durch den Antagonisten Strychnin inhibiert (Rajendra et al., 1995; Flint et al., 1998; Sergeeva, 1998; Kilb et al., 2002; Okabe et al., 2004). Zink, Alkohol, Anästhetika, Picrotoxin, Kokain und einige Antiepileptika modulieren die Glyzinrezeptor-Aktivität (Leite und Cascio, 2001; Yang und Svensson, 2008).

### **4.3.3 Pharmakologische Manipulation der Migration**

Die organotypischen Schnittkulturen des pränatalen Kortex wurden 48 Stunden unterschiedlichen Antagonisten und Agonisten ausgesetzt. Die Kontrollkulturen wurden mit dem gleichen Volumen an Lösungsmittel (Wasser oder DMSO) behandelt. Im Folgenden sind die verwendeten Antagonisten/Agonisten, ihre Abkürzung, Wirkung, die finale Konzentration und das verwendete Lösungsmittel aufgelistet:

Antagonist/ Agonist	Abkür- zung	Wirkung	Konz. [ $\mu$ M]	Lösungs- mittel
<i>cis</i> -4- Aminocrotonsäure	CACA	GABA <sub>C</sub> -Rezeptor-Agonist	100	H <sub>2</sub> O
(-)-Bicucullin- methiodid	BMI	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Antagonist	100	DMSO
Glyzin	-	Glyzinrezeptor-Agonist	500	H <sub>2</sub> O
Guanidino- Ethansulfonat	GES	Taurintransporter-Inhibitor	300	H <sub>2</sub> O
N-[(3R)-3-([1,1'-Bi- phenyl]-4-yloxy)- 3-(4-fluorophenyl)- propyl]- N-methylglyzin- Hydrochlorid	ALX 5407	Glyzintransporter1-Inhibitor	0,1	DMSO
O-[(2-Benzyloxy- phenyl-3- fluorophenyl) methyl]-L-Serin	ALX 1393	Glyzintransporter2-Inhibitor	0,5	DMSO
Picrotoxin	PTX	unspezifischer GABA <sub>A</sub> - und GABA <sub>C</sub> -Rezeptor-Antagonist	100	H <sub>2</sub> O
Strychnin	-	Glyzinrezeptor-Antagonist	1	H <sub>2</sub> O
2-Amino- Ethansulfonsäure	Taurin	unspezifischer GABA <sub>A</sub> - und Glyzinrezeptor-Agonist	2000	H <sub>2</sub> O
(1,2,5,6- Tetrahydropyridin- 4-yl) methyl- Phosphinsäure	TPMPA	GABA <sub>C</sub> -Rezeptor-Antagonist	50	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 2: Auflistung der zur Migrationsanalyse verwendeten Antagonisten und Agonisten.**

#### 4.3.4 Pharmakologische Manipulation der $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten während der Fluoreszenzmessung

Bei der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung wurden entweder der GABA-Rezeptor-Agonist GABA oder der  $\text{GABA}_C$ -Rezeptor-Agonist CACA per Badapplikation für eine Minute appliziert. Die Antagonisten wurden bereits zehn Minuten davor eingewaschen. Die dafür verwendeten Antagonisten/Agonisten, ihre Abkürzung, Wirkung, die finale Konzentration und das verwendete Lösungsmittel sind wie folgt aufgelistet:

Antagonist/ Agonist	Abkürzung	Wirkung	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Lösungsmittel
<i>cis</i> -4-Aminocrotonsäure	CACA	$\text{GABA}_C$ -Rezeptor-Agonist	100	$\text{H}_2\text{O}$
(-)-Bicucullinmethiodid	BMI	$\text{GABA}_A$ -Rezeptor-Antagonist	100	DMSO
$\gamma$ -Aminobuttersäure	GABA	GABA-Rezeptor-Agonist	100	$\text{H}_2\text{O}$
(1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl) methyl-Phosphinsäure	TPMPA	$\text{GABA}_C$ -Rezeptor-Antagonist	50	$\text{H}_2\text{O}$
Natrium-L-Glutamat	-	NMDA-Rezeptor-Agonist	4000	$\text{H}_2\text{O}$

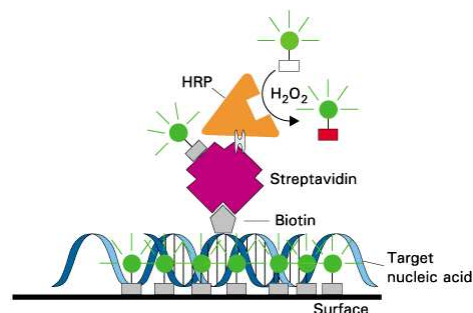
**Tabelle 3:** Auflistung der bei der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung verwendeten Antagonisten und Agonisten.

## 4.4 *In situ*-Hybridisierung

### 4.4.1 Die Methode der *in situ*-Hybridisierung mit dem Tyramidsignal-Amplifikationssystem

Die US-amerikanischen Biologen Joe Gall und Mary Lou Pardue entwickelten Ende der 1960er Jahre die *in situ*-Hybridisierung (Gall und Pardue, 1969). Sie stellt eine Methode zur zeitlichen und räumlichen Detektion spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen dar, an die eine komplementäre RNA oder cDNA bindet.

Für die in dieser Dissertation durchgeführte *in situ*-Hybridisierung wurde eine Digoxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonde verwendet und das Sonden-Signal durch das Tyramidsignal-Amplifikationssystem verstärkt (Hermann et al., 2002). Ein hoch-affiner anti-DIG-Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, detektiert die DIG-markierte Sonde. Anschließend aktiviert die Peroxidase ein biotinyliertes Tyramid-Derivat (Abb.11). Daraus entstehen hoch-reaktive Tyramidradikale, die kovalent an nukleophile Reste in der direkten Umgebung der Peroxidase-Reaktion binden. Anschließend interagiert das mit alkaliner Phosphatase gekoppelte Streptavidin mit dem Biotin des Tyramid-Derivats und setzt *Vector Red* als Substrat um, wobei ein roter Farbstoff gebildet wird.



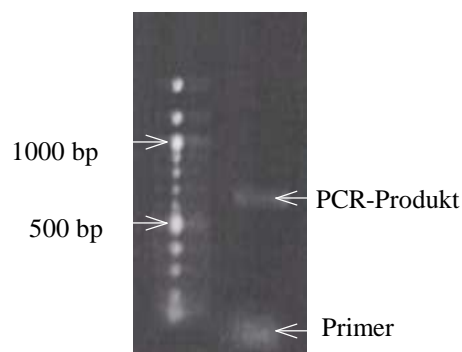
**Abb.11: Schema eines SONDENSIGNALS mit dem Tyramidsignal-Amplifikationssystem.** In Anwesenheit der Meerrettich-Peroxidase (HRP, gelbes Dreieck) bilden sich Tyramidradikale (rotes Viereck), die kovalent an die nukleophilen Reste in der direkten Umgebung der Peroxidase-Reaktion binden (aus [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

#### 4.4.2 Herstellung der Sonden für die *in situ*-Hybridisierungsexperimente

Für die Durchführung der *in situ*-Hybridisierung wurde vorab eine DIG-markierte RNA-Sonde hergestellt. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA aus einem Gehirn eines E17-Mausembryos mit Hilfe des *High Pure RNA Tissue-Kits* isoliert. Von dieser Gesamt-RNA wurde 1 µg für eine RT-PCR-Reaktion eingesetzt und unter Verwendung von *random hexameric*-Primern und von dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis*-Kit zu cDNA transkribiert. Diese cDNA diente als Matrize, um durch eine weitere PCR ein 590 bp langes Fragment der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Untereinheit ρ<sub>2</sub> zu amplifizieren. Dafür wurden die folgenden, mit flankierenden *EcoRI* und *XhoI* Schnittstellen versetzten, Primer verwendet:

GABA<sub>C</sub>-ρ<sub>2</sub>-Untereinheit: *forward*      CGAATTCGCCTGATGGCTCTCGT;  
 GABA<sub>C</sub>-ρ<sub>2</sub>-Untereinheit: *reverse*      GGCTCGAGTTCATCTGTGTACGCA.

20 µL des PCR-Produktes wurden zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abb.12). Als Marker diente ein 100 bp DNA-Leiter. Die Laufstrecke des PCR-Produktes entsprach der erwarteten Größe von 590 bp. Im unteren Bereich des Agarosegels waren Reste der Primer zu erkennen.



**Abb.12: Gelelektrophorese zur Überprüfung der RT-PCR zur Herstellung einer ρ<sub>2</sub>-Sonde.** Es wurden 20 µL der cDNA-Matrize auf das Gel aufgetragen. Die Bande der 590 bp-langen DNA war in der erwarteten Höhe im Gel zu erkennen, ebenso wie die in der PCR eingesetzten Primer.

Die cDNA wurde in die *EcoRI/XhoI*-Stellen eines pBluescriptKS-Vektors kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *PstI* oder *KpnI* linearisiert. Der Restriktionsverdau mit *PstI*

diente als Vorlage für die Herstellung der *antisense*-Sonde durch *in vitro* Transkription. Der Restriktionsverdau mit *KpnI* diente der Herstellung einer *sense*-Sonde, die als Negativkontrolle während des *in situ*-Hybridisierungsexperiments Verwendung fand.

Für die *in vitro* Transkription wurden 250 ng des jeweiligen linearisierten Plasmids, 1x Transkriptions-Puffer, 5 µL *DIG RNA labeling mix*, 80 Einheiten RNAsin und 100 Einheiten der *T3*-oder *T7*-RNA-Polymerase in einem Reaktionsansatz von 50 µL gemischt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die *T3*-RNA-Polymerase wurde für den Reaktionsansatz, mit dem durch *PstI* linearisierten Vektors verwendet. Die *T7*-RNA-Polymerase fand in dem Reaktionsansatz, mit dem durch *KpnI* linearisierten Vektors Verwendung. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mit 20 Einheiten RNase-freier DNaseI 20 Minuten bei 37°C behandelt und mit Hilfe des Qiagen-RNeasy Kit aufgereinigt. Die Herstellung der Sonde wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Robin White und der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Lutz (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie) durchgeführt.

#### 4.4.3 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden Gehirne aus E18-Mausembryonen präpariert und 2,5 Stunden in 4% PFA fixiert. Anschließend wurde das Fixativ drei Mal für je 20 Minuten mit PBS ausgewaschen und die Gehirne in 30%ige Saccharose überführt. Sobald die Gehirne in der Saccharose abgesunken waren, bettete man sie in *Tissue freezing*-Medium ein und stellte mit dem Kryostat 18 µm dünne, koronale Schnitte des Vorderhirns her. Die Schnitte wurden auf gefrorene SuperFrost Plus-Objektträger gebracht, auf einer Wärmeplatte getrocknet und bei -20°C bis zur Benutzung aufbewahrt.

Am ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung wurden diese Schnitte zuerst auf Raumtemperatur gebracht und zwei Mal in 0,1 M PBS gewaschen, bevor sie zur Inaktivierung der endogener Enzymaktivitäten 15 Minuten in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100% Methanol inkubiert wurden. Nach zwei 2-minütigen Waschschrritten in 0,1 M PBS wurden die Schnitte für acht Minuten in 0,2 M HCl überführt, wieder zweimal für



zwei Minuten in 0,1 M PBS inkubiert und anschließend für zehn Minuten mit 20 µg/mL ProteinaseK in 50 mM Tris-HCl/5mM EDTA behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift in 0,1 M PBS folgte ein Fixationsschritt für zehn Minuten in 4% PFA bei 0°C und die Inkubation der Schnitte in 0,1 M Triethanolamin mit zweimaliger Zugabe von 600 µM Essigsäureanhydrid unter Rühren. Nach fünfminütigem Waschen in 0,1 M PBS wurden die Schnitte in 0,9% NaCl inkubiert, schrittweise mit einer Ethanolreihe dehydriert (30%, 50%, 70%, 80%, 95% und 100% Ethanol) und mindestens eine Stunde luftgetrocknet. Der Hybridisierungsmix, in den man entweder 400 ng der *sense*-oder *antisense*-Sonde gegeben hatte, wurde zwei Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend 100 µL Hybridisierungsmix auf je einen Objektträger verteilt. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 54°C in einer befeuchteten Hybridisierungskammer statt.

Am zweiten Tag wurden die ersten Posthybridisierungs-Waschschriffe bei 62°C durchgeführt. Diese bestanden zunächst aus 30-minütigen Waschschriffen in 5x salzigem Natriumzitat (SSC), in 50% Formamid/2x SSC/0,05% Tween-20, in 50% Formamid/1x SSC/0,05% Tween-20 und zuletzt in 0,1x SSC. Die darauf folgenden Waschschriffe wurden bei 30°C durchgeführt. Dazu gehörten ein kurzer Waschschrift in NTE-Puffer mit 0,05% Tween-20 und eine 10-minütige Inkubation in NTE-Puffer mit 0,05% Tween-20 und 15 mM Iodazetamid. Anschließend wurden die Objektträger zwei Mal für je eine halbe Stunde in NTE-Puffer mit 0,05% Tween-20 inkubiert und dann für mindestens eine Stunde in 4%igem Hitze-inaktiviertem, gefiltertem Schafserum in TNT-Puffer blockiert. Nach dreimaligem Waschen in TNT-Puffer wurden die Schnitte 30 Minuten in TNB-Blocking-Puffer und anschließend 1,5 Stunden in dem anti-DIG(Fab)-POD Antikörper (1:1000 in TNB-Blocking-Puffer verdünnt) inkubiert. Nachdem der Antikörper durch drei 2-minütige Waschschriffe in TNT-Puffer ausgewaschen wurde, inkubierten die Schnitte 15 Minuten in Biotin-markiertem Tyramid und anschließend blieben zwei Mal für 2 Minuten im Waschpuffer. Daraufhin inkubierten die Schnitte eine Stunde in Streptavidin-Alkaline-Phosphatase (1:100 in 1% Blocking-Reagenz/Waschpuffer verdünnt). Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer wurde die Färbereaktion mit Hilfe des *Vector Red*-Kits durchgeführt. Die Färbereaktion dauerte etwa 26 Minuten und wurde durch einmaliges Waschen in PBS für zehn Minuten gestoppt und durch Inkubation in PBS mit 2,5% Glutaraldehyd für 15 Minuten fixiert. Nach dreimaligem

Waschen in 0,1x SSC wurden die Schnitte unter Verwendung abgestufter Ethanolreihen dehydriert (30% EtOH mit 300 mM NH<sub>4</sub>OAc, 50% EtOH mit 300 mM NH<sub>4</sub>OAc, 70% EtOH mit 300 mM NH<sub>4</sub>OAc, 95% EtOH und 100% EtOH). Die Schnitte trockneten über Nacht und wurden am nächsten Tag mit Fluoromount-G eingedeckelt und fotografiert. Die *in situ*-Hybridisierung wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Lutz (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie) durchgeführt.

## 4.5 Weitere molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Experimente wurde aus einem E18-Mausembyro der Kortex entfernt, in Flüssigstickstoff eingefroren und die Gesamt-RNA mit dem *RNeasy Micro*-Kit isoliert und aufgereinigt. Für die darauffolgende RT-PCR fand das *SuperScriptIII-Reverse Transkriptase*-Kit Verwendung. Es wurden 50 ng der Gesamt-RNA, 10 mM dNTPs und 50 µM OligodT zu einem Endvolumen von 29 µL gemischt, für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und dann eine Minute auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µL des 5x *First-Strand*-Puffers, 1 µL 0,1 M DTT, 1 µL *RNaseOut* (40 Einheiten/µL) und 1 µL *Super-ScriptIII* RT (200 Einheiten/µL) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz inkubierte 60 Minuten bei 55°C. Darauf folgte ein Inaktivierungsschritt für 15 Minuten bei 70°C. Für die Amplifikation der cDNA wurde das Qiagen *Taq PCR*-Kit verwendet. Das Volumen der verwendeten cDNA zum Nachweis der β-Untereinheit von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren betrug 2 µL und für den Nachweis der ρ-Untereinheiten der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren 16 µL. Der PCR-Ansatz setzte sich aus 10 µL 10x PCR Puffer, 4 µL MgCl<sub>2</sub>, 20 µL 5x Q-Lösung, 2 µL dNTPs (10 mM von jedem), 0,5 µL Taq-Polymerase (2,5 Einheiten/Reaktion) und der cDNA-Primer-Lösung zusammen, so dass ein Gesamtvolumen von 100 µL entstand. Die RT-PCR wurde in einem Thermozykler durchgeführt und setzte sich aus einem initialen Denaturierungsschritt für drei Minuten bei 94°C, einem weiteren

Denaturierungsschritt für 45 Sekunden bei 94°C, Anlagerungsschritten bei 55°C für 30 Sekunden und einem Extensionsschritt für eine Minute bei 72°C zusammen. Für die Detektion der  $\rho_2$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten wurden die sekundären Denaturierungs-, Anlagerungs- und Extensionsschritte 45 Mal wiederholt, für die Detektion der  $\rho_1$ -Untereinheit wurden 55 Wiederholungen benötigt.

Es wurden folgende Primerpaare verwendet:

GABA<sub>C</sub>- $\rho_1$ -Untereinheit: *forward* ACAGACCTGCTCTCTGGAAATCG;  
GABA<sub>C</sub>- $\rho_1$ -Untereinheit: *reverse* GGGTTTCTCTCCGTTCTCAGGC;  
GABA<sub>C</sub>- $\rho_2$ -Untereinheit: *forward* AGCAGCACTGGCTGGTACAACC;  
GABA<sub>C</sub>- $\rho_2$ -Untereinheit: *reverse* AGAATGTGGCTTGTTGGGTAGCC;  
GABA<sub>A</sub>- $\beta_1$ -Untereinheit: *forward* ACAGCTCCAATGAACCCAGCAA;  
GABA<sub>A</sub>- $\beta_1$ -Untereinheit: *reverse* TGCTCCCTCTCGTCCATTCCA.

Die PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese (100 V, für 30 Minuten) mit einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Cybr-Gold gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Als Marker diente der 100 bp DNA Marker.

#### 4.5.2 Western Blot Analyse

Die ersten Schritte der Western-Blot-Analyse beinhalteten die Proteinisolierung aus E17- und adulten Kortizes und die Proteinkonzentrationsbestimmung durch die Pierce BCA<sup>TM</sup>-Bestimmungsmethode. Für die Proteinisolation wurde die Muttermaus mit Isofluran anästhesiert und durch Genickbruch getötet, das Gehirn der Muttermaus isoliert und in eiskaltem ACSF gelagert. Die Embryonen wurden aus dem Mutterleib präpariert und in eiskaltes ACSF überführt. Unter der Sterilbank wurden in eiskaltem ASCF die Gehirne aus den Embryonen isoliert und von allen Gehirnen die Hirnhaut, der Thalamus, der Hippokampus und die Basalganglien mit Hilfe zweier Pinzetten unter dem Binokular entfernt sowie der ventrale, kaudale und rostrale Teil des Kortex mit einem Mikroskalpell abgeschnitten. Die Kortizes der Mutter und der Embryonen wurden jeweils in eiskaltem Lysepuffer mit *Complete Protease Inhibitor Cocktail* überführt und mit dem QIAshredder homogenisiert. Das

Homogenisat wurde eine Stunde auf einem Wippschüttler bei 4°C inkubiert, anschließend fünf Minuten bei 9300 g zentrifugiert und die Proteine aus dem Überstand gewonnen. Für die Proteinbestimmung wurde die Pierce BCA<sup>TM</sup>-Bestimmungsmethode verwendet. Dazu wurden zuerst die Kupferreagenzien angesetzt, indem Reagenz A und Reagenz B aus dem BCA<sup>TM</sup>-Kit in einem 1:50-Verhältnis gemischt wurden. Je zwei Mal wurden 2,5 µL der Proteinprobe mit 47,5 µL Lysepuffer, 5 µL der Proteinprobe mit 45 µL Lysepuffer und 10 µL der Proteinprobe mit 40 µL Lysepuffer in je einem Eppendorfgefäß gemischt. In alle Gefäße wurde je 1 mL Kupferreagenz hinzugegeben und diese Lösung 30 Minuten bei 60°C erhitzt. Die Proteinkonzentration wurde an einem UV-Spektrometer gemessen, wobei die 50 µL Lysepuffer mit 1 µL Kupferreagenz als Referenzwert diente. Mit Hilfe einer BSA-Standardkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

Eine PVDF-Membran wurde durch kurzes Eintauchen in 100% Methanol für zehn Sekunden und anschließender Inkubation in Wasser und Transferpuffer für je zehn Minuten aktiviert. Die Proteine wurden durch Gelelektrophorese bei 100 V und circa 1,5 Stunden mit Hilfe eines 10%igen SDS Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und danach auf die aktivierte PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde anschließend 30 Minuten in 4%igem, fettfreiem Milchpulver in Tris-gepufferter Saline mit 0,1% Tween-20 (TBST) geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem *rho63*-polyklonalen GABA<sub>C</sub>-Rezeptorantikörper (1:500 in der Blockierungslösung verdünnt, aus dem Kaninchen, von Professor Wässle, Max-Planck-Institut Frankfurt a.M. bereitgestellt) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal in TBST gewaschen und 35 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörper (1:5000 in Blockierungslösung verdünnt, anti-Kaninchen, aus der Ziege) inkubiert.

Anschließend wurde die Membran drei Mal in TBST und einmal in TBS gewaschen, Die Proteingröße wurde mit den Markern *Precision Plus Protein* und *Wide Range* verglichen. Die Banden des *Wide Range*-Markers wurden bei der Überführung auf die PVDF-Membran mit dem Kugelschreiber nachgezogen. Die Proteine wurden mit dem *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP*-Substrat sichtbar gemacht und mit dem *LAS3000 imaging System* (Arbeitsgruppe Behl, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie) fotografiert.

## **4.6 Bildverarbeitung, statistische Analyse und Textverarbeitung**

Die für die Migrationsanalyse mit dem Metamorph-Programm aufgenommenen Bilder wurden mit dem Metamorph-Programm weiter verarbeitet und ausgezählt. Die Werte wurden in eine Excel-Tabelle von Microsoft Office 2003/2007 übertragen und die relative Anzahl der Zellen sowie Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Das Programm *GraphPad Prism* fand Verwendung, um mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test zu bestimmen, ob sich die Verteilung der Zellen innerhalb der Schnitte signifikant unterscheiden. Die Balkendiagramme und Bildzusammenstellungen wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop* und *CorelDraw* hergestellt und beschriftet.

Die mit Metamorph aufgenommenen Zeitreihen der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung wurden mit dem Metamorph-Programm und einer Tabellenkalkulation in Excel Microsoft Office 2003 ausgewertet. Zur statistischen Auswertung der Fluoreszenzmessungen wurden der Wilcoxon-Rangsummentest und der Exakte Fisher-Test (zweiseitig) verwendet. Die Abbildungen wurden mit dem Programm *CorelDraw* erstellt.

Zur Textverarbeitung und Tabellenkalkulation wurde Microsoft Office 2003/2007 verwendet. Die Referenzverwaltung erfolgte mit dem Referenz Manager.

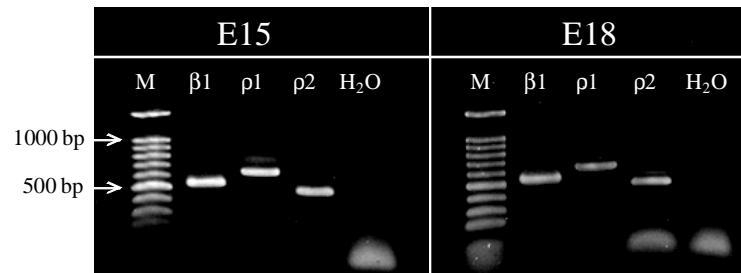
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im immaturren Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration

Aus früheren Studien ist bekannt, dass verschiedene GABA-Rezeptoren die radiale Migration beeinflussen und dass Picrotoxin-sensitive Rezeptoren die radiale Migration fördern (Behar et al., 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Effekte des spezifischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren-Antagonisten Bicucullin und des unspezifischen Antagonisten Picrotoxin wurde geschlossen, dass GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Migration von der VZ/SVZ in die IZ spielen. Allerdings wurde die Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren und ihre Rolle während der radialen Migration bislang nicht direkt untersucht. Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war daher, die Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren während der Kortexentwicklung von Mäusen nachzuweisen und ihre Rolle während der radialen Migration aufzuklären.

#### 5.1.1 Expression der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-mRNA und des Rezeptorproteins

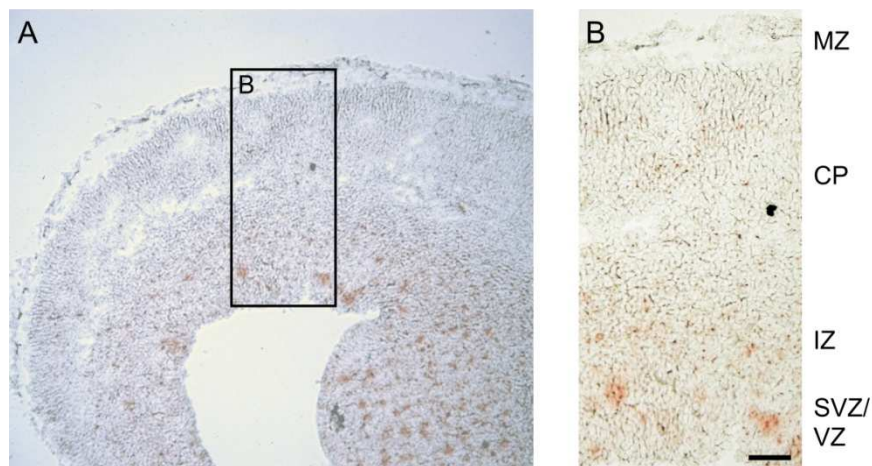
Um die Expression der für die GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\rho_1$  und  $\rho_2$  kodierenden mRNA im embryonalen Kortex nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Primer für die  $\beta_1$ -Untereinheit der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verwendet (Ma und Barker, 1998). Die PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Cybr-Gold gefärbt und unter UV-Licht fotografiert (Abb.13). Die Banden der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\rho_1$  und  $\rho_2$  und der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\beta_1$  befanden sich auf der erwarteten Höhe im Gel.



**Abb.13: Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte.** Die Banden der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\rho_1$  (633 bp) und  $\rho_2$  (456 bp) und der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  $\beta_1$  (521 bp) befanden sich auf der erwarteten Höhe.

Aus den Ergebnissen der RT-PCR konnte geschlossen werden, dass die mRNA der  $\rho_1$ - und  $\rho_2$ -Untereinheiten im Kortex von E15- und E18-Mausembryonen exprimiert wird.

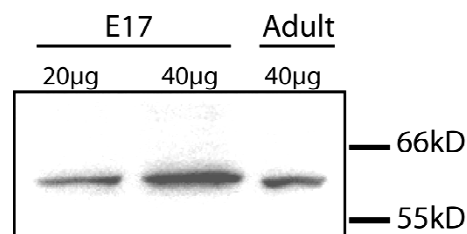
Ob die mRNA der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren nur in bestimmten Regionen des Kortex zu finden ist, wurde mit Hilfe eines *in situ*-Hybridisierungs-Experimentes unter Verwendung einer spezifischen  $\rho_2$ -Sonde untersucht. Das Sondensignal war überwiegend im unteren Bereich des E18-Kortex zu sehen (Abb.14).



**Abb.14: Lichtmikroskopische Aufnahme der *in situ*-Hybridisierung mit einer  $\rho_2$ -Sonde.** **A** In dem Übersichtsbild war zu erkennen, dass das Sondensignal (Rotfärbung) besonders in den unteren Schichten des Kortex und in der ganglionischen Eminenz stark ist. **B** Die Ausschnittsvergrößerung des Kortex zeigte, dass das Sondensignal nur in den unteren Schichten im Kortex nachzuweisen ist. In der VZ/SVZ ist es besonders stark und noch schwach in der IZ vorhanden (Maßstab = 100  $\mu$ m).

Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung zeigten, dass die  $\rho_2$ -Untereinheiten des GABA<sub>C</sub>-Rezeptors überwiegend im unteren Bereich des E18-Kortex exprimiert werden. Die  $\rho_2$ -Untereinheiten werden in der VZ/SVZ am stärksten und noch leicht in der IZ exprimiert. Oberhalb der IZ findet keine  $\rho_2$ -Expression statt.

Ein weiterer Schritt bei der Überprüfung der Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren war der Nachweis auf Proteinebene. Dafür wurde eine Westernblot-Analyse mit Kortex-Proteinen von E17-Mausembryonen durchgeführt. Proteine eines adulten Gesamtgehirnes dienten als Positivkontrolle (Harvey et al., 2006; Frazao et al., 2007). Für das Experiment wurde der polyklonale GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antikörper *rho63* verwendet (von Professor Wässle, Max-Planck-Institut Frankfurt a.M. zur Verfügung gestellt), der alle  $\rho$ -Untereinheiten des GABA<sub>C</sub>-Rezeptors erkennt (Enz et al., 1996). Die Proteine wurden durch Gelelektrophorese mit einem SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine PVDF-Membran übertragen. Auf dieser Membran färbte der *rho63*-Antikörper eine starke Bande bei 60 kDa (Abb.15) an, was der erwarteten Proteingröße entsprach (Rozzo et al., 2002).



**Abb.15: Western Blot-Analyse des GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Proteins in E17-Kortizes und im adulten Gesamthirn.** Die Banden befanden sich auf der erwarteten Höhe von etwa 60 kD.

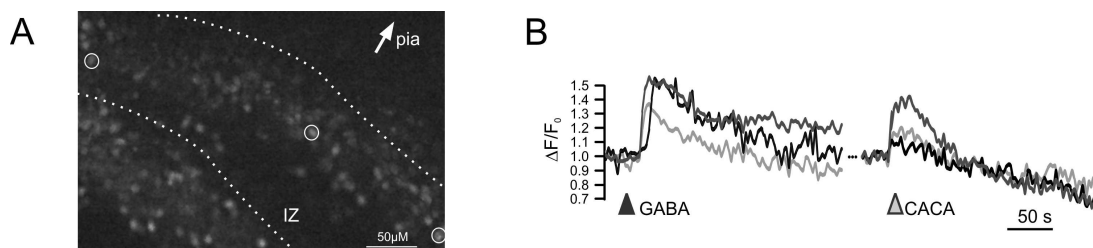
Aus den Ergebnissen der RT-PCR konnte geschlossen werden, dass auch das Protein der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im immaturren Kortex vorhanden ist. Zusammenfassend ließ sich aus diesen Experimenten schließen, dass GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im pränatalen Kortex exprimiert werden und dass die GABA<sub>C</sub>-Rezeptor mRNA vorwiegend im unteren Bereich des Kortex vorhanden ist.



### 5.1.2 Funktioneller Nachweis von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren in der IZ

Um die funktionelle Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren zu untersuchen, wurden die pharmakologischen Eigenschaften des GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms mit der Methode der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung, unter Verwendung eines Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes, überprüft. Die Eigenschaften der GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten wurden zuerst in der IZ untersucht, da dort bei der *in situ*-Hybridisierung ein Sondersignal zu erkennen war und dort vorwiegend postmitotische, migrierende Neurone zu finden sind (Noctor et al., 2004). Im Vergleich dazu wurden die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten im oberen Teil der CP untersucht, in der kein Sondersignal zu erkennen war und in dem die Neurone ihren radialen Migrationsprozess beenden (Noctor et al., 2004).

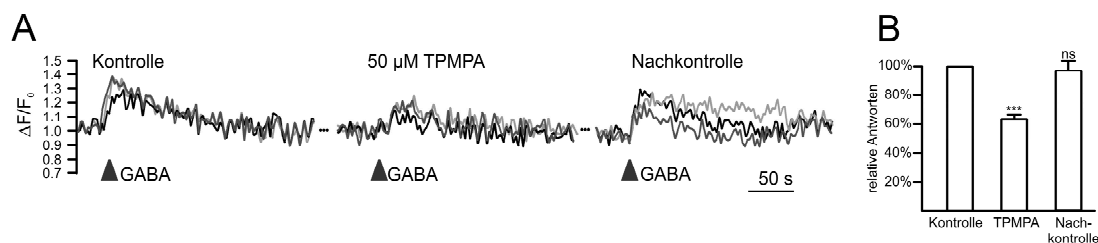
In der IZ führte die Badapplikation von 100 µM GABA in allen Neuronen zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (Abb.16A). Daraus konnte geschlossen werden, dass ionotrope GABA-Rezeptoren in der IZ eine depolarisierende Membran-Antwort auslösen. Die Badapplikation von 100 µM des GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Agonisten *cis*-4-Aminocrotonsäure (CACA) in Anwesenheit von 100 µM des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten (-)-Bicucullinmethiodid (BMI) induzierte in der Mehrzahl der Neurone (n = 132 von 192 Zellen, in 12 Schnitten) einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der 85 ± 2,5% der GABA-induzierten Antwort betrug (Abb.16B). Die anderen Zellen zeigten keine CACA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten (n = 60 von 192 Zellen)



**Abb.16: GABA und CACA-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Neuronen der IZ.** **A** Typische Fluoreszenzaufnahme *Calcium Green* gefüllter Neurone in der IZ. **B** Aufeinanderfolgende Veränderungen der relativen Fluoreszenz ( $F/F_0$ ) in den in A markierten Neuronen (weiße Kreise). Die Badapplikation von 100 µM GABA führte zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Neurone. Die darauf folgende Badapplikation von 100 µM CACA, unter Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit 100 µM BMI, führte in der Mehrzahl der Neurone zu einem geringeren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom.

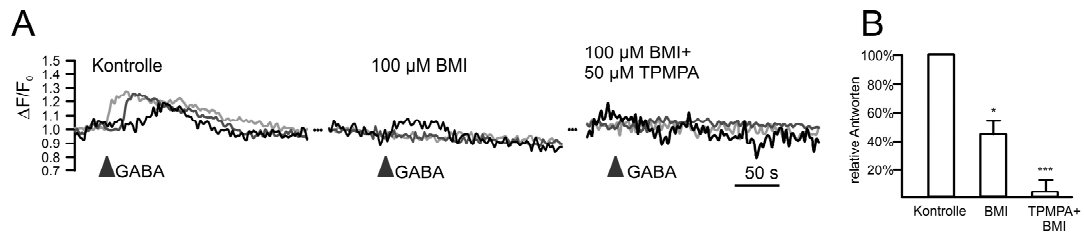
In einem weiteren Experiment wurde die Beteiligung von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren an dem GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ermittelt, in dem die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren durch den spezifischen GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antagonist (1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)methyl-Phosphinsäure (TPMPA) blockiert wurden (Johnston, 1996).

Die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten waren in den meisten Zellen in Anwesenheit von 50 µM TPMPA signifikant ( $p < 0,0001$ ) um durchschnittlich  $36,8 \pm 1,9\%$  reduziert ( $n = 78$  von 105 Zellen, in 18 Schnitten). In den anderen Neuronen wurde durch die Applikation von TPMPA die GABA-induzierte Depolarisation entweder komplett unterdrückt ( $n = 9$  von 105 Zellen) oder blieb unverändert ( $n = 18$  von 105 Zellen, Abb.17B).



**Abb.17: Effekt von TPMPA auf die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten in Neuronen der IZ.** **A** GABA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Antworten wurden durch Zugabe von 50 µM TPMPA reduziert. Der TPMPA-Effekt war vollständig reversibel. **B** Statistische Analyse der relativen GABA-Antworten: TPMPA induzierte eine signifikante und reversible Reduktion des GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms. Das Balkendiagramm gibt den Mittelwert + den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Wilcoxon-Test, \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns =  $p > 0,05$ .

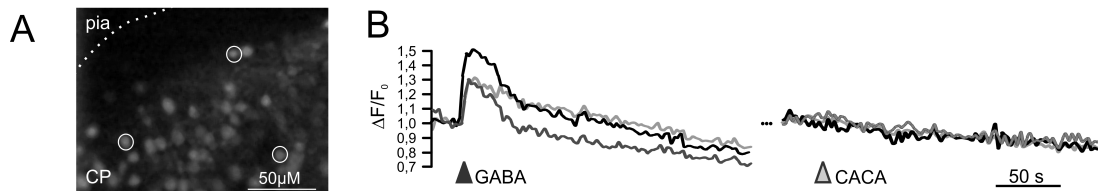
Die Beteiligung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an dem GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom wurde ermittelt, in dem die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Applikation des spezifischen Antagonisten BMI blockiert wurden (Behar et al., 2000; Bormann, 2000). BMI inhibierte den GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in der Mehrzahl der Neurone ( $n = 73$  von 80 Zellen in 11 Schnitten, Abb.18A). In den restlichen Neuronen induzierte GABA einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der signifikant ( $p = 0,018$ ) kleiner als in den Kontrollen ( $44,5\% \pm 8,7$ ,  $n = 7$  Zellen) war (Abb.18B). Die Co-Applikation von 100 µM BMI und 50 µM TPMPA blockierte die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten in allen Neuronen vollständig (Abb.18B).



**Abb.18: Effekt von BMI auf den GABA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Neuronen der IZ.** **A** 100  $\mu\text{M}$  BMI blockierte (hell- und dunkelgraue Kurven) oder reduzierte (schwarze Kurve) den GABA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. **B** Statistische Analyse der relativen GABA-Antworten: 100  $\mu\text{M}$  BMI reduzierte signifikant den GABA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in 7 Zellen. Die Co-Applikation von 50  $\mu\text{M}$  TPMPA und 100  $\mu\text{M}$  BMI blockierte den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in allen Zellen. Das Balkendiagramm gibt Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Wilcoxon-Test; \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

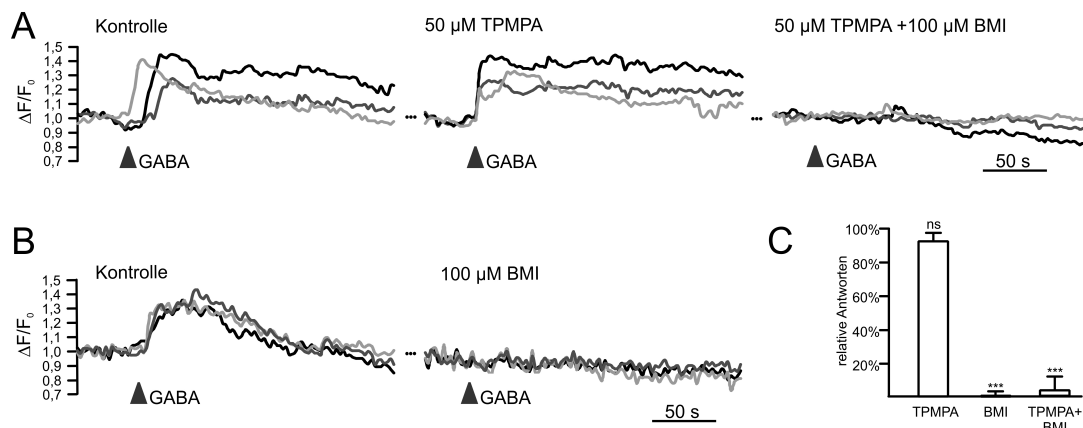
Aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung konnte geschlossen werden, dass nur in wenigen Neuronen der IZ des immaturren Kortex ausschließlich  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren exprimiert werden.

In weiteren Experimenten wurde die funktionelle Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im oberen Bereich der CP überprüft. Dort führte die Badapplikation von 100  $\mu$ M GABA zu einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in allen Zellen (n = 130 Zellen in 3 Schnitten). Im Gegensatz dazu löste die Badapplikation von 100  $\mu$ M CACA in keiner dieser Zellen einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus (Abb.19).



**Abb.19: GABA- und CACA-induzierter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Neuronen der CP.**  
**A** Typische Fluoreszenzaufnahme *Calcium Green* gefüllter Neuronen im dem oberen Teil der CP.  
**B** Aufeinanderfolgende Veränderungen der relativen Fluoreszenzänderung ( $F/F_0$ ) in den in A markierten Neuronen (weiße Kreise). Die Applikation von 100  $\mu$ M GABA führte in allen Neuronen zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. 100  $\mu$ M CACA hingegen induzierte keinen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.

In der CP hatte die Blockade von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren durch 50  $\mu$ M TPMPA keinen signifikanten ( $93,8 \pm 4,8\%$  der Kontrolle,  $p = 0,107$ ) Effekt auf die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten (n = 29 Zellen in 4 Schnitten; Abb.20A+C). In Anwesenheit von 100  $\mu$ M BMI (n = 80 Zellen in 11 Schnitten) oder bei Co-Applikation von 100  $\mu$ M BMI und 50  $\mu$ M TPMPA (n = 29 Zellen in 4 Schnitten) war der GABA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom komplett blockiert (Abb.20B+C).



**Abb.20: Effekt von TPMPA und BMI auf die GABA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten in Neuronen der CP.** **A** Die GABA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Antworten wurden durch Zugabe von 50  $\mu$ M TPMPA nicht signifikant verändert. Die Co-Applikation von 100  $\mu$ M BMI und 50  $\mu$ M TPMPA blockierte die GABA-induzierte  $Ca^{2+}$ -Transienten. **B** Die Applikation von 100  $\mu$ M BMI blockierte den GABA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom. **C** Statistische Analyse der relativen GABA-Antworten: 50  $\mu$ M TPMPA hatte keinen signifikanten Effekt auf den GABA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom, wohingegen 100  $\mu$ M BMI und die Co-Applikation von BMI und TPMPA den  $Ca^{2+}$ -Einstrom in allen Zellen blockierten. Das Balkendiagramm gibt den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Wilcoxon-Test, \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns =  $p > 0,05$ .

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen in der CP zeigten, dass in dieser Schicht  $GABA_C$ -Rezeptoren nicht funktionell nachgewiesen werden können.

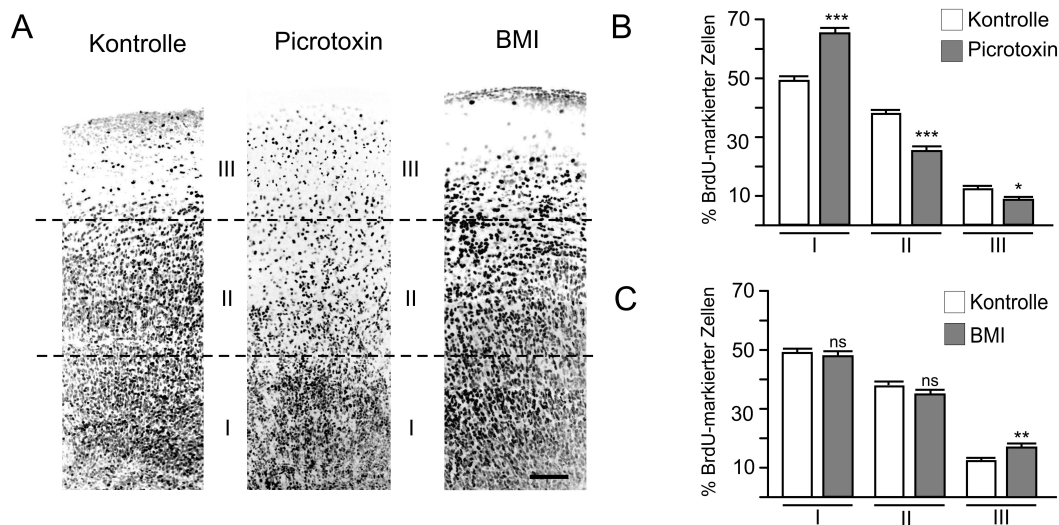
Insgesamt zeigten die Ergebnisse der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung, dass  $GABA_C$ -Rezeptoren in der IZ, aber nicht in der CP funktionell exprimiert werden.  $GABA_A$ -Rezeptoren werden hingegen sowohl in der IZ als auch in der CP exprimiert.

### 5.1.3 Unterschiedliche Funktionen von GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren während der radiale Migration

Um zu untersuchen, welche Funktionen GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren bei der radialen Migration im präfrontalen Kortex haben, wurde eine BrdU-basierte *in vitro* Migrationsanalyse an organotypischen, kortikalen Schnitten von E17- oder E18-Mausembryonen durchgeführt. Dazu wurden die organotypischen Schnittkulturen 48 Stunden mit spezifischen GABA-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten inkubiert und die Veränderungen in der Migration der Neurone bestimmt.

Die Zugabe von 100 µM PTX, ein unspezifischer Antagonist für ionotrope GABA-Rezeptoren, reduzierte die Migration (Abb.21A). Dies zeigte sich dadurch, dass im Vergleich zu unbehandelten Schnitten in den Regionen II und III signifikant ( $p < 0,0001$  in Region II,  $p = 0,0287$  in Region III) weniger (-32,8% in Region II, -28,7% in Region III) BrdU-positive Neurone vorhanden waren ( $n = 25$  Schnitte). Die Anzahl an BrdU-positiven Neuronen war dementsprechend in der Region I signifikant ( $p < 0,0001$ ) erhöht (+32,4%, Abb.21B).

Um zwischen der Rolle von GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren bei der radialen Migration unterscheiden zu können, wurden spezifische Antagonisten für jeden Rezeptor verwendet. Die Zugabe des spezifischen GABA<sub>A</sub>- Rezeptor-Antagonisten BMI führte zu einer Verstärkung der Migration (Abb.21A). In der Region III befanden sich signifikant ( $p = 0,0044$ ) mehr BrdU-positive Neurone (+44,2%) als bei den unbehandelten Schnitten ( $n = 33$  Schnitte, Abb.21C).

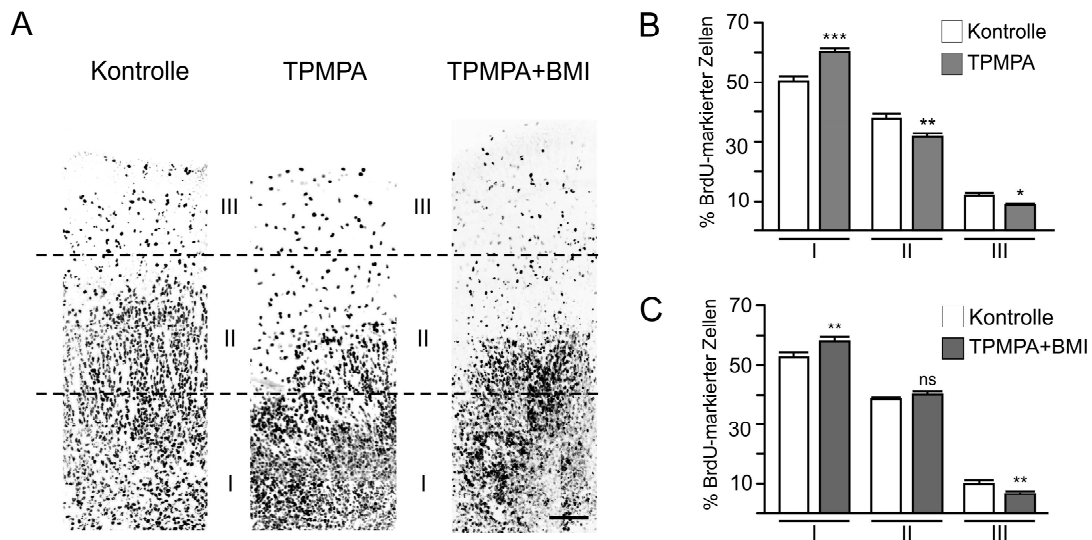


**Abb.21: Effekt von PTX und BMI auf die radiale Migration.** **A** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links), bei Zugabe von 100  $\mu$ M PTX (Mitte) und bei Zugabe von 100  $\mu$ M BMI (rechts). Zur Analyse der Migrationsrate wurde der Kortex in drei Regionen geteilt und die relative Anzahl der BrdU-positiven Neurone innerhalb der Regionen gezählt (Maßstab = 100  $\mu$ m). **B** PTX inhibierte die Migration kortikaler Neurone in organotypischen Schnittkulturen. Die Anzahl der BrdU-positiven Neurone war in den Regionen II und III signifikant reduziert, während in der Region I mehr Neurone verblieben. **C** BMI förderte die Migration. Signifikant mehr BrdU-positive Zellen waren in der Region III zu sehen. Die Balkendiagramme geben den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns =  $p > 0,05$ .

In einem weiteren Experiment wurde gezielt die Rolle der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren während der radialen Migration unter Verwendung des spezifischen GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antagonisten TPMPA untersucht. Die Applikation von TPMPA reduzierte die radiale Migration (Abb.22A). Die relative Anzahl an BrdU-positiven Neuronen war in den Regionen II und III signifikant ( $p = 0,0053$  in Region II,  $p = 0,0206$  in Region III) reduziert (-16,7% in Region II, -28,2% in Region III). Dementsprechend verblieben signifikant ( $p = 0,0003$ ) mehr Neurone (+19,6%) in Region I ( $n = 33$  Schnitte, Abb.22B).

Da PTX in der eingesetzten Konzentration auch Glyzinrezeptoren, die homomer aus  $\alpha$ -Untereinheiten aufgebaut sind (Pribilla et al., 1992; Bormann et al., 1993), inaktiviert, wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob die Co-Applikation

von 100  $\mu\text{M}$  BMI und 50  $\mu\text{M}$  TPMPA zu dem gleichen Ergebnis wie die PTX-Applikation führt (Abb.22C). Bei der Zugabe von BMI und TPMPA war die Anzahl der BrdU-positiven Neurone in der Region III signifikant ( $p = 0,006$ ) reduziert (-35,6%). Signifikant ( $p = 0,024$ ) mehr Neurone (+10,7%) blieben in der Region I ( $n = 35$  behandelte Schnitte, 46 Kontrollschnitte). Die Co-Applikation von BMI und TPMPA hatte also einen vergleichbaren Effekt wie die Applikation von PTX.

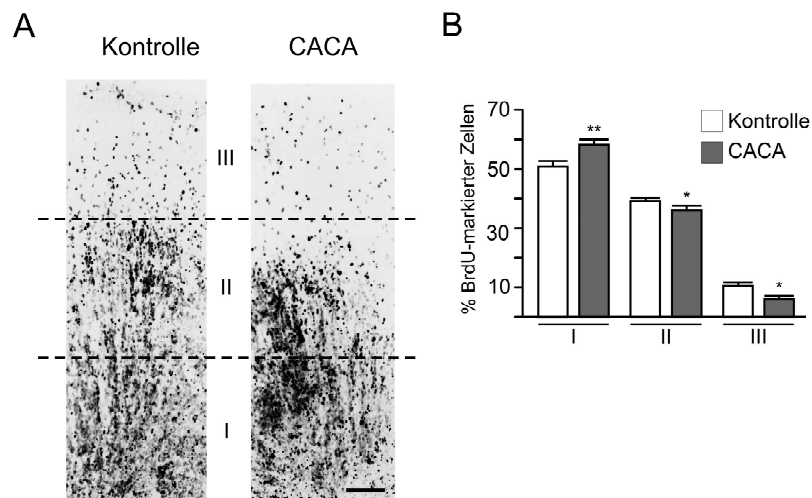


**Abb.22: Effekt von TPMPA und TPMPA plus BMI auf die radiale Migration.** **A** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links), bei Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  TPMPA (Mitte) und bei Co-Applikation von 50  $\mu\text{M}$  TPMPA plus 100  $\mu\text{M}$  BMI (TPMPA+BMI, rechts) (Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ ). **B** Durch die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  TPMPA war die relative Anzahl an BrdU-positiven Neuronen in den Regionen II und III signifikant reduziert und in der Region I erhöht. **C** Die Co-Applikation von 50  $\mu\text{M}$  TPMPA und 100  $\mu\text{M}$  BMI verringerte die Migration. Die Anzahl der BrdU-positiven Neurone in der Region III war signifikant reduziert und in der Region I erhöht. Die Balkendiagramme geben den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns =  $p > 0,05$ .

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, welchen Effekt die Aktivierung von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren durch den spezifischen Agonisten CACA auf die radiale Migration hat. Die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  CACA inhibierte die radiale Migration (Abb.23A). Die relative Anzahl an BrdU-positiven Neuronen war in den Regionen II und III signifikant ( $p = 0,0274$  in Region II,  $p = 0,0167$  in Region III) verringert (-7,8% in Region II, -41% Region III). Dafür befanden sich signifikant ( $p = 0,0068$ )



mehr BrdU-positive Neurone (+14,1%) in der Region I (n = 15 behandelte Schnitte, 25 Kontrollschnitte, Abb.23B).



**Abb.23: Effekt von CACA auf die radiale Migration.** **A** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links) und bei Zugabe von 100  $\mu$ M CACA (rechts) (Maßstab = 100  $\mu$ m). **B** 100  $\mu$ M CACA reduzierte die Anzahl an BrdU-positiven Neuronen in den beiden Regionen II und III, wohingegen die Anzahl in der Region I erhöht war. Das Balkendiagramm gibt den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

Mit dieser Migrationsstudie konnte gezeigt werden, dass  $GABA_C$ -Rezeptoren die radiale Migration fördern. Dass PTX oder die Kombination aus BMI und TPMPA den gleichen Effekt wie der  $GABA_C$ -Rezeptor-Antagonist TPMPA hatte, deutete darauf hin, dass der fördernde Effekt der  $GABA_C$ -Rezeptoren über die inhibitorische Wirkung der  $GABA_A$ -Rezeptoren dominiert.

#### 5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Teils

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war, die Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im unreifen Kortex nachzuweisen und ihre Rolle bei der radialen Migration zu untersuchen. Anhand von RT-PCR- und Westernblot-Experimenten konnte die Expression der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-mRNA und des GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Proteins nachgewiesen werden. Die *in situ*-Hybridisierungs-Experimente zeigten, dass die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren ausschließlich in unteren Regionen des Kortex exprimiert werden, wobei keine Expression oberhalb der IZ zu erkennen ist. Durch die Analyse von GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten in der IZ und CP konnte bewiesen werden, dass die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren auch funktionell in wenigen Neuronen der IZ exprimiert werden, wohingegen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in Neuronen der IZ und CP vorkommen. Die Migrationsanalysen zeigten, dass GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren die Migration fördern und dass dieser Effekt über den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Migrationsstop dominiert.

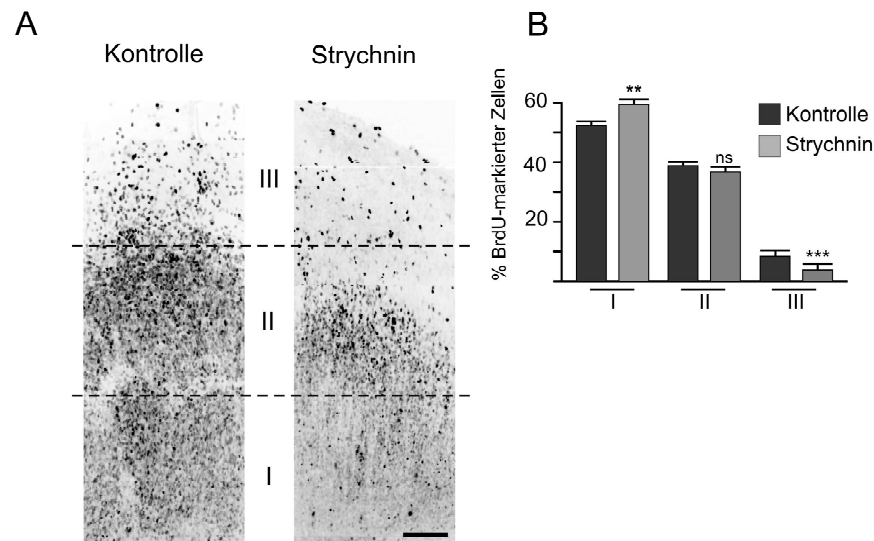
## **5.2 Einfluss der Glyzinrezeptoren auf die radiale Migration und ihre Aktivierung durch einen endogenen Liganden**

Glyzinrezeptoren sind bereits während der frühen Kortextentwicklung in Ratten und Mäusen vorhanden und induzieren ebenfalls eine Membran-Depolarisation in Neuronen des unreifen Kortex (Malosio et al., 1991; Flint et al., 1998; Okabe et al., 2004; Kilb et al., 2008). Obwohl die funktionelle Expression von Glyzinrezeptoren in migrierenden Neuronen nachgewiesen wurde (Flint et al., 1998), wurde die Beteiligung der Glyzinrezeptoren an der radialen Migration bislang nicht untersucht. Ziel dieses zweiten Teils der vorliegenden Arbeit beinhaltete, die Rolle der Glyzinrezeptoren während der radialen Migration zu analysieren und die Auswirkung potentieller Glyzinrezeptor-Agonisten auf die Migration zu testen.

### **5.2.1 Förderung der radialen Migration durch Glyzinrezeptoren**

Zur Untersuchung der Rolle von Glyzinrezeptoren während der radialen Migration im präfrontalen Kortex wurden *in vitro* Migrationsanalysen an organotypischen Schnittkulturen von E16-Mausembryonen durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurde 1  $\mu$ M Strychnin, welches in dieser Konzentration überwiegend Glyzinrezeptoren inhibiert (Sergeeva, 1998) hinzugefügt. Die Strychnin-Applikation führte zu einer Reduktion der radialen Migration (Abb.24A). Die relative Anzahl an BrdU-positiven Neuronen war im Vergleich zu den Kontrollschnitten in der Region III signifikant ( $p = 0,0002$ ) reduziert (-53,8%), wohingegen die Anzahl der Neurone in der Region I signifikant ( $p = 0,006$ ) höher (+13,3%) war ( $n = 31$  Kontrollschnitte, 30 behandelte Schnitte, Abb.24B).

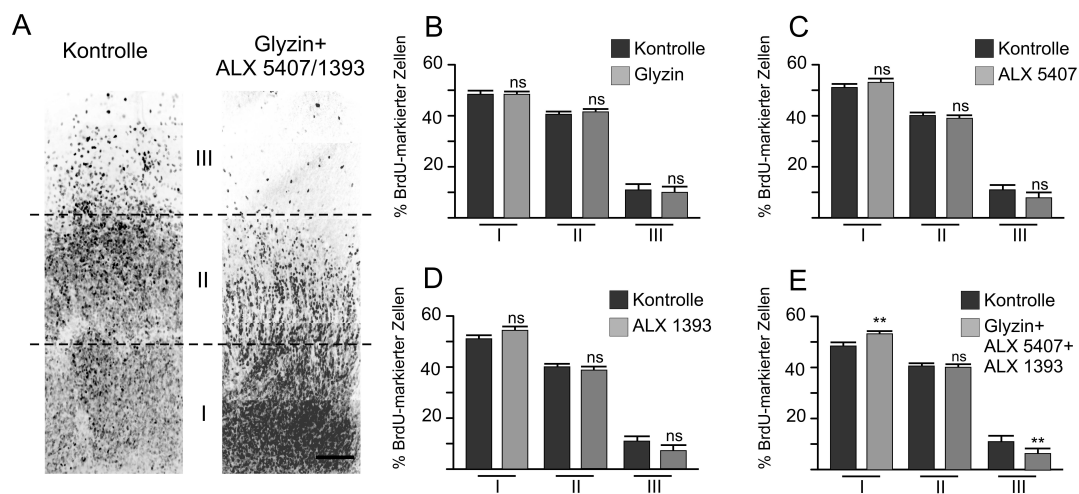


**Abb.24: Effekt von Strychnin auf die radiale Migration.** **A** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links) und bei Zugabe von 1  $\mu$ M Strychnin (rechts) (Maßstab = 100  $\mu$ m). **B** Strychnin inhibierte die radiale Migration. Die Anzahl der BrdU-positiven Neurone war in der Region III signifikant reduziert, wohingegen in der Region I signifikant mehr Neurone verblieben. Das Balkendiagramm gibt den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns =  $p > 0,05$

Diese Migrationsstudie zeigte, dass Glyzinrezeptoren an der Kontrolle der radialen Migration kortikaler Neurone beteiligt sind. Die Inhibition der Migration durch Strychnin legte die Vermutung nahe, dass die Glyzinrezeptoren die Migration fördern.

In einem weiteren Experiment wurde die Auswirkung des Glyzinrezeptor-Agonisten Glyzin auf die radiale Migration untersucht (Abb.25A+B). Die Zugabe von 500  $\mu$ M Glyzin führte zu keiner signifikanten Veränderung der Migration ( $n = 77$  Kontrollschnitte, 56 behandelte Schnitte). Die fehlende Wirkung des Neurotransmitters in diesen Experimenten könnte auf die Aktivität der Glyzin-Transporter I und II und auf die schnelle Aufnahme des extrazellulären Glyzins zurückzuführen sein. Um die extrazelluläre Glyzinkonzentration durchgehend zu erhöhen, wurden in den nächsten Experimenten entweder der Glyzin-Transporter I oder der Glyzin-Transporter II durch die spezifischen Inhibitoren ALX 5407 (Aubrey und Vandenberg, 2001; Mallorga et al., 2003) oder ALX 1393 (Lechner, 2000)

blockiert. Die Applikation von 0,1  $\mu\text{M}$  ALX 5407 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Migration ( $n = 28$  behandelte Schnitte, 36 Kontrollschnitte, Abb.25C). Auch die Applikation von 0,5  $\mu\text{M}$  ALX 1393 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Migration ( $n = 36$  Kontrollschnitte, 28 behandelte Schnitte, Abb.25D). Die Applikation von 500  $\mu\text{M}$  Glyzin mit gleichzeitiger Blockade der Glyzin-Transporter I und II hingegen führte zu einer Hemmung der Migration (Abb.25E). In der Region I war die relative Anzahl an BrdU-positiven Neuronen signifikant ( $p = 0,0050$ ) erhöht (+10,1%), während in der Region III signifikant ( $p = 0,0016$ ) weniger Neurone vorhanden waren (-40,5%,  $n = 36$  Schnitte, 76 Kontrollschnitte).



**Abb.25: Effekt von Glyzin und von Glyzintransporter-Inhibitoren auf die radiale Migration.**

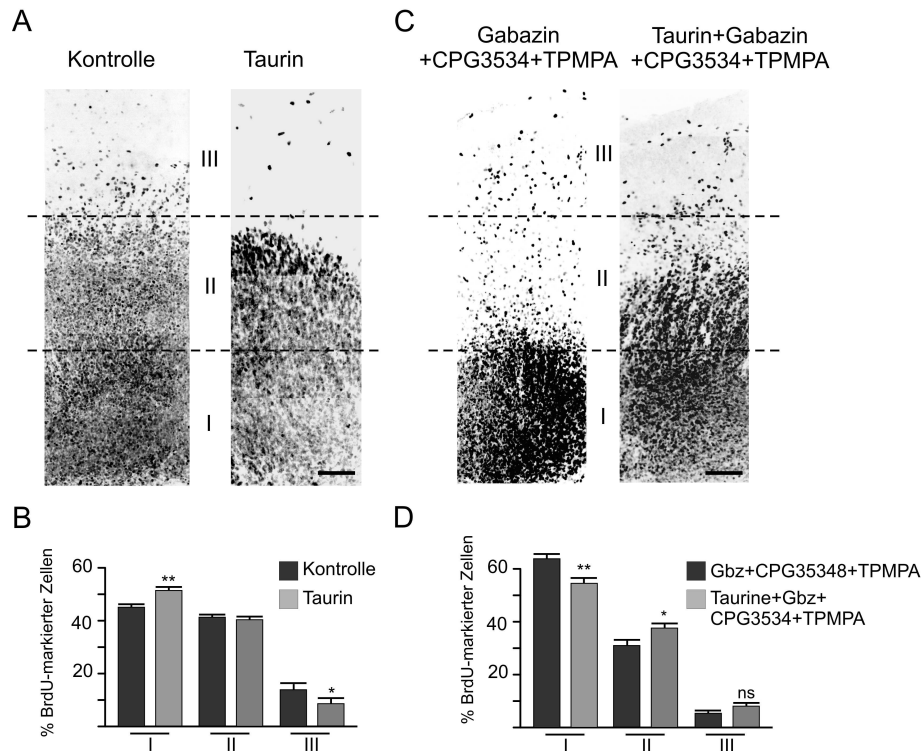
**A** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links) und bei Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  Glyzin plus 0,1  $\mu\text{M}$  ALX 5407 und 0,5  $\mu\text{M}$  ALX 1393 (rechts, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ ). **B** Die Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  Glyzin hatte keinen Einfluss auf die Migration. Die relative Anzahl an BrdU-positiven Neuronen war in keiner Region signifikant verschieden. **C+D** Weder die Inhibition des Glycin-Transporters I durch ALX 5407 (**C**) noch die des Glycin-Transporters II durch ALX 1393 (**D**) veränderte signifikant die radiale Migration. **E** Die Co-Applikation von Glyzin mit den beiden Transporter-Inhibitoren verringerte die Migration. Signifikant mehr Neurone befanden sich in der Region I und signifikant weniger in der Region III. Die Balkendiagramme geben den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \*\* =  $p < 0,01$ , ns =  $p < 0,05$

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass die Inhibition, aber auch die Aktivierung von Glyzinrezeptoren die radiale Migration kortikaler Neuronen reduziert.

### 5.2.2 Die Rolle von Taurin als endogener Ligand der Glyzinrezeptoren

Es wird angenommen, dass während der frühen Kortextentwicklung nicht Glyzin, sondern Taurin der endogene Ligand von Glyzinrezeptoren ist (Flint et al., 1998). Die Applikation von 2 mM Taurin führte zu einer verringerten Migration (Abb.26A). In der Region III waren signifikant ( $p = 0,0108$ ) weniger BrdU-gefärbte Neurone zu finden (-39,1%), wohingegen sich in der Region I signifikant ( $p = 0,0068$ ) mehr (+13,9%) Neurone befanden ( $n = 32$  behandelte Schnitte, 25 Kontrollschnitte, Abb.26B).

Da Taurin nicht ausschließlich Glyzinrezeptoren, sondern auch GABA-Rezeptoren aktiviert, wurden in einem nächsten Experiment alle bekannten GABA-Rezeptoren spezifisch inhibiert, um einen Glyzinrezeptor-vermittelten Effekt von Taurin auf die Migration erkennen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Kontrollschnitte mit 5  $\mu$ M Gabazin (ein spezifischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist), 100  $\mu$ M CPG 3534 (ein spezifischer GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonist) und 50  $\mu$ M TPMPA (ein spezifischer GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antagonist) inkubiert. Dies führte zu einer signifikanten Abnahme der Migration (Abb.26C). In den Regionen II und III war die Anzahl der BrdU-positiven Neuronen signifikant ( $p = 0,0091$  in Region II,  $p = 0,0258$  in Region III) reduziert (-18,9% in Region II, -49,3% in Region III). Dementsprechend befanden sich in der Region I signifikant ( $p = 0,0009$ ) mehr BrdU-positive Neurone (+23,94,  $n = 18$  Schnitte, Kontrollschnitte aus vorausgegangenen Experimenten). In einer anschließenden Versuchsreihe wurden 2 mM Taurin zu den GABA-Rezeptor-Antagonisten gegeben (Abb.26C+D). Die Taurinapplikation führte unter diesen Bedingungen zu einer Verstärkung der Migration. In der Region I befanden sich signifikant ( $p = 0,0017$ ) weniger (-14,6%) BrdU-gefärbte Neurone (Abb.26D). In der Region II waren signifikant ( $p = 0,0147$ ) mehr BrdU-positive Neurone (+32,8%) erkennbar ( $n = 18$  Schnitte ohne Taurin, 20 Schnitte mit Taurin). Die Migration war trotz Taurinzugabe leicht reduziert. Verglichen mit unbehandelten Kontrollschnitten befanden sich signifikant ( $p = 0,0283$ ) mehr Neurone in der Region I (+10,6%,  $n = 20$  Schnitte mit GABA-Rezeptor-Antagonisten plus 2 mM Taurin, 52 Kontrollschnitte aus vorausgegangenen Experimenten).

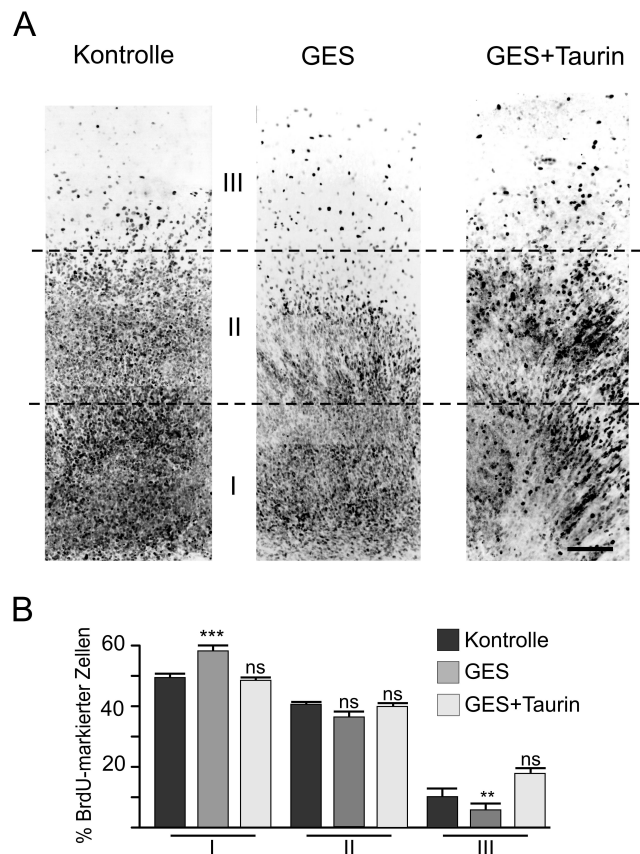


**Abb.26: Effekt von Taurin auf die radiale Migration.** **A** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links) und in Anwesenheit von 2 mM Taurin (rechts) (Maßstab = 100 µm). **B** Die Applikation von 2 mM Taurin hemmte die Migration. Die Anzahl BrdU-positiver Neurone war in der Region I signifikant erhöht und in Region III signifikant verringert. **C** Repräsentatives Bild der Verteilung BrdU-positiver Neurone bei Blockade aller GABA-Rezeptoren (links) und bei Zugabe von Taurin zu den GABA-Rezeptor-Antagonisten (rechts). **D** Nach Inhibition der GABA-Rezeptoren verstärkte Taurin die Migration. Die Anzahl der BrdU-gefärbten Neurone war in der Region I signifikant reduziert und in Region II signifikant erhöht. Die Balkendiagramme geben den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , ns =  $p > 0,05$ .

Diese Experimente wiesen darauf hin, dass Taurin durch Aktivierung von GABA-Rezeptoren die Migration inhibiert und durch Aktivierung von Glyzinrezeptoren die Migration fördert.

Die Blockade des Taurin-Transportes durch Guanidino-Ethansulfonat (GES) führte zu einer Reduktion der intrazellulären Taurinkonzentration (Maar et al., 1995) und zu einer erhöhten extrazellulären Taurinkonzentration (Flint et al., 1998). Um zu unter-

suchen, welche Folgen diese Veränderungen der Taurinkonzentration auf die radiale Migration haben, wurden die kortikalen Schnittkulturen mit 300  $\mu$ M GES inkubiert (Abb.27A). Dies führte zu einer starken Reduktion der Migration. Es verblieben signifikant ( $p = 0,0001$ ) mehr BrdU-gefärbte Neurone in der Region I (+17,9%). Auch waren signifikant ( $p = 0,0061$ ) weniger Neurone (-43,9%) in der Region III zu finden ( $n = 42$  behandelte Schnitte, 52 Kontrollschnitte). Der Effekt von GES auf die Migration konnte vollständig durch die Zugabe von 2 mM Taurin aufgehoben werden. In Anwesenheit von GES und 2 mM Taurin migrierten die Neurone nicht signifikant verschieden zu den Neuronen der Kontrollschnitte ( $n = 36$  Schnitte, Abb.27B).



**Abb.27: Effekt von GES auf die radiale Migration.** **A** Repräsentative Bilder der Verteilung BrdU-positiver Neurone unter Kontrollbedingungen (links), bei Zugabe von 300  $\mu$ M GES (Mitte) und Co-Applikation von 300  $\mu$ M GES und 2 mM Taurin (rechts). **B** GES führte zu einer starken Reduktion der Migration. Signifikant mehr Neurone befanden sich in der Region I und signifikant weniger in der Region III. Taurin in Anwesenheit von GES verstärkte die Migration. In keiner Region unterschied sich die Migration signifikant von den Kontrollen. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SEM an. Die statistische Analyse erfolgte durch den Mann-Whitney-Test, \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , ns =  $p > 0,05$



Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die Zugabe von GES die Migration hemmt und dieser Effekt durch Zugabe von Taurin aufgehoben wird.

### **5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Teils**

In diesem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die radiale Migration kortikaler Neurone durch Zugabe des Glyzinrezeptor-Antagonisten Strychnin und durch Zugabe von Glyzin, bei gleichzeitiger Blockade zellulärer Aufnahme-Mechanismen, inhibiert wird. Im Gegensatz dazu fördert der endogene Glyzinrezeptor-Agonist Taurin die radiale Migration, wenn alle GABA-Rezeptoren inhibiert werden. Insgesamt zeigten diese Experimente, dass Glyzinrezeptoren fördernd auf die radiale Migration wirken und weisen darauf hin, dass die Glyzinrezeptoren durch Taurin aktiviert werden können.

## **6. Diskussion**

### **6.1 Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im immaturren Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration**

#### **6.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Der erste Teil der vorliegenden Dissertation behandelte die Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im immaturren Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration von kortikalen Neuronen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass (i) GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im Kortex von E17-Mausembryonen auf mRNA- und Proteinebene exprimiert werden und dass sich die mRNA-Expression auf die VZ/SVZ und IZ des Kortex beschränkt, dass (ii) die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren funktionell in der IZ und nicht im oberen Bereich der CP exprimiert werden, wohingegen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in beiden Regionen funktionell sind, dass (iii) GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen die radiale Migration fördern und damit eine entgegengesetzte Wirkung zu GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren haben und dass (iv) der migrationsfördernde Effekt von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren über den migrationshemmenden Effekt der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren dominiert.

#### **6.1.2 Expression der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene im pränatalen Kortex**

Die Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren wurde bereits in einigen Arealen des frühen postnatalen Gehirns (Rozzo et al., 2002) und in der Proliferationszone des immaturren Kortex nachgewiesen (Fukui et al., 2008). Entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit die mRNA- und Protein-Expression von  $\rho_1$ - und  $\rho_2$ -Untereinheiten im Kortex

von E17-Mausembryonen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA der  $\rho_2$ -Rezeptor-Untereinheit ausschließlich in der unteren Hälfte des Kortex exprimiert wird. Die Expression ist vor allem in der VZ und SVZ besonders stark. In der IZ exprimieren nur wenige Zellen die mRNA der  $\rho_2$ -Rezeptor-Untereinheit und oberhalb der IZ ist keine Expression mehr zu erkennen. Die Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren scheint sich im Kortex also auf die proliferierenden und migrierenden Neuronen in der VZ/SVZ und IZ zu beschränken.

### 6.1.3 Funktionelle Expression von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren in der IZ

Die funktionelle Expression von GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren wurde mit Ca<sup>2+</sup>-mikrofluorimetrischen Messungen analysiert. In unreifen Neuronen bewirkt GABA eine Depolarisation der Zellmembran (Luhmann und Prince, 1991; Owens et al., 1996; Achilles et al., 2007). Diese ist ausreichend, um spannungsaktivierte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu öffnen und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu erhöhen (Owens et al., 1996). Ca<sup>2+</sup>-Transienten sind für die Regulation der neuronalen Migration essentiell (Komuro und Rakic, 1998; Komuro und Kumada, 2005).

Mit der Methode der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung konnten die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten durch einen Ca<sup>2+</sup>-bindenden Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass in der IZ sowohl GABA als auch CACA einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom induzieren. In der CP hingegen kann CACA keinen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom auslösen. Der spezifische GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antagonist TPMPA inhibiert ebenfalls nur in der IZ die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten. In den meisten Neuronen der IZ und in allen Neuronen der CP wurden die GABA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten BMI inhibiert. Allerdings konnten in wenigen Neuronen der IZ ein BMI-insensitiver Ca<sup>2+</sup>-Einstrom gemessen werden. Zusammenfassend wurden in der IZ größtenteils Neurone nachgewiesen, die GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren besitzen, aber auch einige wenige Neurone, die entweder nur GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren oder nur GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren zu haben scheinen. Im Gegensatz dazu wurde in der CP keine funktionelle GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Expression entdeckt. In dieser kortikalen Schicht zeigten in allen untersuchten Zellen CACA und TPMPA keine Wirkung, während

---

alle GABAergen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten durch BMI vollständig blockiert wurden. Damit untermauert die Fluoreszenzmessung das Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung.

Dennoch weist die kalziumabhängige Fluoreszenzmessung in der IZ einige Unstimmigkeiten auf. Die Anzahl an Neuronen, deren GABA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten durch TPMPA beeinflusst wurden (etwa 80%), war deutlich höher als die Anzahl der Neuronen, in denen die GABA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nicht durch BMI inhibiert wurden (etwa 10%). Zusätzlich wurden nur etwa 10% der Neurone der IZ komplett durch TPMPA blockiert, obwohl etwa 70% der Neurone auf CACA reagierten. Ein unspezifischer Effekt von CACA auf  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren kann in diesen Experimenten ausgeschlossen werden, da sie in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  BMI durchgeführt wurden. Diese Diskrepanz könnte jedoch durch  $\text{GABA}$ -Rezeptoren hervorgerufen werden, die aus einer Kombination von  $\text{GABA}_A$ - und  $\text{GABA}_C$ -Rezeptor-Untereinheiten bestehen (Hartmann et al., 2004; Milligan et al., 2004). Solche  $\text{GABA}$ -Rezeptoren, in denen die  $\rho_1$ -Untereinheiten mit  $\alpha_1$ - und  $\gamma_2$ -Untereinheiten Komplexe bilden (Milligan et al., 2004), weisen eine gemischte Pharmakologie auf. Sie reagieren auf CACA, können jedoch sowohl durch BMI als auch durch TPMPA blockiert werden (Hartmann et al., 2004).

Ob die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  BMI zu einer vollständigen oder teilweisen Hemmung der GABAergen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führt, kann anhand der kalziumabhängigen Fluoreszenzmessung nicht geklärt werden. Mit dieser Methode können, im Gegensatz zur Patch-Clamp-Methode, keine unterschwellig Depolarisationen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde in dieser Studie aufgrund der großen Standardabweichung eine relativ hohe Schwelle festgelegt, ab der Fluoreszenzänderungen als GABA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten klassifiziert werden.

#### 6.1.4 Die Rolle von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren während der radialen Migration

Dass GABA-Rezeptoren die neuronale Migration beeinflussen können, wurde bereits für viele Zelltypen gezeigt, wie für Interneurone (Lopez-Bendito et al., 2003; Cuzon et al., 2006), für Neurone des olfaktorischen Systems (Bolteus und Bordey, 2004; Gascon et al., 2006) und Neurone des Hippokampus (Manent et al., 2005). Auch ein konzentrationsabhängiger Effekt von GABA und die spezifische Rolle von GABA-Rezeptoren mit unterschiedlicher GABA-Affinität wurden im pränatalen Kortex nachgewiesen (Behar et al., 1996; Owens et al., 1999). In den *in vitro* und *in vivo* Migrationsstudien an Ratten wurde bereits gezeigt, dass die Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch BMI die radiale Migration verstärkt (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). Die Studien zeigten, dass GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für die Beendigung der Migration verantwortlich sind (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit mit kortikalen Schnittkulturen von Mäusen bestätigt werden. Auch in Mäusen führt BMI zu einer verstärkten Migration. Ebenfalls konnte verifiziert werden, dass PTX, ein unspezifischer Antagonist für ionotrope GABA-Rezeptoren, die radiale Migration massiv hemmt. Dass BMI eine andere Wirkung auf die Migration zeigt als PTX, weist darauf hin, dass mindestens ein weiterer Faktor neben den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine Rolle bei der Modulation der Migration spielt.

Um zu untersuchen, welche Rolle GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren während der radialen Migration spielen, wurden in der vorliegenden Studie Migrationsanalysen mit dem spezifischen GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Antagonisten TPMPA und dem GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Agonisten CACA durchgeführt. Die Zugabe von TPMPA führte zu einer verringerten Migration, ähnlich wie bei PTX. Daraus lässt sich schließen, dass GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren eine migrationsfördernde Rolle während der radialen Migration einnehmen. Da die Applikation von PTX und die Co-Applikation von TPMPA und BMI ebenfalls die Migration hemmen, scheint die migrationsfördernde Rolle der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren über die migrationshemmende Rolle der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu dominieren.

Die Zugabe des spezifischen GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Agonisten CACA führte ebenfalls zu einer verringerten Migration. Dieses Ergebnis scheint zuerst widersprüchlich, da bei

Applikation von Agonisten und Antagonisten im Prinzip gegensätzliche Resultate erwartet werden. Es wurde jedoch bereits im Kortex von Ratten gezeigt, dass der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonist Muscimol die gleiche Wirkung auf die Migration hat wie der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist BMI. Dies wurde mit einer Desensitivierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch die lang anhaltende Applikation des Agonisten und durch einen daraus resultierenden funktionellen Verlust der GABA-Rezeptor-vermittelten Antworten begründet (Heck et al., 2007). Auch wenn GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren weniger schnell desensitivieren als GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Bormann und Feigenspan, 1995), könnte die massive und lang anhaltende Applikation von CACA zu einer Desensitivierung von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren führen. Ebenso könnte es sein, dass die CACA-induzierte Aktivierung der ionotropen GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren die intrazelluläre Cl<sup>-</sup>-Konzentration so stark senkt, dass keine spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle mehr aktiviert werden können. Dazu könnte insbesondere beitragen, dass der Cl<sup>-</sup>-Transporter NKCC1 in unreifen Neuronen nur zu einer relativ langsamen Wiederauffüllung der intrazellulären Cl<sup>-</sup>-Konzentration führt (Achilles et al., 2007). Ein letzter Grund für die gleiche Wirkung der Agonisten und Antagonisten könnte darin liegen, dass die Rezeptoren durch den Überfluss an extrazellulären Botenstoffen das relevante Migrationssignal nicht erkennen. Dass CACA auf Rezeptoren mit gemischter Pharmakologie in migrierenden Neuronen wirken könnte (Hartmann et al., 2004), kann nicht ausgeschlossen werden. Da diese Rezeptoren jedoch von BMI und TPMPA inhibiert werden, diese beiden Antagonisten aber unterschiedliche Wirkungen auf die Migration aufweisen, ist davon auszugehen, dass diese „gemischten“ Rezeptoren die radiale Migration nicht entscheidend beeinflussen. Dass CACA über Depolarisation durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren einen frühzeitigen Stop der Migration auslöst, kann hingegen ausgeschlossen werden, da CACA in dieser Konzentration nicht oder nur minimal GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aktiviert (Kusama et al., 1993; Bormann und Feigenspan, 1995).

### 6.1.5 Potentielle Funktionen und Interaktionen der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren

Die Expression der  $\rho_2$ -Untereinheit in der VZ und SVZ unterstützt die Theorie, dass PTX-sensitive Rezeptoren die Migration von der VZ/SVZ in die IZ fördern (Behar et al., 2000). Dies könnte darüber hinaus auch auf eine Rolle von GABA-Rezeptoren mit  $\rho$ -Untereinheiten während der Proliferation hinweisen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass GABA die Proliferation von Vorläuferzellen der VZ verstärkt und von Vorläuferzellen der SVZ verringert (Owens et al., 1999). Der GABA-induzierte Effekt auf die Proliferation in der VZ wird jedoch nicht durch BMI inhibiert (Owens et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass andere GABA-Rezeptoren, wie zum Beispiel GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren, an der Kontrolle der Proliferation in der VZ beteiligt sind.

Die funktionelle Expression der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren in der IZ weist darauf hin, dass die migrationsfördernde Wirkung der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren auch in der IZ vermittelt wird. Die IZ ist für die radiale und tangential Migration von besonderer Bedeutung. Die Mehrheit der tangential migrierenden Neuronen ist sowohl in der SVZ als auch in der IZ zu finden (O'Rourke et al., 1995; Jimenez et al., 2002; Marín und Rubenstein, 2003). Die IZ ist auch eine Schlüsselregion für radial migrierende Neurone, die dort in die sogenannte multipolare Phase übergehen (Tabata und Nakajima, 2003; Noctor et al., 2004), um anschließend entweder radial oder tangential weiterzuwandern (Tabata und Nakajima, 2003). Die multipolare Phase der Migration ist ein kritischer Punkt während der radialen Migration. Verschiedene Missbildungen des Kortex basieren auf einer Störung dieses Stadiums (LoTurco und Bai, 2006). Für die morphologischen Veränderungen während der multipolaren Phase werden unter anderem Modifikationen im Zytoskelett benötigt, woran verschiedene MAPs und Aktin-bindende Proteine beteiligt sind (Jimenez-Mateos et al., 2005). Von dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MAP1B wurde gezeigt, dass es die radiale Migration moduliert, indem es das Neuritenwachstum, die Stabilität der Mikrotubuli und die Interaktion zwischen Mikrotubuli- und Aktinfilamenten beeinflusst (Gonzalez-Billault et al., 2005). In retinalen Synapsen interagieren die GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  $\rho_1$  und  $\rho_2$  direkt mit dem MAP1B-Protein (Hanley

et al., 1999; Billups et al., 2000), wobei die Verbindung mit dem Zytoskelett die Affinität von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren verringert (Billups et al., 2000).

Dass die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren in der IZ exprimiert werden, könnte darauf hinweisen, dass GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren eine Rolle während des multipolaren Migrationsstadiums und bei der Orientierung der Neurone spielen. Dies könnte durch Interaktionen mit dem Zytoskelett vermittelt werden, wie beispielsweise über das Protein MAP1B. Ob die direkte Interaktion von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren mit dem Zytoskelett einen Einfluss auf die radiale Migration kortikaler Neurone ausübt, konnte im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht geklärt werden. Wahrscheinlich ist, dass die Migration durch die GABA<sub>C</sub>-Rezeptor-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten und durch intrazelluläre, Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege gefördert wird (Komuro und Rakic, 1998).

#### **6.1.6 Wie kann die Aktivierung der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren gegensätzliche Migrationssignale induzieren?**

Während der frühen kortikalen Entwicklung führt die Aktivierung von ionotropen GABA-Rezeptoren zu einem Cl<sup>-</sup>-Einstrom in das Neuron, welches dadurch depolarisiert wird und spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle öffnet (Ben-Ari et al., 1989; Luhmann und Prince, 1991; Owens et al., 1996; Achilles et al., 2007; Dresbach et al., 2008). Dass die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine große Rolle während der neuronalen Migration spielt, wurde bereits in einigen Studien belegt (Behar et al., 1997; Lee et al., 1999; Owens et al., 2000) und ist bei der Migration zerebellarer Granularzellen besonders deutlich (Komuro und Rakic, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass GABA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signale in der CP ausschließlich von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt werden, wohingegen in der IZ auch die Aktivierung von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom auslösen kann. Obwohl die Aktivierung von GABA<sub>A</sub>- und von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in ein Neuron führt, haben diese Rezeptoren gegensätzliche Wirkungen auf die Migration. Die durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten führen zu einem Migrationsstop, wohingegen die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Transienten die Migration fördern.



Es ist insgesamt wenig über die intrazellulären Mechanismen bekannt, über die das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  die Migration unreifer Neurone kontrolliert (Komuro und Kumada, 2005). Dass  $\text{Ca}^{2+}$  unterschiedliche Wirkungen haben kann, je nachdem welchen Weg es in die Zelle nimmt, wurde im Zusammenhang mit synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren beschrieben (Hardingham et al., 2002). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch synaptische NMDA-Rezeptoren induziert das Überleben des Neurons, wohingegen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch extrasynaptische NMDA-Rezeptoren zu einer Abschaltung von CREB und zu Apoptose führt (Hardingham et al., 2002). Es wäre denkbar, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, abhängig von der Position der GABA-Rezeptoren, unterschiedliche intrazelluläre Signale auslöst. Die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften (Bormann, 2000) der beiden GABA-Rezeptoren könnten ebenfalls dazu beitragen. Die dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom folgenden intrazellulären Signalwege könnten auch von der Position und vom Entwicklungsstadium des Neurons abhängig sein. Der Grund, warum die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die durch  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren und durch  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren induziert werden, eine unterschiedliche Wirkung auf die Migration haben, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden.

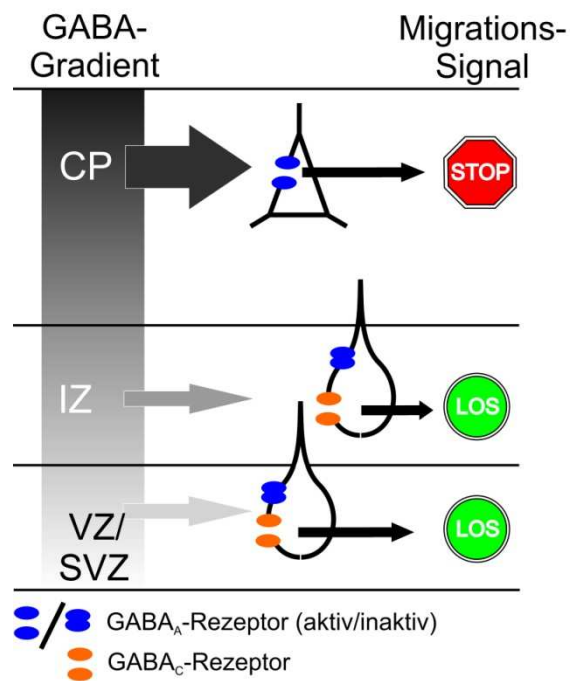
### 6.1.7 Modifikation des Gradienten-Modells von Behar

Behar entwickelte anhand früherer Studien (Behar et al., 1994; Behar et al., 1996; Behar et al., 1998; Owens et al., 1999) ein Modell zur Erklärung des GABAergen Einflusses auf die radiale Migration kortikaler Neurone (Behar et al., 2000). Nach diesem Modell ist GABA während der späten Embryonalentwicklung gradientenförmig verteilt, wobei GABA nahe der pialen Oberfläche am höchsten konzentriert auftritt und in der VZ/SVZ kaum noch vorhanden ist (Behar et al., 2000). Nach diesem Modell werden  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren im gesamten Kortex exprimiert, aber aufgrund ihrer niedrigen Affinität zu GABA ( $\text{EC}_{50} = 10\text{-}100 \mu\text{M}$ ) (Bormann und Feigenspan, 1995) erst in den oberen kortikalen Schichten aktiviert. Dort wirkt die  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor-vermittelte Depolarisation als Stop-Signal und ist für die korrekte Beendigung der Migration verantwortlich (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007).  $\text{GABA}_B$ -Rezeptoren besitzen eine höhere GABA-Affinität ( $\text{EC}_{50} = 1,6 \mu\text{M}$ )

(Sodickson und Bean, 1996) und werden bereits in tieferen Kortex-Regionen aktiviert, wo sie die neuronale Migration von der IZ in die CP fördern (Behar et al., 2000). Die Aktivierung PTX-sensitiver-Rezeptoren ist für die Migration kortikaler Neurone von der VZ/SVZ in die IZ verantwortlich (Behar et al., 2000).

Anhand der Ergebnisse des ersten Teils der vorliegenden Dissertation können dem Modell von Behar einige wichtige Punkte hinzugefügt werden: Bei den PTX-sensitiven Rezeptoren handelt es sich um GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren, die im unteren Bereich des immaturren Kortex, also in der VZ/SVZ und in der IZ exprimiert werden. Da GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren mit einem EC<sub>50</sub> von 1-4 µM zehnmal sensitiver als GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind (Bormann und Feigenspan, 1995; Bormann, 2000), können sie bereits durch die geringen GABA-Konzentrationen in diesen Bereichen aktiviert werden. Die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren fördern die radiale Migration sowohl von der VS/SVZ in die IZ als auch wahrscheinlich von der IZ in höhere Regionen, wobei ihre migrationsfördernde Wirkung über den migrationshemmenden Effekt der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren dominiert.

Anhand dieser Ergebnisse kann das Migrationsmodell von Behar um die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren in der VZ/SVZ und in der IZ erweitert werden (Abb.28).



**Abb.28: Position der GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren im embryonalen Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration.** GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren werden in den Proliferationszonen und in der IZ exprimiert. Dort werden sie bereits durch eine geringe GABA-Konzentration (grauer Farbverlauf = Konzentrationsgradient) aktiviert und fördern die Migration (grüne LOS-Schilder). Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden erst in den oberen Bereichen der CP exprimiert, wo sie die kortikale Migration beenden (rotes STOP-Schild, verändert nach Behar et al., 2000).

## **6.2 Einfluss der Glyzinrezeptoren auf die radiale Migration und ihre Aktivierung durch einen endogenen Liganden**

### **6.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit behandelte den Einfluss der Glyzinrezeptoren auf die radiale Migration kortikaler Neurone. Dabei konnte gezeigt werden, dass (i) die Hemmung der Glyzinrezeptoren die radiale Migration blockiert, dass (ii) die Aktivierung von Glyzinrezeptoren durch Glyzin ebenfalls zu einer Hemmung der Migration führt und dass (iii) Taurin durch Aktivierung von GABA-Rezeptoren die Migration hemmt und durch Aktivierung von Glyzinrezeptoren die Migration fördert.

### **6.2.2 Die Rolle von Glyzinrezeptoren während der radialen Migration**

Die Expression von Glyzinrezeptoren und eine Glyzinrezeptoren-vermittelte Depolarisation von immaturren Neuronen wurden bereits in den Cajal-Retzius-Zellen (Okabe et al., 2004), in Zellen der SP (Kilb et al., 2008), der CP und in migrierenden Neuronen der IZ (Flint et al., 1998) beschrieben. Die Funktion der Glyzinrezeptoren während der radialen Migration kortikaler Neurone wurde jedoch bislang nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition der Glyzinrezeptoren durch Strychnin die Migration der Neurone hemmt. Daraus lässt sich schließen, dass Glyzinrezeptoren eine fördernde Wirkung auf die Migration ausüben. Vermutlich wird diese migrationsfördernde Wirkung durch eine Glyzinrezeptoren-vermittelte Membrandepolarisation und den nachfolgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermittelt, wie es auch für die migrationsfördernde Wirkung von GABA- und NMDA-Rezeptoren angenommen wird (Behar et al., 1999; Lee et al., 1999; Owens et al., 2000). Durch den Glyzinrezeptor-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird beispielsweise auch das Neuritenwachstum bei Rückenmarksneuronen beeinflusst (Tapia et al., 2000; Tapia et al., 2001).

### 6.2.3 Die Rolle von Glyzin als endogener Ligand

Die Zugabe des Glyzinrezeptor-Agonisten Glyzin hatte keine Wirkung auf die Migration in den kortikalen Schnittkulturen. Da die extrazelluläre Glyzinkonzentration unter präziser Kontrolle durch Glyzin-Aufnahmemechanismen steht (Betz et al., 2006), wurden die beiden  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen Glyzintransporter I und II durch spezifische Inhibitoren (Lechner, 2000; Aubrey und Vandenberg, 2001; Mallorga et al., 2003) gehemmt, um dadurch die extrazelluläre Glyzinkonzentration zu erhöhen (Chen et al., 2003).

Die Inhibition eines einzelnen Glyzintransporters hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Migration. Allerdings führte Glyzin in Gegenwart dieser beiden Transportblocker zu einer signifikanten Reduktion der Migration, was darauf hindeutet, dass mindestens einer dieser Transporter im unreifen Kortex funktionell ist. Die Expression der Glyzintransporter I und II wurde in dem verwendeten Embryonalstadium bislang nicht nachgewiesen. Der überwiegend in Gliazellen exprimierte Glyzintransporter I ist im embryonalen Kortex von Mäusen nicht nachweisbar und auch der in Neuronen exprimierte Glyzintransporter II ist embryonal nur im Rückenmark, Thalamus, Zerebellum und in den Colliculi zu finden (Zafra et al., 1995; Jursky und Nelson, 1996). Dass die beiden Transporter mit histologischen Methoden im embryonalen E16-Kortex nicht nachgewiesen werden konnten, lässt den Schluss zu, dass ihre Expression nur gering ist.

Dass der Glyzinrezeptor-Agonist Glyzin (bei gleichzeitiger Blockade der zellulären Aufnahme-Mechanismen) die gleiche Wirkung auf die Migration hat wie der Antagonist Strychnin, kann durch die starke Desensitivierung der Glyzinrezeptoren durch Glyzin erklärt werden (Flint et al., 1998; Kilb et al., 2002). Darüber hinaus kann anhand dieses Ergebnisses ausgeschlossen werden, dass der Effekt von Glyzin auf die Migration durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren vermittelt wird. Glyzin bindet zwar als Co-Agonist von Glutamat an NMDA-Rezeptoren und ist für deren Aktivierung notwendig (Thomson, 1989; Yamakura und Shimoji, 1999), die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt jedoch zu einer Verstärkung der radialen Migration (Komuro und Rakic, 1993; Behar et al., 1999).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Glyzinrezeptoren die Migration fördern und mindestens ein Glyzintransporter im pränatalen Kortex exprimiert wird. Glyzin scheint als Glyzinrezeptor-Agonist keine große Rolle während der Migration zu spielen, da die Hemmung der Glyzin-Transporter keinen Effekt auf die Migration hatte. Möglicherweise könnte Glyzin durch die schnelle Desensitivierung der Glyzinrezeptoren kontraproduktiv auf die Migration wirken.

#### **6.2.4 Die Rolle von Taurin als endogener Ligand**

Einige Studien legen nahe, dass Taurin im unreifen Nervensystem der wichtigste endogene Agonist von Glyzinrezeptoren ist (Sturman et al., 1977; Flint et al., 1998). Taurin ist im pränatalen Kortex in hoher Konzentration vorhanden (Sturman et al., 1977) und aktiviert sowohl Glyzin- als auch GABA-Rezeptoren (Schmieden et al., 1992; Hussy et al., 1997; Jia et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Applikation von Taurin zu einer Reduktion der Migration in kortikalen Schnittkulturen führt. Taurin desensitiviert die Glyzinrezeptoren nicht in dem Maße wie Glyzin, weshalb eine Desensitivierung der Rezeptoren nicht Ursache für die verringerte Migration sein dürfte. Die ektopische Aktivierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in tieferen kortikalen Schichten durch Taurin, könnte jedoch zu einem verfrühten Migrationsstopp führen, wie er beispielsweise auch bei Anstieg der extrazellulären GABA-Konzentration nach Blockade von GABA-Transportern durch Tiagabin zu sehen ist (unveröffentlichte Ergebnisse von Dr. Nicolas Heck). Um den Glyzinrezeptor-vermittelten Effekt von Taurin auf die Migration zu isolieren, wurden die GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>B</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren spezifisch inhibiert. Die Hemmung von GABA-Rezeptoren führt zu einer starken Reduktion der Migration, vergleichbar mit dem Ergebnis der PTX-Applikation. Wurde jedoch zusätzlich zu den GABA-Rezeptor-Antagonisten Taurin appliziert, verstärkte sich die Migration wieder. Die Aktivierung von Glyzinrezeptoren durch Taurin ist also höchstwahrscheinlich ein migrationsfördernder Stimulus. In Anbetracht dieses Befundes, dass Taurin ein endogener und tonisch wirkender Agonist von Glyzinrezeptoren im unreifen Gehirn ist (Flint et al., 1998), können auch Glyzinrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der radialen Migration

spielen. Allerdings konnte Taurin die, durch Blockade aller GABA-Rezeptoren, induzierte Hemmung der Migration nicht vollständig aufheben. Dies deutet darauf hin, dass GABA-Rezeptoren ebenfalls eine bedeutsame Rolle während der Migration spielen. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Taurin durch Aktivierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren die radiale Migration hemmt, aber durch Aktivierung von Glyzinrezeptoren die Migration positiv beeinflusst. Hierbei kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob ein Tauringradient im unreifen Kortex eine Rolle spielt.

Durch die Zugabe des Taurintransport-Inhibitors GES wird die extrazelluläre Taurinkonzentration erhöht (Flint et al., 1998) und die intrazelluläre erniedrigt (Maar et al., 1995). GES ist ein Taurin-Analogon, welches den Natrium-Taurin Co-Transport inhibiert (Flint et al., 1998). In der dazu durchgeführten Versuchsreihe führte die Applikation von GES zu einer verminderten Migration. Dieser Effekt könnte direkt auf eine Erhöhung der extrazellulären Taurinkonzentration nach Blockade des Taurin-Transports zurückzuführen sein. Da GES außerdem als schwacher GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonist und als kompetitiver Glyzinrezeptor-Antagonist wirkt (Sergeeva et al., 2002), ist auch eine direkte Wirkung auf diese beiden Rezeptoren mit einem entsprechenden Effekt auf die Migration nicht auszuschließen. Allerdings konnte der migrationshemmende Effekt von GES durch Zugabe von Taurin aufgehoben werden. Das Ergebnis dieses Experimentes lässt sich nur schwer erklären. Die Wiederherstellung der Migration durch dieses Co-Applikations-Protokoll wurde zwar bereits in der Literatur beschrieben (Maar et al., 1995), jedoch keine Begründung geliefert, wie die Applikation von Taurin in den extrazellulären Raum die erhöhte extrazelluläre Taurinkonzentration aufheben kann, wenn der Taurin-Transport inhibiert ist. Eine mögliche Erklärung des Phänomens wäre, dass der kompetitive Transportblocker GES vielleicht nicht zu einer solch hohen Taurin-Konzentration führt, so dass der Agonist mit dem Transportblocker konkurrieren könnte. Durch die zusätzliche Taurinzugabe wäre so viel Taurin im extrazellulären Raum vorhanden, dass GES nicht mehr an die Taurin-Transporter binden kann und somit der normale Taurin-Transport in die Zelle wieder aufgenommen wird. Damit ist jedoch nicht geklärt, warum die Applikation von Taurin ohne GES die Migration inhibiert und nach GES-Zugabe dann fördert. Über die genauen Mechanismen der Taurin-Aufnahme und ihre Blockade durch das

Taurin-Struktur analogon GES ist jedoch noch sehr wenig bekannt (Dominy et al., 2004). Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung Taurins auf die Migration auch über andere Mechanismen als die Aktivierung von Glyzinrezeptoren vermittelt wird.

### **6.2.5 Potentielle weitere Funktionen von Taurin**

Dass Taurin eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung und der neuronalen Migration der Granularzellen inne hat, wurde durch Experimente mit Taurin-freier Nahrung an schwangeren Katzen gezeigt (Sturman et al., 1985a; Sturman et al., 1985b). In diesem Zusammenhang wurde die Interaktion Taurins mit den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen NCAM und L1 als einer der möglichen Gründe diskutiert (Maar et al., 1995). Eine andere Möglichkeit wäre, dass Taurin als Osmolyt, also durch Regulation des Zellvolumens in Neuronen und Gliazellen (Pasantes und Schousboe, 1988; Saransaari und Oja, 1992; Moran et al., 1994; Pasantes-Morales et al., 2002) die radiale Migration beeinflusst. Auch durch die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die Zellmembran und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports könnte Taurin auf die Migration Einfluss nehmen (Huxtable et al., 1979; Foos und Wu, 2002).



### 6.3 Ist Taurin oder GABA der endogene Modulator der Migration?

Die chemotrope Wirkung von GABA wurde zuerst in Chemotaxis-Kammern untersucht, in denen die konzentrationsabhängige Migration dissoziierter Neurone analysiert wurde (Behar et al., 1996; Behar et al., 1998). In neokortikalen Schnitten konnte gezeigt werden, dass GABA-Rezeptoren die Migration unterschiedlich beeinflussen (Behar et al., 2000). Die Aktivierung von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren fördert die Migration in der VZ/SVZ und der IZ, und die Aktivierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren fördert die Migration in die CP; wohingegen die Aktivierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren als Stop-Signal wirkt (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). In *knockout*-Mäusen, denen beide Isoformen der Glutamat-Decarboxylase (GAD65 und GAD67) fehlen und die dementsprechend kein GABA bilden können, sind jedoch keine kortikalen Fehlentwicklungen zu erkennen (Ji et al., 1999). Der frappierende Unterschied zwischen den *in vitro*- und *in vivo* Daten, ist nicht durch unterschiedliche Spezies zu erklären, wie in der Literatur spekuliert wird, da in der vorliegenden Dissertation alle vorher in Ratten erworbenen *in vitro* Daten auch an C57BL/6-Mäusen gezeigt werden konnten und die *knockout*-Mäuse auch aus C57BL/6-Mäusen stammten (Asada et al., 1996; Asada et al., 1997; Ji et al., 1999). Wahrscheinlicher ist, dass andere Mediatoren die fehlende GABA-Funktion *in vivo* kompensieren können.

Die Aminosulfonsäure Taurin ist in hoher Konzentration im pränatalen Kortex vorhanden und aktiviert sowohl Glyzin- als auch GABA-Rezeptoren (Horikoshi et al., 1988; Flint et al., 1998; Jia et al., 2008). Taurin kann nach Depolarisation, tetanischer elektrischer Stimulation und nach einem hypoosmotischen Schock ausgeschüttet werden (Flint et al., 1998). Ebenso wie GABA stimuliert Taurin die kortikale Zellbewegung (Behar et al., 2001) und ein Taurinentzug führt *in vivo* zu Migrationsdefekten im Zerebellum (Sturman et al., 1985a; Sturman et al., 1985b). Immunhistochemische Färbungen mit einem Taurin-spezifischen Antikörper zeigten, dass Taurin im gesamten Kortex mit Ausnahme der VZ in E19-Rattenembryonen vorhanden ist (Flint et al., 1998).

Während GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren eine sehr hohe Affinität für GABA besitzen, kann nur eine sehr hohe Taurin-Konzentration die GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren aktivieren (EC<sub>50</sub> = 5 mM) (Ochoa-de la Paz et al., 2008). Taurin ist zwar in hoher Konzentration in der IZ vorhanden, aber eventuell nicht ausreichend, um über die Aktivierung von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren die Migration zu kontrollieren. Jedoch wurde bereits viel über die Interaktionen zwischen Taurin und GABA-Rezeptoren publiziert. Beispielsweise werden die  $\rho_1$ -Untereinheiten von GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren in der humanen Retina abhängig von der Taurinkonzentration modifiziert (Ochoa-de la Paz et al., 2008). In hippokampalen Schnitten wiederum wird die Taurin-Ausschüttung konzentrationsabhängig durch Aktivierung von GABA<sub>B</sub>- und GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren moduliert (Saransaari und Oja, 2000).

Da weder der Phänotyp der GAD65/67-*knockout*-Mäuse (Ji et al., 1999), noch der Phänotyp der Glyzinrezeptor- $\alpha_2$ -*knockout*-Mäuse (Young-Pearse et al., 2006) eine Migrationsstörung zeigt, jedoch die Kombination aus beiden Mutationen zu einem starken Migrationsdefekt führt (Information von Professor Fukuda, *Hamamatsu University School of Medicine*, Hamamatsu, Japan), ist es wahrscheinlich, dass die fehlende Aktivierung eines Faktors durch Aktivierung des anderen kompensiert werden kann. Auch das Zusammenspiel von GABA und Taurin weist darauf hin, dass ein endogener Agonist den anderen ersetzen könnte. Zusammen mit den NMDA-Rezeptoren bilden GABA<sub>A</sub>-, GABA<sub>B</sub>-, GABA<sub>C</sub>- und Glyzinrezeptoren ein raffiniertes Netzwerk zur aktivitätsabhängigen Regulation der radialen Migration.

## 7. Zusammenfassung

Für die Entwicklung des zerebralen Kortex ist die radiale Migration von Neuronen von elementarer Bedeutung. Bei der Kontrolle der radialen Migration spielen extrazelluläre Signale, die mit den Neuronen interagieren und über intrazelluläre Signalwege eine Umgestaltung des Zytoskeletts vermitteln, eine wichtige Rolle (Ayala et al., 2007). Zu diesen extrazellulären Signalen gehört auch der Neurotransmitter GABA, der über Depolarisation der Neurone einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermittelt und über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege die Migration beeinflusst (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). Wenngleich die Rolle von  $\text{GABA}_A$ - und  $\text{GABA}_B$ -Rezeptoren während der radialen Migration durch eine Reihe von Publikationen belegt wurde (Behar et al., 2000; Behar et al., 2001; Heck et al., 2007), gab es nur indirekte Hinweise auf eine Beteiligung von  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren an der Regulation der Migration. Auch die Fragestellung, ob die im unreifen Kortex exprimierten Glyzinrezeptoren eine Rolle bei der radialen Migration spielen, wurde bislang noch nicht untersucht. Aus diesem Grund wurden im ersten Teil der vorliegenden Dissertation die Expression von  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren im immaturren zerebralen Kortex und ihre Rolle während der radialen Migration analysiert. In einem zweiten Teil wurden die Rolle von Glyzinrezeptoren und der Einfluss der potentiellen endogenen Liganden während der radialen Migration überprüft. Dazu wurden *in vitro* Migrationsanalysen,  $\text{Ca}^{2+}$ -mikrofluorimetrische Messungen sowie molekularbiologische und histologische Methoden verwendet.

Die in der vorliegenden Dissertation dargestellten Ergebnisse zeigen, dass  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren in den unteren Schichten des zerebralen Kortex auf mRNA- und Proteinebene exprimiert werden.  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren tragen nur in der IZ zu GABA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei, wohingegen  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren in der IZ und in der oberen CP  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auslösen. Unter physiologischen Bedingungen wirken  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren fördernd auf die radiale Migration.

Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Glyzinrezeptoren ebenfalls eine wichtige Rolle während der radialen Migration spielen. Unter physiologischen Bedingungen wirkt die Aktivierung dieser Rezeptoren fördernd auf die Migration. Zudem zeigten die Experimente, dass der endogene Neurotransmitter Taurin über eine Aktivierung von GABA- und Glyzinrezeptoren eine wichtige Funktion bei der Regulation der radialen Migration einnimmt.

Insgesamt bestätigen die Experimente der vorliegenden Arbeit, dass GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren tatsächlich eine wichtige migrationsfördernde Wirkung vermitteln und offenbaren, dass Glyzinrezeptoren ebenfalls an der Regulation der radialen Migration beteiligt sind. Diese Ergebnisse zeigen erneut auf, welche wichtige Rolle den klassischen Neurotransmittern bereits während der frühen Phasen der neuronalen Entwicklung zukommt.

## 8. Literaturverzeichnis

**Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann HJ, Kilb W (2007)** Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27: 8616-8627.

**Agrawal HC, Davison AN, Kaczmarek LK (1971)** Subcellular distribution of taurine and cysteinesulphinatase in developing rat brain. *Biochem J* 122: 759-763.

**Altshuler D, Lo Turco JJ, Rush J, Cepko C (1993)** Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro. *Development* 119: 1317-1328.

**Anderson SA, Marín O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001)** Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128: 353-363.

**Aprison MH, Shank RP, Davidoff RA (1969)** A comparison of the concentration of glycine, a transmitter suspect, in different areas of the brain and spinal cord in seven different vertebrates. *Comp Biochem Physiol* 28: 1345-1355.

**Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K (1996)** Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 891-895.

**Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K (1997)** Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6496-6499.

**Aubrey KR & Vandenberg RJ (2001)** N[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine (NFPS) is a selective persistent inhibitor of glycine transport. *Br J Pharmacol* 134: 1429-1436.

**Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007)** Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128: 29-43.

**Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX, Ma W, Somogyi R, Wen X, Brown E, Scott C, McKay RD, Barker JL (1997)** Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* 9: 2561-2570.

**Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL (1996)** GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 16: 1808-1818.

**Behar TN, Schaffner AE, Colton CA, Somogyi R, Olah Z, Lehel C, Barker JL (1994)** GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J Neurosci* 14: 29-38.

**Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000)** GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* 10: 899-909.

**Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998)** Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J Neurosci* 18: 6378-6387.

**Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen XL, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999)** Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 19: 4449-4461.

**Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker AL (2001)** GABA<sub>B</sub> receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb Cortex* 11: 744-753.

**Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C (2005)** Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration

of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25: 5691-5699.

**Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa J-L (1989)** Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 416: 303-325.

**Bentivoglio M & Mazzarello P (1999)** The history of radial glia. *Brain Res Bull* 49: 305-315.

**Betz H, Gomeza J, Armsen W, Scholze P, Eulenburg V (2006)** Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans* 34: 55-58.

**Billups D, Hanley JG, Orme M, Attwell D, Moss SJ (2000)** GABAC receptor sensitivity is modulated by interaction with MAP1B. *J Neurosci* 20: 8643-8650.

**Bolteus, AJ & Bordey, A (2004).** Ambient GABA reduces the migration rate of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone. *FENS Abstr.* 2, 211.3.

**Bormann J (2000)** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21: 16-19.

**Bormann J & Feigenspan A (1995)** GABAC receptors. *Trends Neurosci* 18: 515-519.

**Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D (1993)** Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J* 12: 3729-3737.

**Bortone D & Polleux F (2009)** KCC2 Expression Promotes the Termination of Cortical Interneuron Migration in a Voltage-Sensitive Calcium-Dependent Manner. *Neuron* 62: 53-71.

**Bronner-Fraser M (1994)** Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J* 8: 699-706.

**Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T, Reiner O (2000)** Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet* 9: 2205-2213.

**Chen L, Muhlhauser M, Yang CR (2003)** Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol* 89: 691-703.

**Citi S & Kendrick-Jones J (1987)** Regulation of non-muscle myosin structure and function. *Bioessays* 7: 155-159.

**Clark RM & Collins GG (1976)** The release of endogenous amino acids from the rat visual cortex. *J Physiol* 262: 383-400.

**Clayton GH, Owens GC, Wolff JS, Smith RL (1998)** Ontogeny of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporter expression in rat neocortex. *Dev Brain Res* 109: 281-292.

**Collins GC & Topiwala SH (1974)** Proceedings: The release of (14C)-taurine from slices of rat cerebral cortex and spinal cord evoked by electrical stimulation and high potassium ion concentrations. *Br J Pharmacol* 50: 451P-452P.

**Condeelis J (1993)** Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 9: 411-444.

**Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN (2003)** The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4: 784-793.

**Creutzfeldt OD (1983)** *Cortex Cerebri - Leistung, strukturelle und funktionelle Organisation der Hirnrinde*. Springer-Verlag.

**Cuzon VC, Yeh PW, Cheng Q, Yeh HH (2006)** Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex* 16: 1377-1388.

**Darcy DP & Isaacson JS (2009)** L-Type Calcium Channels Govern Calcium Signaling in Migrating Newborn Neurons in the Postnatal Olfactory Bulb. *J Neurosci* 29: 2510-2518.

**De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996)** Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16: 6146-6156.



**Dehmelt L & Halpain S (2004)** Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58: 18-33.

**Dhavan R & Tsai LH (2001)** A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 749-759.

**Dominy J, Jr., Thinschmidt JS, Peris J, Dawson R, Jr., Papke RL (2004)** Taurine-induced long-lasting potentiation in the rat hippocampus shows a partial dissociation from total hippocampal taurine content and independence from activation of known taurine transporters. *J Neurochem* 89: 1195-1205.

**Dresbach T, Nawrotzki R, Kremer T, Schumacher S, Quinones D, Kluska M, Kuhse J, Kirsch J (2008)** Molecular architecture of glycinergic synapses. *Histochem Cell Biol* 130: 617-633.

**Enz R, Brandstatter JH, Wassle H, Bormann J (1996)** Immunocytochemical localization of the GABA<sub>C</sub> receptor rho subunits in the mammalian retina. *J Neurosci* 16: 4479-4490.

**Feigenspan A & Bormann J (1994)** Differential pharmacology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol* 288: 97-104.

**Flint AC, Liu XL, Kriegstein AR (1998)** Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20: 43-53.

**Foos TM & Wu JY (2002)** The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem Res* 27: 21-26.

**Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006)** Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 7: 259-267.

**Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA (1998)** Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21: 1315-1325.

**Frazao R, Nogueira MI, Wassle H (2007)** Colocalization of synaptic GABA(C)-receptors with GABA (A)-receptors and glycine-receptors in the rodent central nervous system. *Cell Tissue Res* 330: 1-15.

**Frotscher M (1997)** Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res* 290: 315-322.

**Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Forster E, Zhao S (2009)** Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *J Neural Transm.*

**Fukui M, Nakamichi N, Yoneyama M, Ozawa S, Fujimori S, Takahata Y, Nakamura N, Taniura H, Yoneda Y (2008)** Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain. *J Cell Physiol* 216: 507-519.

**Gall JG & Pardue ML (1969)** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63: 378-383.

**Gascon E, Dayer AG, Sauvain MO, Potter G, Jenny B, De Roo M, Zraggen E, Demarex N, Muller D, Kiss JZ (2006)** GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *J Neurosci* 26: 12956-12966.

**Gonzalez-Billault C, Del Rio JA, Urena JM, Jimenez-Mateos EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simo S, Torre AL, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Avila J (2005)** A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex* 15: 1134-1145.

**Götz M (1995)** Getting there and being there in the cerebral cortex. *Experientia* 51: 301-316.

**Götz M & Huttner WB (2005)** The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777-788.

**Götz M & Sommer L (2005)** Cortical development: the art of generating cell diversity. *Development* 132: 3327-3332.

**Greene ND & Copp AJ (2009)** Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn* 29: 303-311.

**Gressens P (2005)** Neuronal migration disorders. *J Child Neurol* 20: 969-971.

**Hanganu IL, Okabe A, Lessmann V, Luhmann HJ (2009)** Cellular mechanisms of subplate-driven and cholinergic input-dependent network activity in the neonatal rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 19: 89-105.

**Hanley JG, Koulen P, Bedford F, Gordon-Weeks PR, Moss SJ (1999)** The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397: 66-69.

**Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002)** Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5: 405-414.

**Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M (2001)** Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229: 15-30.

**Hartmann K, Stief F, Draguhn A, Frahm C (2004)** Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. *Eur J Pharmacol* 497: 139-146.

**Hartwig JH & Yin HL (1988)** The organization and regulation of the macrophage actin skeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 10: 117-125.

**Harvey VL, Duguid IC, Krasel C, Stephens GJ (2006)** Evidence that GABA rho subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 577: 127-139.

**Hatten ME (1999)** Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22: 511-539.

**Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann HJ (2007)** GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. *Cereb Cortex* 17: 138-148.

**Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002)** Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109: 451-460.

**Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2000)** Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* 26: 93-96.

**Horikoshi T, Asanuma A, Yanagisawa K, Anzai K, Goto S (1988)** Taurine and beta-alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse brain messenger RNA. *Brain Res* 464: 97-105.

**Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F (1997)** Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 502: 609-621.

**Huxtable RJ, Laird HE, Lippincott SE (1979)** The transport of taurine in the heart and the rapid depletion of tissue taurine content by guanidinoethyl sulfonate. *J Pharmacol Exp Ther* 211: 465-471.

**Ji F, Kanbara N, Obata K (1999)** GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both the isoforms of glutamic acid decarboxylase. *Neurosci Res* 33: 187-194.

**Jia F, Yue M, Chandra D, Keramidas A, Goldstein PA, Homanics GE, Harrison NL (2008)** Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. *J Neurosci* 28: 106-115.

**Jimenez D, Lopez-Mascaraque LM, Valverde F, de Carlos JA (2002)** Tangential migration in neocortical development. *Dev Biol* 244: 155-169.

**Jimenez-Mateos EM, Wandosell F, Reiner O, Avila J, Gonzalez-Billault C (2005)** Binding of microtubule-associated protein 1B to LIS1 affects the interaction between dynein and LIS1. *Biochem J* 389: 333-341.

**Johnston GA (1996)** GABA<sub>C</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci* 17: 319-323.

**Jursky F & Nelson N (1996)** Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain. *J Neurochem* 67: 336-344.

**Kaila K (1994)** Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42: 489-537.

**Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A (2005)** A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7: 1167-1178.

**Kandel, Schwartz JH, Jessel TM (1996)** Neurowissenschaften- Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag

**Khazipov R & Luhmann HJ (2006)** Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of human and rodents. *Trends in Neurosciences* 29: 414-418.

**Kholmanskikh SS, Koeller HB, Wynshaw-Boris A, Gomez T, Letourneau PC, Ross ME (2006)** Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci* 9: 50-57.

**Kilb W, Hanganu IL, Okabe A, Sava BA, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Luhmann HJ (2008)** Glycine receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 100: 698-707.

**Kilb W, Ikeda M, Uchida K, Okabe A, Fukuda A, Luhmann HJ (2002)** Depolarizing glycine responses in Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. *Neuroscience* 112: 299-307.

**Komuro H & Kumada T (2005)** Ca<sup>2+</sup> transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium* 37: 387-393.

**Komuro H & Rakic P (1993)** Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260: 95-97.

**Komuro H & Rakic P (1998)** Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations. *J Neurobiol* 37: 110-130.

**Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakic P (2001)** Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 21: 527-540.

**Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB (2003)** Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 541-564.

**Kriegstein AR (2005)** Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. *Epilepsia* 46 Suppl 7: 15-21.

**Kriegstein AR & Noctor SC (2004)** Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27: 392-399.

**Kubo T, Takano A, Tokushige N, Miyata N, Sato M, Hatakeyama S (1992)** Electrical stimulation-evoked release of endogenous taurine from slices of the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum of the rat. *J Pharmacobiodyn* 15: 519-525.

**Kusama T, Spivak CE, Whiting P, Dawson VL, Schaeffer JC, Uhl GR (1993)** Pharmacology of GABA rho 1 and GABA alpha/beta receptors expressed in *Xenopus* oocytes and COS cells. *Br J Pharmacol* 109: 200-206.

**Lambert de Rouvroit C & Goffinet AM (2001)** Neuronal migration. *Mech Dev* 105: 47-56.

**Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH (1992)** The distribution of thirteen GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 12: 4151-4172.

**Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999)** The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19: 7881-7888.

**Lawson MA & Maxfield FR (1995)**  $Ca^{2+}$  and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377: 75-79.

**Lechner SM (2000)** Novel glycine transporter 2 inhibitors are analgesic in a rat model of inflammatory pain. *Abstr. Soc. Neurosci.*

**Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K (1999)** Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400: 382-386.

**Leite JF & Cascio M (2001)** Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. *Mol Cell Neurosci* 17: 777-792.

**Lewis DA (2004)** Structure of the human prefrontal cortex. *Am J Psychiatry* 161: 1366.

**Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z (2003)** Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex* 13: 932-942.

**LoTurco JJ & Bai J (2006)** The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci* 29: 407-413.

**Luhmann HJ & Prince DA (1991)** Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65: 247-263.

**Luo L (2000)** Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1: 173-180.

**Ma W & Barker JL (1998)** GABA, GAD, and GABA(A) receptor alpha4, beta1, and gamma1 subunits are expressed in the late embryonic and early postnatal neocortical germinal matrix and coincide with gliogenesis. *Microsc Res Tech* 40: 398-407.

**Maar T, Moran J, Schousboe A, Pasantés-Morales H (1995)** Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int J Dev Neurosci* 13: 491-502.

**Macdonald RL & Olsen RW (1994)** GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17: 569-602.

**Mallorga PJ, Williams JB, Jacobson M, Marques R, Chaudhary A, Conn PJ, Pettibone DJ, Sur C (2003)** Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl]) sarcosine. *Neuropharmacology* 45: 585-593.

**Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991)** Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10: 2401-2409.

**Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2005)** A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25: 4755-4765.

**Marín O & Rubenstein JL (2003)** Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26: 441-483.

**Marín O & Rubenstein JLR (2001)** A long, remarkable journey: Tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2: 780-790.

**Marty S, Wehrlé R, Alvarez-Leefmans FJ, Gasnier B, Sotelo C (2002)** Postnatal maturation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci* 15: 233-245.

**Merot Y, Retaux S, Heng JI (2009)** Molecular mechanisms of projection neuron production and maturation in the developing cerebral cortex. *Semin Cell Dev Biol* 20: 726-734.

**Metin C, Vallee RB, Rakic P, Bhide PG (2008)** Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J Neurosci* 28: 11746-11752.

**Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000)** Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9: 1415-1423.



**Miller MW, Nowakowski RS (1988)** Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res* 457: 44-52.

**Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA (2004)** Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA-A and GABA-C receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci* 24: 9241-9250.

**Misson JP, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS, Jr. (1991)** The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1: 221-229.

**Monuki ES & Walsh CA (2001)** Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. *Nat Neurosci* 4 Suppl: 1199-1206.

**Moran J, Maar TE, Pasantés-Morales H (1994)** Impaired cell volume regulation in taurine deficient cultured astrocytes. *Neurochem Res* 19: 415-420.

**Morris NR, Efimov VP, Xiang X (1998)** Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* 8: 467-470.

**Mountcastle VB (1997)** The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 ( Pt 4): 701-722.

**Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992)** NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211.

**Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001)** Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4: 143-150.

**Nadarajah B & Parnavelas JG (2002)** Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3: 423-432.

**Nguyen L, Besson A, Roberts JM, Guillemot F (2006)** Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell Cycle* 5: 2314-2318.

**Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001)** Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720.

**Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002)** Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22: 3161-3173.

**Noctor SC, Martínez-Cerdano V, Ivic L, Kriegstein AR (2004)** Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7: 136-144.

**O'Leary DD, Chou SJ, Sahara S (2007)** Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* 56: 252-269.

**O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, Jacobs AA, McConnell SK (1995)** Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 121: 2165-2176.

**Ochoa-de la Paz L, Martínez-Davila IA, Miledi R, Martínez-Torres A (2008)** Modulation of human GABA $\rho$ 1 receptors by taurine. *Neurosci Res* 61: 302-308.

**Oja SS & Saransaari P (1992)** Taurine release and swelling of cerebral cortex slices from adult and developing mice in media of different ionic compositions. *J Neurosci Res* 32: 551-561.

**Okabe A, Kilb W, Shimizu-Okabe C, Hanganu IL, Fukuda A, Luhmann HJ (2004)** Homogenous glycine receptor expression in cortical plate neurons and Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. *Neuroscience* 123: 715-724.

**Olpe HR, Karlsson G, Pozza MF, Brugger F, Steinmann M, Van Riezen H, Fagg G, Hall RG, Froestl W, Bittiger H (1990)** CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors. *Eur J Pharmacol* 187: 27-38.

**Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, Kriegstein AR (1996)** Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16: 6414-6423.

**Owens DF, Flint AC, Dammerman RS, Kriegstein AR (2000)** Calcium dynamics of neocortical ventricular zone cells. *Dev Neurosci* 22: 25-33.

**Owens DF & Kriegstein AR (1998)** Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci* 18: 5374-5388.

**Owens DF, Liu XL, Kriegstein AR (1999)** Changing properties of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated signaling during early neocortical development. *J Neurophysiol* 82: 570-583.

**Ozmen M, Yilmaz Y, Caliskan M, Minareci O, Aydinli N (2000)** Clinical features of 21 patients with lissencephaly type I (agyria-pachygyria). *Turk J Pediatr* 42: 210-214.

**Palackal T, Moretz R, Wisniewski H, Sturman J (1986)** Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J Neurosci Res* 15: 223-239.

**Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008)** Chemical calcium indicators. *Methods* 46: 143-151.

**Parnavelas JG (2000)** The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23: 126-131.

**Pasantes MH & Schousboe A (1988)** Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res* 20: 503-509.

**Pasantes-Morales H, Franco R, Ochoa L, Ordaz B (2002)** Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: relevance and mechanisms. *Neurochem Res* 27: 59-65.

**Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E (1997)** Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: A possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33: 781-795.

**Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H (1992)** The atypical M2 segment of the beta subunit confers PTXin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* 11: 4305-4311.

**Rajendra S, Lynch JW, Pierce KD, French CR, Barry PH, Schofield PR (1995)** Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms beta-alanine and taurine from agonists into competitive antagonists. *Neuron* 14: 169-175.

**Rakic P (1972)** Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145: 61-83.

**Rakic P (1988)** Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241: 170-176.

**Rakic P (1990)** Principles of neural cell migration. *Experientia* 46: 882-891.

**Rakic P, Ayoub AE, Breunig JJ, Dominguez MH (2009)** Decision by division: making cortical maps. *Trends Neurosci* 32: 291-301.

**Rees DA, Charlton J, Ataliotis P, Woods A, Stones AJ, Bayley SA (1989)** Myosin regulation and calcium transients in fibroblast shape change, attachment, and patching. *Cell Motil Cytoskeleton* 13: 112-122.

**Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993)** Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364: 717-721.

**Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003)** Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709.

**Roberts JS, O'Rourke NA, McConnell SK (1993)** Cell migration in cultured cerebral cortical slices. *Dev Biol* 155: 396-408.

**Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E (2002)** Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 15: 1747-1758.

**Saransaari P & Oja SS (1992)** Release of GABA and taurine from brain slices. *Prog Neurobiol* 38: 455-482.

**Saransaari P & Oja SS (2000)** Taurine release modified by GABAergic agents in hippocampal slices from adult and developing mice. *Amino Acids* 18: 17-30.

**Schaar BT & McConnell SK (2005)** Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13652-13657.

**Schmieden V, Kuhse J, Betz H (1992)** Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *EMBO J* 11: 2025-2032.

**Sergeeva OA (1998)** Comparison of glycine- and GABA-evoked currents in two types of neurons isolated from the rat striatum. *Neurosci Lett* 243: 9-12.

**Sergeeva OA, Chepkova AN, Haas HL (2002)** Guanidinoethyl sulphonate is a glycine receptor antagonist in striatum. *Br J Pharmacol* 137: 855-860.

**Sjaastad MD & Nelson WJ (1997)** Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays* 19: 47-55.

**Sodickson DL & Bean BP (1996)** GABAB receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* 16: 6374-6385.

**Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ (2003)** *Fundamental Neuroscience*. Academic Press

**Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991)** A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182.

**Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS (2001)** Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 138-145.

**Strohmeier R & Bereiter-Hahn J (1984)** Control of cell shape and locomotion by external calcium. *Exp Cell Res* 154: 412-420.

**Sturman JA, Lu P, Xu YX, Imaki H (1994)** Feline maternal taurine deficiency: effects on visual cortex of the offspring. A morphometric and immunohistochemical study. *Adv Exp Med Biol* 359: 369-384.

**Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM (1985a)** Postnatal taurine deficiency in the kitten results in a persistence of the cerebellar external granule cell layer: correction by taurine feeding. *J Neurosci Res* 13: 521-528.

**Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM (1985b)** Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J Neurosci Res* 13: 405-416.

**Sturman JA, Rassin DK, Gaull GE (1977)** Taurine in developing rat brain: transfer of [<sup>35</sup>S] taurine to pups via the milk. *Pediatr Res* 11: 28-33.

**Sur M & Cowey A (1995)** Cerebral cortex: function and development. *Neuron* 15: 497-505.

**Sur M & Rubenstein JL (2005)** Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science* 310: 805-810.

**Sutor B & Luhmann HJ (1998)** Involvement of GABA<sub>B</sub> receptors in convulsant-induced epileptiform activity in rat neocortex *in vitro*. *Eur J Neurosci* 10: 3417-3427.

**Tabata H & Nakajima K (2003)** Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 23: 9996-10001.

**Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1996)** Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 16: 5762-5776.

**Tapia JC, Cardenas AM, Nualart F, Mentis GZ, Navarrete R, Aguayo LG (2000)** Neurite outgrowth in developing mouse spinal cord neurons is modulated by glycine receptors. *Neuroreport* 11: 3007-3010.

**Tapia JC, Mentis GZ, Navarrete R, Nualart F, Figueroa E, Sanchez A, Aguayo LG (2001)** Early expression of glycine and GABA(A) receptors in developing spinal cord neurons. Effects on neurite outgrowth. *Neuroscience* 108: 493-506.

**Thomson AM (1989)** Glycine modulation of the NMDA receptor/channel complex. *Trends Neurosci* 12: 349-353.

**Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ayala R, Tsai LH, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A (2003)** 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* 34: 274-285.

**Waldeyer A (2002)** Anatomie des Menschen. deGruyter Verlag.

**Wang DD & Kriegstein AR (2009)** Defining the role of GABA in cortical development. *J Physiol* 587: 1873-1879.

**Watakabe A (2009)** Comparative molecular neuroanatomy of mammalian neocortex: what can gene expression tell us about areas and layers? *Dev Growth Differ* 51: 343-354.

**Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessel T, Lawrence P, Meyerowitz E (1999)** Entwicklungsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag

**Woodhams PL, Basco E, Hajos F, Csillag A, Balazs R (1981)** Radial glia in the developing mouse cerebral cortex and hippocampus. *Anat Embryol (Berl)* 163: 331-343.

**Yacubova E & Komuro H (2003)** Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochem Biophys* 37: 213-234.

**Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004)** Cl<sup>-</sup> uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557: 829-841.

**Yamakura T & Shimoji K (1999)** Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59: 279-298.

**Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T (2001)** Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 1: 717-724.

**Young-Pearse TL, Ivic L, Kriegstein AR, Cepko CL (2006)** Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol* 26: 5728-5734.

**Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J (1995)** Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 15: 3952-3969.

**Zilles K, Rehkämper G (1993)** Funktionelle Neuroanatomie. Springer-Verlag

**Internetquelle:** [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)



---

# Lebenslauf

## Zur Person

---

Name Denise Gabrielle Denter

## Schulbildung

---

1990-1999 Abitur am St. Angela Gymnasium, Note: 2,0

## Hochschulstudium (Diplom und Promotion)

---

10/1999-08/2006 Diplom-Studium Biologie, an der Technischen Universität Darmstadt, Schwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie, Spezielle Zoologie

03.08.2006 Diplom, Note: Sehr gut  
Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung eines neuen Gens aus der dachshund-Genfamilie des Zebrafisches *Danio rerio*, Fachbereich Entwicklungsbiologie, AG Layer

10/2006-12/2009 Promotion an der Universitätsmedizin Mainz  
Institut für Physiologie und Pathophysiologie, AG Luhmann

11/2006-10/2009 Kollegiatin im Graduiertenkolleg „*Entwicklungsabhängige und krankheitsinduzierte Modifikationen im Nervensystem*“ der Universität Mainz

**Vertraute Techniken**

---

*In-vitro* Migrationsstudien, Calcium-Imaging, *in situ*-Hybridisierung, Herstellung von RNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription, Klonierung, histologische Färbungen, Mikroskopie

**Publikation und Poster**

---

- Publikation      “GABA<sub>C</sub> receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex”; Neuroscience
- Poster            “Opposite roles of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors for radial migration in the mouse neocortex”, SFB665-Symposium, 11/2007 in Potsdam und FENS-Meeting, 03/2008 in Genf
- Poster            “Evidences for Glycinergic Control of Cortical Migration”, 8<sup>th</sup> Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 03/2009

## **Versicherung gemäß §11 Abs. 3d der Promotionsordnung**

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen und Materialien) in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe und hatte die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
3. Ich hatte weder die als wissenschaftliche Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung daraus bei einer anderen Fakultät bzw. bei einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den \_\_\_\_\_