



Institut für Medizin

***Neuroanatomie des Cortex cerebri
der neugeborenen Ratte***

***Einfluss glutamaterger und GABAerger Agonisten und
Antagonisten auf die strukturelle Entwicklung
der Großhirnrinde***

Petra Reiprich

Neuroanatomie des Cortex cerebri der neugeborenen Ratte

***Einfluss glutamaterger und GABAerger Agonisten und
Antagonisten auf die strukturelle Entwicklung
der Großhirnrinde***

Petra Reiprich

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4095

ISSN 0944-2952

Institut für Medizin Jül-4095

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Abstract

Neuronal migration is a fundamental event in the construction of the mammalian brain during ontogeny. Forming the six layered cortex requires the movement of postmitotic neurons from their sites of origin to their final laminar positions. This migration is essential for normal brain development and depends on the orchestration of many extra- and intracellular signals. Alterations in the mechanisms that underlie the migratory process lead to abnormal laminar organization and loss of function in the developing neocortex.

In the present study we investigated the development of the cerebral cortex of the newborn rat. In order to obtain information concerning the basic organization and neuronal differentiation, we used histological and morphometrical methods to analyze the cortical structure. The studies were performed under physiological and experimentally altered conditions.

Four principal types of neurons can be distinguished in the early developing neocortex, namely Cajal-Retzius cells, immature and bifurcated pyramidal cells, as well as subplate cells. Each cell type was analyzed morphometrically and three-dimensionally reconstructed. The shape and size of the immature pyramidal cells suggests, that these cells represent the migrating neurons. The bifurcated pyramidal cells are more differentiated, they establish their connectivity. Cajal-Retzius- and subplate cells have a differentiated dendritic system and could integrate synaptic information over a broad spatial territory. Cajal-Retzius and subplate cells might function together as an early transient network, creating a scaffold on which the cortex itself is constructed.

In the second part of the study, an animal model was established to enable the examination of altered physiological conditions on brain structure and architecture. The physiological concentrations of the neurotransmitters glutamate and GABA were changed by means of ethylene-vinyl acetate (EVA) copolymers, which enable long-term controlled release of substances. The influence of muscimol (a GABA_A receptor agonist), bicuculline, (a GABA_A receptor antagonist) and MK801 (an NMDA receptor antagonist) on the migratory process and normal brain development was investigated.

The resulting severe changes in cortical architecture were detected by means of histological and immunocytochemical methods.

Besides disorders in laminar organization affecting all cortical layers, we identified malformations of cortical layer I. Furthermore heterotopic cells that could be identified as neurons were found in lamina I.

Our observations suggest, that GABA and glutamate play an essential role in directed neuronal migration during the ontogeny of the cerebral cortex.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Entwicklung des Nervensystems	1
1.1.1.	Frühe Morphogenese: von der Keimscheibe zum Neuralrohr	1
1.1.2.	Histologische Differenzierung des Neuralrohrs	3
1.1.3.	Histogenese des Cortex cerebri	4
1.1.4.	Differenzierung der corticalen Schichten	4
1.2.	Die Migration der Nervenzellen	7
1.2.1.	Radiale und tangentielle Migration	7
1.2.2.	Entscheidende Faktoren für die Migration und die Ontogenese des cerebralen Cortex	10
1.2.3.	Migrationsstörungen und Modelle	19
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	23
1.3.1.	<i>In-vitro</i> Untersuchungen zur Morphometrie des neonatalen Cortex der Ratte	24
1.3.2.	<i>In-vivo</i> Untersuchungen zum Einfluss glutamaterger und GABAerger Agonisten und Antagonisten auf den neonatalen Cortex der Ratte	25
2.	Material und Methoden und Versuchstiere	26
2.1.	Substanzen und Chemikalien	26
2.2.	Verwendete Geräte	27
2.3.	Versuchstiere	28
2.4.	Präparation	28
2.5.	Biocytin-Färbung	29
2.6.	Morphometrische Analyse	33
2.6.1.	Camera Lucida Zeichnungen	33
2.6.2.	Datenerfassung mit Neurolucida	33
2.6.3.	Analyse der erfassten Daten	34
2.7.	Herstellung von EVA-Implantaten	35
2.8.	Messung der Substanzfreisetzung aus den EVA-Implantaten	37
2.9.	Tierversuche	37
2.10.	Histologische Untersuchungen	38
2.10.1.	Nissl-Färbungen/Kresylviolett-färbung	39
2.10.2.	Immunhistochemie	40
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Biocytin – Färbung	43
3.2.	Morphometrische Analyse	44
3.2.1.	Camera Lucida Zeichnungen	44
3.2.2.	Darstellung einer der mit Neurolucida gezeichneten Zelle	46
3.2.3.	Dendrogramme	47
3.3.	Analyse der erfassten Daten	48
3.3.1.	Oberflächen und Volumina der Somata	48

3.3.1.1.	Oberflächen	48
3.3.1.2.	Volumina	49
3.3.2.	Morphologie der Dendriten	50
3.3.2.1.	Anzahl der dendritischen Stämme	50
3.3.2.1.	Länge der Dendriten	51
3.3.2.2.	Oberfläche der Dendriten	51
3.3.2.3.	Volumen der Dendriten	52
3.3.3.	Verzweigung der Dendriten – Sholl-Analyse	53
3.3.3.1.	Cajal-Retzius Zellen	53
3.3.3.2.	Unreife Pyramidenzellen	53
3.3.3.3.	Verzweigte Pyramidenzellen	54
3.3.3.4.	Subplatezellen	54
3.3.4.	Vergleich der Gesamtoberflächen und –volumina	55
3.3.4.1.	Zelloberflächen	55
3.3.4.2.	Zellvolumen	56
3.4.	Messung der Substanzfreisetzung aus den EVA-Implantaten	57
3.4.1.	MK 801	57
3.4.2.	BMI	58
3.4.3.	Muscimol	58
3.5.	Histologische Untersuchungen	59
3.5.1.	Nissl-Färbungen/Kresylviolett – Färbungen	59
3.5.1.1.	Unoperierte Kontrolltiere	60
3.5.1.2.	DMSO	62
3.5.1.3.	MK 801	64
3.5.1.4.	BMI	68
3.5.1.5.	Muscimol	72
3.5.2.	Immunhistochemie	76
3.5.2.1.	Gliazellen	77
3.5.2.2.	Pyramidenzellen – Map 2	79
3.5.2.3.	Pyramidenzellen und GABAerge Interneurone	81
3.5.2.3.1.	NMDA-Rezeptor	81
3.5.2.3.2.	GABA	84
3.5.2.3.3.	Calcium-bindende Proteine	86
3.5.2.4.	Cajal-Retzius-Zellen	81
4.	Diskussion	93
	Zusammenfassung	104
	Abkürzungen	105
	Literaturverzeichnis	106
	Danksagungen	

1. Einleitung

Das Gehirn der Säugetiere gehört durch die unvorstellbar vielschichtige und plastische Interaktion neuronaler und nicht-neuronaler Zellen zu den komplexesten bekannten Strukturen.

Neben der Untersuchung der Informationsverarbeitung im Gehirn gehört die Erforschung pathophysiologischer Prozesse vor dem Hintergrund der häufig dramatischen Folgen solcher Abweichungen vom "Normalzustand" zu den wichtigsten aktuellen Gebieten der biomedizinischen Forschung. Eine Vielzahl dieser Abweichungen resultiert vermutlich unter anderem aus Störungen der Entwicklung des Gehirns. Für das Verständnis der Arbeitsweise des Gehirns, seiner enormen Plastizität und der möglichen Störungen ist daher das Verständnis seiner Entwicklung unabdingbar. Eng verknüpft mit dem wachsenden Verständnis der Entwicklung des Gehirns ist seit dem Beginn der Hirnforschung die Entwicklung neuer methodischer Forschungsansätze. Neben frühen deskriptiven Untersuchungen hat die fortschreitende Entwicklung experimenteller Ansätze zu einem tieferen Verständnis der Prozesse, die der Entwicklung unterliegen geführt.

In den folgenden Abschnitten sollen zunächst wesentliche strukturelle Prozesse in der Ontogenese des Gehirns, hier des Großhirns der Säugetiere, dargelegt werden. Weiterhin sollen wichtige bisher bekannte elementare Mechanismen beschrieben werden, die diesen strukturellen Veränderungen zugrunde liegen.

Im Kontext dieser Mechanismen soll anschließend die Fragestellung dieser Arbeit erläutert werden, die die Interaktion neurophysiologischer und strukturbildender Prozesse in der frühen postnatalen Großhirnentwicklung der Ratte zum übergeordneten Thema hat.

1.1. Die Entwicklung des Nervensystems

1.1.1. Frühe Morphogenese: von der Keimscheibe zum Neuralrohr

In der ontogenetischen Entwicklung der Säugetiere umgibt sich nach der Befruchtung der Keim mit einem Trophoblasten und birgt im Inneren die Blastozystenöhle sowie das Zellmaterial des Embryoblasten. Hieraus entwickelt sich die Keimscheibe. Sie besteht ursprünglich aus zwei Keimblättern, dem Ekto- und dem Entoderm. Aus dem Ektoderm entstehen im Laufe der Entwicklung der Axialfortsatz, der Primitivknoten und der Primitivstreifen, aus welchem ektodermale Zellen in die Tiefe auswandern und das dritte

Keimblatt, das Mesoderm bilden. Kurz nach der Entstehung des Axialfortsatzes wird das Ektoderm in der Nähe des Axialfortsatzes dick, lateral bleibt es dünn. Der verdickte Teil wird als Neuralplatte bezeichnet. Aus ihr geht später das gesamte ZNS hervor. Die lateralen Ränder der Neuralplatte stellen sich auf und bilden die Neuralfalten. Durch ungleiches Wachstum entsteht median über dem Axialfortsatz die Neuralrinne. Bereits jetzt lassen sich die Anlagen von Gehirn und Rückenmark unterscheiden. Im Bereich des Gehirns sind die Anlagen von Pros-, Mes- und Rhombencephalon erkennbar. Charakteristisch für die Anlage des Prosencephalons sind die weit ausladenden Neuralfalten, für das Rhombencephalon mehrere Vorwölbungen der lateralen Wand in dem späteren Ventrikelraum. Der Bereich zwischen den beiden stellt die Anlage des Mesencephalons dar. Die Neuralfalten wölben sich auf, berühren sich median und verschmelzen miteinander. So wird die Neuralrinne zum Neuralrohr umgeformt. Der Schluss des Neuralrohres erfolgt an der Mittellinie seiner Längsausdehnung und breitet sich von zahlreichen Orten entlang der anterior-posterioren Achse aus (Golden and Chernoff, 1993 ; Nievelstein *et al.* 1993; Van Allen *et al.* 1993)

Beiderseits der Mittellinie des Neuralrohrs bilden sich im dorsalen Bereich nach dessen Schluss die aus locker zusammenliegenden Zellen des Neuralrohrs und Ektoderms bestehenden Neuralleisten. Aus diesen Zellen entstehen in der weiteren ontogenetischen Entwicklung eine Vielzahl von Gewebetypen, die zum Teil die Wanderung dieser Zellen über beträchtliche Wegstrecken voraussetzen. So entstehen aus den Neuralleistenzellen z.B. das periphere Nervensystem, endokrine Zellen, Pigmentzellen der Haut und Bindegewebsstrukturen im Kopf- und Halsbereich (Kalcheim, 2000 und zur Übersicht: Erickson and Reedy, 1998).

Zu dem Zeitpunkt, an dem sich der posteriore Teil des Neuralrohres geschlossen hat, haben sich am kranialen Teil des Neuralrohres die drei primären Hirnbläschen gebildet, die die Anlagen von Pros-, Mes- und Rhombencephalon erkennen lassen (Vorder-, Mittel- und Endhirn). Das Vorderhirn lässt sich kurze Zeit später in das anterior gelegene paarige Telencephalon und das mehr caudal gelegene Diencephalon (Zwischenhirn) unterteilen. Das Mesencephalon wird nicht weiter unterteilt, aus dem Rhombencephalon gehen das Met- und Myelencephalon (Nachhirn und verlängertes Mark) hervor. Aus dem Metencephalon entstehen später Pons und Cerebellum, das Myelencephalon stellt die Medulla oblongata dar. Aus der Anlage des Telencephalons gehen das Pallium, das Corpus striatum und der Globus pallidus hervor. Aus dem Pallium entwickelt sich später der Cortex cerebri (Desmond and Schoenwolf, 1986; Super *et al.* 1998; Uylings *et al.* 1990).

1.1.2. Histologische Differenzierung des Neuralrohrs

Die Wand des Neuralrohrs besteht zunächst aus einer einzigen Schicht von Neuroepithelzellen die wegen ihrer Nähe zum Ventrikel (Flüssigkeitsraum) ventrikuläre Zellen genannt werden. Deren Fortsätze reichen von der äußeren, pialen bis zur inneren, ventrikulären Grenzmembran. Dort sind sie untereinander durch Zellkontakte verbunden. Sie bilden zusammen mit der Basalmembran die Membrana limitans externa und die Membrana limitans interna. Durch ihre Fähigkeit sich zu teilen, können sie als neuroepitheliale Keimzellen aufgefasst werden, die durch einen Zyklus der DNA-Synthese und Mitose gehen. Sie lassen sich in zwei Typen gliedern: die teilungsfähigen Vorläufer von Nervenzellen, die Neuroblasten und die teilungsfähigen Vorläufer von Gliazellen, die Glio- oder Spongioblasten. Die Proliferation von Neuronen im Neuralrohr ist regional unterschiedlich. In jeder Region der Zeitpunkt der Entstehung der Neurone und die Anzahl der pro Zeiteinheit entstehenden Neurone mehr oder weniger verschieden

Die Teilung der neuroepithelialen Keimzellen verläuft „vertikal“ statt „horizontal“, d.h. eine Tochterzelle bleibt mit der ventrikulären Oberfläche verbunden (und bleibt gewöhnlich eine Keimzelle), während die andere Tochterzelle als postmitotisches Neuron zu migrieren beginnt (Chenn and McConnell, 1995; Fujita, 1996; Sauer, 1935).

Die am Lumen des Neuralrohres verbliebenen Zellen teilen sich weiter, während die migrierenden Neurone eine sich stetig verbreiternde neue Schicht um das Neuralrohr bilden, diese wird „Preplate“, oder frühe Marginalzone genannt (auch PPL: primordial plexiform layer). Die Schicht der neuroepithelialen Keimzellen wird jetzt Ventrikulärzone genannt (Angevine and Sidman, 1961; Hicks and D'Amato, 1968; Jakobson, 1991; Meyer *et al.* 1998; Uylings *et al.*, 1990).

Die Zellen der Preplate differenzieren zu Neuronen und Gliazellen und bilden später die graue Substanz. Sie stellen Verbindungen untereinander her und senden Axone weg vom Lumen, hierbei entsteht eine zellarme Schicht, die Intermediärzone (IZ), die später die weiße Substanz darstellt. Diese drei Schichten bleiben in der Medulla oblongata und dem Rückenmark erhalten, während sich im übrigen Gehirn durch weitere Migrationsvorgänge, differenzielle neuronale Proliferation und sekundären Zelltod Modifikationen der dreischichtigen Struktur ergeben (Marin-Padilla, 1972). Das Cerebellum beispielsweise besteht im adulten Zustand aus drei Schichten, während der cerebrale Cortex sechs Schichten aufweist.

1.1.3. Histogenese des Cortex cerebri

Die Entwicklung des Cortex cerebri verläuft in mehreren Phasen. Ausgehend von der dreischichtigen Struktur, der Ventrikulärzone, der Intermediärzone und der frühen Marginalzone (Preplate), bildet sich durch weitere Migration von postmitotischen Neuronen eine neue Schicht zwischen der Preplate und der IZ, die corticale Platte (CP). Hier sind die Zellen dicht gepackt und radiär angeordnet. Die Ventrikulärzone teilt sich ebenfalls und besteht jetzt aus einer inneren, Ventrikulärzone (mit extremer Zellkörperdichte) und einer äußeren Subventrikulärzone (mit geringerer Zelldichte) (Angevine and Sidman, 1961; Hicks and D'Amato, 1968; Meyer *et al.* 2001; Meyer, 2000; Super *et al.* 2001; Super and Uylings, 1998). Von hier aus wandern weitere postmitotische Neurone entlang von Radialgliafasern in die corticale Platte ein (Edmondson and Hatten, 1987; Hatten, 1990), wo sie sich nach Erreichen ihres Bestimmungsortes differenzieren und synaptische Konnektivitäten ausbilden (Rakic, 1972).

Die corticale Platte entwickelt sich, wie beschrieben, innerhalb der Preplate und spaltet diese in die oben liegende Marginalzone (spätere Schicht I) und die unterhalb liegende Subplate (Kostovic and Rakic, 1990; Marin-Padilla, 1971; Shatz *et al.* 1989). Subplatezellen haben die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von ausdifferenzierten Neuronen und verarbeiten synaptische Information, die von den einwachsenden thalamo-corticalen und cortico-corticalen Afferenzen kommt, sowie von benachbarten Subplatezellen (Shatz *et al.* 1990). Sie selbst haben Afferenzen in die corticale Platte und projizieren auch in den Thalamus und den Colliculus superior (McConnell *et al.* 1989). Einwachsende Axone innervieren zunächst die Zellen der Subplate, bevor sie in die späteren Schichten eintreten (Shatz *et al.* 1990). Einige Subplatezellen gehen vermutlich durch Apoptose zugrunde, einzelne verbleiben in Schicht VI und manche gehen als interstitielle Zellen in die weiße Substanz ein. (Finney *et al.* 1998; Woo *et al.* 1991).

1.1.4. Differenzierung der corticalen Schichten

In nachfolgender Abbildung wird die Cortexentwicklung der Ratte vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Erwachsenenalter dargestellt.

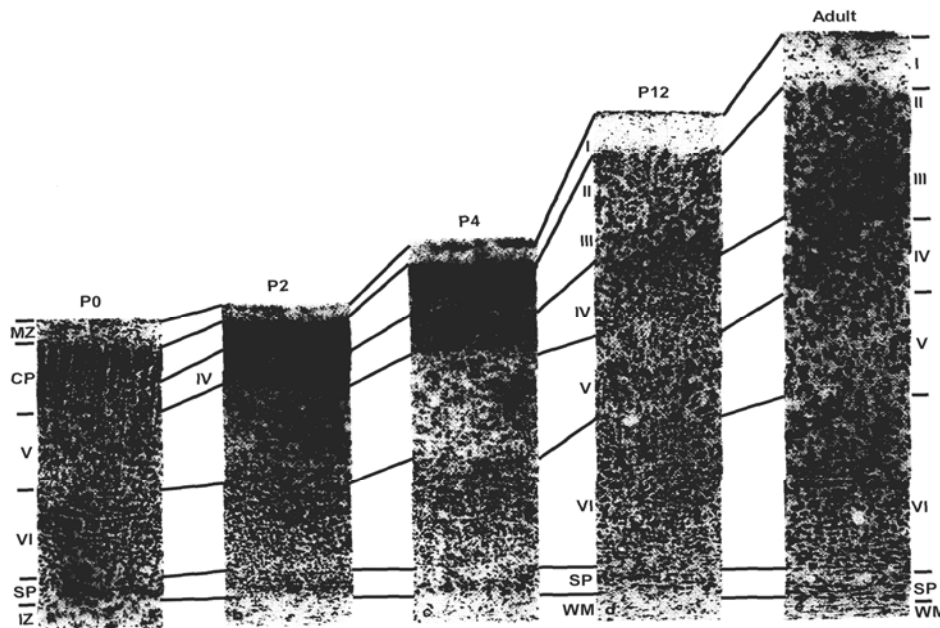


Abb. 1.1: Die Cortextentwicklung der Ratte aus (Kageyama and Robertson, 1993)

CP=corticale Platte, IZ=Intermediärzone, MZ=Marginalzone, SP=Subplate, WM=weiße Substanz

Am Tag P0 (Tag der Geburt) können bei Ratten die Schichten VI, V und die Marginalzone (die spätere Schicht I) unterschieden werden, dazwischen liegt die corticale Platte. In ihr befinden sich die unreifen migrierenden Neuronen und Zellen, die bereits an ihrem Bestimmungsort angekommen sind, sich weiter differenzieren und Konnektivitäten ausbilden. Zwei Tage nach der Geburt ist bereits Schicht IV ausgebildet, die corticale Platte wird dünner. Migration findet immer noch statt. Am Tag P6-P8 lassen sich alle sechs Schichten des adulten Cortex unterscheiden. Die Migration der postmitotischen Neurone nimmt ab während die Differenzierung und Synaptogenese rasch fortschreitet (Caviness Jr, 1982; Ignacio *et al.* 1995; Lorente de Nó, 1949; Miller, 1988; Parnavelas *et al.* 1983; Rice *et al.* 1985).

Der cerebrale Cortex wird von zwei Klassen von Nervenzellen aufgebaut, dies sind Pyramidenzellen und nicht-Pyramidenzellen, wobei es sich zum Großteil um Interneurone. Pyramidenzellen besitzen ein pyramidenförmiges Soma, einen Hauptdendriten (apikaler Dendrit), von dem zahlreiche oblique Dendriten abgehen. Der apikale Dendrit ist in Richtung der pialen Oberfläche orientiert. Alle Dendriten zeigen einen dichten Besatz mit Dornfortsätzen, den Spines. Nach unten gehen vom Soma die basalen Dendriten ab, sowie vom Axonhügel ausgehend, das Axon, welches zahlreiche Kollateralen bildet. Pyramidenzellen bilden den zahlenmäßig höchsten Anteil an Neuronen im Cortex,

Interneurone und Sternzellen (also nicht-Pyramidenzellen) haben einen wesentlich geringeren Anteil. Während Pyramidenzellen klar durch ihren Zellkörper und ihr relativ einheitliches dendritisches Verzweigungsmuster charakterisiert werden können, bilden die Interneurone eine uneinheitliche Gruppe, die eine Vielzahl von Morphologien und Subpopulationen zeigen (Dori and Parnavelas, 1996; Dori *et al.* 1989; Feldmann, 1984; Hill *et al.* 2001; Jones, 1990; Parnavelas *et al.* 1983; Ramón y Cajal, 1990).

Interneuronen fehlt der apikale Dendrit, die Dendriten gehen direkt vom Soma ab und verzweigen sich in ihren proximalen Abschnitten. Das Axon kann überall vom Soma abgehen und verzweigt sich dann stark in der Nähe der Zelle. Es sind zahlreiche Interneurone beschrieben worden, unter ihnen zum Beispiel Korbzellen, Kandelaberzellen, Doppelbuschzellen und Martinotti-Zellen (Gupta *et al.* 2000; Hof *et al.* 1999; Houser *et al.* 1984; Marin-Padilla, 1972; Mrzljak *et al.* 1988).

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit sind im Folgenden genannte Zelltypen, die während der Cortexentwicklung der Ratte im Zeitraum von P0 bis P8 auftreten.

Die Zellen der Schicht I / Cajal-Retzius-Zellen (CR):

In der Marginalzone und der späteren Schicht I finden sich zunächst sogenannte „Pionierzellen“ (pioneer neurons). Hier unterscheidet man Reelin-exprimierende Neurone (kleine Zellen in der Marginalzone) und welche, die kein Reelin exprimieren (größere Zellen). Sie befinden sich in frühen Stadien der Entwicklung in der Preplate (Frotscher, 1997; Hu, 2001; Meyer *et al.* 2000; Meyer *et al.* 1999).

Cajal-Retzius Zellen, die Reelin exprimieren und später in der Entwicklung entstehen. Sie wandern über tangentielle Migration in die Marginalzone ein (Meyer *et al.* 1999). Die Somata, Dendriten und Axone der Zellen liegen zwischen der pialen Oberfläche und der corticalen Platte. Sie sind bipolar, besitzen einen Hauptdendriten und ein Axon, die jeweils an entgegengesetzten Polen der Zelle entspringen. Das Soma ist ellipsoid, länglich und horizontal orientiert (Super *et al.* 2000; Zecevic and Rakic, 2001).

Unreife Pyramidenzellen (IP) befinden sich in der corticalen Platte. Aufgrund ihrer Morphologie wird davon ausgegangen, dass es sich bei ihnen um die migrierenden Neurone handelt. Es sind bipolare Zellen, das Soma ist oval. Die Zellen besitzen einen kleinen apikalen Dendriten. Basale Dendriten sind nicht vorhanden, oder beginnen gerade erst auszuwachsen. Die Dendriten sind für gewöhnlich nicht, oder nur wenig verzweigt. Das Axon ist, wenn vorhanden, kurz. Sie stellen die undifferenzierte Form der verzweigten Pyramidenzellen dar (Marin-Padilla, 1992; Marin-Padilla, 1972).

Die Verzweigten Pyramidenzellen (BP) befinden sich ebenfalls in der corticalen Platte und in den Schichten V und VI des cerebralen Cortex. Sie entsprechen dem Typ der Pyramidenzelle im adulten Cortex, sind jedoch weniger differenziert und erheblich kleiner als diese. s. S 4.

Die Gruppe der Subplatezellen (SP) sind in der sog. Subplate lokalisiert, die ein Band dicht gepackter Zellen darstellt, welche in zwei oder drei Reihen unmittelbar über der weißen Substanz liegen. Die Morphologie der Somata ist vielgestaltig, sie kann von ellipsoid bis pyramidenähnlich reichen. Häufig hat es die Form einer invertierten Pyramide. Es handelt sich im allgemeinen um multipolare Zellen, teilweise jedoch sind es auch bipolare Zellen, die in diesen Fällen horizontal orientiert sein können. Subplatezellen haben ein ausgeprägtes dendritisches System. Sie besitzen mehrere dendritische Stämme, die sich reich verzweigen und in viele Richtungen orientiert sind. Ein großer Dendrit entspringt dem Apex der Zelle und ist in Richtung der darunter liegenden weißen Substanz orientiert. Das Axon projiziert in die weiße Substanz, zu Neuronen der corticalen Platte oder anderen Subplatezellen (Kristt, 1978; Marin-Padilla, 1972; Mrzljak *et al.* 1992; Valverde *et al.* 1989).

1.2. Die Migration der Nervenzellen

1.2.1. Radiale und tangentielle Migration

Sowohl die GABAergen Interneurone, als auch die Pyramidenzellen erreichen über Migration ihren Bestimmungsort im cerebralen Cortex. Beide Klassen von Neuronen haben ihren Ursprung in der Ventrikulärzone des sich entwickelnden Telencephalons (vgl. 1.1.2.). Die corticalen Pyramidenzellen migrieren nach ihrer letzten mitotischen Teilung aus den dorsalen (corticalen) Teilen der Ventrikulärzone entlang der Radiärfaserglia in Richtung pialer Oberfläche und bilden dort die corticale Platte (vgl. 1.1.3). Die Radiärfaserglia ist zu diesem Zeitpunkt durch den gesamten Cortex von der VZ bis zur pialen Oberfläche aufgespannt. Mehrere Zellen wandern in Kolumnen an jeweils einer Gliazelle hintereinander hoch und bilden in der CP eine vertikal orientierte Zellsäule die sich über die späteren Schichten II - VI des Isocortex erstreckt. (Edmondson and Hatten, 1987; Hatten, 1999; Hatten, 1990; O'Rourke *et al.* 1992; Rakic, 1972; Sidman and Rakic, 1973; Walsh and Cepko, 1993). Da diese von der Radialglia geleitete Migration eine beliebige seitliche Verteilung von Neuronen verhindert, könnte die Position der Zellen im Cortex und damit auch die Lage zukünftiger corticaler Areale schon durch den Entstehungsort in

der VZ definiert werden (Rakic, 1988; Shatz, 1992) vgl. hierzu auch Genetische Kontrolle S. 10. Nachfolgende Abbildung soll den Migrationsvorgang verdeutlichen:

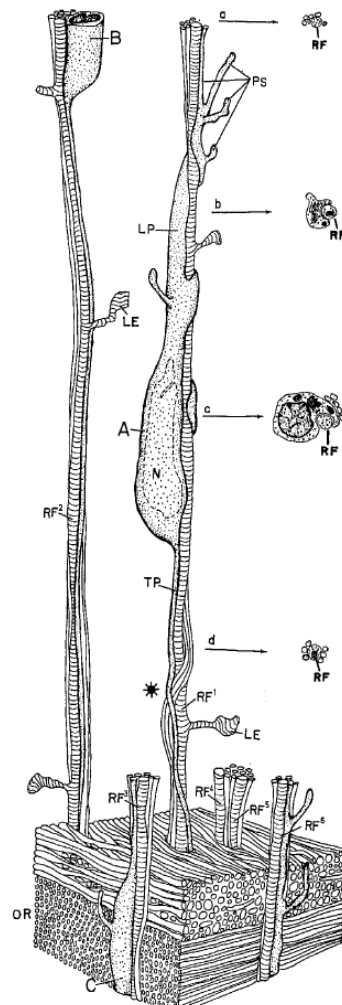


Abb. 1.2: Migration eines Neurons entlang einer Radialgliafaser (Rakic, 1972).

A=Zellsoma, LP=führender Fortsatz, N=Nucleus, RF=Radialgliafaser, TP=nachfolgender Fortsatz.

Sehr stark vereinfacht lässt sich der Migrationsvorgang folgendermaßen beschreiben: das migrierende Neuron liegt an der Radialgliafaser an. Der führende Fortsatz ist in Richtung pialer Oberfläche orientiert, darunter liegt das Soma, in Richtung der unteren Corteschichten befindet sich der nachfolgende Fortsatz. Die Migration erfolgt indem sich der führende Fortsatz mit Filopodien weiter nach oben erstreckt. Ist dies erfolgt, wird das Soma ebenfalls in Richtung pialer Oberfläche verlagert. Abschließend folgt der nachfolgende Fortsatz (Edmondson and Hatten, 1987; Hatten, 1990; Rakic, 1972). Eine Reihe von Faktoren, wie zum Beispiel Elemente des Cytoskeletts und deren Abhängigkeit

von der Calciumkonzentration (Komuro and Rakic, 1996; Rakic *et al.* 1996), Adhäsions- und Erkennungsproteine, sowie Wachstumsfaktoren und viele mehr, sind für die geordnete Migration und Ontogenese des Cortex wichtig (zur Übersicht: Rakic *et al.* 1994). Die GABAergen Zellen wandern während der Embryogenese aus dem lateralen und medialen Ganglienhügel tangential in die verschiedenen Areale des sich entwickelnden Cortex ein. Die ersten GABAergen Zellen lassen sich in der in der MZ nachweisen. Eine Gruppe davon sind die Cajal-Retzius-Zellen (Anderson *et al.* 1997; Meyer *et al.* 1998; Parnavelas, 2000; Super *et al.* 1998; Zecevic and Milosevic, 1997). Das tangentielle Verteilungsmuster ist abhängig von der Migration der Vorläuferzellen und der postmitotischen Neurone. Die laminäre Verteilung scheint, neben dem Zeitpunkt der Entstehung der Zellen, auch durch die Zellzyklen selbst beeinflusst zu werden (Rakic, 1995; Takahashi *et al.* 1999).

Nähere Informationen zur tangentialen Migration und Verteilung der GABAergen Zellen geben: (Fishell *et al.* 1993; Hatten, 1993; O'Rourke *et al.*, 1994; O'Rourke *et al.* 1992; Reid *et al.* 1995; Tamamaki *et al.* 1997; Tan and Breen, 1993; Tan *et al.* 1998; Walsh and Cepko, 1993; Walsh and Cepko, 1988).

Klar ist jedoch bislang nicht, ob die Zellen senkrecht zur Radiärfaserglia wandern, wobei die Axone Kontakte zu den einzelnen Fasern herstellen. Da es sich jedoch um einen Prozentsatz von mindestens 30% aller Zellen handelt, ist dies als einziges Substrat für tangentielle Migration relativ unwahrscheinlich (Bayer *et al.* 1991; O'Rourke *et al.* 1995). Weitere Möglichkeiten bestehen in der Migration entlang tangential orientierter Gliafasern, tangential orientierter Axone (Hatten, 1993), oder über Oberflächenkontakte zu benachbarten Zellen. Wichtig hierbei ist das Molekül DM-GRASP, ein Protein, das Zell-Zell-Interaktionen ermöglicht (Heffron and Golden, 2000). Die Entwicklung der Phänotypen der Neurone (Pyramidenellen oder Interneuron) sind entweder schon in den Vorläuferzellen festgelegt, oder multipotente Zellen könnten, abhängig von den Umgebungsbedingungen einen von beiden Phänotypen ausbilden (Arimatsu *et al.* 1999; Hatten, 1993; Park *et al.* 1999; Tan *et al.*, 1998). Die extrazelluläre Matrix und Wachstumsfaktoren, die in benachbarten Zellen sezerniert werden, spielen hierbei eine wichtige Rolle (Goffinet, 1984; Nakanishi, 1983; Streuli, 1999).

Eine weitere Besonderheit des Migrationsprozesses ist das sogenannte „*inside-to-outside-layering*“, d.h., die früh entstandenen Neuronen sind im adulten Cortex in den tiefen Schichten lokalisiert, die später entstandenen in den oberen Schichten. Dies bedeutet, dass postmitotische Neurone während der Migration zu ihren Bestimmungsorten, durch die

dicht mit Neuronen gepackte corticale Platte, an schon etablierten Zellen vorbei wandern müssen. Sie nehmen dann die Position ein, die am dichtesten an der Marginalzone gelegen ist (Allendoerfer and Shatz, 1994; McConnell *et al.* 1994).

Die Nervenzellen dieser Region - die Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone/späteren Schicht I und weitere Zellen in den tieferen Cortexschichten - sezernieren das Protein Reelin. Dies wirkt repulsiv auf die ankommenden Neurone und dient somit als Stop-Signal für die Migration. Durch einen Ausfall dieses Stop-Signals entstehen typische Störungen der corticalen Architektur (vgl. 1.3.4).

1.2.2. Entscheidende Faktoren für die Migration und die Ontogenese des cerebralen Cortex

Genetische Kontrolle

Nach Bildung der drei primären Hirnbläschen, die die Anlagen für das Pros-, Mes- und Rhombencephalon darstellen, entstehen aus dem Prosencephalon das Diencephalon und die beiden paarigen Endhirnbläschen (Telencephalon, vgl. hierzu auch 1.1.1).

Diese Vorgänge werden unter anderem von Otx und Gbx Genen gesteuert, die für die am frühesten exprimierten Transkriptionsfaktoren im Neuroectoderm codieren. Diese bewirken eine Differenzierung des Gewebes in einer anterior-posteriore Achse, wobei Otx2 für die Entwicklung des Vorder- und Mittelhirns, Gbx für die des Endhirns zuständig ist (Li and Joyner, 2001; Tian *et al.* 2002). Für die dorso-ventrale Einteilung des Telencephalons ist, neben anderen, BF-1 (brain factor 1), ein anderer Transkriptionsfaktor zuständig. Er beeinflusst entscheidend die Entwicklung der beiden Hemisphären (Dou *et al.* 1999). Nach Induktion des Telencephalons entwickelt sich ein dorsaler (Pallium) und ein ventraler Teil (Subpallium). Für diesen Prozess sind einige Transkriptionsfaktoren wie Neuogenin (Ngn) 1 und 2 wichtig. Sie werden selektiv von den Vorläuferzellen des dorsalen Telencephalons exprimiert. Auch Gli3, das im gesamten dorsalen Telencephalon exprimiert wird, ist ein wichtiger Faktor, der zusammen mit Ngn 1/2 die Entwicklung des ventralen Gebietes fördert (Monuki and Walsh, 2001).

Sonic hedgehog (Shh) wird bereits in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert und dient unter anderem zur Einteilung der dorso-ventralen Achse des Neuralrohrs (zur Übersicht: Ho and Scott, 2002). Es wird dort im ventralen Teil exprimiert und freigesetzt und entscheidet gradientenabhängig u.a. über die Identität von Neuronen (zur Übersicht: Ruiz *et al.* 2002). Shh wird in frühen Phasen von den Vorläuferzellen der

VZ und später in der corticalen Platte exprimiert. Hier wirkt es dann wiederum auf Nestin-positive Zellen in der VZ um deren Proliferation zu stimulieren (zur Übersicht: Ruiz *et al.* 2002).

Die corticale Ventrikulärzone exprimiert spezifisch das Homöobox Gen Lhx2, welches weniger für die Anlage des dorsalen Teils essentiell ist, sondern die Expression einer Reihe von Faktoren in der VZ initiiert (Monuki *et al.* 2001). Das Homöobox Gen Lhx5 spielt im Hippocampus eine besondere Rolle. Lhx5 ist wichtig für die Proliferation der Vorläuferzellen und für die Migration und Differenzierung der Neuronen (Zhao *et al.* 1999). Die regionale Einteilung der Ventrikulärzone steht unter der Kontrolle einiger wichtiger lokal exprimierter Transkriptionsfaktoren, z.B. LAMP (limbic system-associated membrane protein) und Ephrine. Ephrine sind in einem spezifischen Muster im Cortex verteilt, bilden häufig Gradienten und/oder sind funktionellen Arealen und ihren Grenzen zugeordnet. Sie übernehmen allerdings auch in anderen Entwicklungsphasen wichtige Aufgaben; zusammen mit Neurotremine, Cadherin und Latexin sind sie am gerichteten Einwachsen von Axonen in die entsprechenden Areale beteiligt (cortico-cortical und thalamo-cortical Verbindungen). Sie tragen somit zur Festlegung der Topografie und Einteilung des Cortex in (funktionell) unterschiedliche Regionen bei (Arimatsu *et al.* 1999; Donoghue and Rakic, 1999; Eagleson and Levitt, 1999; Mackarechtschian *et al.* 1999; Rubenstein *et al.* 1999; Schell *et al.* 1997).

Nicht nur die Einteilung in Regionen, auch die Ausdehnung der Ventrikulärzone wird durch diffusible Faktoren bewerkstelligt. Hier sind vor allem die Bmp-Proteine und die Wnt-Proteine beteiligt. Mutationen in den entsprechenden Genen sind von schwerwiegenden Störungen der corticalen Entwicklung begleitet (Monuki and Walsh, 2001).

Die Größe der einzelnen corticalen Areale wird durch die Homöobox Gene Pax6 und Emx2 reguliert. Die regionale Einteilung der Ventrikulärzone beeinflusst die Entwicklung der corticalen Areale (Muzio *et al.* 2002). Pax6 und Emx2 werden in Gradienten und auf gegensätzliche Weise exprimiert. Pax6 wird in Gradienten von niedrig bis hoch in rostro-caudaler und lateral-medialer Richtung exprimiert. Bei Emx2 sind die Verhältnisse genau umgekehrt (Bishop *et al.* 2000). Der Verlust von Emx2 bewirkt eine Größenreduktion in den posterioren Cortexarealen, einschließlich dem Hippocampus, und den visuellen corticalen Arealen. Entsprechendes gilt für den Verlust von Pax6. Dieser resultiert anterior in einer verminderten Größe des Neocortex (Mallamaci *et al.* 2000). Die beiden Gene wirken also direkt auf die Cortexentwicklung ein. Pax6 ist wahrscheinlich für die

Proliferation der ontogenetisch spät entstandenen Vorläuferzellen wichtig. Weiterhin scheint es eine Rolle bei der Ausbildung von glutamatergen Neuronen und bei der Entwicklung thalamo-corticaler Afferenzen und Efferenzen zu spielen (Caric *et al.* 1997; Kawano *et al.* 1999; Ware *et al.* 1999; Warren *et al.* 1999).

Für die Entwicklung der Basalganglien und die Differenzierung von GABAergen Zellen hingegen sind *Dlx* Gene wichtig (Anderson *et al.* 1999). Die Migration dieser Zellen wird durch Fehlen der *Dlx 1/2* gestoppt (Anderson *et al.*, 1997).

Für die Entwicklung der normalen corticalen Architektur ist neben der regionalen Einteilung und Expansion des Gewebes auch das genetisch kontrollierte Absterben von Zellen (Apoptose) wichtig.

Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man das genetisch kontrollierte Absterben von Zellen, das zu deren selektiven Entfernung führt. (Nekrose hingegen beschreibt das Absterben von Zellen aufgrund pathologischer Vorgänge).

Apoptose ist entscheidend für die Entwicklung, da durch sie die Zellzahl reguliert wird. Damit verbunden ist die Regulation der Größe, des Volumens und der Gestalt der verschiedenen Gewebe. Zahlreiche Faktoren können die Kaskaden auslösen die zum Zelltod führen. Im folgenden werden nur einige ausgewählte Beispiele genannt (Bergeron and Yuan, 1998; Castagne *et al.* 1999; Herrmann *et al.* 1996; Sastry and Rao, 2000).

- Extrazelluläre Faktoren:

Der Entzug von neurotrophen Faktoren, wie z.B. BDNF, NGF, NT3, NT4/5, GDNF (glial cell line neurotrophic factor), führt im sich entwickelnden Gehirn zur Apoptose. Weiterhin gehören dazu: reaktive Sauerstoff-Spezies (damit verbunden der Redox-Zustand der Zellen), γ - und UV-Strahlung, sowie Hitzeschock (Lotto *et al.* 2001; Troy *et al.* 2001).

- Intrazelluläre Faktoren:

wichtig ist hierbei die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Wirkung von Calcium als second-messenger (Glazner and Mattson, 2000)

- Signale durch Protein-Kinasen:

JNK (jun N-terminale Kinasen): die zugrunde liegenden Gene sind *jnk1*, 2 und 3. Sie wirken auf Proteine, die für die Apoptose verantwortlich sind, wie zum Beispiel: *c-jun*, *p53* und *bcl2*. Weiterhin können sie Caspasen aktivieren. Sie werden während der frühen Ontogenese exprimiert und tragen zum Regionen-spezifischen Absterben von Zellen bei (Haydar *et al.* 1999; Kuan *et al.* 1999).

-Signalvermittlung durch Transkriptionsfaktoren:

- c-jun: c-jun ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor der die *de novo* Proteinsynthese auslöst, die für die Einleitung apoptotischer Vorgänge nötig ist. Dies ist eine Reaktion auf Stress (Bergeron and Yuan, 1998).

- Tumorsuppressor p53: p53 reguliert den Zellzyklus und den Zelltod. Kultivierte Zellen sterben bei einer Überexpression von p53. Bei einer Ischämie oder einem epileptischen Anfall wird der Transkriptionsfaktor ebenfalls hochreguliert (Castagne *et al.* 1999).

- Mechanismen, die in Gang gesetzt werden, wenn die apoptotischen Signale überwiegen (– „The point of no return“):

- Caspase-Reaktionskaskaden: Caspasen sind eine Familie aus strukturell verwandten Proteasen. Wenn die Hemmung bestimmter Proteaseaktivatoren gestört wird, werden Caspasen aktiviert, die wiederum die nächsten Caspasen aktivieren und so eine Kaskade verursachen, die letztlich den Zelltod initiiert. Betroffen sind hier vor allem die Mitochondrien, was in letzter Konsequenz zur Lipidperoxidation führt. Caspasen werden, wie JNK, während der frühen Entwicklung exprimiert (Bergeron and Yuan, 1998; Haydar *et al.* 1999; Kuan *et al.* 2000; Li *et al.* 2001; Parrish *et al.* 2001; Troy *et al.*, 2001; Zaidi *et al.* 2001).

Im Cortex treten apoptotische Zellen vermutlich zuerst in der Subplate auf, später auch in den darüberliegenden Schichten, vor allem in den Schichten II und III. Die Anzahl der apoptotischen Zellen variiert stark in den verschiedenen corticalen Arealen (Ferrer *et al.* 1990, zur Übersicht: Ferrer *et al.* 1992; Oppenheim *et al.* 1992).

Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren mit erheblicher Wirkung auf die Migration sind NT4, NGF und Neuregulin (Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998; Lotto *et al.* 2001; Maisonpierre *et al.* 1990a). Sie regulieren den intrazellulären Calciumspiegel, haben Einfluss auf das Wachstum von Axonen (Ganguly *et al.* 2001), beeinflussen die Migration von postmitotischen Neuronen (Behar *et al.* 1997; Behar *et al.* 1994) und dienen - im Fall von Neuregulinen - als Mediatoren zwischen migrierenden Neuronen und Gliazellen (Anton *et al.* 1997). Die Rezeptoren für Neureguline sind erbB2, 3 und erbB4. Sie werden auf Neuronen und Gliazellen exprimiert und haben neben der Wirkung auf die Migration einen Einfluss auf das Wachstum der Radialglia (Rio *et al.* 1997).

Der Wachstumsfaktor BDNF beeinflusst unter anderem auch die Konzentration von Reelin. Mit Erhöhung der Konzentration an BDNF sinkt die von Reelin. Dies erfolgt

während der Beendigung der Schichtenbildung (Ringstedt *et al.* 1998). Veränderungen in der physiologischen Konzentration der Wachstumsfaktoren führt zu Störungen der corticalen Architektur (Brunstrom *et al.* 1997; Maisonpierre *et al.* 1990b).

Wachstumsfaktoren spielen weiterhin eine erhebliche Rolle bei der regionellen Einteilung der Ventrikulärzone (Levitt, 2000).

Reelin

Dieses Glycoprotein wird von den Zellen der Marginalzone und zu großen Teilen von GABAergen Zellen in den tieferen Cortexschichten und im Hippocampus exprimiert (Meyer *et al.*, 1999; Pesold *et al.* 1999; Pesold *et al.* 1998).

Reelin ist essentiell für Migrationsvorgänge (Sheldon *et al.* 1997; Soriano *et al.* 1997) und eine normale Laminierung des Cortex (D'Arcangelo *et al.* 1995; Frotscher, 1998; Meyer and Goffinet, 1998; Ogawa *et al.* 1995; Sheppard and Pearlman, 1997), sowie für die Schichtenspezifische Ausbildung hippocampaler Konnektivitäten (Del Rio *et al.* 1997; Frotscher, 1997; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998; Meyer *et al.*, 2000; Nakajima *et al.* 1997). Weiterhin ist es für die Ablösung der migrierenden Zellen von der Radialgliafaser wichtig und dient hier als repulsives Element für migrierende Neuronen. Reelin stoppt die Migration in Gebieten, in denen es in hoher Konzentration vorliegt (zur Übersicht: (Dulabon *et al.* 2000; Goffinet, 1984).

Weiterhin induziert Reelin das Wachstum von Radialgliafasern und ist für die Ausbildung des glialen Phänotyps verantwortlich. In Abwesenheit von CR Zellen wird Radialglia zu Astrocyten umgebildet und die Migration wird gestoppt. Bei Störung der normalen Ausbildung der Radialglia kommt es zu schweren Laminierungsstörungen (Anton *et al.*, 1997; Hartmann *et al.* 1998; Noctor *et al.* 1999; Soriano *et al.*, 1997; Super *et al.*, 2000).

Es wird vermutet, dass Cajal-Retzius-Zellen zudem Faktoren sezernieren, die eine chemotaktische Anziehung auf migrierende Neurone ausüben (Hartmann *et al.* 1999). Auch bereits in sehr frühen Stadien der Cortexentwicklung spielt Reelin eine wichtige Rolle. Sein Zusammenwirken mit Adhäsions- und Erkennungsproteinen wie zum Beispiel Dab1 (Seite 15 ff.) ermöglicht die Spaltung der Preplate und ermöglicht damit erst eine geordnete Schichtenausbildung im Cortex cerebri (vgl. hierzu auch Punkt 1.2.3)

Adhäsions- und Erkennungsproteine

Sie werden von migrierenden Neuronen, Radialgliazellen und von ausdifferenzierteren Zellen, die sich schon an ihren Bestimmungsorten befinden, exprimiert. Sie sind wichtig für

Neuron-Neuron-, Neuron-Axon- und Neuron-Glia-Kontakte und deren Auflösung. Zu ihnen gehören unter anderem:

- Dab1 (homolog zum Drosophila Gene disabled) wird von migrierenden Neuronen exprimiert, die mit Reelin in Kontakt kommen. Das Protein mDab1 p80 ist eine Art Adapter-Protein (zwischen z.B. non-Rezeptor Tyrosinkinasen Src, Abl und Fyn) und ist wahrscheinlich bei der Beendigung der Migration, der Ablösung der Neuronen von der Radialglia, sowie der Schichtenbildung beteiligt. Es entstand die Hypothese, dass mDab1 p80 Teil der Reelin Kaskade ist. Weiterhin ist das Protein wichtig für die Axogenese, während Reelin für die Reifung und das Auswachsen von Axonen verantwortlich ist. Beide Faktoren tragen also essentiell zur Migration und Entwicklung bei. Dab1 könnte auch ein einzelner Faktor sein, der dazu dient den Bestimmungsort der Neuronen vorzugeben (Gonzalez *et al.* 1997; Howell *et al.* 1997; Sheldon *et al.* 1997).
- Integrine: $\alpha 3 \beta 1$ -Intergrin ist ein Adhäsionsmolekül und dient als Rezeptor für Reelin. Es ist häufig mit Dab1 colokalisiert. $\alpha 3 \beta 1$ -Intergrin könnte mit Laminin interagieren, das entlang der Radialgliafasern verteilt ist. Integrine gelten als Erkennungsproteine und vermitteln Neuron-Glia-Interaktionen, zur Übersicht: (Dulabon *et al.*, 2000; Rakic *et al.* 1994).
- Cadherine: sie sind wichtig für die morphologische Differenzierung. Die Proteine sind Calcium-abhängig. Sie zählen wie Integrine ebenfalls zu den Erkennungsproteinen (Rakic *et al.* 1994). Einige Mitglieder der Cadherin-Familie binden Reelin und sie vermitteln, wie Integrine, ebenfalls Neuron-Glia-Interaktionen zur Übersicht (Gupta *et al.* 2002).
- N-CAM, Ng-CAM: N-CAM (neural cell adhesion molecule) und Ng-CAM (neuron-glia cell adhesion molecule) gehören zur Gruppe der Zelloberflächenproteine und sind wichtig für die Migration von Zellen und die Ausbildung von Neuriten (zur Übersicht: Choung, 1990; Hatten, 1993; Hatten and Mason, 1990; Pearlman *et al.* 1998).
- Astrotactin (ASTN): ist ein wichtiger Ligand für die Neuron-Glia-Bindung während der Migration. Entfernt man ASTN, erfolgt bis zu 60% weniger Migration (Hatten, 1993; Hatten, 1990).
- Tenascin (=Cytotactin), Thrombospondine, Fibronectin, Laminin: sie sind Proteine der extrazellulären Matrix. Thrombospondin bindet Heparansulfat, Tenascin bindet Chondroitinsulfat. Fibronectin und Laminin werden entlang der Radialgliafasern und Axone, sowie auf Neuronen gefunden. Beide Proteine werden schon zum Zeitpunkt der Entstehung der Presubplate exprimiert. Fibronectin besitzt Ähnlichkeit mit Contactin und wird auf den Zellen der Subplate exprimiert. Es induziert das Anheften von Neuronen und

das Auswachsen von Neuriten und ist damit essentiell an der Entwicklung und Migration beteiligt. Laminin scheint ebenso auf Blutgefäßen und den Meningien exprimiert zu werden und kann hier als repulsives Element dienen (zur Übersicht: Choung, 1990; Liesi, 1990; Lom and Hockberger, 1997; Pearlman and Sheppard, 1996).

- Glykosaminoglykane (GAGs): Diese Zelloberflächenproteine sind der Auslöser für die Anheftung oder Ablösung der Neuronen von der Radialglia. Wichtig ist besonders das Protein Heparansulfat(-Glykosaminoglykan). GAGs sind häufig mit den Proteinen der extrazellulären Matrix verbunden (Hu, 2001; Liesi, 1990).
- Netrin, Semaphorin und axonales Glycoprotein TAG-1: diese Proteine spielen eine Rolle bei dem Einwachsen von Axonen in ihre Zielgebiete, bei den Prozessen während der Migration und bei der Morphogenese von Neuronen. Sie sind chemotaktisch wirksam (Alcantara *et al.* 2000; Hatten, 1993; Rakic *et al.*, 1994). Eine weitere wichtige Gruppe dieser Proteine sind die
- Slit Proteine. Slit-1 Proteine wirken repulsiv auf Axone, Slit-2-Proteine hingegen haben neben der repulsiven Wirkung einen fördernden Effekt auf das Auswachsen und das Verzweigen von sensorischen Axonen. Rezeptoren sind die Robo-Proteine (Roundabout), eine Gruppe von Transmembran-Proteinen. Wichtig für die repulsive Wirkung der Slit-Proteine ist das Zusammenspiel mit Heparansulfat (Brose and Tessier-Lavigne, 2000; Hu, 2001).

Calcium

Calcium dient in einer Vielzahl neuronaler Signaltransduktionswege als sekundärer Botenstoff. Es kann durch spannungs- und/oder ligandengesteuerte Calciumkanäle aus dem Extrazellulärraum oder aus intrazellulären Speichern in das Cytosol gelangen. Durch die unterschiedliche Lokalisation der beteiligten Kanäle wird der intrazelluläre Calciumspiegel von Neuronen in Verbindung mit Calcium-puffernden Mechanismen (z.B. intrazelluläre Calciumspeicher, Calcium-bindende Proteine) ständig räumlich und zeitlich moduliert. Die genannte Modulation kann sich bis hin zu rhythmisch oszillierenden Calciumspiegeln einzelner Neurone oder in Zellverbänden („Calciumwellen“) äußern (Garaschuk *et al.* 2000).

Je nach Lokalisation, Höhe und Dauer der Veränderungen des Spiegels können unterschiedliche Wirkungen der Calciumionen resultieren. Calcium ist unabdingbar für die präsynaptische Freisetzung von Neurotransmittern (Almers, 1990), es beeinflusst die Genregulation (Ghosh and Greenberg, 1995; Hardingham *et al.* 1997; Rajadhyaksha *et al.*

1999) und ist notwendig für die Funktionalität bestimmter Adhäsionsproteine wie N-CAM und Cadherine. Weiterhin ist es essentiell für die Motilität der migrierenden Neurone und für die Bewegung von Wachstumskegeln zu sein (zur Übersicht: Komuro and Rakic, 1998; Komuro and Rakic, 1996; Rakic *et al.*, 1994, siehe auch Abschnitt Wachstumsfaktoren.)

Eine Blockade der N-Typ Calciumkanäle, der NMDA-Rezeptoren, sowie eine zu geringe Calciumkonzentration führt zu veränderten Eigenschaften der migrierenden Neuronen und zur Verlangsamung der Migration (Komuro and Rakic, 1992; Komuro and Rakic, 1993; Rakic *et al.* 1996).

Die intrazelluläre Calciumkonzentration spielt eine große Rolle für die gerichtete Bewegung der postmitotischen Zellen entlang der Radialgliafasern. Durch die Polymerisation und Depolymerisation von Mikrotubuli im führenden Fortsatz könnten Kräfte entstehen, die die Bewegung der Neurone und die Translokation des Zellkerns ermöglichen. Die Polymerisation von Tubulin ist Ca^{2+} -abhängig (Rakic *et al.* 1996)

Weiterhin ist die intrazelluläre Calciumkonzentration wichtig für die durch GABA und Glutamat bewirkten Effekte auf die neuronale Migration.

Häufig vermitteln Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration Signale, die die Apoptosevorgänge einleiten (eine Übersicht bietet (Herrmann *et al.* 1996).

GABAerge und glutamaterge Signalübertragung

Die Übertragung elektrischer Aktivität zwischen Neuronen erfolgt in der Regel über synaptische Kontakte, an denen Aktionspotenziale der präsynaptischen Zelle zur Freisetzung eines spezifischen Neurotransmitters führt, der über den synaptischen Spalt diffundiert und in der postsynaptischen Zelle über spezifische Rezeptoren zur Öffnung von ebenfalls spezifischen Ionenkanälen führen kann. Je nach Membranpotenzial und Gleichgewichtspotenzial der beteiligten Ionen kann die Öffnung der Ionenkanäle nun zu einem Nettoein- oder Ausstrom von Ionen führen und das Membranpotenzial damit verringern (Depolarisation) oder erhöhen (Hyperpolarisation).

Im adulten Neocortex ist die Aminosäure Glutamat der wichtigste exzitatorische Transmitter, GABA, ebenfalls eine Aminosäure, ist dagegen ein elementarer inhibitorischer Transmitter (Jones, 1990).

Dieses Verhältnis gilt jedoch nicht während der Ontogenese. Hier wirkt GABA, wie auch Glutamat exzitatorisch auf postsynaptische Neurone (Ben Ari *et al.* 1997; Marret *et al.* 1995). Damit können beide Transmitter synergistische depolarisierende Wirkung entfalten,

welche durch die sekundäre Öffnung weiterer Ionenkanäle, wie z.B. spannungsgesteuerter Calciumkanäle noch verstärkt werden könnte.

GABA wird im adulten Neocortex von Interneuronen ausgeschüttet. Im unreifen Neocortex wird es von Neuronen aller Schichten gebildet (siehe 1.1.4).

Die hyperpolarisierende Wirkung von GABA in der frühen Entwicklung ist vermutlich auf eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration in den Neuronen des unreifen Neocortex gegenüber den adulten Neuronen zurückzuführen (Ben Ari *et al.*, 1997; Marret *et al.*, 1995). In der Juvenilphase reduziert sich die intrazelluläre Chloridkonzentration durch die zunehmende Aktivität von Chloridaustauschern in der Zellmembran, wodurch sich die exzitatorische Wirkung von GABA in eine inhibitorische Wirkung umwandelt (Ganguly *et al.* 2001).

GABA kann somit im unreifen Cortex, neben Glutamat, depolarisierende Aktivität induzieren, die für Migrations- und Differenzierungsprozesse von großer Bedeutung ist (Aamodt *et al.* 2000; Ben Ari *et al.* 1997; Owens *et al.* 1996; Staley and Smith, 2001; Taketo and Yoshioka, 2000; van den Pol *et al.* 1998).

GABA wirkt auf drei Rezeptoren: GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren. Der GABA_A-Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor, der für Cl⁻-Ionen permeabel ist und Bindungsstellen für Barbiturate, Benzodiazepine, Neurosteroiden und Ethanol besitzt. GABA_B-Rezeptoren sind metabotrop und aktivieren eine second-messenger Kaskade, die ihrerseits K⁺-Kanäle aktiviert. GABA_C-Rezeptoren sind ebenfalls für Cl⁻-Ionen durchlässig, sie sind integraler Bestandteil der Membran und stabilisieren das Ruhepotential der Zelle durch Erhöhung der Leitfähigkeit für Cl⁻ (Olsen and Tobin, 1990).

GABA_A-Rezeptoren können durch Bicucullin gehemmt und durch Muscimol aktiviert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass GABA die Migration von Neuronen beeinflusst und chemotaktisch auf die Zellen wirkt. Es erhöht konzentrationsabhängig die Migrationsrate durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und durch Aktivierung von G-Proteinen (Behar *et al.* 1999; Behar *et al.*, 1998; Behar *et al.* 1996; Behar *et al.* 1994; Ben Ari *et al.* 1997).

Der Neurotransmitter Glutamat wird von den primären afferenten Neuronen (Projektionsneuronen) des Neocortex gebildet und bei deren Aktivierung freigesetzt. Glutamat bindet an metabotrope und ionotrope Rezeptoren (Tsumoto, 1990). Die ionotropen Glutamatrezeptoren können aufgrund ihrer Struktur und Kinetik grob in NMDA- und AMPA-/Kainat-Rezeptoren (non-NMDA-Rezeptoren) unterteilt werden.

Die non-NMDA-Rezeptoren sind Kationenkanäle, die für Na^+ und K^+ permeabel, aber in der Regel nicht für Ca^{2+} durchlässig sind.

Der NMDA-Rezeptor weist einige Besonderheiten auf. Er ist ein Kationenkanal, der für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} durchlässig ist. Durch Ca^{2+} -Einstrom werden vermutlich Calcium-abhängige second-messenger Kaskaden aktiviert, welche biochemische Veränderungen auslösen können. Weiterhin hat der Ca^{2+} -Einstrom über den NMDA-Rezeptor Einfluss auf die Migrationsrate. Der NMDA-Rezeptor ist sowohl glutamat- als auch spannungsgesteuert. Dabei wird der Rezeptor am normalen Ruhepotenzial durch Mg^{2+} -Ionen blockiert. Erst bei Depolarisation wird dieser Block aufgehoben (Cull-Candy, 1987). Er wird unter anderem von MK 801 gehemmt, welches einen hochwirksamen, selektiven und nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor Antagonisten darstellt. MK 801 bindet innerhalb des Ionenkanals, blockiert ihn und unterbindet auf diese Weise den Calciumfluss.

NMDA-Rezeptoren werden von den migrierenden Zellen in der corticalen Platte schon vor der Ausbildung synaptischer Kontakte exprimiert und aktiviert. Sie sind aber nicht auf den Zellen der Ventrikulärzone zu finden (Fulton, 1995; LoTurco *et al.* 1991).

Weiterhin finden sich funktionell aktive NMDA- und GABA-Rezeptoren auf den Zellen der Marginalzone. Sie projizieren sowohl in untere Schichten, als auch auf benachbarte Neurone. Durch Ausschüttung von Glutamat wird Einfluss auf die Migration genommen (Behar *et al.* 1999; del Rio *et al.* 1995; Mienville and Pesold, 1999; Soria *et al.* 1999).

Die Ausbildung der normalen Topografie verschiedener Gehirnnareale und die Migration im cerebralen Cortex kann durch chronische Applikation von MK 801 gestört werden, das bedeutet, dass NMDA-Rezeptoren während der Entwicklung wichtig für die Ausbildung der normalen corticalen Struktur sind. Dies kann unter anderem auch durch Regulation der DNA-Synthese und Wirkung auf die Proliferation von Zellen erfolgen (Cline and Constantine-Paton, 1989; Hirai *et al.* 1999; Komuro and Rakic, 1998; Komuro and Rakic, 1993; Kwon and Tsai, 1998; LoTurco *et al.* 1991; LoTurco and Kriegstein, 1995; Marret *et al.* 1996).

1.2.3. Migrationsstörungen und Modelle

Im Folgenden sollen nur einige ausgewählte Beispiele für Migrations- und Laminierungsstörungen beschrieben werden. Es werden sowohl Tiermodelle, als auch Störungen beschrieben, die sich pränatal beim Menschen ausbilden können.

Tiermodelle für Migrations- und Laminierungsstörungen

Einen Überblick bieten (Gupta *et al.*, 2002; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998; Pearlman *et al.*, 1998; Redecker *et al.* 2000):

Die natürlich auftretenden Mutationen Reeler, Scrambler und Yotari beruhen auf einem Defekt, der die Trennung der Preplate betrifft. Hierzu gehört auch ein "knock-out"-Modell, bei dem die Gene Vldlr (very low density lipoprotein receptor) und Lpr8 (codiert für den Apolipoprotein-E2-Rezeptor) ausgeschaltet sind. Alle vier Modelle zeigen denselben Defekt.

- Reeler: die Trennung der Preplate unterbleibt, es besteht weiterhin nur eine sog Superplate, in der sich die Zellen der Marginalzone und der Subplate befinden. Darunter sammeln sich die Zellen der corticalen Platte, jedoch ohne Organisation und Laminierung, diese kann allerdings auch invertiert sein (D'Arcangelo *et al.* 1995; Falconer, 1991; Sheppard and Pearlman, 1997). Der Hippocampus ist ebenfalls betroffen, hier unterbleibt das korrekte Einwandern von Axonen und die Schichten-spezifische Ausbildung von Konnektivitäten (Del Rio *et al.* 1997; Ishida *et al.* 1994). Das Cerebellum weist eine geringere Anzahl von Purkinje-Zellen auf, die teilweise anders orientiert sind (Goffinet, 1984; Heckroth *et al.* 1989). Es werden "Jackson-Reeler"- und "Orleans-Reeler"- Mutanten unterschieden, die unterschiedliche Deletionen des Reeler Gens aufweisen (de Bergeyck *et al.* 1997; Hirotsune *et al.* 1995).

- Scambler (scm) und Yotari (yot). Die Tiere zeigen schwere Laminierungsstörungen verbunden mit Ectopien im Hippocampus, dem cerebralen Cortex und dem Cerebellum. Dies ist häufig vergrößert. Die Reelinexpression ist normal, die Störung liegt in beiden Fällen in einer Mutation des Gens mdab1, jedoch an verschiedenen Stellen (Gonzalez *et al.* 1997; Howell *et al.* 1997; Sheldon *et al.* 1997).

Die Tatsache, dass alle o.g. Tiermodelle ähnliche Laminierungsdefekte haben, könnte darauf hinweisen, dass die betroffenen Genprodukte Teile desselben Signal-Übermittlungsweges sind.

- "Knock-outs" für Serin/Threonin Kinase cdk5 oder den Reaktionspartner cdk5R (p35): die Tiere haben ebenfalls schwerwiegende Laminierungsstörungen. Die Teilung der Preplate verläuft weitgehend normal, die corticale Platte ist zwischen Marginalzone und Subplate lokalisiert, später jedoch nicht dem Reeler-Phänotyp ähneln. Migrierende Neurone sammeln sich unter und in der Subplate, viele verbleiben auch in der IZ. Daher sind cdk5 und p35 vermutlich mehr in die frühen Prozesse der Migration einbezogen, als in die letzten Stadien die bei der Reeler-Mutante betroffen sind. Vermutet werden Störungen

biochemischer Interaktionen und Einfluss auf das Auswachsen von Neuriten (Gilmore *et al.* 1998; Gleeson and Walsh, 2000; Kwon and Tsai, 1998).

- Weaver: die Vorläufer von Körnerzellen migrieren nicht entlang der Radialglia und sterben in ectopischen Positionen ab. Das Weaver Gen ist in unreifen Neuronen aktiv. Der Untergang der Neuronen wird durch eine Punktmutation in einem G-Protein gesteuerten, einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal codierenden Gen hervorgerufen. Diese führt zum Zelluntergang vor der Migration (Murtomaki *et al.* 1995; Reeves *et al.* 1989).
- Dreher: ist eine autosomal rezessive Mutation, die einen Defekt der glialen Membran an der Oberfläche des Cortex hervorruft. Charakteristisch sind Heterotopien im cerebralen Cortex, dem Cerebellum und im Hippocampus. Im Cortex sind Zellen in der Schicht I auffallend, bei denen es sich um Neuronen handelt und die für Schicht II bestimmt waren. Die Mutation wird durch einen Defekt im LIM Homöobox Gen Lmx1a hervorgerufen (Costa *et al.* 2001).
- „Flathead Mutation“: diese Mutation resultiert in einer Reduktion der GABAergen Interneurone über den gesamten Cortex hinweg. Diese Mutation wird durch eine Deletion im Citron-K Gen hervorgerufen (Sarkisian *et al.* 2002). Neben der verminderten Anzahl der GABAergen Neurone gibt es Änderungen in der Größe der Zellen. Sie besitzen größere Somata und Dendritenbäume als die Interneurone in den Wildtypen. Weiterhin besteht ein hoher Prozentsatz an apoptotischen Zellen bereits in frühen Stadien der Entwicklung. Dies wird unter anderem auf eine Störung in den letzten mitotischen Teilungen der Vorläuferzellen zurückgeführt (Sarkisian *et al.* 2001).
- Gefrierläsion und Injektion von Ibutensäure: Das histologische Bild ist durch eine fokale Dysplasie mit Verlust der tieferen Cortexschichten und einer Einfaltung des Cortex (Microgyrus) gekennzeichnet (Ferrer, 1993; Humphreys *et al.* 1991; Innocenti and Berbel, 1991b; Innocenti and Berbel, 1991a; Marret *et al.* 1995; Redecker *et al.*, 2000; Rosen *et al.* 1995). Das Entstehen von Polymicrogyrien durch Gefrierläsion dient als Modell für Epilepsie. Es wurden epileptiforme Entladungsmuster und eine veränderte Dichte von glutamatergen und GABAergen Rezeptoren nachgewiesen. (DeFazio and Hablitz, 2000; Germano and Sperber, 1997; Jacobs *et al.* 1999; Luhmann *et al.* 1998; Luhmann *et al.* 1996; Luhmann, 1996; Zilles *et al.* 1998).

Migrations-/ und Laminierungsstörungen im humanen Cortex

Es wurden mehr als 25 verschiedene Syndrome beschrieben die zu einer anomalen Entwicklung des Cortex führen, viele davon sind genetischen Ursprungs. Sie sind unter

anderem Ursache für Epilepsie und mentale Retardierung (Barth, 1987; Pearlman *et al.* 1998).

Neuronale Migrationsstörungen (NMDs - Neuronal Migration Disorders) betreffen in erster Linie den cerebralen Cortex, das Ausmaß und die Art der Störung variieren enorm.

- Lissencephalie: die Cortexoberfläche ist nur minimal gyrifiziert und wirkt glatt. Der Cortex ist verbreitert und zeigt keine Laminierung, die Morphologie der Neuronen ist ebenfalls betroffen. Dieser Effekt entsteht aufgrund nicht abgeschlossener Migration zur Übersicht: (Feng and Walsh, 2001).

Es gibt zwei unterschiedliche Syndrome: ILS = „isolierte Lissencephalie Sequenz“ und Miller-Diecker Lissencephalie. Verantwortlich für die Lissencephalie ist das Gen *Lis1*, das an verschiedenen Positionen Deletionen aufweisen kann (Redecker *et al.*, 2000). Das Gen enthält WD40 Repeats (ca. 40 Aminosäure lange Sequenzen, die Tryptophan-Aspartat-Reste enthalten) und ist eine regulatorische Untereinheit von PAF-AH (PAF=plättchenaktivierender Faktor, AH=Acetylhydrolase). Dies ist ein, einem G-Protein ähnliches Trimer, das die zelluläre Konzentration von PAF reguliert. PAF-AH mRNA wird in hoher Zahl während der Migration exprimiert. Das LIS-1 Genprodukt ist in hoher Menge in Cajal-Retzius-Zellen enthalten. PAF-Rezeptor-Agonisten vermindert die Migrationrate von Körnerzellen im Cerebellum. Unklar ist jedoch, wie das LIS-1 Genprodukt im Detail auf die Migration wirkt (Alvarez *et al.* 1986; Gleeson and Walsh, 2000; Hattori *et al.* 1994; Jellinger and Rett, 1976; Kuchelmeister *et al.* 1993; Lo *et al.* 1997; Reiner *et al.* 1995; Reiner *et al.* 1993; Walsh and Goffinet, 2000).

- Zellweger-Syndrom: autosomal rezessiv vererbte NMD. Es ist durch Pachygyrie (verminderte Anzahl von Gyri, die jedoch abnorm vergrößert sind) und Polymicrogyrie (Auftreten extrem vieler kleiner Gyri) gekennzeichnet. Heterotopien sind häufig. Verantwortlich sind wahrscheinlich 10 verschiedene Gene. Betroffen ist die Biosynthese der Peroxisomen mit einer erheblichen Funktionseinschränkung. Zwei Tiermodelle konnten bisher für das Zellweger Syndrom etabliert werden. Die Gene *Pex2* und *Pex5* wurden in Mäusen gezielt deletiert (Chevassus-au-Louis and Robain, 1999; Pearlman *et al.* 1998).

- X-chromosomal vererbte Defekte:

- Lissencephalie und Doppelkortex-Syndrom (SBH= bandförmige subcorticale Heterotopie = „double cortex syndrome“): die verantwortlichen Gene sind *XLIS* und *DCX* (=„doublecortin“, ein MAP-Protein). In heterozygoten Männern tritt eine klassische Lissencephalie auf, in heterozygoten Frauen eine SBH. Diese ist durch Auftreten bilateraler

Bänder von grauer Substanz direkt unter dem Cortex gekennzeichnet. Die Trennung vom Cortex erfolgt durch ein dünnes Band an weißer Substanz (des Portes and *et al.* 1998; Feng and Walsh, 2001; Francis *et al.* 1999; Gleeson *et al.* 1999; Horesh *et al.* 1999; Pearlman *et al.* 1998; Redecker *et al.* 2000).

- Periventrikuläre Heterotopie (BPNH=bilateral periventricular nodular heterotopia):

Für Männer ist dies häufig vor der Geburt letal oder mit schwererem Krankheitsverlauf verbunden als für Frauen. Charakteristisch für die Krankheit ist die Ansammlung von ausdifferenzieren corticalen Zellen an der Ventrikelwand (Heterotopie) und vorwiegend vaskuläre Fehlbildungen außerhalb des ZNS. Das verantwortliche Gen ist Xq28, das Produkt wurde als FLN-1 (Filamin 1) identifiziert. Das Protein bindet an Aktin (vernetzt es quer) und kann damit Einfluss auf das Cytoskelett der Zellen nehmen.

Corticale Heterotopien sind häufig mit dem Auftreten von Epilepsie verbunden (Chevassus-au-Louis and Robain, 1999; Gleeson and Walsh, 2000; Hannan *et al.* 1999).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In den bisherigen Abschnitten wurde beschrieben, welche strukturellen Veränderungen im Verlauf der Entwicklung des Cortex cerebri auftreten und welche elementaren Mechanismen für diese Veränderungen unter anderem verantwortlich sind. Es wird deutlich, dass für die frühen Entwicklungsschritte in der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung genetische Faktoren eine essentielle Rolle spielen. Umgebungsfaktoren, wie z.B. neurotrophe Faktoren oder Reelin gewinnen jedoch in der weiteren Entwicklung zunehmend an Wichtigkeit in der Beeinflussung der corticalen Architektur. Diese Faktoren wirken in der Regel konzentrationsabhängig z.B. auf die Migration von Neuronen und deren Neuriten. Durch den zunehmenden Differenzierungsgrad der Neurone bilden sich erste synaptische Konnektivitäten und Netzwerke aus. Einige der o.g. Umgebungsfaktoren werden aktivitätsabhängig freigesetzt und wirken wiederum auf die neuronale Aktivität. Beispiele für solche Umgebungsfaktoren sind neben den genannten auch die Neurotransmitter GABA und Glutamat.

Die chemotaktische Wirkung von Neurotransmittern wurde bislang größtenteils in *in-vitro* Modellen an isolierten Neuronen oder an Gehirnschnitten untersucht.

Ein *in-vivo* Modell, in dem neuroaktive Substanzen wie Transmitter lokal chronisch appliziert werden könnten, würde es ermöglichen, Untersuchungen an intakten Hirnstrukturen vorzunehmen, die der gleichzeitigen Wirkung der Transmitter auf die frühe

Netzwerkaktivität und die Entwicklungsvorgänge Rechnung tragen würden. Dieser Untersuchungsansatz stellt einen von zwei Schwerpunkten der vorliegenden Arbeit dar.

In einer Voruntersuchung wurden ausgewählte der in Absatz 1.2.4 beschriebenen Neuronenklassen des früh postnatalen Cortex cerebri der Ratte morphometrisch untersucht. Diese Untersuchungen dienten der Gewinnung von Erkenntnissen zur neuronalen Struktur und zum Komplexitätsgrad der entsprechenden neuronalen Elemente. Die Resultate dieser Untersuchungsreihe sollten ausschließlich deskriptive vergleichende Aussagen über den Differenzierungsgrad und damit die mögliche Funktionalität und Konnektivität eines früh postnatalen intracortikalen Netzwerkes treffen.

Im Kontext zusätzlicher, bereits bekannter Daten zur Morphologie und Physiologie eines solchen Netzwerkes, könnten die so gewonnenen Daten die Interpretation der im zweiten Schwerpunkt der Arbeit gewonnenen experimentellen Daten unterstützen.

Hier stand das o.g. pharmakologische *in-vivo* Versuchsparadigma im Mittelpunkt, in dem die Morphologie des cerebralen Cortex der neugeborenen Ratte unter Beeinflussung der GABAergen und glutamatergen Transmission untersucht wurde. Dabei erfolgte ein Vergleich der corticalen Entwicklung unter physiologischen Bedingungen und unter lokaler, chronischer pharmakologischer Einflussnahme auf die Physiologie und die Differenzierung des früh postnatalen Cortex cerebri.

Ziel war es, die Einflüsse dieser experimentellen Eingriffe in das physiologisch aktive Gehirn neugeborener Ratten mit Hilfe histologischer Untersuchungsmethoden sichtbar zu machen und diese Resultate deskriptiv zu beschreiben.

In den folgenden Absätzen sollen die beiden Untersuchungsschwerpunkte etwas näher erläutert werden.

1.3.1. In-vitro Untersuchungen zur Morphometrie des neonatalen Cortex der Ratte

In dieser Untersuchungsreihe sollten detaillierte strukturelle Analysen der unter 1.2.4. beschriebenen Neurone durchgeführt werden. Nach Darstellung der Morphologie der vier Zelltypen sollten die Unterschiede in den Oberflächen und Volumina der einzelnen zellulären Strukturen (Soma, Axon, Dendriten) ermittelt werden.

Eine Analyse des dendritischen Verzweigungsmusters sollte zudem Hinweise auf den Differenzierungsgrad und mögliche Konnektivitäten zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt liefern. Diese beschreibenden Daten sollten zur besseren visuellen

Veranschaulichung der Unterschiede zwischen den Zelltypen durch die dreidimensionale Darstellung der Neuronentypen unterstützt werden.

Die Resultate dieser Untersuchungsreihe sollten Aufschluss über die Struktur und damit auch funktionelle Eigenschaften des unreifen, sich normal entwickelnden Cortex geben.

1.3.2. *In-vivo* Untersuchungen zum Einfluss Glutamaterger Antagonisten und GABAerger Agonisten und Antagonisten auf den neonatalen Cortex der Ratte

Neben vielen anderen Faktoren ist die GABAerge und glutamaterge Signalübertragung wichtig für das normale Migrationsverhalten und die ungestörte Entwicklung des cerebralen Cortex. Dies war Gegenstand zahlreicher, bislang beinahe ausschließlich an *in-vitro* Modellen durchgeführter Untersuchungen, bei denen epigenetische Faktoren, die nur durch ein intaktes funktionierendes Nervensystem zum Tragen kommen können, entfallen.

Um Aussagen darüber treffen zu können, wie die corticale Entwicklung *in-vivo* unter pharmakologischer Beeinflussung der Aminosäuretransmitter im Vergleich zur ungestörten physiologischen Entwicklung abläuft, war primäres Ziel dieser Versuchsreihe, ein entsprechendes Modell hierzu zu etablieren. Als geeignetes Modell stellte sich in Voruntersuchungen die Verwendung neugeborener Ratten heraus, bei denen unter Verwendung eines operativ auf den Cortex cerebri implantieren Kunststoffpolymers, neuroaktive Substanzen chronisch und lokal appliziert werden konnten.

Nach Erreichung dieses Zwischenziels sollten histologische und immunhistochemische Untersuchungen Aufschluss über die strukturelle Entwicklung des Cortex unter Modulation der GABAergen und glutamatergen Neurotransmission im Vergleich zu Kontrolluntersuchungen an diesem Modell geben.

Ziel dieser Auswertungen war es, den Einfluss der pharmakologischen Intervention auf die Laminierung des Cortex cerebri und damit auf die Entstehung früher postnataler Netzwerke zu beschreiben. Diese Resultate sollten neben der bekannten physiologischen Funktion dieser Transmittersysteme Rückschlüsse auf die Bedeutung der GABAergen und glutamatergen Neurotransmission für postnatale corticale Differenzierungsvorgänge erlauben.

2. Material und Methoden und Versuchstiere

2.1. Substanzen und Chemikalien

40 % Ethylen Vinyl Acetat (Elvax 40 W) wurde freundlicherweise von der Firma Erbslöh GmbH, Krefeld zur Verfügung gestellt.

Perikardersatz wurde von W.L. Gore Associates GmbH bereitgestellt.

Der anti-Reelin Antikörper SP 142 wurde von J.M. Goffinet, Universität Namurs, hergestellt und freundlicherweise der Experimentatorin überlassen.

Tritium-markiertes MK 801 und Muscimol wurde vom C. und O. Vogt Institut für Hirnforschung, Leiter Prof. Dr. K. Zilles, bereitgestellt.

Alle anderen verwendeten Chemikalien und Antikörper (detaillierte Beschreibung s. Punkt 2.10.2) wurden in der höchsten kommerziell erhältlichen Reinheitsstufe eingesetzt und von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Buckinghamshire, UK)

Biomol (Hamburg)

Biotrend (Köln)

Böhringer Mannheim (Mannheim)

Chemicon -> DPC Biermann (Bad Nauheim)

Fluka (Neu-Ulm)

Gibco (Eggenstein)

ICN (Eschwege)

Merck (Darmstadt)

NEN (Zaventem, Belgien)

Packard (Meriden, USA)

Pharmingen (Hamburg)

RBI (Deisenhofen)

Sigma (Deisenhofen)

Tocris (Köln)

Vektor Labs -> Linaris (Wertheim)

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen, sowie zum Lösen wasserlöslicher Substanzen wurde ausschließlich Reinstwasser aus einer Millipore Wasseraufbereitungsanlage (Fa. Millipore, München) oder Aqua bidest. verwendet.

2.2. Verwendete Geräte

Abzug:	Medite Fume Adsorber TAZ 19 (Medite, Burgdorf)
Autoklav:	Welabo Century II Prestige Medical (Welabo, Düsseldorf)
Bohrer:	High speed micro drill (FST, Heidelberg)
Cryostat:	Jung CM 3000 (Leica, Bensheim)
Gefriermikrotom:	CM 1325 (Leica, Bensheim)
Messkammer:	Interface Hirnschnittkammer (Humboldt-Universität, Berlin)
Mikroskope:	Universalmikroskop Axioplan mit Axioplan Zeichenarm und Mikroskopkamera MC 100 Spot (Zeiss, Jena), Nikon Eclipse E 800 mit Microscope power unit VPS 100 E (Nikon, Japan) und Hitachi HV-C20M 3CCD Color Camera (Hitachi, Japan) und motorized stage MAC 2000 (Ludl Electronic Products, USA), Software: Neurolucida 2.1, 3.0, WinMorph 4.0, Cube (MicroBrightField, Colchester, USA) Operationsmikroskop OPMI 1/F 11554 (Zeiss, Jena)
Schlauchpumpe:	Minipuls 3 (Abimed Gilson, Villier, Frankreich)
Schüttler:	IK HS 250 basic (Janke und Kunkel/IKA Labortechnik, Staufen) Reagenzschüttler Reax top (Heidolph, Kehlheim)
Sterilisator:	SLM 400 (Memmert, Schwabach)
Szintillationszähler:	1217 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Software: 1221-244 Ultroterm III (LKB Wallac, Turin, Finnland)
Ultraschallreinigungsgerät:	Sonorex Super RK 106 (Bandelin, Berlin)
Vibrator:	Pelco 101 (Technical Product International, St.Louis, USA)
Wasserbäder:	GFL Typ 1052 (GFL, Burgwedel) WW/OB 7-45 WBV 45 (Memmert, Schwabach)

2.3. Versuchstiere

Alle verwendeten Tiere wurden aus der zentralen Tierversuchsanlage Düsseldorf, Leiterin Frau Dr. Treiber bezogen.

Für die Anfertigung von Gehirnschnitten, für *in-vitro* Untersuchungen und die Durchführung der Tierversuche wurden Wistar-Ratten im Alter von P0 bis P2 verwendet. Die Tiere wurden mit ihren Müttern in Makrolon®-Kunststoffkäfigen mit Sägemehl-Einstreu (Altromin) bei einer konstanten Temperatur von 25°C und einer definierten relativen Feuchte von 55 % - 60 % in einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Sie erhielten eine Standard-Labordiät (Sniff, Labordiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum.

2.4. Präparation

Abhängig von den entsprechenden Untersuchungen wurden die Ratten jeweils nach einem, zwei, drei, sieben und 14 Tagen präpariert, um anschließend coronale Hirnschnitte anzufertigen.

Tiere bis P7 wurden mit einem Schnitt dekapitiert, die der Altersstufen P7 und P14 vorher kurz zur Betäubung in ein Glas mit Enfluran (Ethrane®, Abbot, Wiesbaden) gesetzt.

Anschließend wurde die Kopfhaut entlang des Medians mit einem Skalpell geöffnet und zu beiden Seiten weggeklappt. Der Schädelknochen im Bereich des Cerebellums wurde durchtrennt. Mit einer feinen Schere wurde der Knochen von caudal nach rostral aufgeschnitten und ebenfalls vorsichtig zu beiden Seiten weggeklappt.

Aus dem Gehirn wurde mit zwei Schnitten durch das gesamte Gewebe ein Block isoliert, der unter anderem den parietalen somatosensorischen Cortex enthielt.

Projekt I

***In-vitro* Untersuchungen zur Morphometrie des neonatalen Cortex der Ratte**

2.5. Biocytin-Färbung

Puffer und Lösungen:

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5

2,176 g KH_2PO_4

14,952 g NaHPO_4

ad 1000 ml Aqua bidest.

0,1 M Tris pH 7,2

3,03 g TRIS

ad 500 ml Aqua bidest,

pH 7,2 mit 10 n HCl einstellen.

ACSF (artificial cerebral spinal fluid) 10fach konzentriert, Angaben für 1 l Lösung

Stammlösung I

NaCl 72,466 mg

NaH_2PO_4 1,725 mg

MgSO_4 4,437 mg

CaCl_2 2,352 mg

KCl 2,237 mg

Glucose 18,016 mg

Stammlösung II

NaHCO_3 21,843 mg

Gebrauchslösung

100 ml Stammlösung I

100 ml Stammlösung II

800 ml Aqua bidest

Vectastain ABC Peroxidase Kit, Standard (Vector)

49 ml PB 0,1 M

1,5 ml 10 % Triton X

1 g RSA (Rinderserum Albumin, =BSA)

10 Tropfen Reagenz A

10 Tropfen Reagenz B

3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

20 mg DAB

2 ml Aqua bidest.

98 ml Tris-Puffer pH 7,2

30 % H_2O_2 (zur Blockade der endogenen Peroxidase)

Osmium-Tetroxid-Lösung (OsO_4)

Durcupan-Einbettung

10 g Komponente A

10 g Komponente B

0,3 g Komponente D

0,3 g Komponente C

Schnitte spülen in 0,1 M PB

45 min 1 % OsO_4

5 min waschen in PB

10 min 50 % EtOH

45 min 70 % EtOH

10 min 90 % EtOH

10 min 96 % EtOH

10 min 100 % EtOH zweimal

5 min Propylenoxid zweimal

In Durcupan über Nacht, 4°C.

Am folgendem Tag:

Schnitte auf Wärmeplatte erwärmen (40°C) und Transfer auf Objektträger, dann für 16-48 Stunden Wärmeschrank (60°C).

Durchführung

Unoperierte Tiere der Altersgruppe P0 – P2 wurden auf die beschriebene Weise präpariert und der isolierte Block wurde in eiskaltes, mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) begastes ACSF überführt. Der Block wurde mit der caudalen Seite auf den Stempel einer Vibratomkammer geklebt und die Kammer mit kaltem, begastem ACSF aufgefüllt. Anschließend wurden bei höchster Vibrationsfrequenz und unter langsamen Vorschub coronale Gehirnschnitte einer Dicke von 600 μm angefertigt. Diese Schnitte wurden in ACSF aufgefangen und in eine „Interface-Kammer“ überführt. Diese Kammer ermöglichte es, die Gehirnschnitte mittels einer Schlauchpumpe mit Nährlösung (ACSF) zu versorgen

und bei 33°C, unter Carbogenatmosphäre für einen Zeitraum von 6-8 Stunden am Leben zu erhalten.

Kleine Biocytinkristalle wurden mit einer Insektennadel auf den Cortex in die Schichten I und VI, sowie auf die corticale Platte aufgebracht und leicht angedrückt.

Schließlich wurden die Gehirnschnitte nach 4-6 Stunden in 4°C kaltes, 4 %iges PFA gelegt, nach mindestens einem Tag in 0,1 M Phosphatpuffer überführt, nach einem weiteren Tag in 30 % Saccharose gebracht und über Nacht im Kühlschrank gelagert.

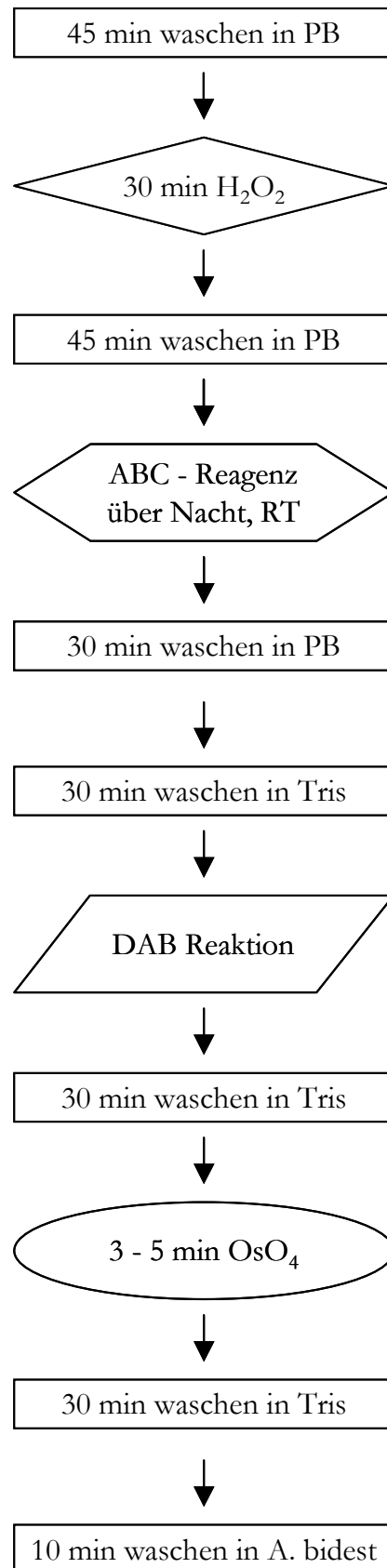
Von jedem biocytinhaltigen Gehirnschnitt wurden entweder am folgenden Tag, oder bis nach einer Lagerung von maximal zwei Wochen Cryostatschnitte einer Dicke von 50 µm hergestellt und diese einzeln in Gewebekulturschalen aufgefangen.

Um die Schrumpfung des Gewebes überprüfen zu können wurden die Schnitte nach Einbringen in die Interface-Kammer, nach 4-6 Stunden und nach der Einbettung in Durcupan in x- und y-Richtung vermessen. Die Schrumpfung in z-Richtung konnte anhand der Anzahl der Cryostatschnitte nachvollzogen werden.

Es ergaben sich folgende Werte für das Ausmaß der Schrumpfung:

x, Länge= 10%, y, Höhe= 20%, z, Breite (Dicke)= 50%.

Biocytin - Färbung



2.6. Morphometrische Analyse

Verwendet wurden die biocytin-gefärbten Gehirnschnitte und Material, das von Herrn Prof. Luhmann zur Verfügung gestellt wurde.

Es wurden jeweils 11 Cajal-Retzius- (CR) und unreife Pyramidenzellen (IP) und je 10 bipolare Pyramidenzellen (BP) und Subplatezellen (SP) analysiert.

Die Klassifizierung der unterschiedlichen Typen erfolgte nach Lage, Morphologie und Orientierung im Cortex.

2.6.1. Camera Lucida Zeichnungen

Jeweils ein Vertreter der vier Neuronklassen wurde mit der Camera Lucida gezeichnet, um die typische Morphologie zu verdeutlichen. Hierbei wurde ein Objektträger auf dem Mikroskoptisch eingespannt. Mit Hilfe eines am Mikroskop befestigten Zeichenarmes konnte die gewünschte Zelle - in einer Vergrößerung von insgesamt x1000 - zunächst mit Bleistift abgezeichnet werden (x100 Öl-Immersionsobjektiv, Zeiss, Jena, und x10 Vergrößerung im Okular).

Anschließend wurden die Konturen der Zelle mit Tusche nachgezogen und ausgefüllt.

2.6.2. Datenerfassung mit Neurolucida

Ein Objektträger mit Biocytin-gefärbten Gehirnschnitten wurde auf dem Mikroskoptisch fest eingespannt. Eine der zu analysierenden Zellen wurde gesucht und mit Hilfe von Neurolucida (MicroBrightField) mit einer Vergrößerung von insgesamt x1280 nachgezeichnet (x100 Öl-Immersionsobjektiv, Zeiss, Jena, x10 Okularvergrößerung, x1,28 Vergrößerungsfaktor der Kamera).

Durch den beweglichen Mikroskoptisch konnten Daten in allen drei Dimensionen erfasst werden, wobei das Programm während des Zeichnens sowohl Parameter wie Länge, Oberfläche und Volumen der Dendriten und des Axons, als auch dendritische und axonale Verzweigungen erfasste und berechnete.

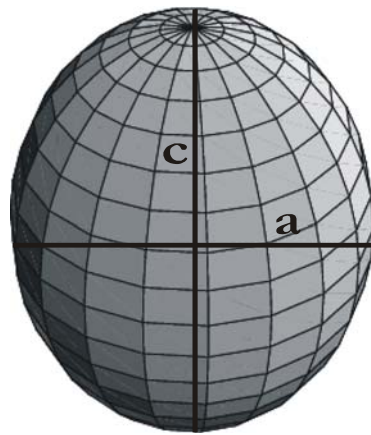
Die Zellfortsätze konnten über mehrere Objektträger hinweg verfolgt und analysiert werden.

Die gezeichneten Zellen wurden mit dem Computerprogramm Cube® dreidimensional dargestellt.

2.6.3. Analyse der erfassten Daten

Zunächst wurden die Volumina und Oberflächen der Somata berechnet.

Da Neurolucida hierzu – außer dem Umfang - keine Daten erfassen konnte, wurde als Grundlage für die Somata aller Zellen das Modell des „oblate spheroid“ mit folgender Formel zugrunde gelegt:



Oberfläche:

$$S = 2\pi a^2 + 2\pi (ac/e) \sin^{-1} e$$

Volumen:

$$V = \frac{4}{3}\pi a^2 c$$

(aus: Eric Weisstein`s World of Mathematics, <http://mathworld.wolfram.com/>)

Die Stecken a und c wurden in jedem Neuron ausgemessen. Das Modell stellte eine gute Annäherung für die Somata sämtlicher erfasster Zellen dar.

Alle übrigen Daten zu den verschiedenen Zelltypen wurden mit Hilfe des Computerprogramms WinMorph® (MicroBrightField) ausgewertet, wobei die Schrumpfung des Gewebes miteinbezogen wurde. Die für die Berechnung verwendeten Faktoren waren x=1.25, y=1.11, z=2.38 und ergaben sich aus den Messungen (vgl.2.5).

Zur Darstellung der Dendritenbäume wurden Dendrogramme erstellt. Deren Morphologie wurde durch Parameter wie Anzahl der dendritischen Stämme, Länge, Oberfläche und Volumen aller Dendriten näher beschrieben. Zur Erfassung des dendritischen Verzweigungsmusters wurden Sholl-Analysen durchgeführt. Bei diesen wurden um das Soma im Abstand von jeweils 20 µm konzentrische Kreise gezogen und die Anzahl der Verzweigungen in den verschiedenen Abständen erfasst (Sholl, 1956).

Schließlich wurde ein Vergleich der Gesamtoberflächen und Gesamtvolumina der verschiedenen Neuronenklassen durchgeführt.

Für die statistische Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde der Student's t-Test verwendet. Voraussetzung hierfür ist der Test auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen. Da die Daten zwar normalverteilt waren, jedoch keine Gleichheit der Varianzen aufwiesen, wurde folgende Formel für den t-Test eingesetzt:

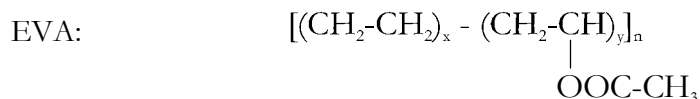
$$t = \frac{\bar{\chi}_A - \bar{\chi}_B}{\sqrt{[Var(\chi_A)/N_A + Var(\chi_B)/N_B]}}$$

Projekt II

***In-vivo* Untersuchungen zum Einfluss glutamaterger und GABAerger Agonisten und Antagonisten auf den neonatalen Cortex der Ratte**

2.7. Herstellung von EVA-Implantaten

Die Herstellung der EVA-Implantate erfolgte nach einer modifizierten Version von (Persico *et al.* 1997; Smith *et al.* 1995)



aus: <http://www.dupont.com/industrial-polymers/elvax/H-36551-1.html>

Ethylen-Vinyl-Acetat (Elvax®40W, DuPont) ist ein Kunststoff, bestehend aus den Monomeren Ethylen und Vinylacetat und enthält in diesem Fall einen Acetat Anteil von 40 % [w/w]. Das Acetat dient als Quervernetzer. Sein Anteil und die Molekülgröße der Substanzen bestimmen die Freisetzungskinetik aus dem Polymer (Balazs *et al.* 1985; During *et al.* 1989; Freese *et al.* 1989; Hsu and Langer, 1985).

EVA hat sich zur lokalen, chronischen Gabe von Substanzen als sehr gut geeignet erwiesen. Durch die Applikation der Substanzen auf ein sehr begrenztes Gebiet, können Reaktionen wie Blutdruckabfall oder das Auftreten epileptischer Anfälle, wie sie zum Beispiel nach systemischer Applikation auftreten würden, vermieden werden. (Doulazmi *et al.* 1998; Prusky and Ramoa, 1999; Schlaggar *et al.* 1993)

Chemikalien und Lösungen:

Die verwendeten Substanzen waren MK 801, Muscimol, BMI, gelöst in DMSO. Für Kontrollversuche wurde Implantat verwendet, das nur Lösungsmittel (DMSO) enthielt. Der Lösungsmittelanteil hat einen Prozentsatz von 4 % im Ansatz nicht überschritten. Die Substanzen wurden in der Stoffmenge eingesetzt, die einer Endkonzentration von 20 mM im Ansatz entspricht.

1 g EVA Pellets

1 ml CH_2Cl_2

10 μl Fast Green

40 μl Substanz oder DMSO

Für die radioaktive Markierung mit Tritium (^3H -) in den EVA-Implantaten wurde dem entsprechenden Ansatz jeweils ein Verhältnis von 1/50000 markierte/unmarkierter Substanz zugefügt. Bei den verwendeten Substanzen handelte es sich um ^3H -MK 801, ^3H -BMI und ^3H -Muscimol. Radioaktiv markiertes Implantat wurde für die Messung der Substanzfreisetzung (2.8.) und für die Autoradiographie (2.11.) benötigt.

Präparation:

In einem Reagenzglas wurden zu 1 ml Dichlormethan 1 g EVA Pellets gegeben und 20 min auf einem Reagenzschüttler gemischt. Anschließend wurde die gewünschte Substanz und Fast Green zur Sichtbarmachung zupipettiert.

Zwischenzeitlich wurden zwei Objektträger mit Klebeband (Omnisilk, Hartmann) verbunden.

Aus Parafilm (American National Can, Greenwich, USA) wurde ein Rahmen geschnitten und auf den unteren Objektträger aufgelegt, um dem Implantat später eine gewünschte Dicke von 100 μm zu geben (Persico et al, 1997).

Nach 25 min Mischen wurde das Polymer auf den unteren Objektträger aufgebracht und mit dem Oberen bedeckt, wobei darauf geachtet wurde, dass das flüssige Polymer nicht länger als 30 sec der Luft ausgesetzt war. Die beiden Objektträger wurden mit zwei Klammern am Rand fixiert und für 30 - 45 min auf Trockeneis gelegt. Schließlich wurden die Objektträger getrennt und das nun feste EVA bei -20°C tiefgefroren, wobei die Reste des Lösungsmittels freigesetzt wurden. Nach sieben Tagen wurde das EVA für die

Operation und die Messung der Substanzfreisetzung mit Hilfe von Millimeterpapier in eine Größe von
1 mm x 1 mm geschnitten.

2.8. Messung der Substanzfreisetzung aus den EVA-Implantaten

Jeweils drei bis vier radioaktiv markierte EVA-Stücke aus einer Präparation wurden nach sieben Tagen in je ein Glasgefäß überführt und ein Volumen von 500 µl GBSS (Gibco) zugegeben.

Die Gläschen wurden anschließend in einem Wasserbad bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Probenvolumen entnommen und in je ein Szintillationstöpfchen überpipettiert. Die verbliebenen EVA-Stücke wurden wiederum für 24 Stunden in 500 µl GBSS unter denselben Bedingungen inkubiert.

Die Proben wurde mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, Meriden, USA) aufgefüllt und in den Szintillationszähler gestellt.

Die Einzelmessungen wurden jeweils dreimal durchgeführt.

Gemessen wurde insgesamt über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer Anzahl von n= 3-4 EVA Präparationen.

2.9. Tierversuche

Am Tag der Geburt wurden die Ratten in den der Tierversuchsanlage eigenen Operationsräumen operiert. Ein EVA-Implantat wurde subdural auf den Cortex aufgelegt. Da die Operation unter weitgehend sterilen Bedingungen stattfinden sollte, wurden generell alle verwendeten Instrumente und Materialien mit Heißluft autoklaviert (20 min, 121°C, 1,5 bar). Instrumente, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden in 95 % Ethanol gereinigt.

Versuchsaufbau und Durchführung

Wegen der Größe der Tiere und der Implantate musste ein Operationsmikroskop verwendet werden.

Die EVA-Implantate wurden in die gewünschte Größe geschnitten und bis zur unmittelbaren Verwendung in GBSS aufbewahrt.

Die Tiere wurden mittels Hypothermie narkotisiert. Dazu wurden sie auf Eis gelegt und waren nach fünf bis zehn Minuten betäubt. Nach Desinfektion wurde die Kopfhaut im Bereich des parietalen Cortex mit einem Skalpell transversal über eine Länge von ca. 1,5 cm geöffnet.

Der Schädelknochen wurde mit einem Bohrer teilweise abgefräst und mit einer Pinzette ein Loch von circa einem Millimeter Durchmesser eröffnet. Die Dura wurde vorsichtig mit feinen Haken aufgezipft. Das EVA-Implantat konnte anschließend auf die Par I Region des somatosensorischen Cortex aufgelegt werden.

Um das entstandene Loch abzudecken, wurde Perikardersatz (W. L. Gore Associates, Putzbrunn) in der Größe von 3 mm x 3 mm x 100 µm verwendet. Abschließend wurde die Kopfhaut vernäht (8/0-Vicryl, Ethicon, Norderstedt). Zum Aufwachen wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt. Die gesamte Operation hat eine Dauer von 20 min nicht überschritten. Zum weiteren Verbleib wurden die Tiere in die Versuchstierhaltung zurückgegeben und bis zur Präparation (nach einer und nach zwei Wochen) von den Tierpflegern überwacht.

2.10. Histologische Untersuchungen

Die Tiere entstammten den Altersgruppen P7 und P14. Im Anschluss an die Präparation wurde der isolierte Block sofort in 4°C kaltes Fixativ (4 % PFA) überführt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde er nach zwei bis drei Stunden in 30 % Saccharose gelegt und über Nacht im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Für die Nissl-Färbungen wurde er eine Woche im Fixativ gelassen und danach ebenfalls in 30 % Saccharose überführt.

Am folgenden Tag wurden die Gehirnböcke auf einem Gefriermikrotom aufgefroren und in 50 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in 0,01 M PBS-Puffer (2.7.1.2.) aufgefangen und für die Immunhistochemie in Glasgefäße, für die Nissl-Färbungen in Gewebekulturschalen (Multiwells, Falcon, New Jersey, USA) aufbewahrt.

Einen Überblick über die Anzahl der verwendeten Tiere in den einzelnen Substanzgruppen gibt nachfolgende Tabelle:

Substanz \ Tierzahl	Postnataler Tag 7 (P 7)		Postnataler Tag 14 (P 14)	
	Nissl	Immunhistochemie	Nissl	Immunhistochemie
unoperierte Kontrolltiere	3	2	4	/
Lösungsmittelkontrollen-DMSO	6	2	4	5
MK 801	5	5	7	3
Bicucullin	5	3	7	3
Muscimol	5	2	4	4

Tab. 1:: Angabe zu den Tierzahlen innerhalb der einzelnen Substanzgruppen.

2.10.1. Nissl-Färbungen/Kresylviolett-färbung

Kresylviolett-Stammlösung

3,1 ml 99 %ige Essigsäure

0,0235 g Natriumacetat

1 g Kresylviolett

ad 1000 ml Aqua bidest.

Acetatpuffer

3,1 ml 99 %ige Essigsäure

0,235 g Natriumacetat

ad 1000 ml Aqua bidest.

Kresylviolett-Gebrauchslösung

250 ml Farblösung

750 ml Pufferlösung

Durchführung:

Die Gehirnschnitte wurden mit einem dünnen Pinsel aus den Gewebekulturschalen genommen und auf die mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden nach folgendem Schema behandelt:

10 min Kresylviolett-Gebrauchslösung

1 min Aqua bidest.

1 min 70 % EtOH

1 min 95 % EtOH

2 min 100 % EtOH

kurz 100 % EtOH

5 min Xylol

Eindecken mit DePeX (Serva).

Die Präparate wurden zur Darstellung und Dokumentation unter einem Mikroskop mit Mikroskopkamera fotografiert (Vergrößerung x5 und x 20, Zeiss, Jena).

2.10.2. Immunhistochemie

Folgende Antikörper wurden verwendet:

1.Antikörper	mono-/polyclonal	Verdünnung	Serum %	2.Antikörper
Anti-Calbindin	monoclonal	1:5000	3%NHS + 0,1% Triton	Bio- α -mouse
Anti-Parvalbumin	monoclonal	1:10000	10%NHS + 0,1% Triton	Bio- α -mouse
Anti- γ -Aminobutyric Acid	monoclonal	1:5000	10% NGS + 0,1% Triton	Bio- α -rabbit
Anti-Glutamat Decarboxylase	polyclonal	1:1000	10% NGS	Bio- α -rabbit
Anti-Calretinin	polyclonal	1:1000	10% NGS + 2% BSA + 0,1% Triton	Bio- α -rabbit
Anti-Reelin SP142	mono-/polyclonal	1:5000/1:1000	3% NHS + 4% BSA + 0,1% Triton	Bio- α -mouse
Anti-Microtubule Associated Protein	monoclonal	1:10000	3% NHS + 0,1% Triton	Bio- α -mouse
Anti-Vimentin	monoclonal	1:100	3% NHS + 0,1% Triton	Bio- α -mouse
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein	monoclonal	1:2000	3% NHS + 0,1% Triton	Bio- α -mouse
Anti-N-Methyl-D-Aspartate				
Receptor R1 / R2ab	polyclonal	je 25 g/ml	3% NGS + 0,1% Triton	Bio- α -rabbit
Receptor R2b / R2c	polyclonal	1:10000/1:1000	3% NGS + 0,1% Triton	Bio- α -rabbit

Tab. 2: Angaben zu den eingesetzten Primär- und Sekundärantikörpern und deren Verdünnungen.

Sekundärantikörper

Horse-Anti-Mouse, bio- α -mouse, (Vector) biotinyliert 1:200

Mouse-Anti-Rabbit IgG2, bio- α -rabbit (Vector) biotinyliert 1:200

Brückenantikörper Vectastain ABC Elite Peroxidase Kit, Standard (Vector)

10 ml 0,01 M PBS

0,3 ml 10 % Triton X

4 Tropfen Reagenz A

4 Tropfen Reagenz B

Seren

Normal Horse Serum

Normal Goat Serum

Puffer und Lösungen:

0,01 M PBS

0,1 M Tris pH 7,2

0,9 g NaCl

3,03 g TRIS

100 ml PB (vgl. 2.5.)

ad 500 ml Aqua bidest.

pH 7,2 einstellen mit 10n HCl

30 % H₂O₂ (zur Blockade der endogenen Peroxidase),

0,1 und 0,3 %iges Triton X-100,

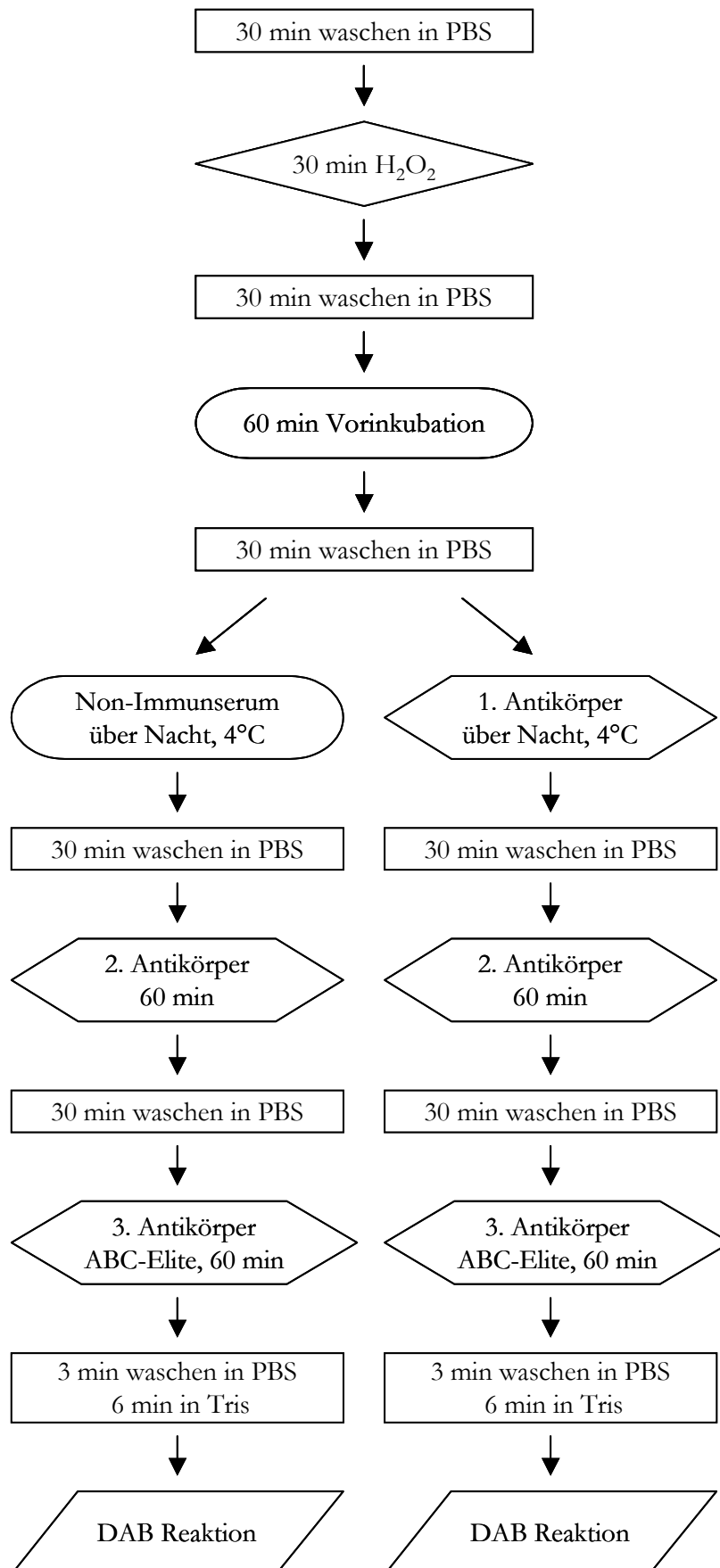
20 mg 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid oder

2 DAB-Pellets (DAB Chromogen Tablets, DAKO, Carpinteria, CA, USA),

2 ml Aqua bidest., 98 ml Tris-Puffer pH 7,2

Die gewonnenen Präparate wurden zur Darstellung und Dokumentation unter einem Mikroskop mit Mikroskopkamera fotografiert (Objektivvergrößerung x5 und x 20, Zeiss, Jena).

Immunhistochemisches Protokoll



3. Ergebnisse

Projekt I

***In-vitro* Untersuchungen zur Morphometrie des neonatalen Cortex der Ratte**

Es wurden vier verschiedene Neuronenklassen untersucht: Cajal-Retzius Zellen (CR), unreife Pyramidenzellen (IP), verzweigte Pyramidenzellen (BP) und Subplatezellen (SP). Hierbei wurden jeweils 11 Zellen der Typen CR und IP und jeweils 10 BP und SP Zellen in die Analysen aufgenommen. Die Auswahl der verschiedenen Neurone erfolgte nach ihrer Lage im Cortex und ihrer Morphologie.

3.1. Biocytin – Färbung

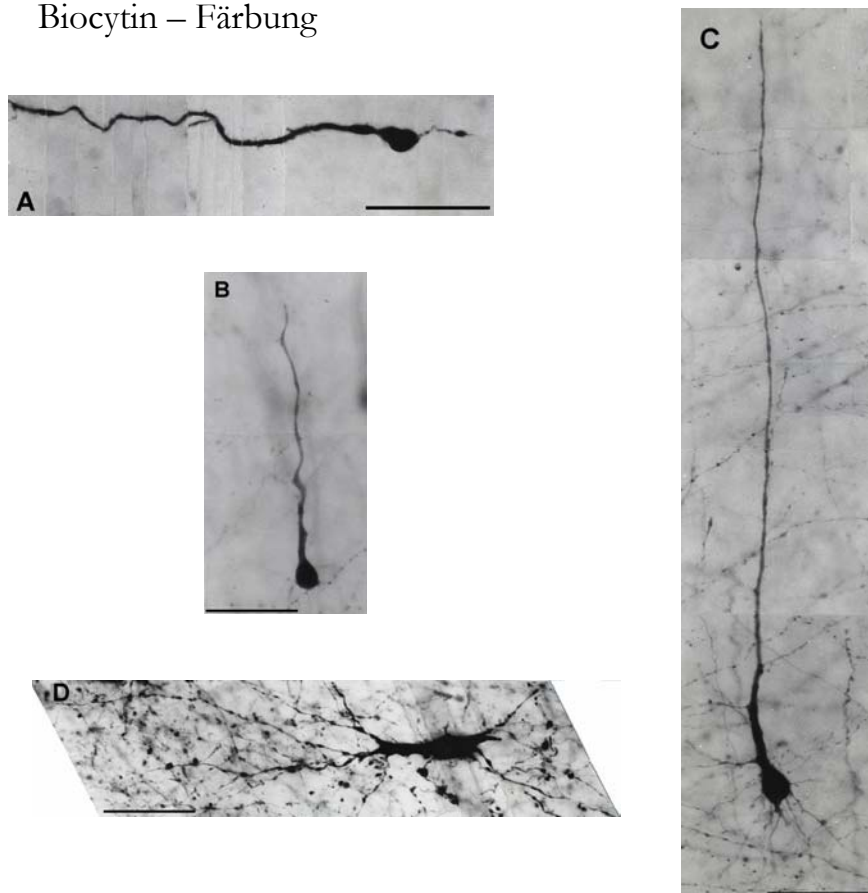


Abb. 3.1: Photomontagen der vier charakteristischen Zelltypen im postnatalen Cortex der Ratte, gefärbt mit Biocytin (vgl. 2.5). Alter der Tiere P0-P2. A. Cajal-Retzius-Zelle, B. unreife Pyramidenzelle, C. verzweigte Pyramiden- und D. Subplatezelle. Schnittdicke 50 μm , Scale bar 100 μm .

3.2. Morphometrische Analyse

3.2.1. Camera Lucida Zeichnungen

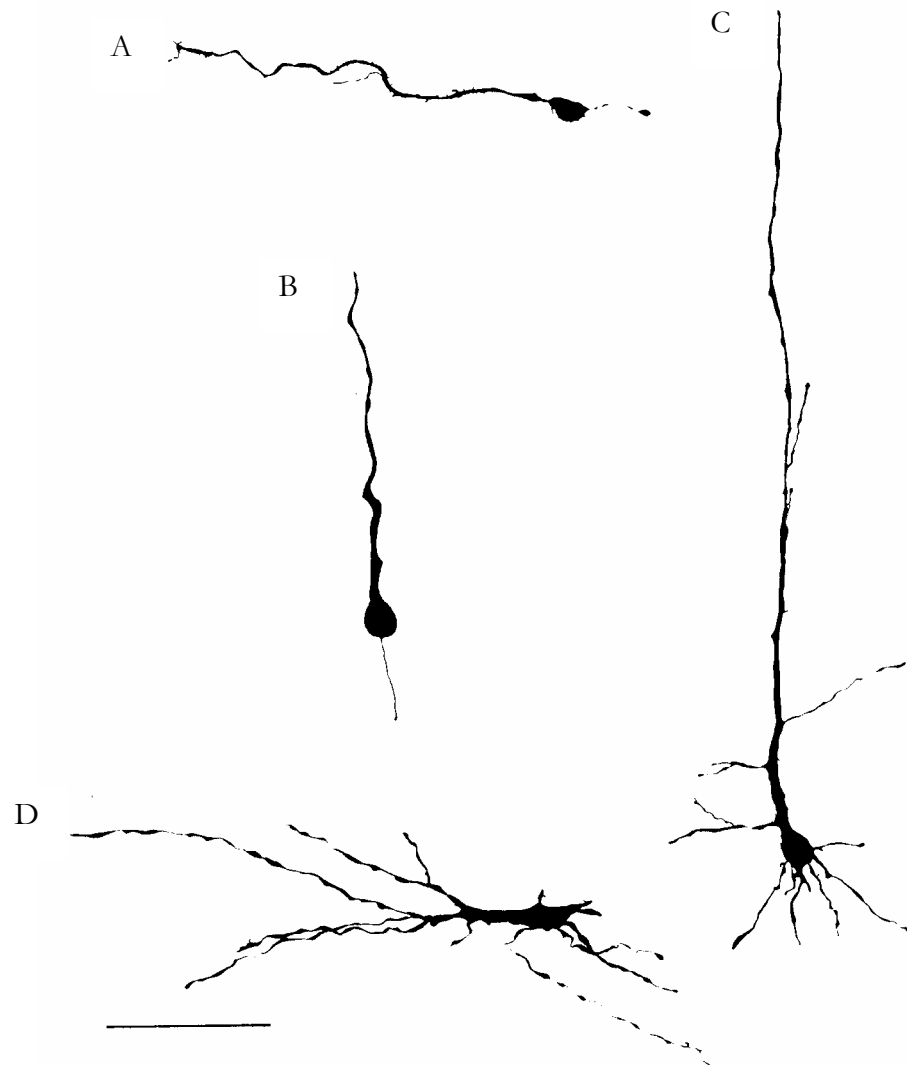


Abb. 3.2: Camera Lucida Zeichnungen der vier verschiedenen Neuronenklassen.

Darstellung der unterschiedlichen Morphologie der Somata und der dendritischen Verzweigungen. A. Cajal-Retzius Zelle, B. unreife Pyramidenzelle, C. verzweigte Pyramidenzelle, D. Subplatezelle. Scale bar 100 μm .

Zur detaillierteren Darstellung wurden die vier typischen Vertreter der einzelnen Neuronenklassen (vgl. Abb. 3.1) mit der Camera Lucida bei einer Vergrößerung von $\times 400$ gezeichnet. Die Orientierung der Zellen ist der Orientierung im Schnitt angepasst.

Deutlich zu erkennen sind die Unterschiede in der Morphologie. Während CR und IP Zellen ein ovales Soma aufweisen, besitzen die Somata der BP Zellen die charakteristische pyramidenähnliche Form. Die Somata von SP Zellen sind polymorph, d.h. sie haben kein einheitliches Erscheinungsbild. Die Verzweigungen der Dendriten unterscheiden sich sowohl in Anzahl als auch in der Länge von Zelltyp zu Zelltyp (vgl. 2.3.2., Dendrogramme).

CR Zellen haben in dieser Altersgruppe im allgemeinen ein langes Axon, welches sich nur innerhalb Schicht I befindet, jedoch nicht in untere Cortexschichten projiziert.

IP Zellen weisen ein kurzes Axon auf, das in Richtung der weißen Substanz orientiert ist, während BP und SP Zellen ein langes Axon haben, das bis in die weiße Substanz hineinreicht.

Unter Verwendung des Computerprogramms Neurolucida® (MicroBrightField, USA) wurden die Biocytin-gefärbten Zellen computerunterstützt rekonstruiert und morphometrische Daten erhoben.

Analysiert wurden die Oberflächen und Volumina der Zellen, der Dendriten und Axone, sowie die dendritischen Verzweigungsmuster der verschiedenen Zelltypen.

Die Axone der BP und SP Zellen konnten in den häufigsten Fällen nur bis zum Eintritt in die weiße Substanz verfolgt werden. Aufgrund der hohen Faserdichte war die Rekonstruktion über mehrere Schnitte hier nicht möglich.

Das Computerprogramm Cube® ermöglichte die dreidimensionale Darstellung der Neuronen (vgl., 3.2.2.).

3.2.2. Darstellung einer der mit Neurolucida gezeichneten Zelle

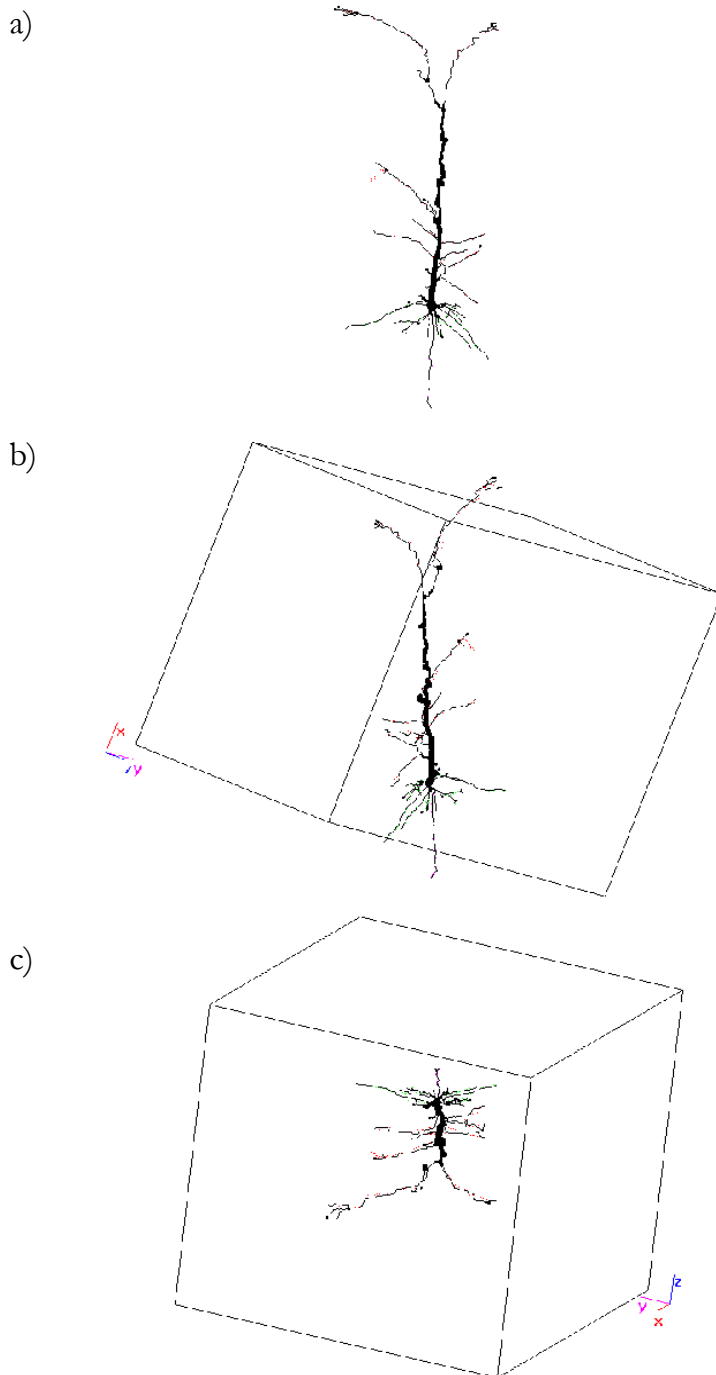


Abb. 3.3: Dreidimensionale Darstellung einer verzweigten Pyramidenzelle aus verschiedenen Blickrichtungen im Schnitt. a) Zelle in originaler Orientierung im Schnitt, b) Zelle aus der medial-lateralen Ansicht, c) Zelle in der dorso-ventralen Blickrichtung.

3.2.3. Dendrogramme

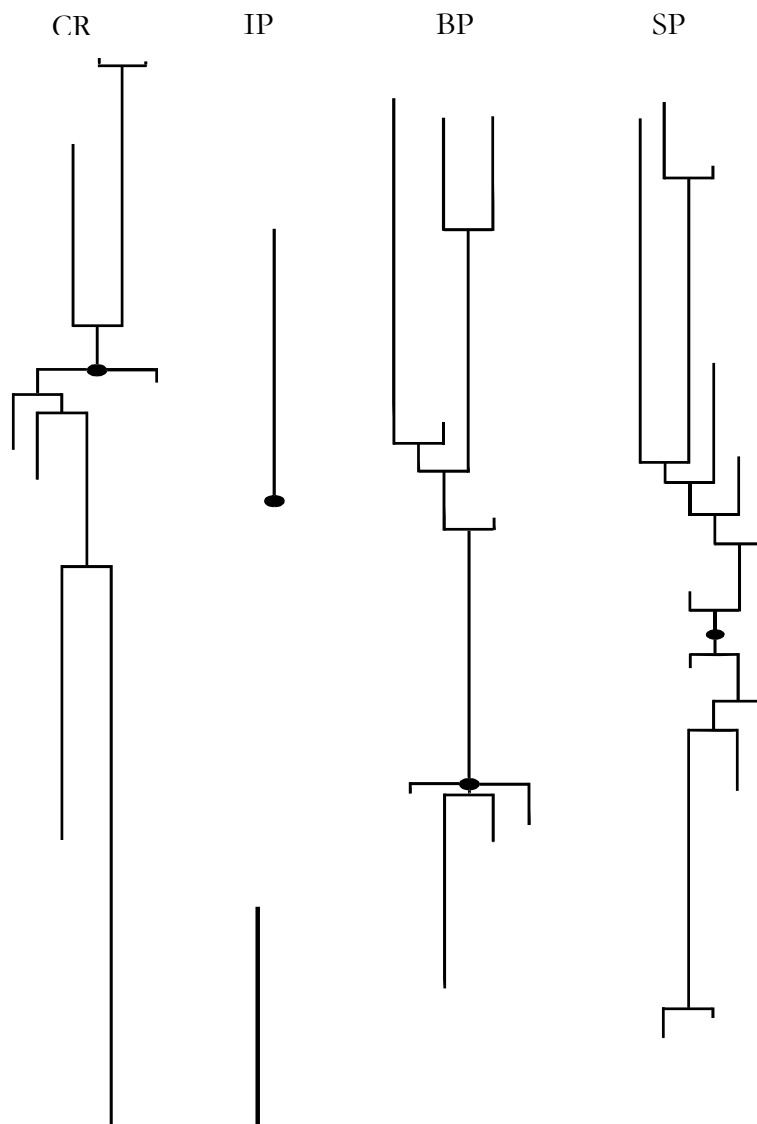


Abb. 3.4: Dendrogramme von Cajal-Retzius-Zellen, unreifen und verzweigten Pyramidenzellen, sowie Subplatezellen. Verdeutlicht wird die dendritische Struktur. Die Lokalisation der Somata wird durch eine gefüllte Ellipse dargestellt.
Scale bar 100 μm .

Cajal-Retzius Zellen besitzen typischerweise einen, selten zwei große Dendriten, die horizontal in Schicht I orientiert sind und mehrere 100 μm lang sein können. In der Regel beobachtet man nur wenige Verzweigungen.

Während IP Zellen nur einen einzigen kurzen apikalen Dendriten aufweisen, kann man bei BP Zellen einen prominenten apikalen und mehrere oblique Dendriten beobachten. Häufig besitzen diese Zellen, je nach Differenzierungsgrad, auch einen bis mehrere basale Dendriten. Der apikale Dendrit reicht bis in Schicht I, wo er sich in mehrere kleine Dendriten aufteilt und den sogenannten „apical tuft“ bildet.

Subplatezellen besitzen ausgehend vom Zellsoma zwei, oder mehr große Dendriten, die sich im Abstand von einigen 100 μm immer weiter verzweigen. Von allen hier charakterisierten Zelltypen zeigen SP Zellen das ausgeprägteste dendritische Verzweigungsmuster.

3.3. Analyse der erfassten Daten

Zur detaillierten Analyse der vier Zelltypen wurden die mit NeuroLucida® erfassten und mit WinMorph® berechneten Daten weiter analysiert. Ziel war es, genauen Aufschluss über die Oberflächen und Volumina der Somata, der Dendriten und die Gesamtstruktur der Neuronen zu erhalten. Die Anzahl der Zellen lag auch hier, bei CR und IP Zellen bei 11, bei BP und SP Zellen bei 10.

3.3.1. Oberflächen und Volumina der Somata

3.3.1.1. Oberflächen

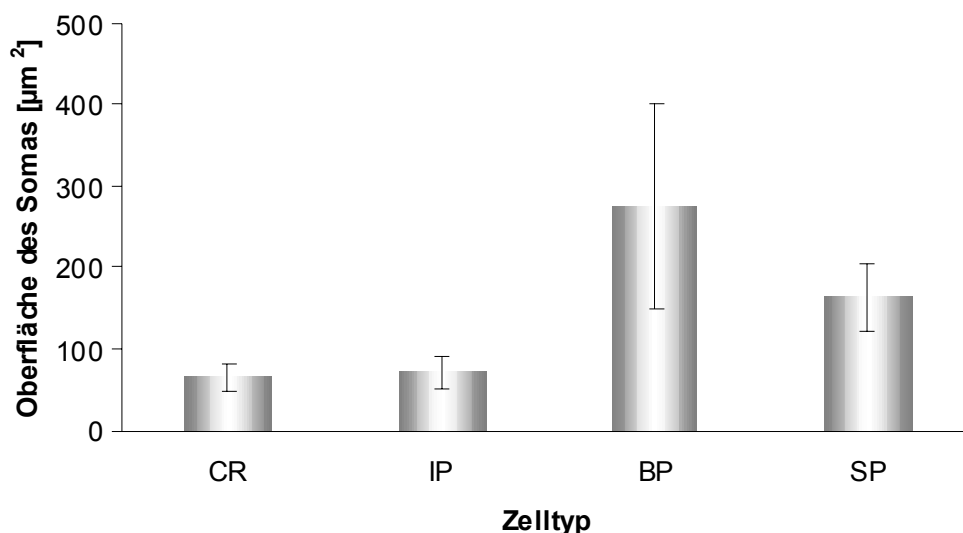


Abb. 3.5: Berechnung der Somaoberflächen für Cajal-Retzius Zellen, unreife Pyramidenzellen, verzweigte Pyramidenzellen und Subplatezellen. Der Berechnung liegt die Formel für die Oberfläche des Sphäroiden zugrunde, vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.6.3. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.3.1.2. Volumina

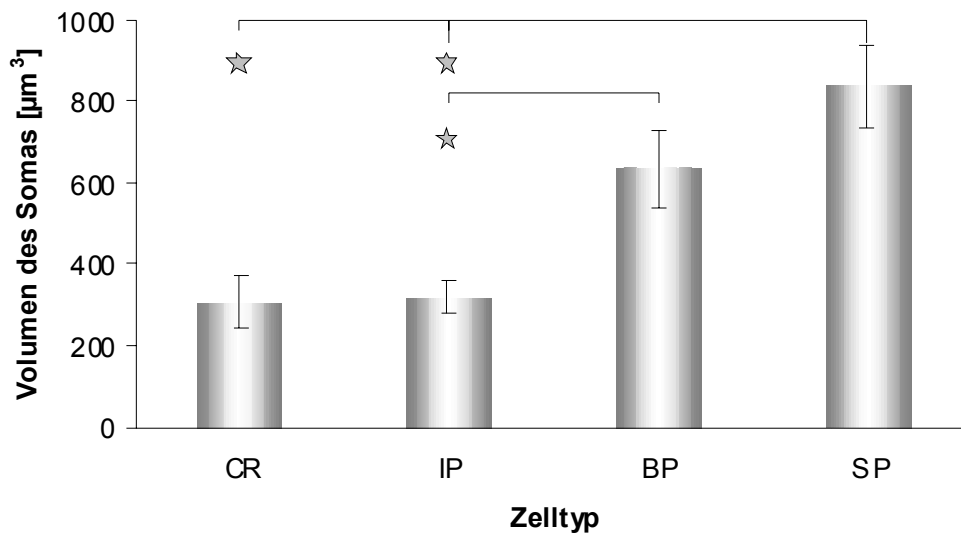


Abb. 3.6: Berechnung des Somavolumens für Cajal-Retzius Zellen, unreife Pyramidenzellen, verzweigte Pyramidenzellen und Subpatezellen. Der Berechnung liegt die Formel für das Volumen des Sphäroiden zugrunde (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.6.3). Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM, Unterschiede zwischen Mittelwerten sind statistisch signifikant (☆, $p < 0.01$).

Die Berechnung der durchschnittlichen Somaoberflächen ergab für CR Zellen einen Wert von $66.3 \pm 17.5 \mu\text{m}^2$, für IP Zellen $72 \pm 20.2 \mu\text{m}^2$. Deutlich größer waren die Somata der BP und SP Zellen mit $276.2 \pm 124.3 \mu\text{m}^2$ und $167.9 \pm 40.7 \mu\text{m}^2$. Signifikante Unterschiede in den Somagrößen traten nicht auf.

Für das durchschnittliche Volumen der Somata der verschiedenen Zellen konnten folgende Werte ermittelt werden: BP und SP Zellen wiesen mit $637.2 \pm 93.7 \mu\text{m}^3$ und $851.4 \pm 104 \mu\text{m}^3$ signifikant größere Somavolumina auf als CR ($308.1 \pm 65.6 \mu\text{m}^3$) und IP Zellen ($319.9 \pm 39.8 \mu\text{m}^3$).

Bei Betrachtung des Oberflächen-/Volumenverhältnisses zwischen BP und SP Zellen fällt auf, dass BP Zellen eine große Somaoberfläche und ein entsprechend größeres Somavolumen besitzen. Die Somaoberfläche von SP Zellen ist kleiner als die der BP Zellen, das Somavolumen jedoch größer als das der BP Zellen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Soma der SP Zellen mehr an die Gestalt einer Kugel heranreicht, die ein ideales Oberflächen-/Volumenverhältnis besitzt.

3.3.2. Morphologie der Dendriten

3.3.2.1. Anzahl der dendritischen Stämme

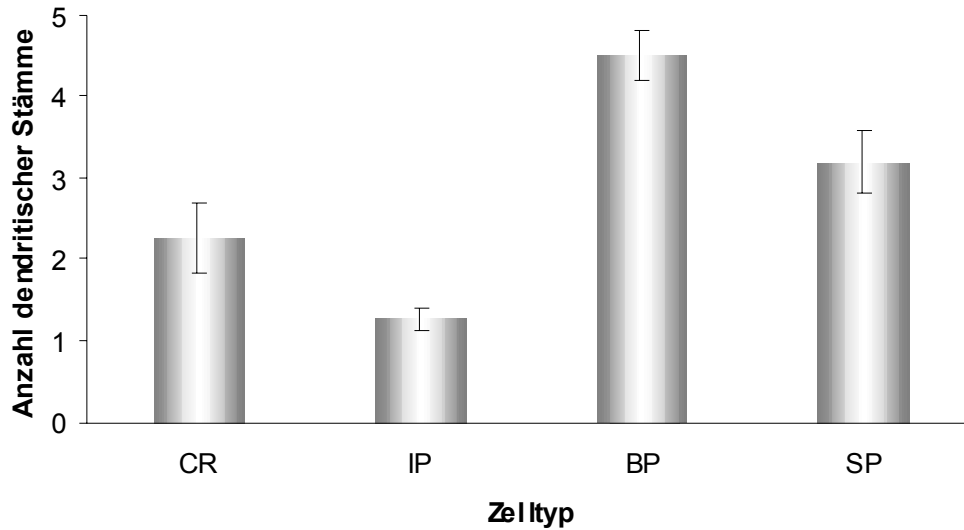


Abb. 3.7: Anzahl der dendritischen Stämme für jeden einzelnen Zelltyp. Angegeben werden die Mittelwerte $\pm$ SEM.

Der Vergleich der durchschnittlichen Anzahl aller dendritischen Stämme, die die Zellen besaßen zeigte, dass BP und SP Zellen mit durchschnittlich drei bis fünf Dendriten deutlich mehr Verzweigungen hatten als CR (zwei) und IP (einen) Zellen.

Die durchschnittliche Länge der Dendriten lag bei CR Zellen bei $408.5 \pm 69.7 \mu\text{m}$ und bei IP Zellen bei $198.5 \pm 31 \mu\text{m}$. Es ergab sich daraus ein signifikanter Unterschied zu BP Zellen und SP Zellen. Die Länge der Dendriten lag hier bei $826.6 \pm 159.3 \mu\text{m}$ (BP) und bei $718.9 \pm 76.1 \mu\text{m}$ (SP).

3.3.2.1. Länge der Dendriten

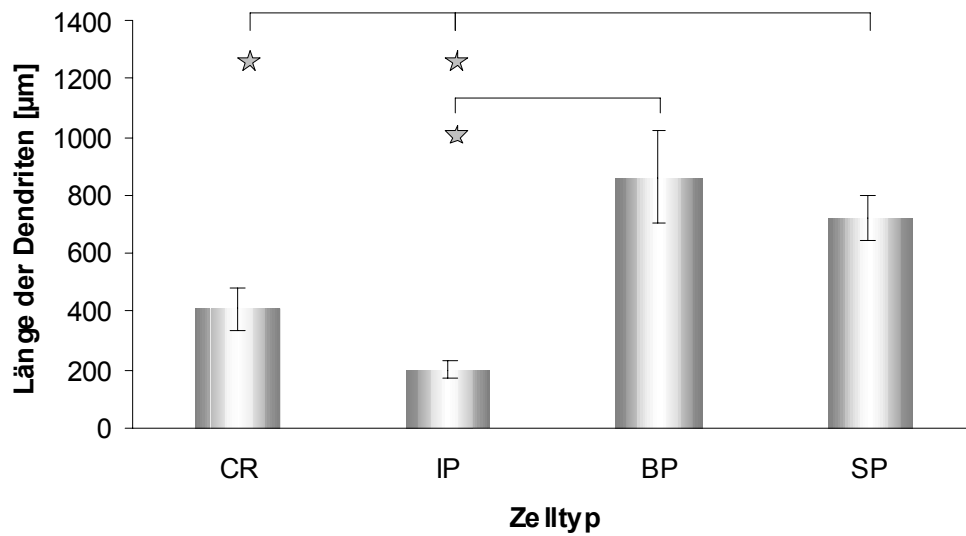


Abb. 3.8: Länge der Dendriten für jeden einzelnen Zelltyp. Darstellung der Mittelwerte $\pm$ SEM, Unterschiede zwischen Mittelwerten sind statistisch signifikant (☆, $p < 0.01$).

3.3.2.2. Oberfläche der Dendriten

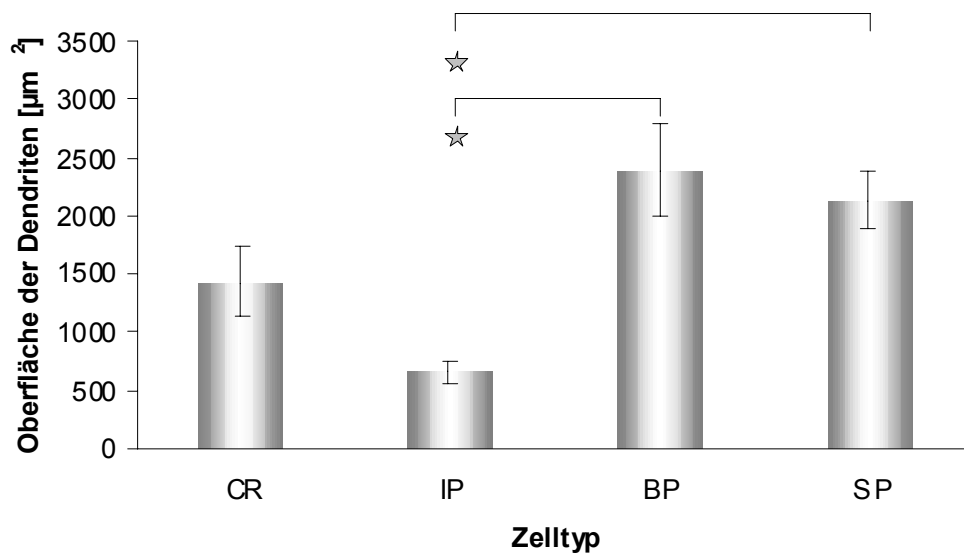


Abb. 3.9: Oberfläche der Dendriten für CR, IP, BP und SP Zellen. Angegeben werden die Mittelwerte $\pm$ SEM, Unterschiede zwischen Mittelwerten sind statistisch signifikant (☆, $p < 0.01$).

3.3.2.3. Volumen der Dendriten

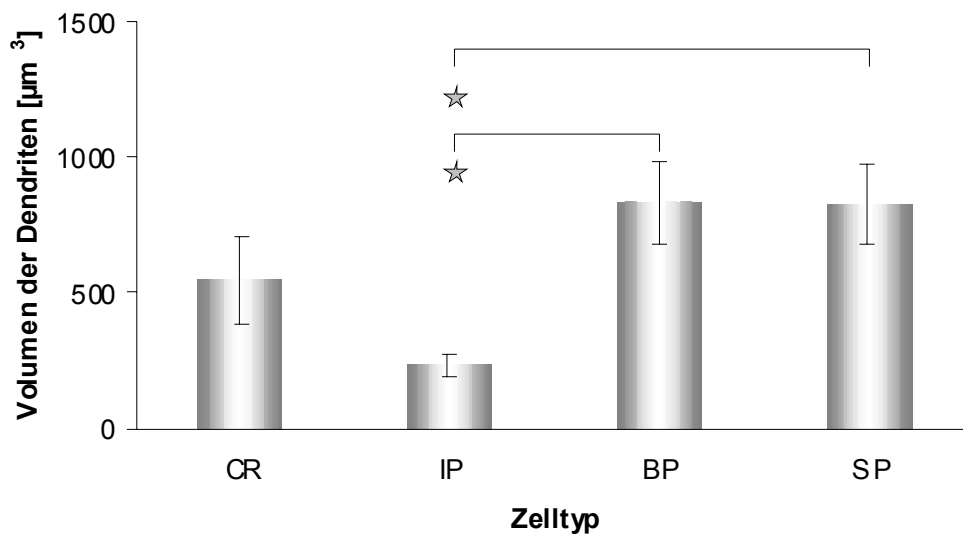


Abb. 3.10: Volumen der Dendriten für CR, IP, BP und SP Zellen. Dargestellt werden die Mittelwerte $\pm$ SEM, Unterschiede zwischen Mittelwerten sind statistisch signifikant (☆, $p < 0.01$).

BP und SP Zellen hatten mit einer dendritischen Oberfläche von $2397 \pm 399 \mu\text{m}^2$ und $2138 \pm 250 \mu\text{m}^2$ deutlich größere Werte als CR Zellen ($1430 \pm 294 \mu\text{m}^2$) und wiesen signifikante Unterschiede zu IP Zellen mit $655 \pm 100 \mu\text{m}^2$ dendritischer Oberfläche auf.

Genauso verhielt es sich mit dem dendritischen Volumen. Es betrug bei BP Zellen $832.5 \pm 155 \mu\text{m}^3$ und bei SP Zellen $831.7 \pm 148 \mu\text{m}^3$. Ein signifikanter Unterschied lag nur zu IP Zellen mit $230.7 \pm 42.4 \mu\text{m}^3$ vor. CR Zellen hatten ein dendritisches Volumen von $544.2 \pm 161.5 \mu\text{m}^3$.

Die dendritische Morphologie zeigte deutliche Unterschiede zwischen CR, BP und SP im Vergleich zu IP Zellen. Während BP und SP Zellen zahlreiche dendritische Stämme mit großer Länge, Oberfläche und hohem Volumen aufwiesen, handelte es sich bei IP Zellen um kleine Neurone, die kaum verzweigt waren. CR Zellen hatten zwar eine geringe Anzahl an dendritischen Stämmen, sowie geringe dendritische Oberfläche und geringes Volumen, jedoch wiesen sie eine große Anzahl an Verzweigungen auf.

Um das dendritische Verzweigungsmuster näher zu analysieren, wurden Sholl-Analysen durchgeführt (vgl. Material und Methoden Teil, 2.6.3). Diese gaben einen genauen

Überblick über die Anzahl der einzelnen Verzweigungen und über die Entfernung vom Soma, in der diese auftraten.

3.3.3. Verzweigung der Dendriten – Sholl-Analyse

3.3.3.1. Cajal-Retzius Zellen

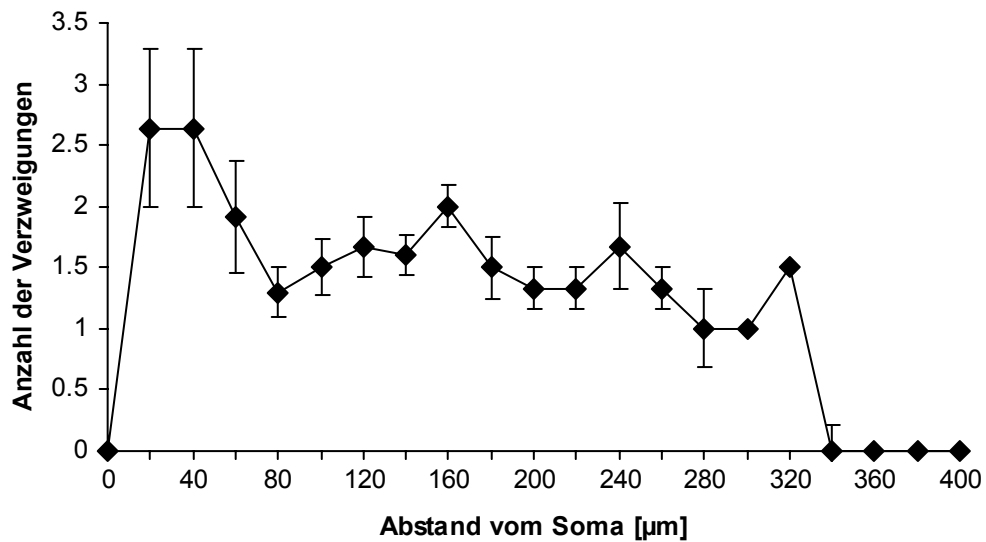


Abb. 3.11: Verzweigung der Dendriten von Cajal-Retzius Zellen in 20 μm Abständen vom Zellsoma. Gezeigt werden die Mittelwerte ± SEM.

3.3.3.2. Unreife Pyramidenzellen

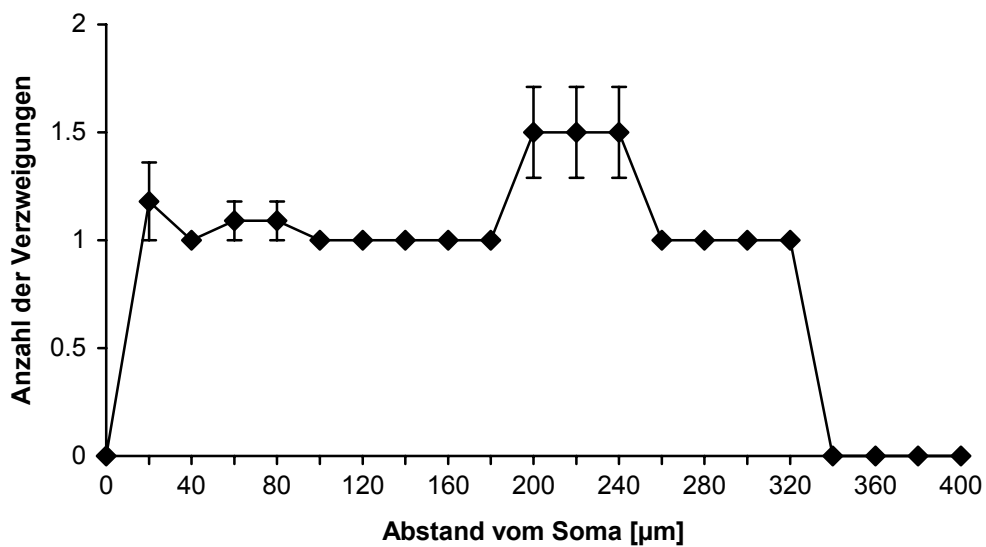


Abb. 3.12: Verzweigung der Dendriten von IP Zellen in 20 μm Abständen vom Zellsoma. Angegeben werden die Mittelwerte ± SEM.

3.3.3.3. Verzweigte Pyramidenzellen

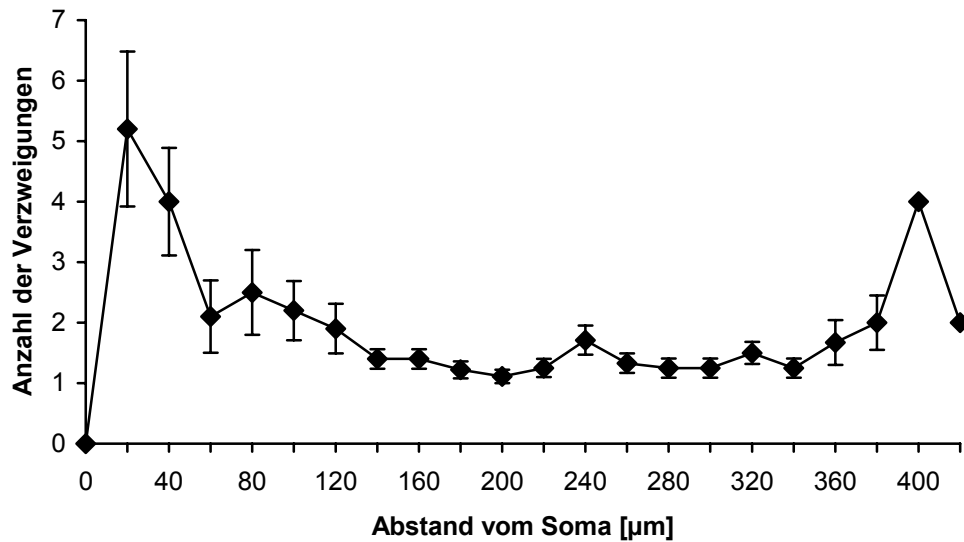


Abb. 3.13: Verzweigung der Dendriten von BP Zellen in 20 µm Abständen vom Zellsoma.
Angabe werden die Mittelwerte $\pm$ SEM.

3.3.3.4. Subplatezellen

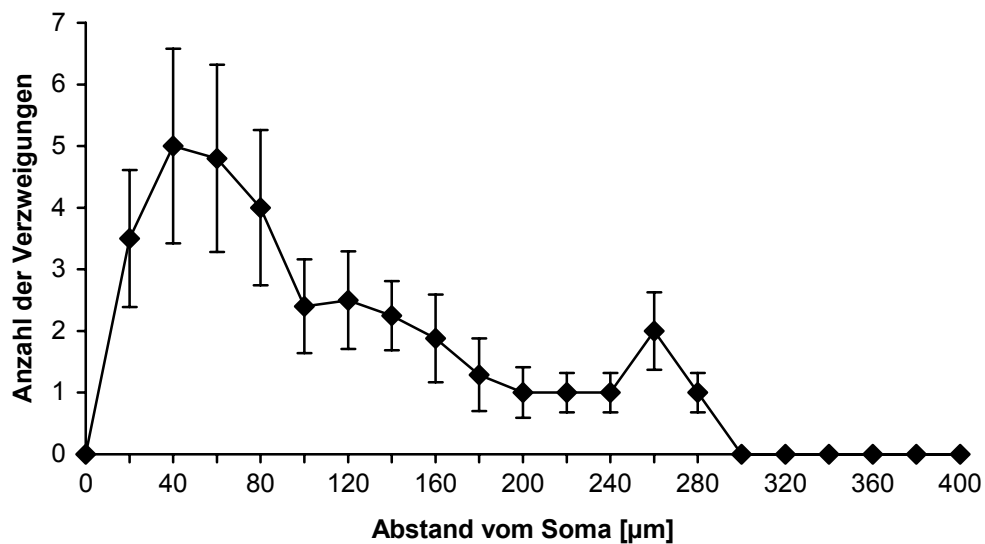


Abb. 14: Verzweigung der Dendriten von SP Zellen in 20 µm Abständen vom Zellsoma.
Gezeigt werden die Mittelwerte $\pm$ SEM.

Die Anzahl der Verzweigungen variierte in einer Entfernung von 20 - 350 μm zwischen eins und drei bei CR und IP Zellen. CR Zellen zeigten die höchste Anzahl an Verzweigungen zwischen 20 und 50 μm , während sich IP Zellen nur selten verzweigten.

In einer Entfernung von 20 - 60 μm zeigten BP und SP Zellen einen großen Anstieg an Verzweigungspunkten, da in diesem Bereich oblique Dendriten aus den Dendritenstämmen hervorgingen und sich wiederum verzweigten. Die Anzahl der Verzweigungen variierte hier zwischen eins und sechs.

Insgesamt betrachtet handelte es sich bei BP und SP Zellen um Neurone, die eine relativ hohe Anzahl an Dendriten besaßen und auch in größerer Entfernung vom Soma noch einige Verzweigungen aufwiesen. CR Zellen dagegen haben eine geringere Anzahl an Dendriten, dafür aber, den gesamten vermessenen Bereich betrachtet, mehr dendritische Verzweigungen.

Um einen Gesamtüberblick über die morphometrischen Daten der vier Neuronentypen zu erhalten, wurden die einzelnen Parameter Somaoberflächen und -volumina, sowie die dendritischen Oberflächen und Volumina zusammengefasst (in der Berechnung sind keine Angaben über dendritische Spines enthalten.).

3.3.4. Vergleich der Gesamtoberflächen und -Volumina

3.3.4.1. Zelloberflächen

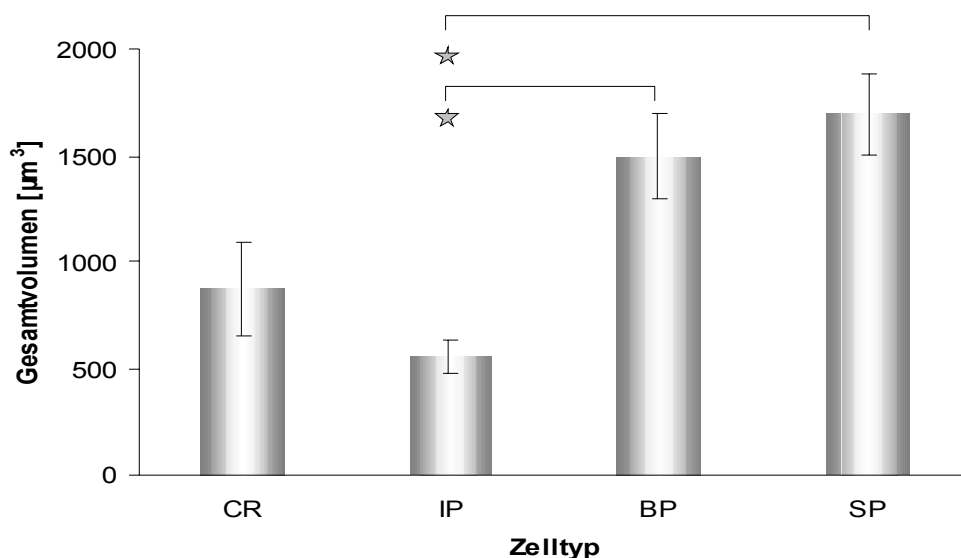


Abb. 3.15: Gesamtoberfläche der CR, IP, BP und SP Zellen. Angegeben werden die Mittelwerte $\pm$ SEM. Unterschiede zwischen Mittelwerten sind statistisch signifikant ($\star$, $p < 0.01$).

3.3.4.2. Zellvolumen

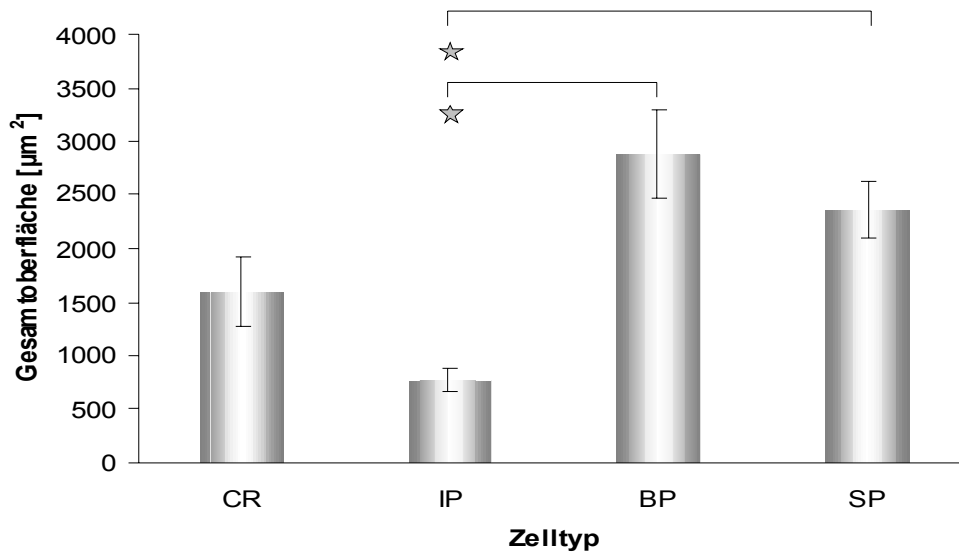


Abb. 3.16: Gesamtvolumen der CR, IP, BP und SP Zellen. Dargestellt werden die Mittelwerte $\pm$ SEM, . Unterschiede zwischen Mittelwerten sind statistisch signifikant (☆, $p < 0.01$).

Die durchschnittliche Gesamtoberfläche der CR Zellen lag bei $1599 \pm 322 \mu\text{m}^2$, IP Zellen hatten eine Gesamtoberfläche von $770 \pm 114 \mu\text{m}^2$. Diese war signifikant kleiner als die durchschnittliche Gesamtoberfläche von BP Zellen mit $2884 \pm 410 \mu\text{m}^2$ und SP Zellen mit $2352 \pm 264 \mu\text{m}^2$.

Die Werte für die Gesamtvolumina lagen bei CR ($873 \pm 219 \mu\text{m}^3$) und IP Zellen ($555 \pm 72 \mu\text{m}^3$) deutlich unter denen von BP ($1496 \pm 203 \mu\text{m}^3$) und SP Zellen ($1691 \pm 189 \mu\text{m}^3$). Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Werten von BP und SP Zellen im Vergleich zu IP Zellen.

Auch hier fällt das veränderte Oberflächen/Volumenverhältnis von SP zu BP Zellen auf.

Nach der morphometrischen Analyse der beschriebenen Zelltypen, sollte die strukturelle Entwicklung des postnatalen Cortex *in-vivo* unter experimenteller pharmakologischer Beeinflussung untersucht und beschrieben werden.

Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

Projekt II

In-vivo Untersuchungen zur Entwicklung des Neocortex neugeborener Ratten

Um zu überprüfen, ob die Substanzen, die in das EVA-Implantat eingebracht wurden wieder austraten, wurden gemäß dem unter 2.8 beschriebenen Protokoll radioaktiv markierte Implantate hergestellt und der Substanzaustritt über mehrere Tage verfolgt.

3.4. Messung der Substanzfreisetzung aus den EVA-Implantaten

3.4.1. MK 801

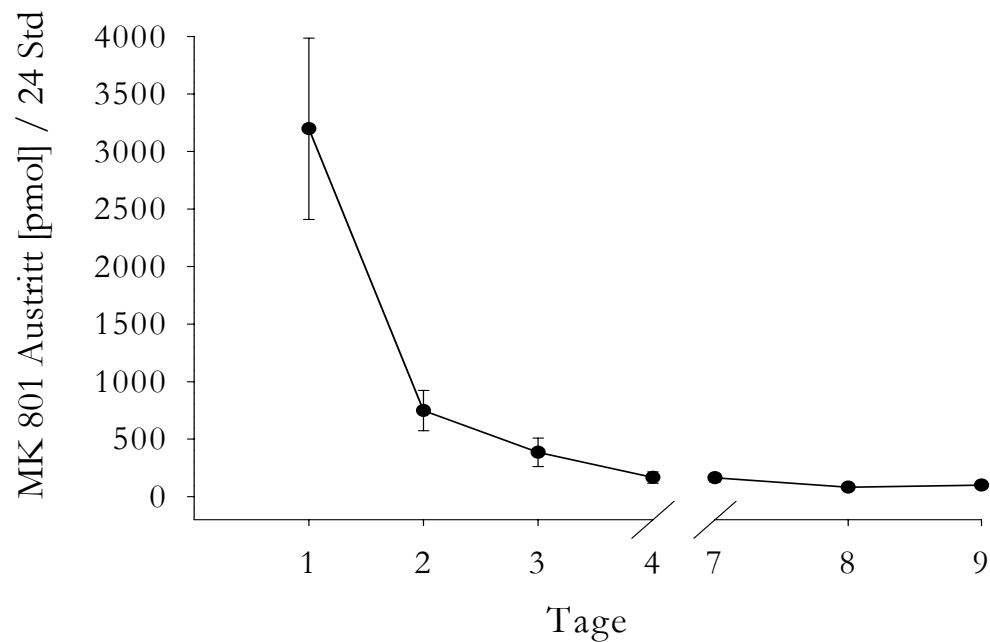


Abb. 3.17: Freisetzung von MK 801 aus den EVA-Implantaten. Angegeben sind die Mittelwerte, $n = 3-4$ Messungen. Die Messungen wurden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Die Substanz trat über einen Zeitraum von 9 Tagen aus.

3.4.2. BMI

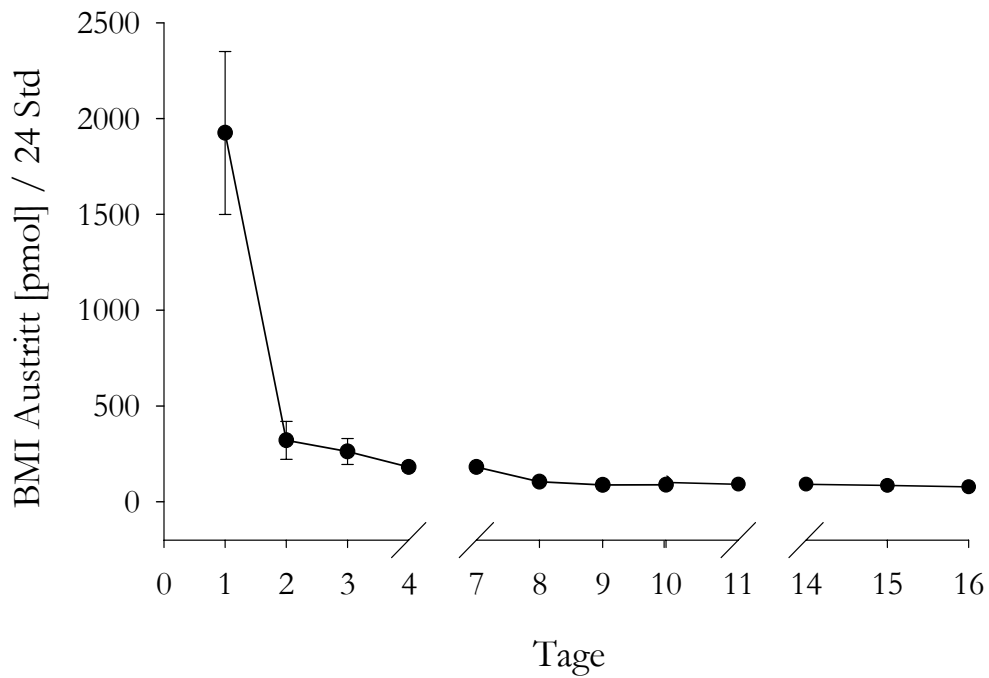


Abb. 3.18: Freisetzung von BMI aus den EVA-Implantaten. Angegeben sind Mittelwerte, $n=3-4$ Messungen. Die Messungen wurden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Bicucullin trat über einen Zeitraum von 16 Tagen aus.

3.4.3. Muscimol

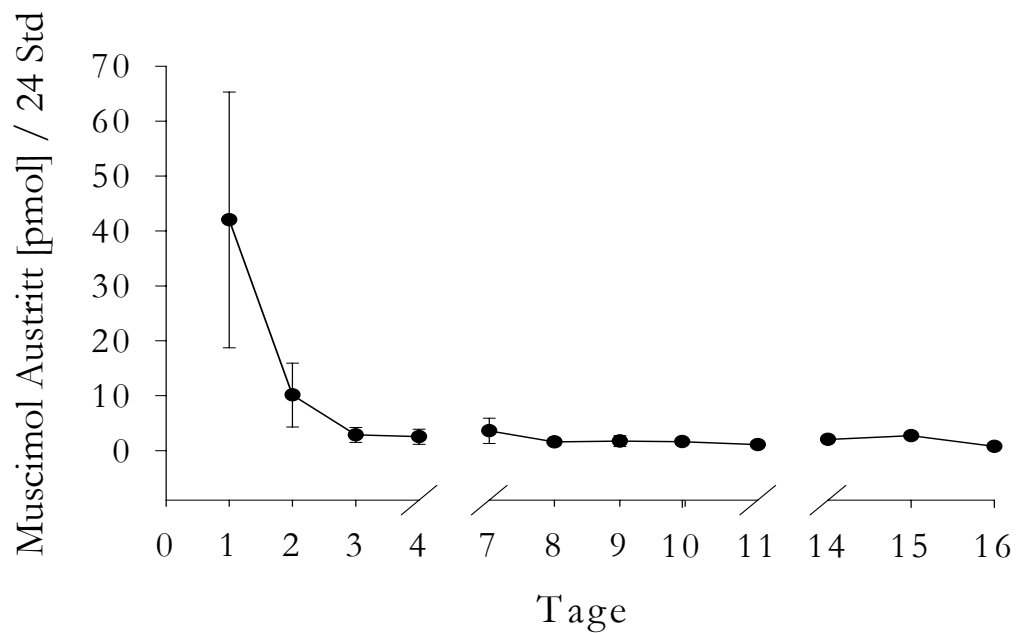


Abb. 3.19: Freisetzung von Muscimol aus den EVA-Implantaten. Angegeben sind Mittelwerte, $n=3-4$ Messungen. Die Messungen wurden wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Die Substanz trat über einen Zeitraum von 16 Tagen aus.

Der Austritt aller drei Substanzen aus dem EVA-Implantat war durch einen initialen Peak am ersten Tag gekennzeichnet, dem eine langsamere Freisetzung ab dem zweiten Tag folgte. MK 801 wurde insgesamt über einen Zeitraum von neun Tagen freigesetzt, bei Muscimol lag der Austritt bei 16 Tagen. Die Freisetzung von Bicucullin konnte über annähernd vier Wochen hinweg gemessen werden (zur detaillierteren Freisetzungskinetik vgl. 1.4.2.). Die Messungen mussten in diesen Zeiträumen aus technischen Gründen für zwei Tage unterbrochen werden (Tag 4-7, 11-14, 18-21 und Tag 24-28).

Bei allen verwendeten Substanzen kann davon ausgegangen werden, dass deren Applikation über den gesamten Zeitraum bis zur Beendigung der neuronalen Migration und Ausbildung aller sechs Cortexschichten erfolgte.

3.5. Histologische Untersuchungen

3.5.1. Nissl-Färbungen/Kresylviolett – Färbungen

In die Auswertung gingen nur Tiere ein, die keine Läsion aufwiesen. Läsionen entstanden während der Implantation durch mechanische Beschädigung der Cortexoberfläche und waren durch weitreichende Beschädigung der Cortices und der subcorticalen Areale gekennzeichnet (Barth 1987). Ein weiteres wichtiges Kriterium war eine intakte piaie Oberfläche.

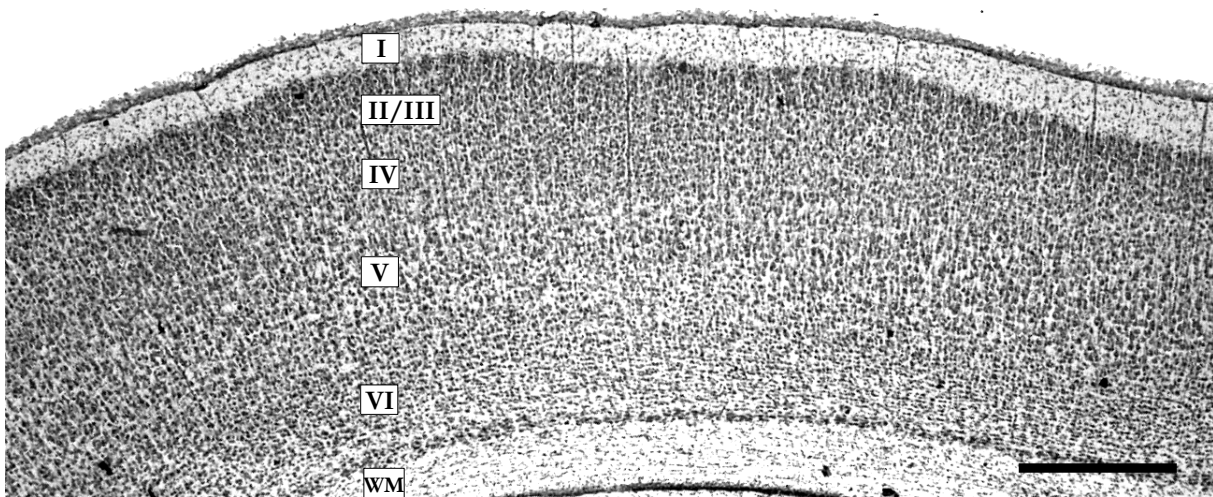
Alle für die Auswertung herangezogenen Tiere zeigten Veränderungen ihrer corticalen Architektur. Dies wird detailliert bei der Besprechung der einzelnen Substanzgruppen dargestellt.

Die Durchführung der Nissl-Färbungen wurde unter 2.10.1 beschrieben. Die Vergrößerung x25 gibt einen Überblick über einen größeren Bereich der Schnitte, die Vergrößerung x50 stellt jeweils einen Ausschnitt aus dem Bereich unter dem EVA-Implantat dar.

3.5.1.1. Unoperierte Kontrolltiere

Die Abbildungen zeigen in den beiden Altersgruppen P7 und P14 den normal entwickelten sechsschichtigen Cortex der Ratte. Der Ausschnitt befindet sich in Par I, somatosensorischer Cortex. Die Anzahl der Tiere wird in Tabelle 1, Punkt 2.10 wiedergegeben.

A. P7



B. P7

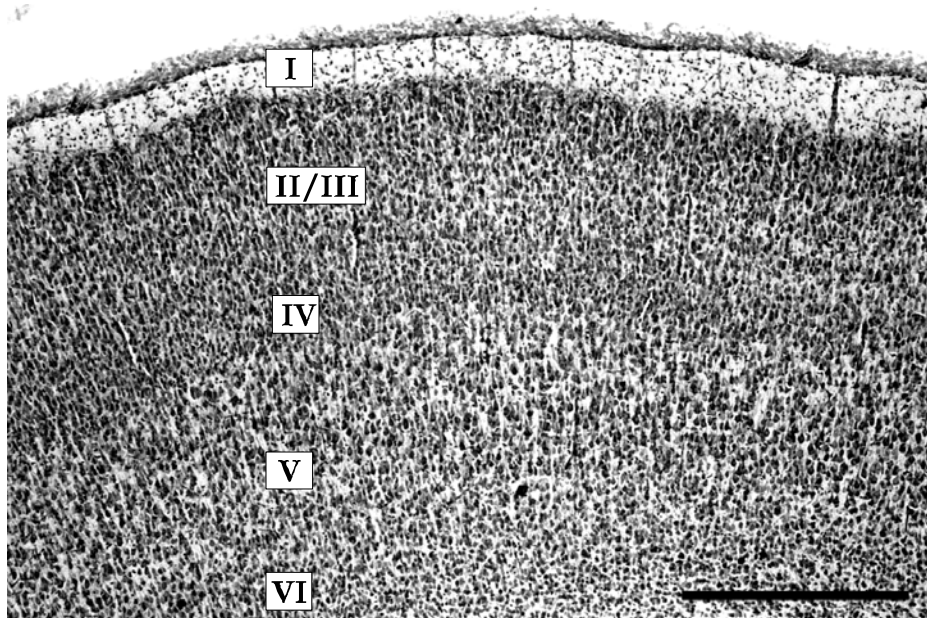
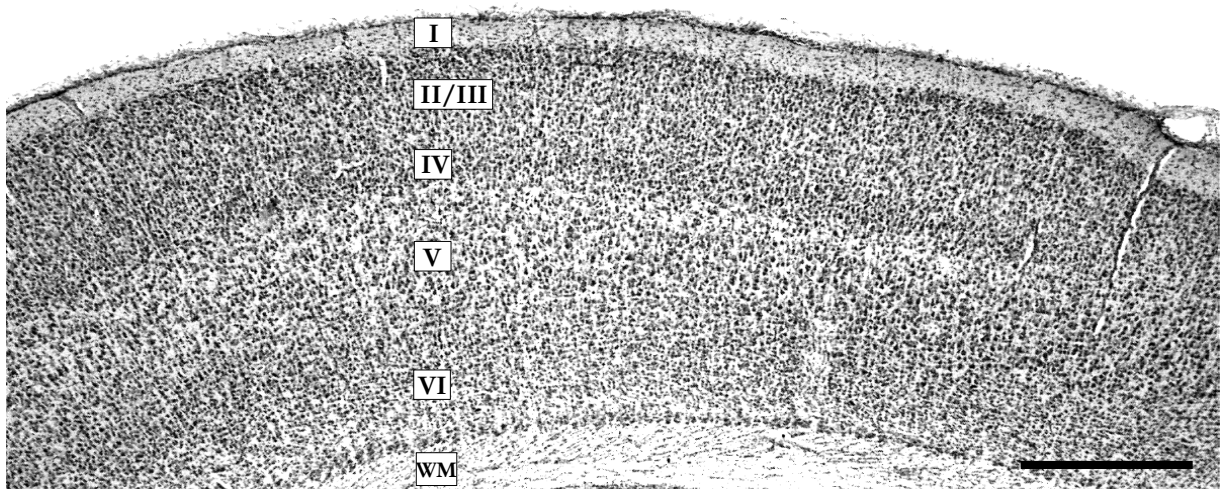


Abb. 3.20: Fotografien der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Nicht operierte **Kontrolltiere**, **Alter P7**. A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Gezeigt wird der normal entwickelte sechsschichtige Cortex der Ratte.

A. P14



B. P14

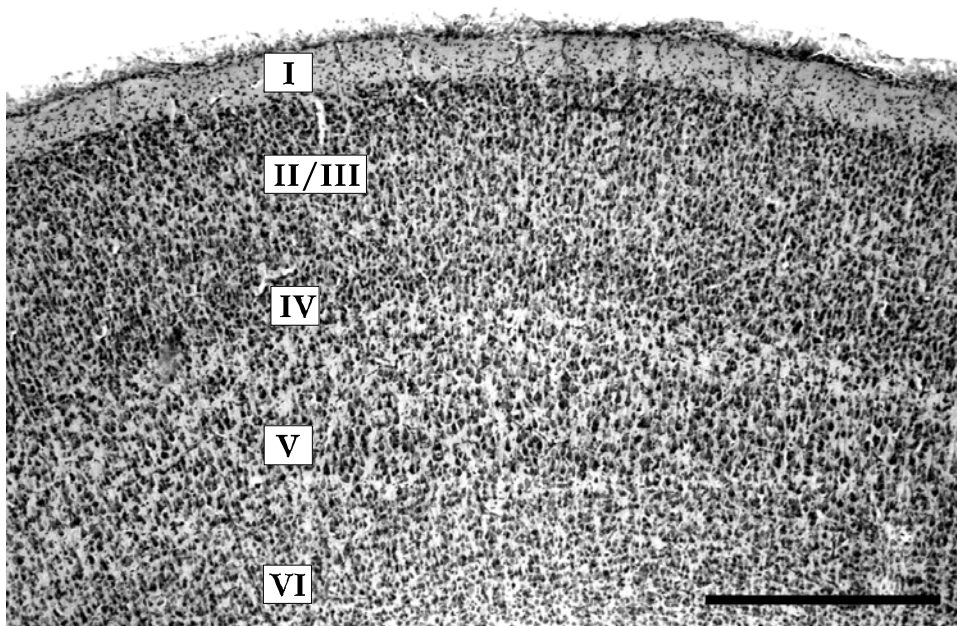
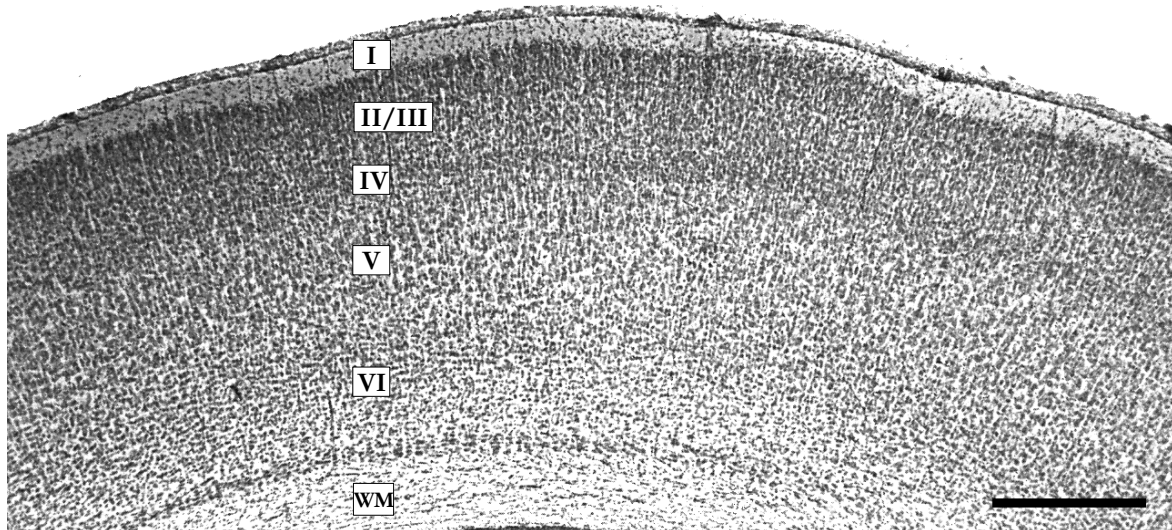


Abb. 3.21: Aufnahmen der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Nicht operierte **Kontrolltiere**, **Alter P14**. A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Gezeigt wird der normal entwickelte sechsschichtige Cortex der Ratte.

3.5.1.2. DMSO

A. P7



B. P7

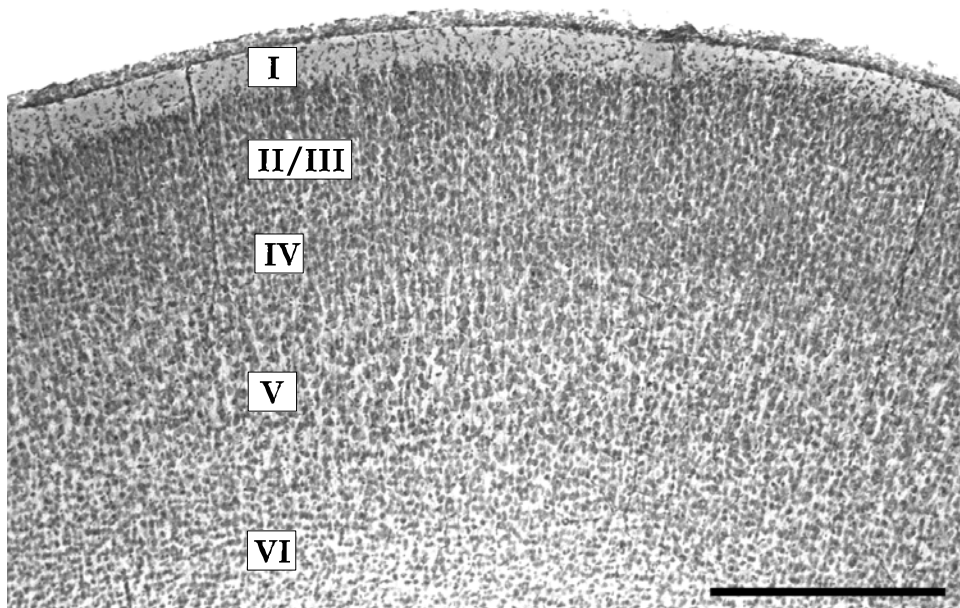
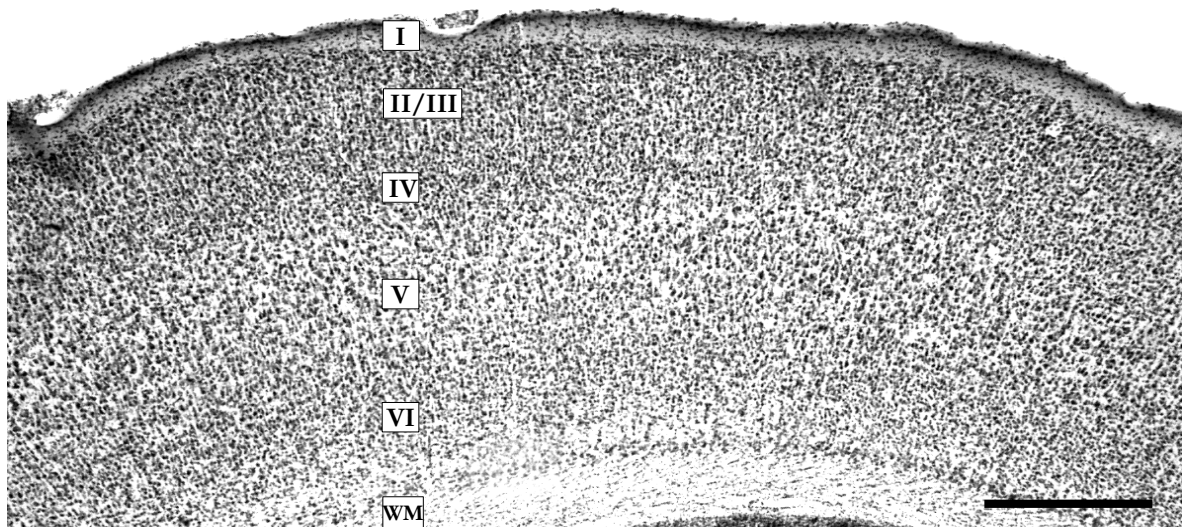


Abb. 3.22: Aufnahmen der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Lösungsmittelkontrollen, d.h. Tiere, die ein **DMSO**-Implantat erhalten haben. **Alter P7.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Im Vergleich zu den unoperierten Kontrolltieren konnte keine Veränderung der corticalen Struktur festgestellt werden.

A. P14



B. P14

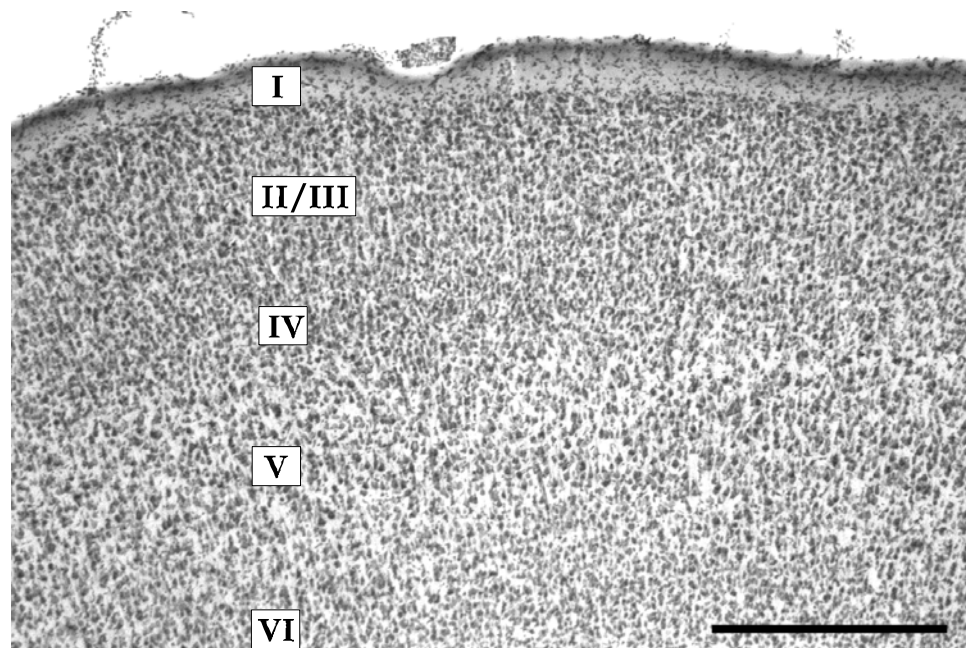


Abb. 3.23: Fotografien der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Lösungsmittelkontrollen, d.h. Tiere, die ein **DMSO**-Implantat erhalten haben. **Alter P14.**

A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm.

Die Implantation der Lösungsmittel-haltigen EVA-Stücke sollte dazu dienen herauszufinden, ob DMSO für eventuell auftretende Veränderungen der corticalen Struktur verantwortlich sein könnte.

Die Tiere, die das DMSO-Implantat erhielten, zeigten in beiden Altersgruppen keine Veränderung in der corticalen Laminierung. Die Schichten waren, wie bei den unbehandelten Kontrolltieren normal ausgebildet. Die leichten Einbuchtungen über der Schicht I in der Altersgruppe P14 könnten darauf hindeuten, dass das EVA-Implantat an dieser Stelle platziert war.

Das Lösungsmittel DMSO hatte also, insgesamt gesehen, keine Effekte auf die Entwicklung der einzelnen Schichten und die Ausbildung der normalen corticalen Struktur.

3.5.1.3. MK 801

Nach chronischer Applikation von MK 801 zeigten alle Tiere beider Altersgruppen Veränderungen in der corticalen Struktur, wobei sich die Effekte als inhomogen herausstellten (vergleiche hierzu auch Tab. 2, folgende Seite).

In Schicht I befanden sich heterotope Zellen, die entweder Zellcluster (Anhäufungen) bildeten, oder die gesamte Schicht I bis zur pialen Oberfläche ausfüllten (vgl. Abb. 3.24, 3.25). Ein oder mehrere Invaginationen der Schicht I in tiefere Cortexschichten waren charakteristisch, die Größe variierte jedoch stark. Innerhalb der Einbuchtungen befanden sich ebenfalls heterotope Zellcluster.

Abhängig von der Größe der Invagination der Lamina I ergaben sich Laminierungsstörungen der unteren Schichten, da diese entsprechend um die Einbuchtung herum orientiert waren.

Schwere Laminierungsstörungen, die auch die Schichten V und VI betrafen, bis hin zu fehlender Laminierung, konnte in sechs von elf Fällen beobachtet werden. Hier schienen die Zellen der unteren Schichten bis an die piale Oberfläche gewandert zu sein (vgl. Abb. 3.24).

Zellfreie Stellen in den unteren corticalen Schichten konnten vereinzelt gesehen werden ($n=2$, nicht gezeigt), wie auch in seltenen Fällen das Corpus callosum verbreitert war ($n=3$, nicht gezeigt), in einem Fall fanden sich Zellen darin.

Auswirkungen auf andere subcorticale Areale, wie zum Beispiel den Hippocampus, konnten jedoch nicht beobachtet werden.

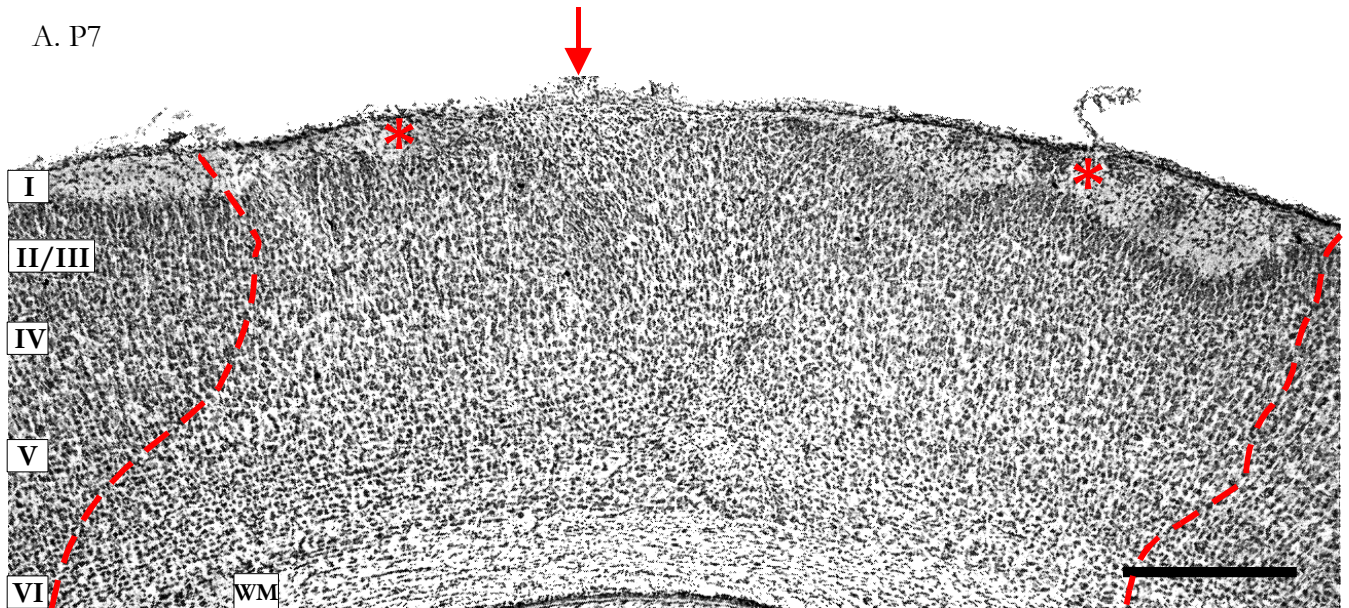
Die Auswirkungen von MK 801 reichten von medial nach lateral über maximal 1200 μm , was etwas über die Breite des EVA-Implantats hinausgeht. Von frontal nach dorsal war im Durchschnitt eine Breite von 2200 μm betroffen.

Die Substanz MK 801 zeigte im Vergleich zu BMI und Muscimol die stärksten Auswirkungen.

Alter P7	Art der Veränderung
Tier 1	Gestörte Laminierung in allen corticalen Schichten, Heterotopien in Schicht I, daneben Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, hierin heterotope Zellen. Scheinbare Verbreiterung des Corpus callosum.
Tier 2	Gestörte Laminierung in Schichten II und III, Heterotopien in Schicht I, mehrfache Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, hierin heterotope Zellen
Tier 3	Gestörte Laminierung der oberen corticalen Schichten durch Invagination der Schicht I. Heterotopien in Schicht I. Zellfreie Stellen in Schicht IV. V Scheinbar verbreitetes Corpus callosum mit ectopischen Zellen.
Tier 4	Heterotopien in Schicht I. Kleine Invaginationen der Schicht I in die unteren corticalen Schichten, Laminierung nicht so stark betroffen.
Tier 5	Heterotopien in Schicht I. Mehrfache Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, dadurch auftretende Laminierungsstörungen. Über Schicht I heterotope Zellen, die einen Zellverband bilden.
Alter P14	Art der Veränderung
Tier 1	Laminierung in allen Schichten gestört. Heterotopien in Schicht I. Invagination der Lamina I in tiefere Schichten, in der Einbuchtung befinden sich meningeale Zellen. Auftreten noch weiterer Einbuchtungen der Schicht I, untere Zellschichten sind entsprechend orientiert.
Tier 2	Gestörte Laminierung, teilweise bis Schicht V. Heterotopien in Schicht I. Mehrfache Invagination der Schicht I entsprechender Umorientierung der darunterliegenden Schichten II und III. In den Einbuchtungen der Schicht I häufig heterotope Zellcluster.
Tier 3	Heterotopien in Schicht I. Daneben Schicht I zunehmend verbreitert, mit heterotopen Zellen darin. Laminierung nicht stark betroffen, da Schicht I über eine größere Strecke extrem verbreitert ist.
Tier 4	Laminierung völlig gestört. Einbuchtungen der Schicht I in tiefere corticale Schichten, diese sind entsprechend orientiert. Heterotopien in Schicht I, teilweise Schicht V Pyramidenzellen bis in Lamina I.
Tier 5	Schicht I schmaler im Bereich unter dem Implantat, teilweise Heterotopien. An einer Stelle ist der Cortex über Schicht I verdickt, mit heterotopen Zellen bis an die piale Oberfläche. Laminierungsstörung bis Schicht V, vor allem im Bereich unter der Ausbuchtung. Invagination der Schicht I bis in Schicht V, hierin heterotope Zellen. Das Corpus callosum scheint verbreitert.
Tier 6	Gestörte Laminierung in allen Schichten. Heterotopien in Schicht I, Mehrfache Invagination der Schicht I mit heterotopen Zellclustern. Zellfreie Stellen in den Schichten III bis V, die sich zu einem Band ausweiten, welches den Cortex zu teilen scheint.

Tab. 2: Anzahl der Versuchstiere und Art der Veränderungen der corticalen Struktur nach chronischer MK 801 Applikation.

A. P7



B. P7

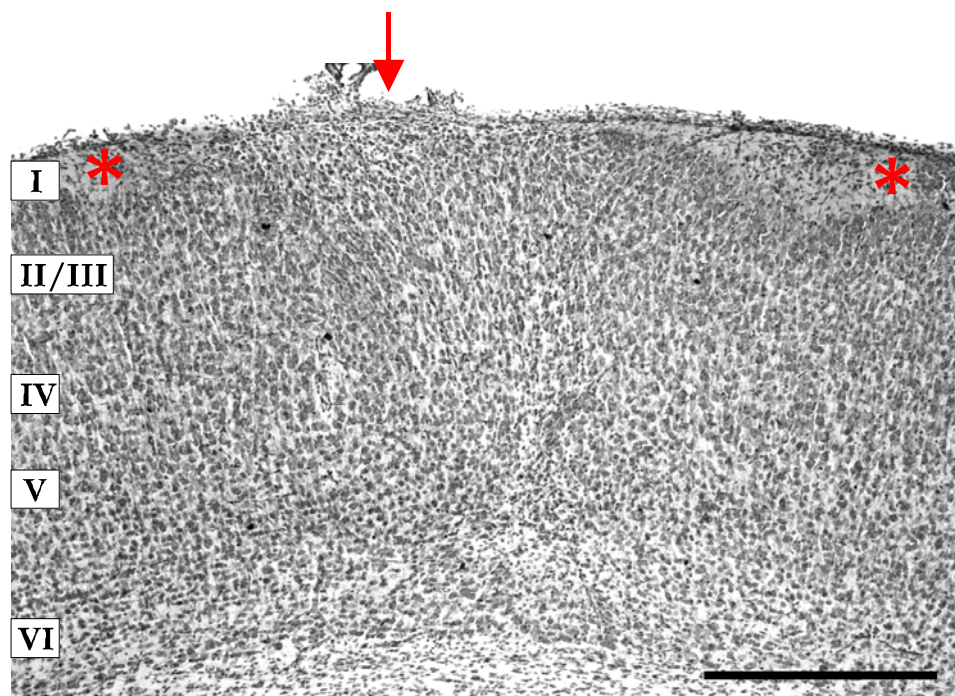
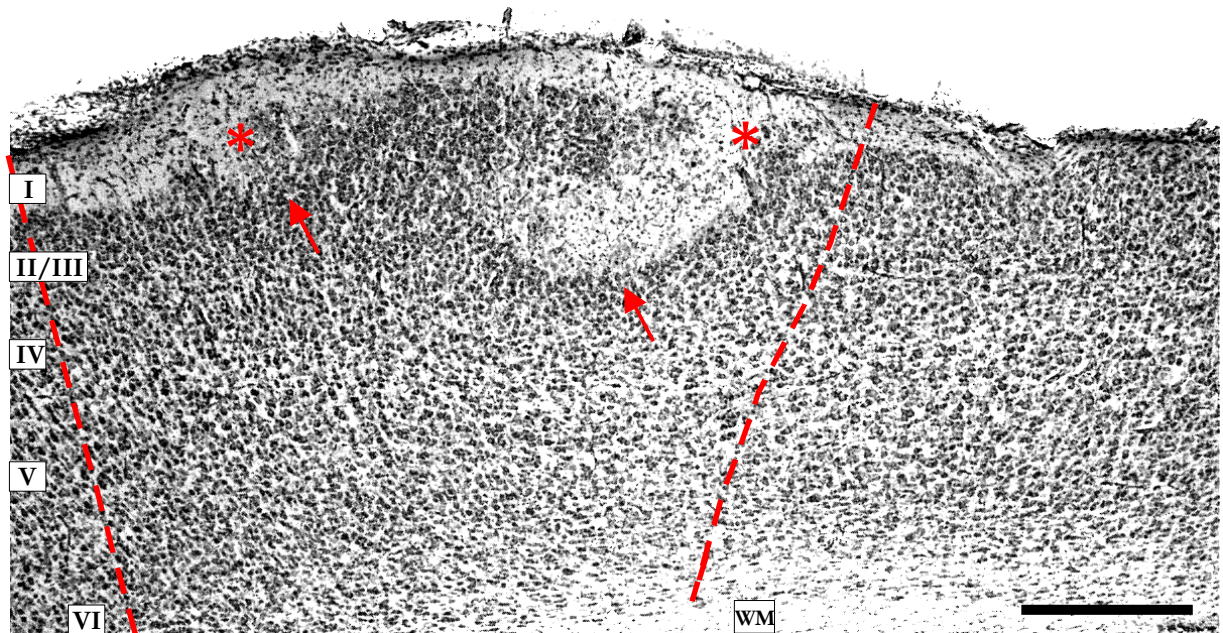


Abb. 3.24: Fotografien der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Gezeigt werden Tiere, die ein Implantat mit **MK 801** erhalten haben. **Alter P7.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm.. Im Bereich unter dem Implantat ist die Laminierung in allen Schichten gestört (Abb. A, Bereich zwischen den gestrichelten Linien). Heterotopien (Sterne), sowie eine leichte Einbuchtung der Schicht I sind deutlich zu erkennen.

A. P14



B. P14

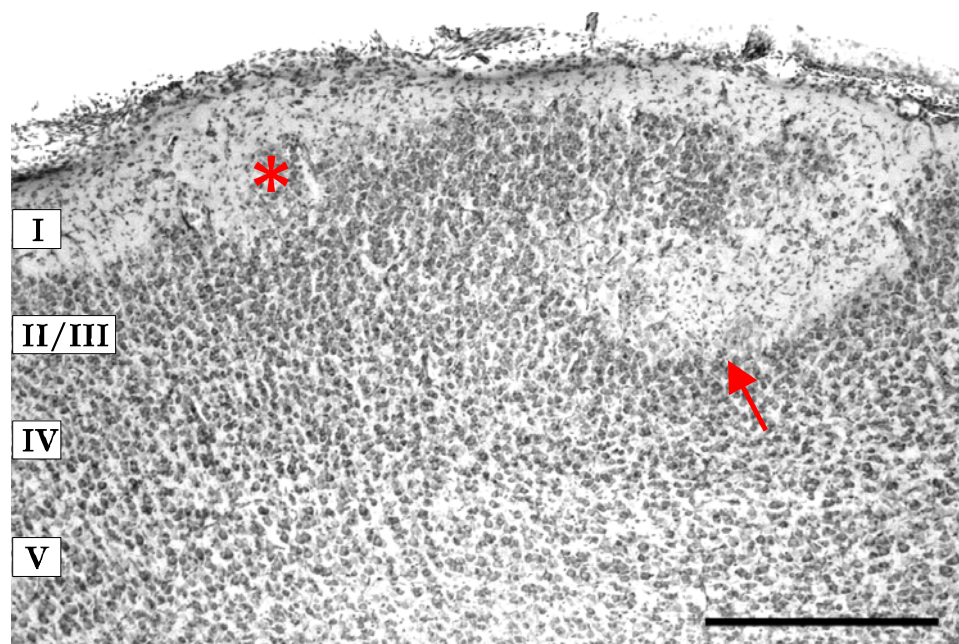


Abb. 3.25: Fotografien der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Gezeigt werden Tiere, die ein Implantat mit **MK 801** erhalten haben. **Alter P14.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Der Bereich, der von der gestrichelten Linie eingefasst wird (Abb. A), markiert die Stelle der Laminierungsstörung. Heterotopien in Schicht I (Sterne), sowie die Invagination der Schicht I in die corticalen Schichten II/III sind deutlich zu erkennen (Pfeil).

3.5.1.4. BMI

Chronische Applikation von Bicucullin führte zu einer veränderten corticalen Struktur, jedoch war der Effekt, im Vergleich zu den MK 801 Tieren nicht so ausgeprägt.

Schicht I war deutlich verbreitert (bis auf ein Tier, das den gegensätzlichen Effekt zeigte) und Heterotopien konnten in allen Fällen beobachtet werden. Unter den Implantaten war Lamina I bis an die Pia mit Zellen unterer Schichten gefüllt. Bei Auftreten von Invaginationen der Schicht I (in 50 % der Fälle, vor allem in der Altersgruppe P7, vgl. Tabelle 3, folgende Seite) in die darunterliegenden Cortexschichten, ging dies mit Laminierungsstörungen einher, da diese Zellschichten entsprechend orientiert waren. Die Laminierung der Schicht VI war nie gestört und subcorticale Areale waren nicht betroffen.

.

Der Cortex war im Bereich des EVA-Implantats bei allen Tieren verbreitert.

Von medial nach lateral war ein Bereich von 800-1100 μm betroffen, was je nach Orientierung der Breite des Implantats entsprach. Die Ausdehnung betrug von frontal nach dorsal durchschnittlich 760 μm , war also deutlich kleiner als bei den MK 801 Tieren.

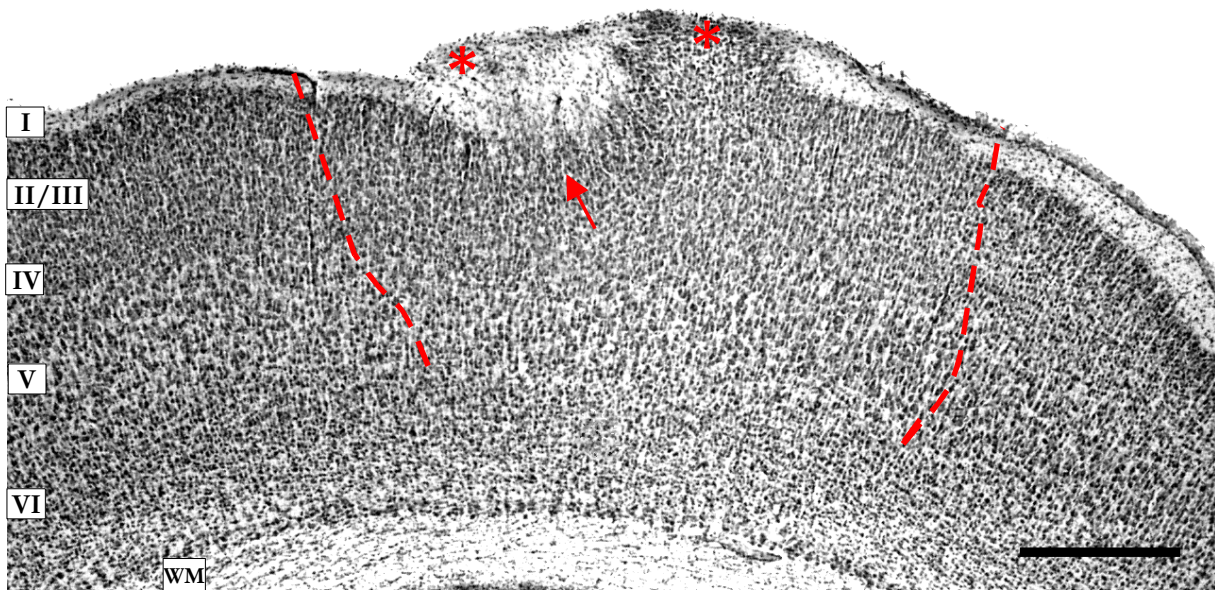
Im Allgemeinen erzeugte die Gabe von Bicucullin keine vergleichbar homogenen Effekte, wie sie bei MK 801 oder Muscimol erzielt werden konnten.

Nachfolgende Tabelle gibt Aufschluss über die Anzahl der Tiere und die Art der aufgetretenen Störungen.

Alter P7	Art der Veränderung
Tier 1	Gestörte Laminierung bis Schicht V, deren Zellen bis an die piale Oberfläche gewandert zu sein scheinen. Heterotopien in Schicht I, daneben Invaginationen der Schicht I in tiefere corticale Schichten, hierin heterotope Zellen.
Tier 2	Heterotopien in Schicht I, Schicht I hier allgemein sehr dünn. Die Laminierung ist nicht betroffen.
Tier 3	Gestörte Laminierung aller corticalen Schichten, auch hier scheinen Schicht V Pyramidenzellen bis an die piale Oberfläche gewandert zu sein.. Heterotopien in Schicht I, Invagination der Lamina I in tiefere Cortexschichten.. Zellfreie Stellen in Schicht IV. V
Tier 4	Heterotopien in Schicht I. Kleine Invaginationen der Schicht I in die unteren corticalen Schichten, dadurch auftretende Laminierungsstörungen. Zellfreie Stellen in den unteren Cortexschichten.
Tier 5	Heterotopien in Schicht I. Mehrfache Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, dadurch auftretende Laminierungsstörungen. Heterotopien in Schicht I, Zellen direkt unter pialer Oberfläche.
Alter P14	Art der Veränderung
Tier 1	Heterotopien in Schicht I. Invagination der Lamina I in tiefere Schichten, die unteren Zellschichten sind entsprechend orientiert. In der Einbuchtung befinden sich heterotope Zellen.
Tier 2	Schicht I ist stark verbreitert, teilweise mit heterotopen Zellclustern, die Laminierung ist nicht betroffen.
Tier 3	Heterotopien in Schicht I. Schicht I ist über den gesamten Bereich erheblich dünner als die Kontrollhemisphäre.
Tier 4	Schicht I ist extrem breit, mehr als doppelt so breit wie die Kontrollhemisphäre. Hier Auftreten von Heterotopien, die Laminierung ist nicht gestört.
Tier 5	Schicht I ist extrem breit, mehr als doppelt so breit wie die Kontrollhemisphäre. Heterotope Zellen in Schicht I, die Laminierung ist nicht gestört.
Tier 6	Schicht I ist extrem breit, mehr als doppelt so breit wie die Kontrollhemisphäre. Hier Auftreten von Heterotopien, die Laminierung ist nicht gestört.
Tier 7	Schicht I ist extrem breit, mehr als doppelt so breit wie die Kontrollhemisphäre. Hierin Heterotopien, die Laminierung ist nicht gestört. Lateral befinden sich Zellen unmittelbar unter der pialen Oberfläche.

Tab.3: Anzahl der Tiere und Art der aufgetretenen Störung nach chronischer BMI Applikation.

A. P7



B. P7

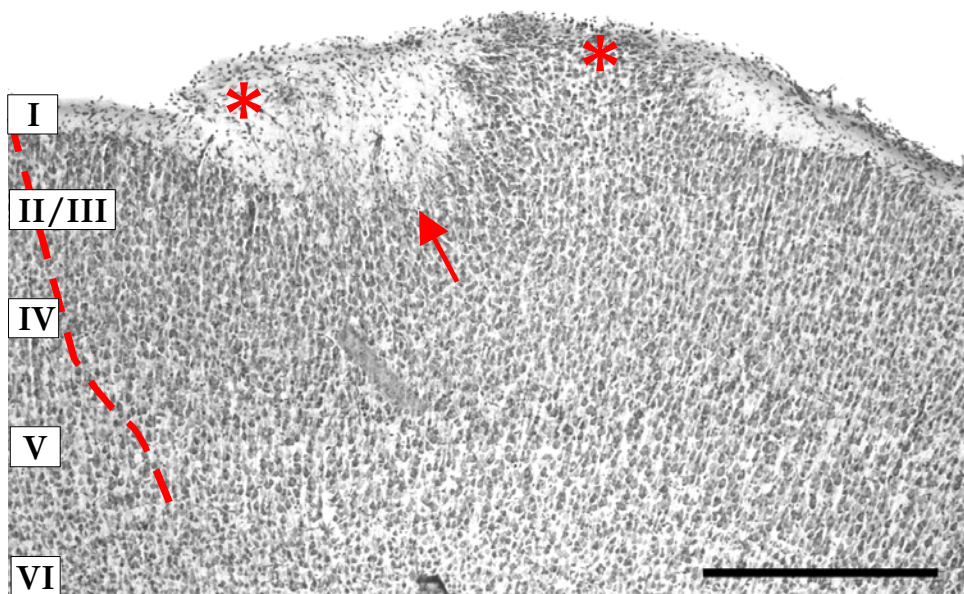
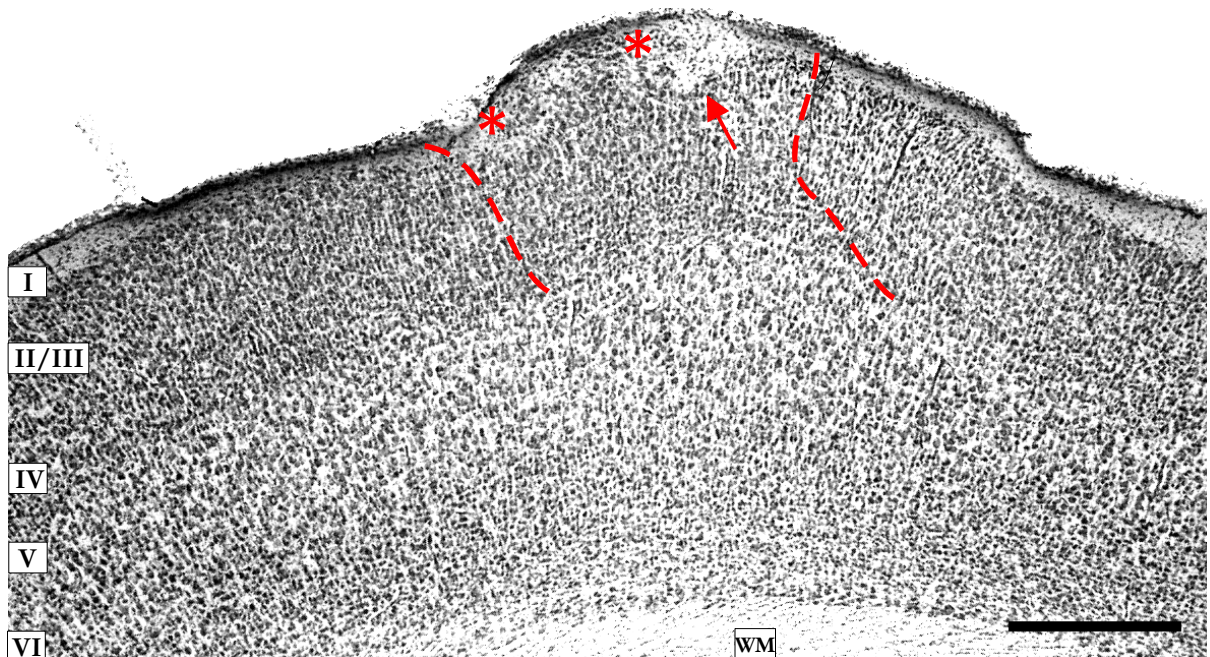


Abb. 3.26: Aufnahmen der Nissl-Färbungen von 50 μm dicken coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Gezeigt werden Tiere, die ein Implantat mit **BMI** erhalten haben. **Alter P7.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 μm . Deutlich zu erkennen ist die Invagination der Schicht I in die unteren Corticeschichten (Pfeil). Schicht I weist Cluster von heterotopen Zellen auf (Sterne). Die gestrichelte Linie in Abb. A umgrenzt den Bereich der Laminierungsstörung.

A. P14



B. P14

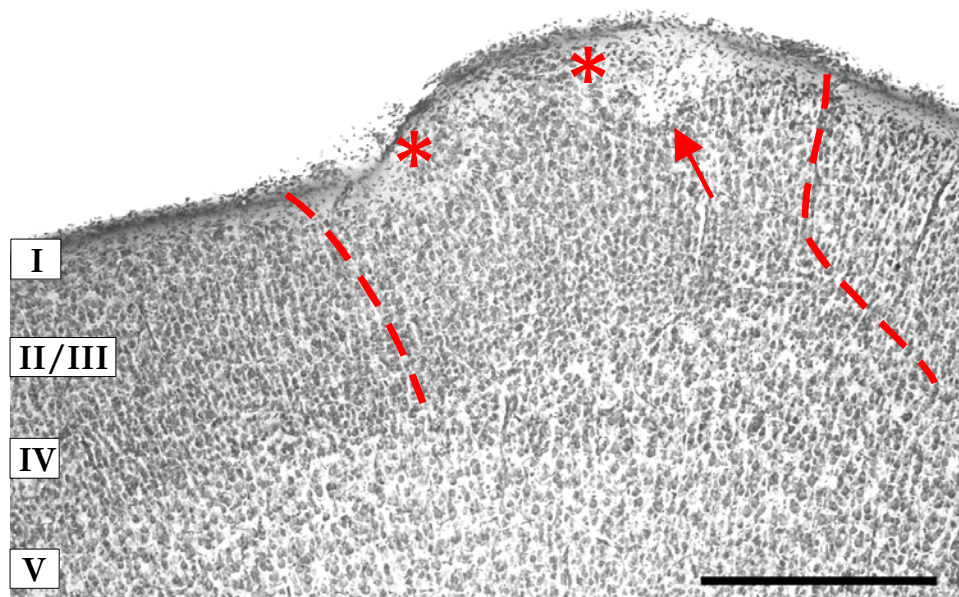


Abb. 3.27: Aufnahmen der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Gezeigt werden Tiere, die ein Implantat mit **BMI** erhalten haben. **Alter P14.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Deutlich zu erkennen ist die Invagination der Schicht I in die unteren Cortexschichten (Pfeil). Schicht I weist Cluster von heterotopen Zellen auf (Sterne). Die gestrichelte Linie in Abb. A umgrenzt den Bereich der Laminierungsstörung.

3.5.1.5. Muscimol

Die chronische Applikation von Muscimol erzeugte folgende Effekte:

Heterotopien in Schicht I konnten bei allen Tieren und in allen Altersgruppen beobachtet werden. Unter den Implantaten war Lamina I bis an die Pia mit Zellen unterer Schichten gefüllt.

Bei Auftreten von Invaginationen der Schicht I (in fünf Fällen, vgl. Tabelle 4 auf folgender Seite) in die darunterliegenden Cortexschichten ging dies mit Laminierungsstörungen einher, die bis in Schicht V reichten. Die Zellschichten waren entsprechend um die Invagination orientiert.

Subcorticale Areale waren nicht betroffen.

Der Cortex war in einem Fall stark verbreitert, dies hat die Laminierung allerdings nicht betroffen.

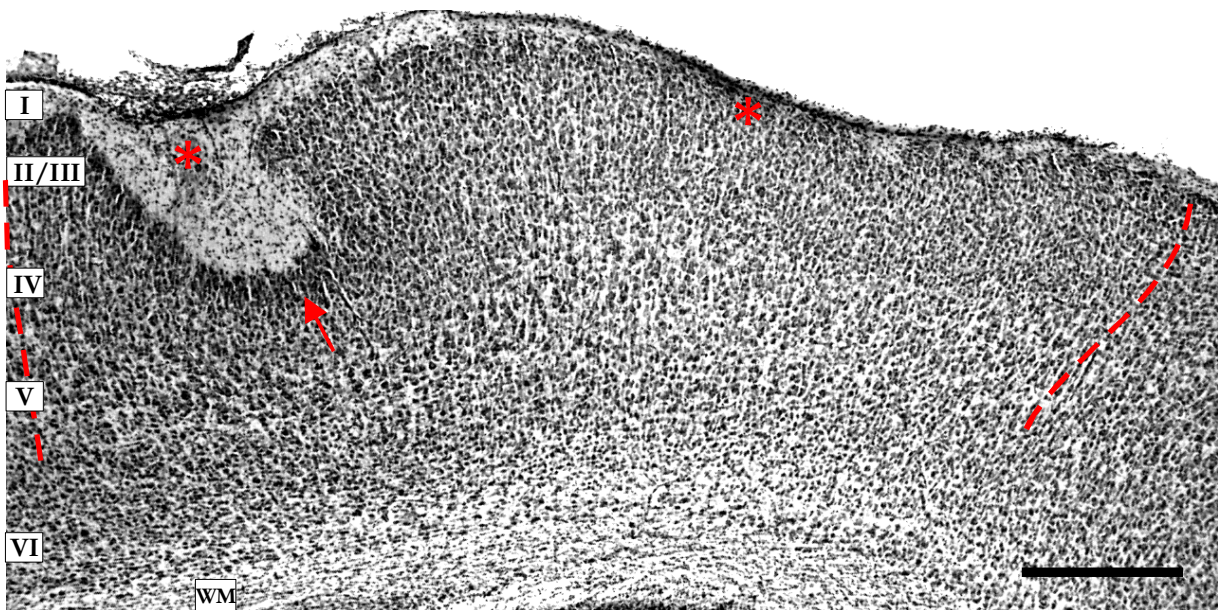
Von medial nach lateral war ein Bereich von 800-1100 μm betroffen. Dies entspricht auch hier, je nach Orientierung, der Breite des EVA-Implantats. Von frontal nach dorsal waren durchschnittlich 760 μm betroffen, der Effekt entsprach in seiner Ausdehnung den Auswirkungen von BMI. Der entsprechende Bereich war ebenfalls deutlich kleiner als bei MK 801.

Der durch Muscimol erzielte Effekt war in allen Altersgruppen einheitlich.

Alter P7	Art der Veränderung
Tier 1	Gestörte Laminierung bis Schicht V, wegen großer Invagination der Schicht I in der sich heterotope Zellcluster befinden. Die restlichen Schichten sind entsprechend orientiert. Weitere Heterotopien in Schicht I.
Tier 2	Gestörte Laminierung bis Schicht V, wegen großer Invagination der Schicht I in der sich heterotope Zellcluster befinden. Die restlichen Schichten sind entsprechend orientiert. Weitere Heterotopien in Schicht I
Tier 3	Heterotopien in Schicht I. Die Zellen reichen bis an die piaale Oberfläche.
Tier 4	Heterotopien in Schicht I. Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, dadurch auftretende Laminierungsstörungen bis Schicht V. In der Einbuchtung befinden sich heterotope Zellcluster.
Tier 5	Heterotopien in Schicht I. Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, dadurch auftretende Laminierungsstörungen bis Schicht V. In der Einbuchtung befinden sich heterotope Zellen.
Alter P14	Art der Veränderung
Tier 1	Heterotopien in Schicht I. Die Zellen reichen bis an die piaale Oberfläche
Tier 2	Schicht I ist stark verbreitert, teilweise mit heterotopen Zellclustern, die Laminierung ist nicht betroffen.
Tier 3	Heterotopien in Schicht I. Die Zellen reichen bis an die piaale Oberfläche
Tier 4	Heterotopien in Schicht I. Invagination der Schicht I in tiefere corticale Schichten, dadurch auftretende Laminierungsstörungen bis Schicht V. In der Einbuchtung befinden sich heterotope Zellen.

Tab.4: Anzahl der Tiere und Art der aufgetretenen Störung nach chronischer Muscimol Applikation.

A. P7



B. P7

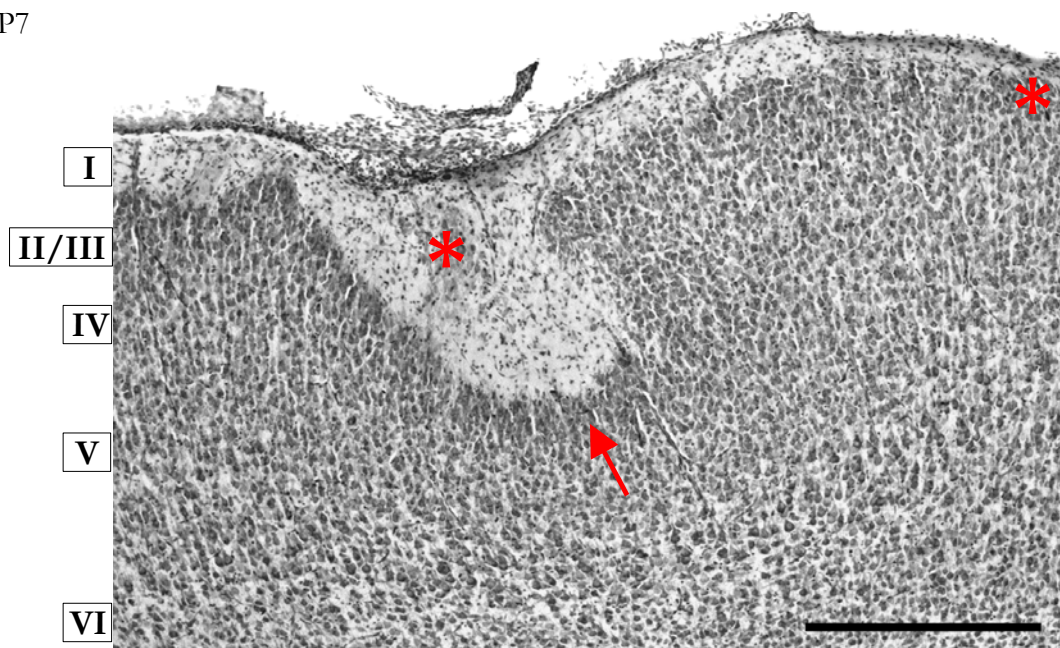


Abb. 3.28: Aufnahmen der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Gezeigt werden Tiere, die ein Implantat mit **Muscimol** erhalten haben. **Alter P7.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Deutlich zu erkennen ist die Invagination der Schicht I in die unteren Cortexschichten (Pfeil). Schicht I weist Cluster von heterotopen Zellen auf (Sterne). Die gestrichelte Linie in Abb. A umgrenzt den Bereich der Laminierungsstörung.

A. P14



B. P14

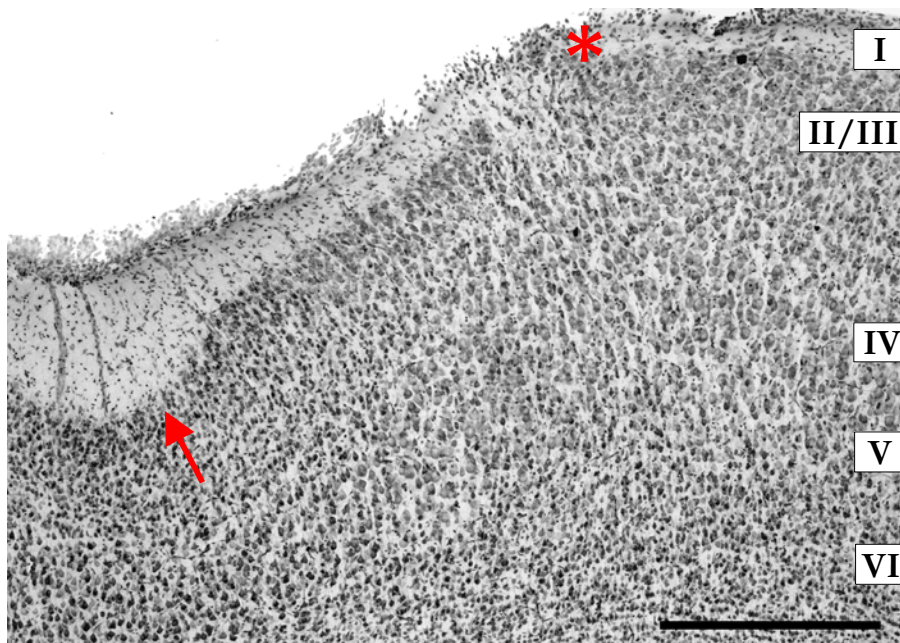


Abb. 3.29: Fotografien der Nissl-Färbungen von 50 µm dicken, coronalen Schnitten aus dem Bereich Par I, somatosensorischer Cortex. Gezeigt werden Tiere, die ein Implantat mit **Muscimol** erhalten haben. **Alter P14.** A. Vergrößerung x25, B. Vergrößerung x50, Scale bar 500 µm. Deutlich zu erkennen ist die Invagination der Schicht I in die unteren Cortexschichten (Pfeil). Schicht I weist Cluster von heterotopen Zellen auf (Sterne). Die gestrichelte Linie in Abb. A umgrenzt den Bereich der Laminierungsstörung.

3.5.2. Immunhistochemie

Zur detaillierteren Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen (und deren Verteilung nach Applikation der Substanzen) wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt, wobei die verwendeten Antikörper folgenden Gruppen zugeteilt wurden:

1. GFAP und Vimentin als Marker für Gliazellen und Endothelien,
2. Map 2 als Marker für Pyramidenzellen,
3. NMDA-Rezeptor Untereinheiten: NR1, NR2ab, NR2b und NR2c als Marker für Pyramidenzellen und GABAerge Interneurone,
4. GABA und Calcium-bindend: Calbindin, Parvalbumin, Calretinin als Marker für GABAerge Interneurone.
5. SP 142 (Reelin-spezifischer Antikörper) als Marker für Cajal-Retzius- und Reelin - exprimierende Zellen.

Die immunhistologischen Färbungen wurden nach dem unter 2.10.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Parallel hierzu wurden für jedes Tier Nissl-Färbungen angefertigt, um einen Überblick über das gesamte Gewebe zu bekommen und um läsionierte Tiere ausschließen zu können. Auffällige Unterschiede zwischen den Altersgruppen P7 und P14 konnten nicht festgestellt werden. Die immunhistologischen Färbungen lagen für jede Altersgruppe bei einer Anzahl von n=3-5 (vgl. Tabelle Punkt 2.10).

Um die Reproduzierbarkeit der aufgetretenen Effekte zu überprüfen und die Daten untereinander vergleichen zu können, wurden von jedem Tier aus dem Bereich unter dem Implantat serielle Schnitte angefertigt. Diese wurden jeweils mit den zu testenden Antikörpern inkubiert. So ergaben sich pro Tier maximal zwei Schnitte pro Antikörper. Die Immunhistochemie korreliert aufgrund dessen nur teilweise mit den Nissl-Färbungen, die ein durchgängiges Bild über den gesamten Bereich unter dem Implantat lieferten. So konnten zum Beispiel Microgyri, wie sie bei den Nissl-Färbungen auftraten, in den Ergebnissen der Immunhistochemie selten gefunden werden. Immunhistologische Färbungen liefern differenzierte Bilder. Hier werden nur einzelne, spezifische Zelltypen dargestellt, nicht alle Neuronen im Schnitt.

Kontrollfärbungen wurden als Negativkontrollen bei jedem Versuch mitgeführt. Da sie ohne primären Antikörper, jedoch mit non-Immunserum inkubiert wurden, dienten sie als Maß für die spezifische Färbung und zur Bewertung des Hintergrundes. Wenn keine Kontamination stattfand, zeigten sie keine Anfärbung von Zellen im Gewebe, wie das für die ausgewerteten Daten der Fall war (Abbildungen werden nicht gezeigt).

3.5.2.1. Gliazellen

Die Marker GFAP und Vimentin wurden zur Anfärbung von Gliazellen und Endothelien eingesetzt. Das diente in erster Linie der Überprüfung, ob diese Zellen für die veränderte Struktur unter den Implantaten verantwortlich sind. Tiere deren corticales Gewebe während der Operation verletzt wurde, zeigten eine deutliche Glianarbe und wurden für die Auswertung nicht herangezogen.

Beide Antikörper lieferten ähnliche Resultate. Da GFAP die höhere Spezifität aufwies und deutlichere Färbungen erlaubte, werden die Vimentin Abbildungen hier nicht gezeigt.

EVA-Implantate verursachten keine Verletzungen und, damit verbunden, kein Einwandern von Gliazellen in die entsprechenden Gebiete. Dies kann also nicht für die beobachteten strukturellen Veränderungen verantwortlich sein.

Hinsichtlich der Verteilung der Astrocyten waren ebenfalls keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich zu den DMSO-Kontrolltieren zu beobachten.

Bei vier von 22 Tieren und in allen drei Substanzgruppen fiel die unter den Implantaten erhalten gebliebene Radialglia auf (im Falle von MK 801 in der Altersgruppe P14, bei Bicucullin und Muscimol in der Altersgruppe P7).

Unten stehende Abbildung zeigt dies besonders deutlich:

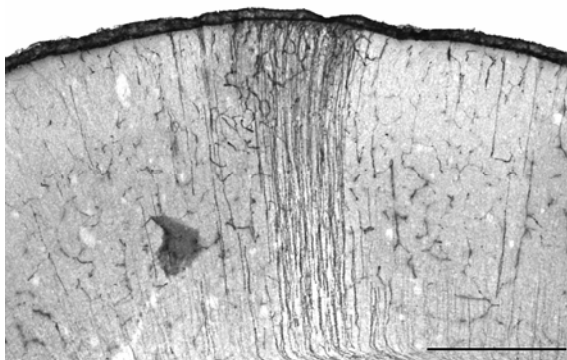


Abbildung einer **Vimentin**- Färbung, verstärkt mit biotinyliertem Thyramin. Alter P7, Implantat Muscimol, scale bar 500 μm . Da das Färbeprotokoll nicht dem Standard-Protokoll entsprach, wird es nicht extra im Material- und Methodenteil aufgeführt.

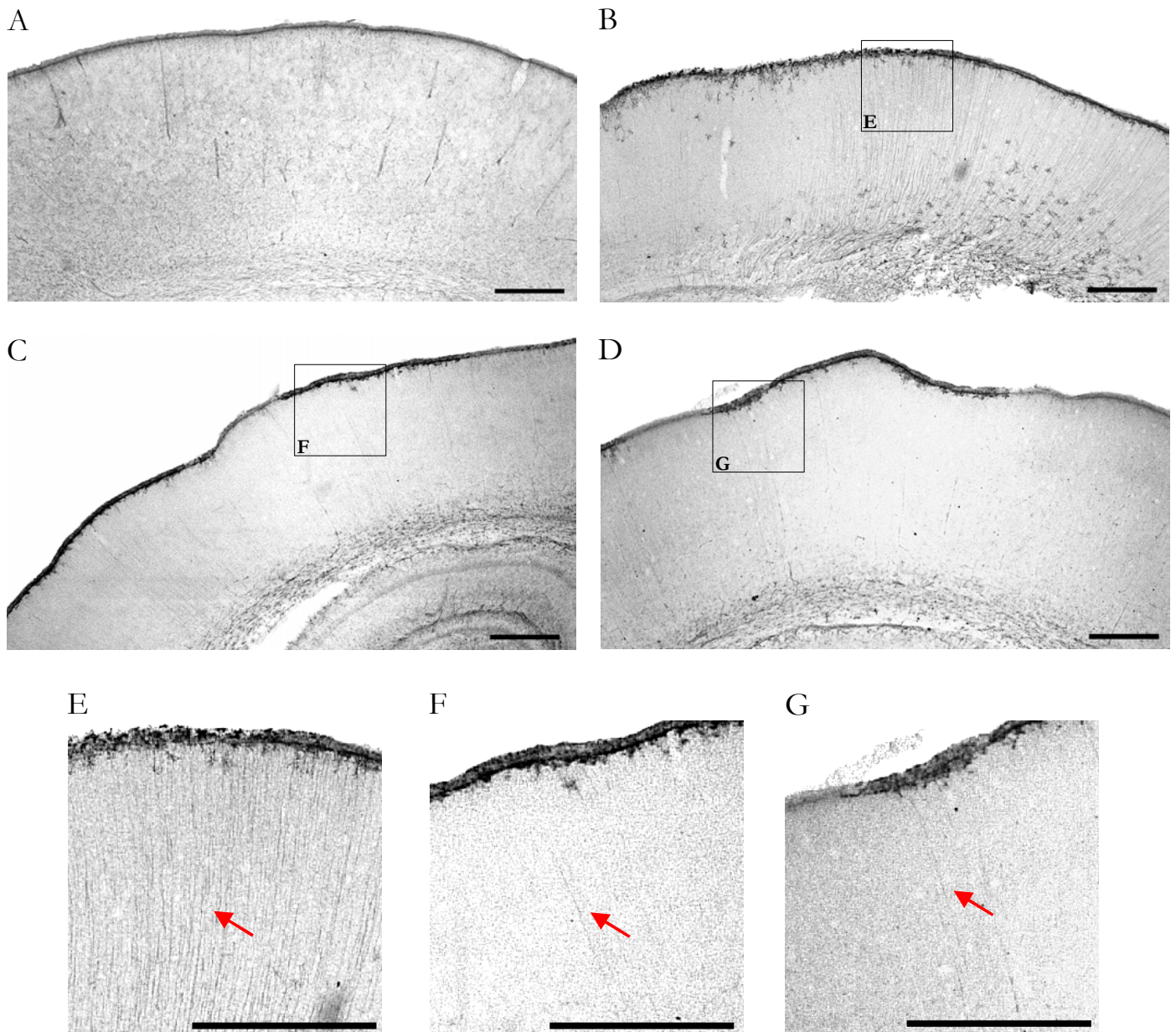


Abb. 3.30: Fotografien von GFAP-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P14), C. BMI (P7), D. Muscimol (P7). E-G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den schwarzen Kästchen dar. Scale bar 500 μ m. Die beobachteten Effekte sind auf Einwirkung der Substanzen zurückzuführen, da das Gewebe keine Glianarben aufweist. Die Pfeile weisen auf die erhaltene Radialglia im Bereich unter dem Implantat hin.

3.5.2.2. Pyramidenzellen – Map 2

Map 2 wurde als spezifischer Marker für Pyramidenzellen eingesetzt und ermöglicht zudem die Darstellung dendritischer Strukturen (Sanchez *et al.* 1992).

Die Verteilung Map 2 positiver Zellen wich bei allen verwendeten Substanzen von der der DMSO-Kontrolltiere ab.

Tiere, die substanzbeladenes Implantat erhalten hatten, zeigten eine intensivere Färbung im Bereich unter dem Implantat. Dies wurde bei DMSO-Kontrollen nicht beobachtet.

Die verstärkte Anfärbung könnte auf eine erhöhte Zelldichte schließen lassen, wurde jedoch aufgrund methodischer Einschränkungen nicht quantifiziert.

In Schicht I traten immunpositive Somata bei allen drei Substanz- und in jeweils beiden Altersgruppen auf. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen aus den Nissl-Färbungen überein, bei denen nach Applikation der Pharmaka heterotope Zellen in Schicht I gefunden wurden. Die Ausschnittsvergrößerungen in der Abb 3.31 E - G zeigen eine veränderte Anordnung der immunpositiven Zellen und das Vorkommen von Somata in Schicht I.

Eine Verbreiterung des Cortex wurde bei MK 801 in zwei Fällen, bei BMI und Muscimol behandelten Tieren in allen Fällen und beiden Altersgruppen beobachtet. Auch dies stimmt mit den Befunden der Nissl-Färbungen überein.

Die Anordnung der Zellen schien im Bereich der Verdickung verändert zu sein, was auf eine gestörte Laminierung hinweisen könnte.

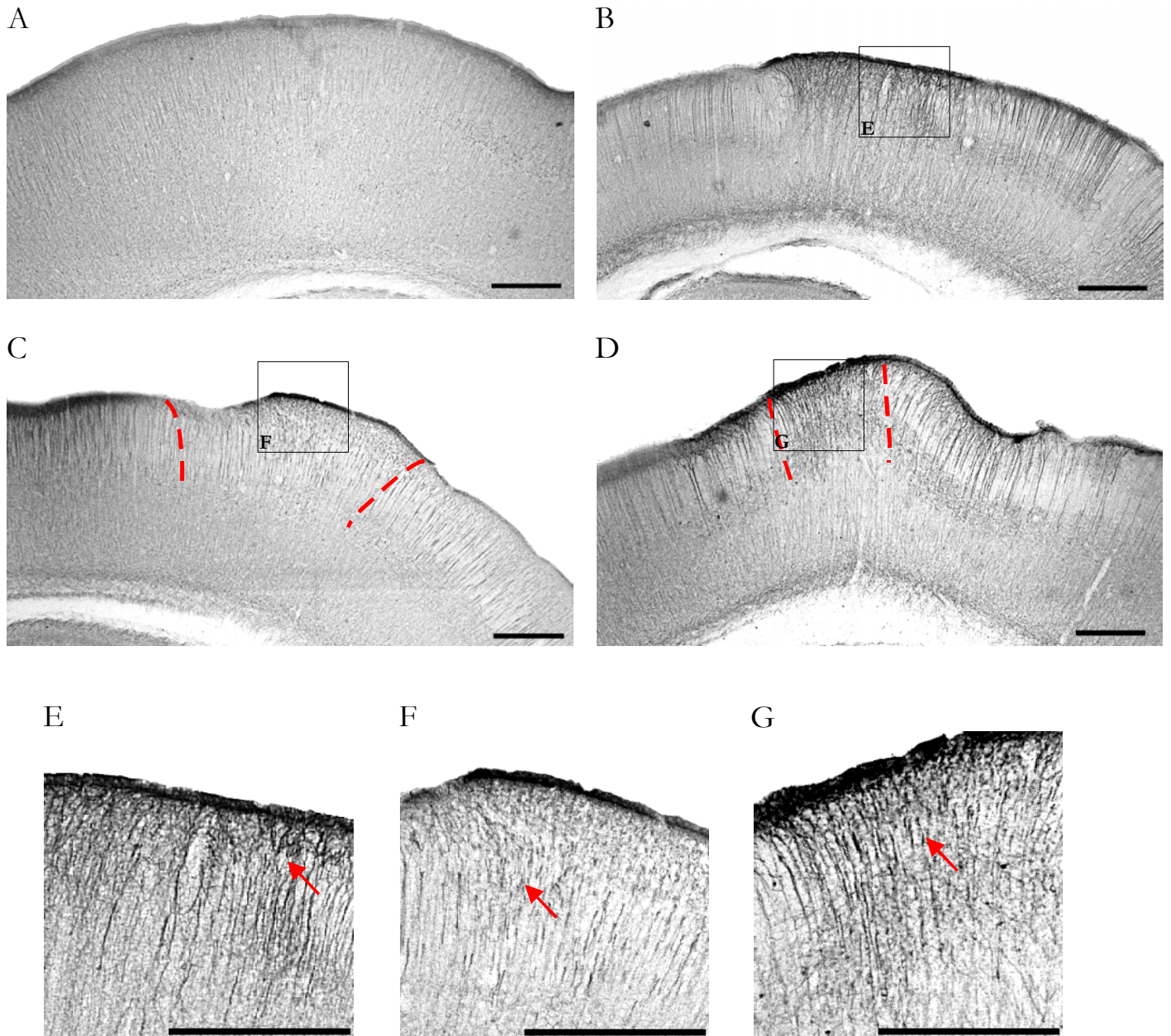


Abb. 3.31: Aufnahmen von Map2-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P7), C. BMI (P7), D. Muscimol (P7). E – G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den schwarzen Kästchen dar. Beobachtet wurde eine veränderte Verteilung der immunpositiven Zellen (Pfeile) und das Auftreten von Somata in Schicht I. Scale bar 500 μ m. Deutlich zu erkennen ist die intensivere Anfärbung im Bereich unter den EVA-Implantaten, die auf eine erhöhte Zelldichte hinweisen könnte. In Abb. B und C ist der Cortex verbreitert, die Region zwischen den gestrichelten Linien grenzt den Bereich ein, in dem die Anordnung der Zellen gestört zu sein scheint.

3.5.2.3. Pyramidenzellen und GABAerge Interneurone –

3.5.2.3.1. NMDA Rezeptor

Mit den Markern für die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors: NR1, NR2A/B, NR2B und NR2C sollten Pyramidenzellen und GABAerge Interneurone angefärbt werden.

Im Gegensatz zu den DMSO-Kontrolltieren konnte eine veränderte Verteilung der immunpositiven Zellen beobachtet werden. Dies wird in den Abbildungen 3.32 und 3.33, jeweils B bis D, deutlich.

Während die DMSO-Tiere eine nahezu zellfreie Schicht I zeigen, finden sich in allen mit Substanz behandelten Tieren heterotope immunpositive Zellen in Lamina I, die dort den gesamten Bereich bis zur pialen Oberfläche einnehmen. Dies stimmt mit den Befunden der Nissl-Färbung überein.

Die Verteilung der Zellen in den Schichten war in den Färbungen gegen die NMDA-Rezeptoruntereinheiten sichtbar gestört. Bei MK 801 konnte dies zweimal in der Altersgruppe P7 und zweimal bei P14, bei Bicucullin einmal in der Altersgruppe P7 (vgl. Abb. 3.32 und 3.33, C) und bei Muscimol zweimal in der Altersgruppe P7 und einmal in P14 beobachtet werden.

In diesen Fällen waren stets die tieferen Cortexschichten bis hin zu Schicht VI betroffen, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Nissl-Färbungen deckt.

Eine Verbreiterung des Cortex wurde bei MK 801 in zwei Fällen, bei BMI und Muscimol behandelten Tieren in allen Fällen und beiden Altersgruppen beobachtet. Auch dies stimmt mit den Befunden der Nissl-Färbungen überein.

Der Antikörper gegen die Rezeptoruntereinheit NMDA R2C lieferte keine deutlichen Färbungen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Untereinheit im Alter von P7 bzw. P14 im Cortex der Ratte nicht, oder nur in sehr geringer Konzentration exprimiert werden. Dasselbe zeigte sich für die Färbung mit dem Antikörper gegen NMDA R2B. In nachgewiesenen Fällen war NMDA R2C mit NMDA R2B colokalisiert (Flint *et al.* 1997; Feldmeyer and Cull-Candy 1996; Monyer *et al.* 1994). Diese Abbildungen werden hier nicht dargestellt.

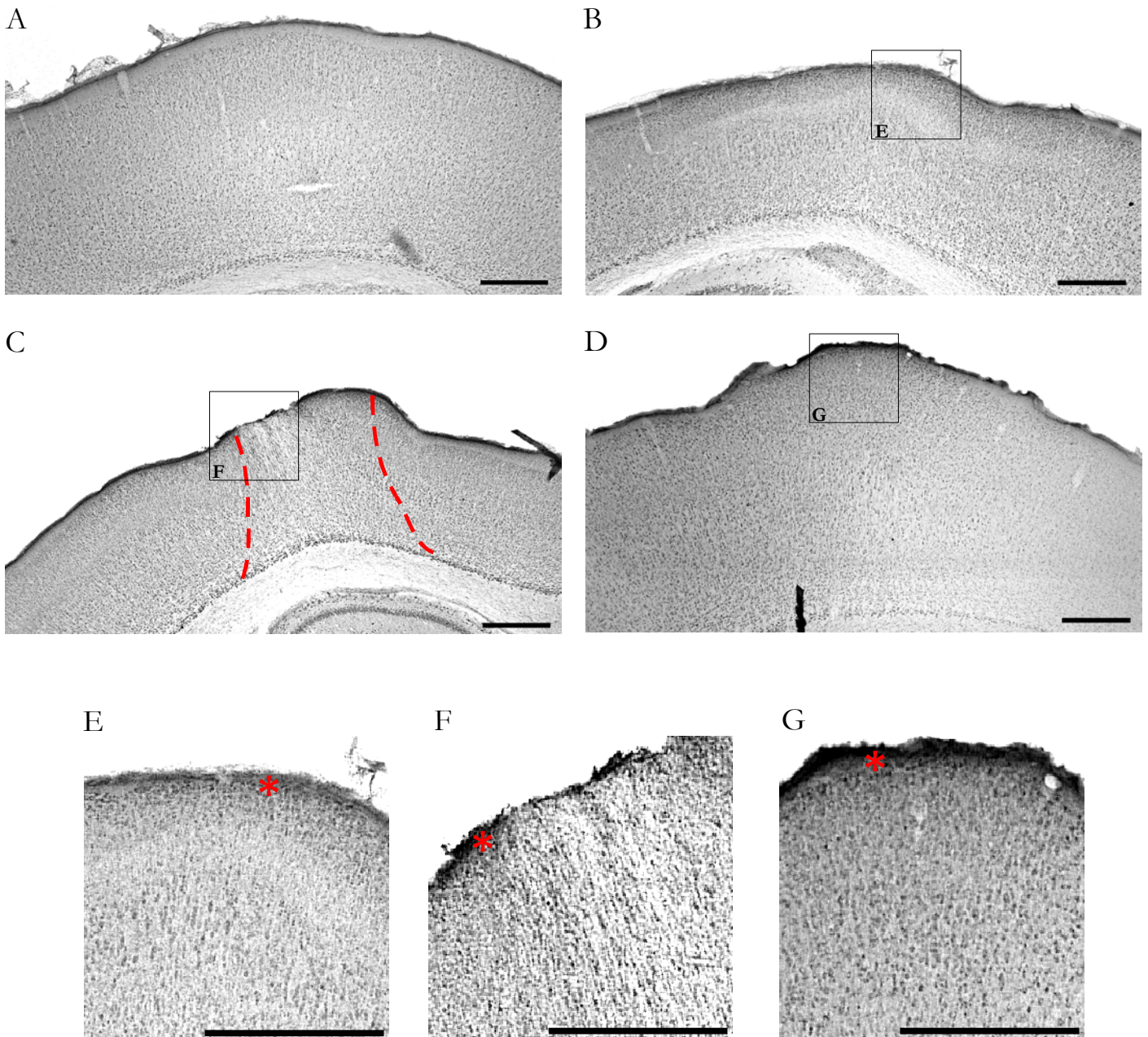


Abb. 3.32: Fotografien von NMDA R1-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P14), B. BMI (P7), C. Muscimol (P14). E – G stellen Ausschnittsvergrößerungen gemäß den Kästchen dar. Scale bar 500 µm. Deutlich zu erkennen sind heterotopie Zellen in Schicht I, die sich bis zur pialen Oberfläche erstrecken (Sterne). In C markieren die gestrichelten Linien den Bereich der Laminierungsstörung, die sich in diesem Fall über alle Schichten hinweg erstreckt. In C und D ist der Cortex im Bereich unter dem Implantat verbreitert.

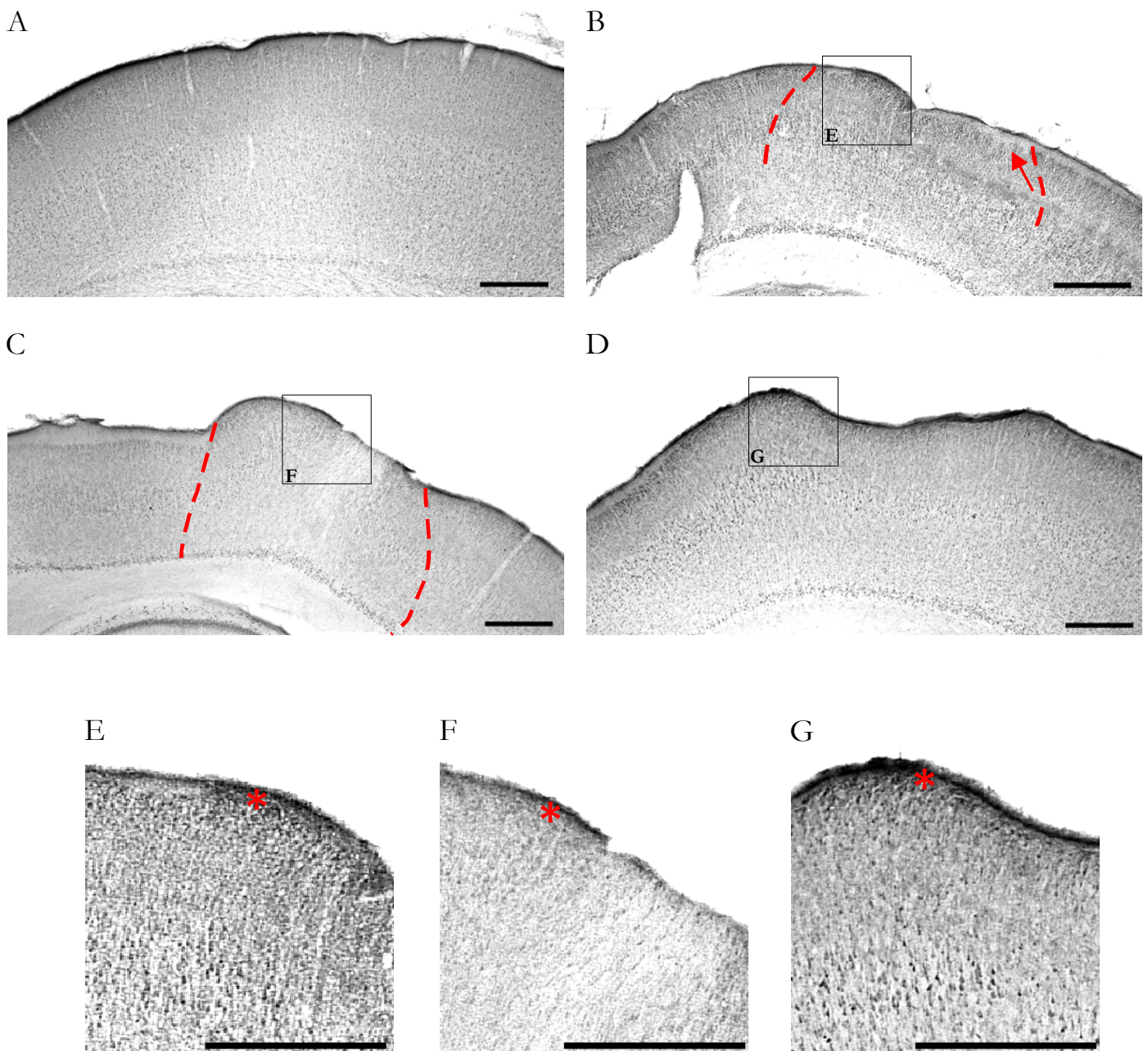


Abb. 3.33: Aufnahmen von NMDA R2A/B-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P7), C. BMI (P7), D. Muscimol (P7). E - G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den Kästchen dar. Scale bar 500 μ m. Deutlich zu erkennen sind heterotopie Zellen in Schicht I, die sich bis zur pialen Oberfläche erstrecken (Sterne). In B und C markieren die gestrichelten Linien den Bereich, in dem die Verteilung der immunpositiven Zellen verändert ist. In C und D ist der Cortex im Bereich unter dem Implantat verbreitert.

3.5.2.3.2. GABA

Die Färbung mit dem Antikörper gegen GABA lieferte folgende Ergebnisse:

wie schon bei den Färbungen mit den Antikörpern gegen die NMDA-Rezeptoruntereinheiten, konnte auch hier beobachtet werden, dass die DMSO-Tiere eine nahezu zellfreie Schicht I zeigten, während sich in allen mit Substanz behandelten Tieren heterotope immunpositive Zellen in Lamina I befanden. Die dort lokalisierten Zellen nahmen den gesamten Bereich dieser Schicht bis zur pialen Oberfläche ein. Dies stimmt mit den Befunden der Nissl-Färbung überein.

In den gezeigten Abbildungen scheint die Verteilung der Zellen innerhalb der Schichten in der GABA-Färbung nicht verändert. Vergleichbare Effekte, wie sie bei den GABA-Färbungen auftraten, konnten bei den DMSO-Kontrollen nicht beobachtet werden.

Die Verteilung der immunpositiven Zellen in den Cortexschichten war nur in einigen Fällen gestört, bei MK 801 konnte dies zweimal in der Altersgruppe P7 und zweimal bei P14, bei Bicucullin einmal in der Altersgruppe P7 (vgl. Abb. 3.32 und 3.33, C) und bei Muscimol zweimal in der Altersgruppe P7 und einmal in P14 beobachtet werden (wird hier nicht gezeigt). In diesen Fällen waren stets die tieferen Cortexschichten bis hin zu Schicht VI betroffen, was sich den Ergebnissen der Nissl-Färbungen und den Befunden aus der NMDA-Rezeptorfärbung deckt.

Eine Verbreiterung des Cortex wurde bei MK 801 in zwei Fällen, bei BMI und Muscimol behandelten Tieren in allen Fällen und beiden Altersgruppen beobachtet. Auch dies stimmt mit den Befunden der Nissl-Färbungen überein.

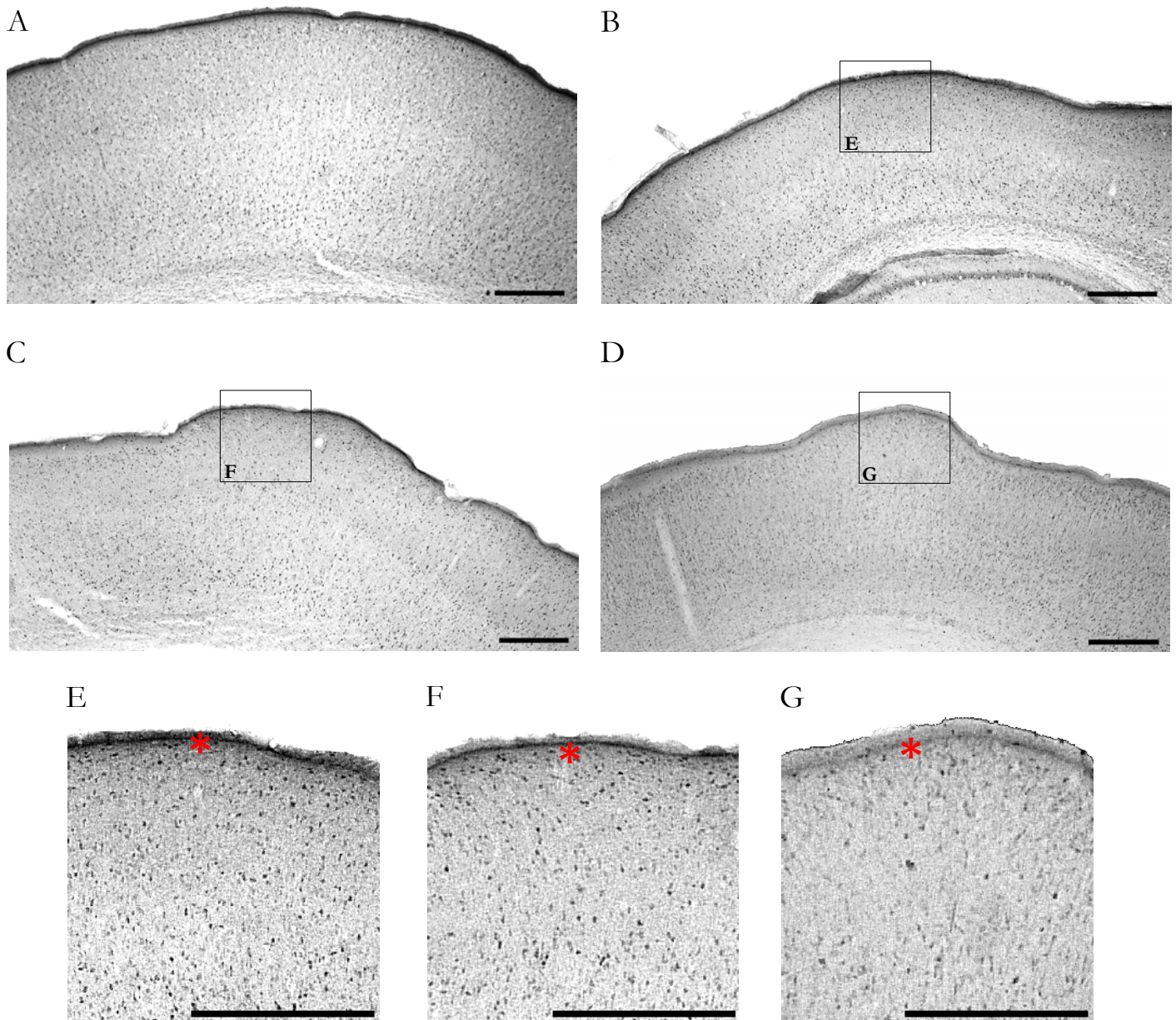


Abb. 3.34: Aufnahmen von GABA-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P14), C. BMI (P14), D. Muscimol (P7). E – G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den Kästchen dar. Scale bar 500 µm. Im Vergleich zu den DMSO-Lösungsmittelkontrollen fallen bei den Tieren, die ein substanzbeladenes EVA-Implantat erhalten haben (B-D), heterotope immunpositive Zellen in Schicht I auf (Sterne). In C und D ist der Cortex im Bereich unter dem Implantat verbreitert.

3.5.2.3.3. Calcium-bindende Proteine, zur Übersicht: (Hof *et al.* 1999)

Die Calcium-bindenden Proteine Calbindin (CaBP), Parvalbumin (PV) und Calretinin werden im Cortex der Ratte in verschiedenen Subpopulationen inhibitorischer Neurone gefunden. Es sollte neben den substanztypischen Effekten überprüft werden, ob sich die Verteilung der immunpositiven Zellen verändert hat.

Calbindin positive Zellen befinden sich zum Zeitpunkt P8 und P11 in allen Cortexschichten (außer Lamina I), ihre höchste Dichte haben sie jedoch in den Schichten II - IV. Parvalbumin immunpositive Neurone befinden sich zu Beginn der Entwicklung vor allem in den mittleren Cortexschichten und sind später über alle Cortexschichten hinweg lokalisiert (außer in Lamina I). Calretinin immunpositive Zellen sind innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt vor allem in den Schichten II/III und V/VIIa lokalisiert (Alcantara *et al.* 1996; Enderlin *et al.* 1987; Sanchez *et al.* 1992).

Weiterhin sind sie in der Marginalzone zu finden. Sie dienen zu diesem frühen Zeitpunkt als Marker für Cajal-Retzius Zellen.

Calbindin: Die DMSO-Lösungsmittelkontrollen zeigten bei dieser Färbung eine nahezu zellfreie Schicht I. Dies deckt sich mit den Befunden der mit MK 801 behandelten Tiere. Hier zeigte sich in einem Fall ein zellfreier Bereich direkt unter Schicht I, der ein Teil dieser Schicht sein könnte. Es könnte sich demzufolge um eine Invagination der Lamina I handeln, wie sie bei den Nissl-gefärbten Tieren gefunden wurde. Bei Applikation von MK 801, BMI und Muscimol fanden sich in allen Fällen und in beiden Altersgruppen immunpositive heterotope Zellen in Schicht I. Nach Behandlung mit Bicucullin konnte in einem Fall, wie bei MK 801, ein zellfreier Bereich unter Lamina I gefunden werden, bei dem es sich um eine Invagination handeln könnte.

Die Verteilung der immunpositiven Zellen in den corticalen Schichten war in den Färbungen gegen Calbindin in einigen Fällen sichtbar gestört (vgl. Abb.3.35, D). Bei MK 801 konnte dies zweimal in der Altersgruppe P7 und zweimal bei P14, bei Bicucullin einmal in der Altersgruppe P7 und bei Muscimol zweimal in der Altersgruppe P7 und einmal in P14 beobachtet werden. In diesem Bereich sind die Zellen anders orientiert und befinden sich zum Teil unmittelbar unter der pialen Oberfläche. Eine Verbreiterung des Cortex zeigte sich nach Applikation von MK 801 in zwei Fällen, nach Gabe von Bicucullin und Muscimol in allen Fällen und jeweils beiden Altersgruppen.

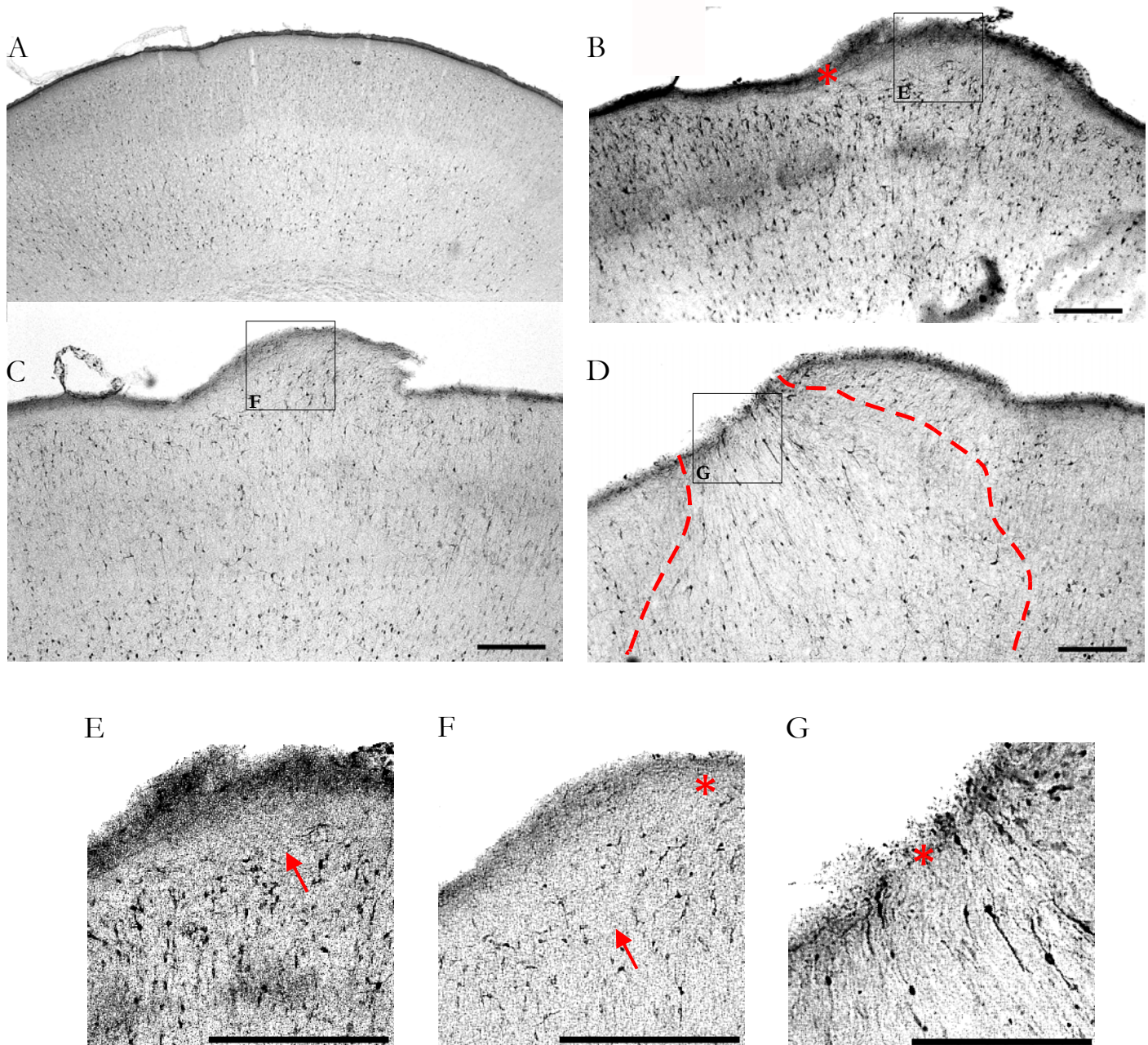


Abb. 3.35: Fotografien von Calbindin-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P7), C. BMI (P7), D. Muscimol (P7). E – G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den Kästchen dar. Scale bar 500 μm .

Die Abbildungen E und F zeigen einen zellfreien Bereich, der Teil von Schicht I sein könnte (Pfeil). In Abb. G ist zu erkennen, dass die Zellen anders orientiert sind und sich unmittelbar unter der pialen Oberfläche befinden. Heterotopien in Schicht I konnten nach Applikation aller drei Pharmaka beobachtet werden (Sterne). Der Bereich zwischen den gestichelten Linien in D umfasst eine Region, in der die Zellen eine veränderte Anordnung haben.

Parvalbumin

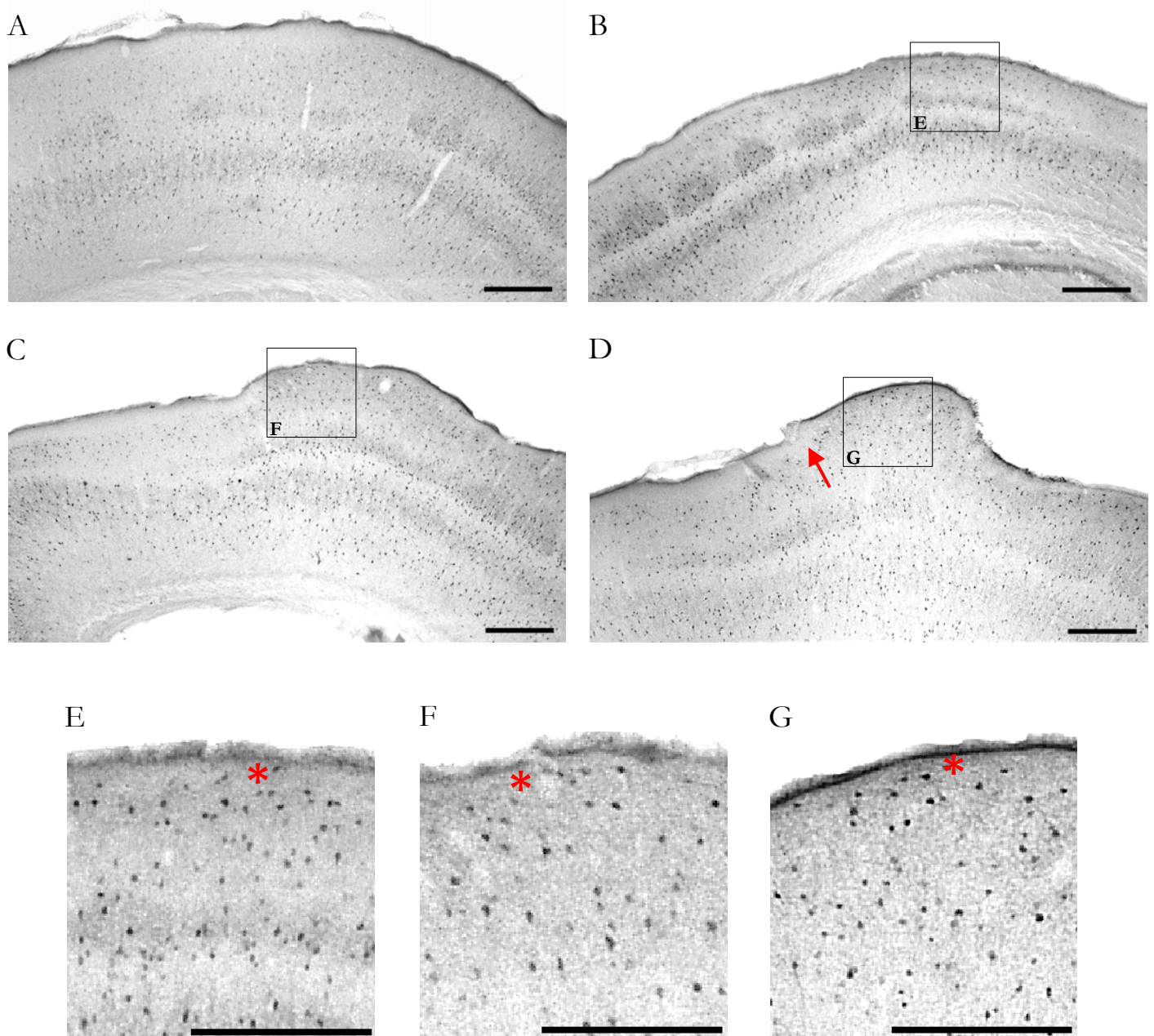


Abb. 3.36: Aufnahmen von Parvalbumin-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P14), C. BMI (P14), D. Muscimol (P14). E – G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den Kästchen dar. Scale bar 500 μ m. Deutlich zu erkennen sind in E – G heterotopische Zellen in Schicht I (Sterne). Der Pfeil in D weist auf eine zellfreie Region hin, die Teil von Schicht I sein könnte. In C und D ist der Cortex deutlich verbreitert.

Parvalbumin Im Gegensatz zu den DMSO-Lösungsmittelkontrollen fanden sich nach Applikation der drei Substanzen in allen Fällen und beiden Altersgruppen immunpositive heterotope Zellen in Schicht I. Dies deckt sich mit den Befunden der Nissl-Färbungen. Dieser Effekt war auf die Region, die sich unmittelbar unter dem Implantat befand, beschränkt.

Die Verteilung der immunpositiven Zellen in den corticalen Schichten war in den Färbungen gegen Parvalbumin nur in einigen Fällen sichtbar gestört. Bei MK 801 konnte dies zweimal in der Altersgruppe P7 und zweimal bei P14, bei Bicucullin einmal in der Altersgruppe P7 und bei Muscimol zweimal in der Altersgruppe P7 und einmal in P14 beobachtet werden. Diese Fälle werden hier nicht dargestellt.

Eine Verbreiterung des Cortex zeigte sich nach Applikation von MK 801 in zwei Fällen, nach Gabe von Bicucullin und Muscimol in allen Fällen und jeweils beiden Altersgruppen

Calretinin Calretinin-positive Zellen waren in allen Substanzgruppen und in den Lösungsmittelkontrollen in Schicht I vorhanden. Dennoch zeigten sich nach Applikation von MK 801, BMI und Muscimol im Bereich unmittelbar unter dem Implantat eine deutlich erhöhte Anzahl immunpositiver Zellen in Schicht I (in allen Fällen und beiden Altersgruppen).

Die Verteilung der immunpositiven Zellen in den corticalen Schichten war auch in den Färbungen gegen Calretinin in einigen Fällen sichtbar gestört (vgl. Abb.3.37, C und D).

Bei MK 801 konnte dies zweimal in der Altersgruppe P7 und zweimal bei P14, bei Bicucullin einmal in der Altersgruppe P7 und bei Muscimol zweimal in der Altersgruppe P7 und einmal in P14 beobachtet werden.

Eine Verbreiterung des Cortex zeigte sich nach Applikation von MK 801 in zwei Fällen, nach Gabe von Bicuculline und Muscimol in allen Fällen und jeweils beiden Altersgruppen

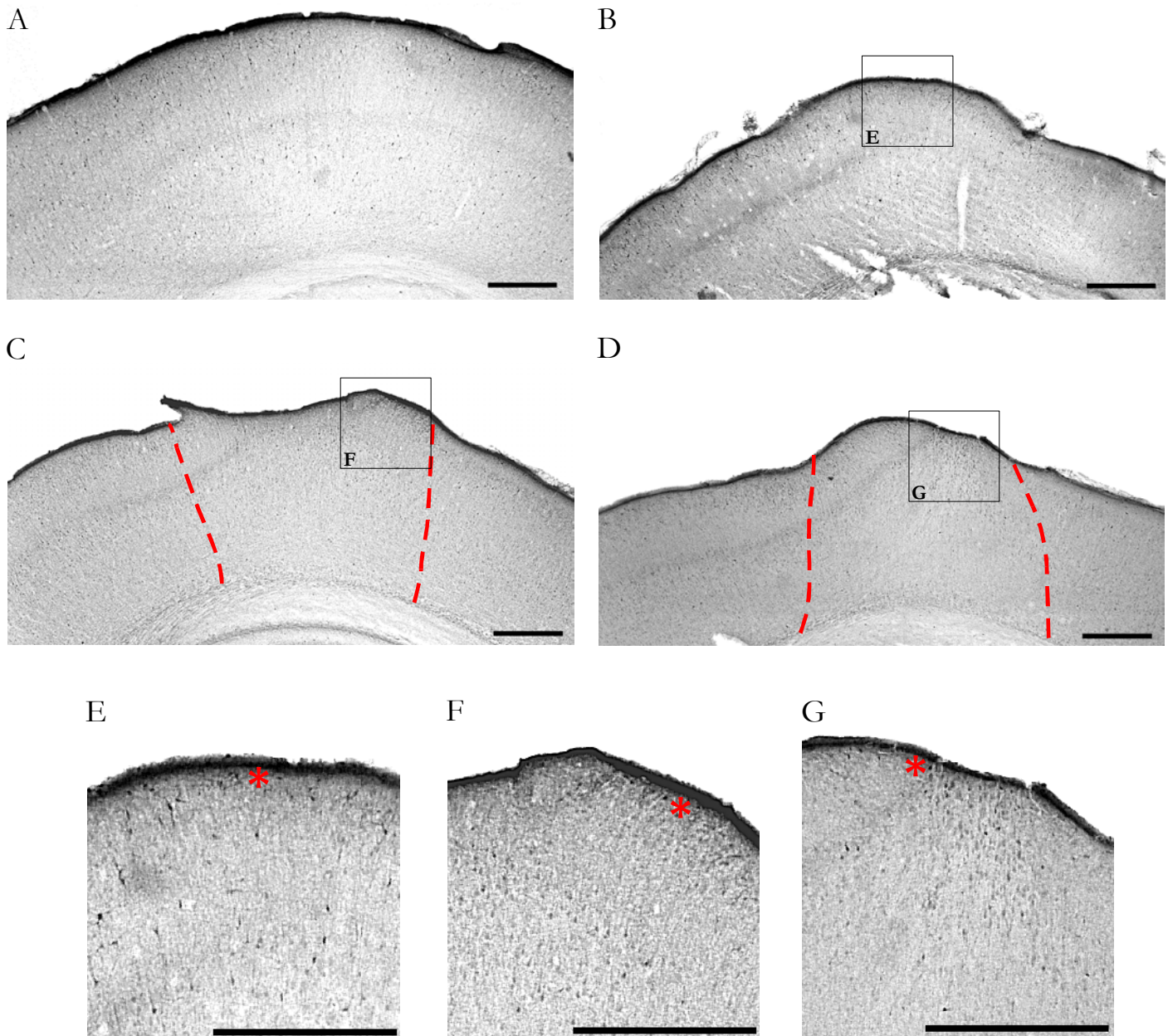


Abb. 3.37: Aufnahmen von Calretinin-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P7), C. BMI (P7), D. Muscimol (P7). E – G stellen Ausschnittsvergrößerungen entsprechend den Kästchen dar. Scale bar 500 μ m. In E und G ist deutlich zu erkennen, dass Schicht I mit heterotopen Zellen gefüllt ist (Sterne). Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien in C und D markiert ein Gebiet, in dem die Anordnung der immunpositiven Zellen verändert ist.

3.5.2.4. Cajal-Retzius-Zellen

Der Antikörper SP 142 wurde eingesetzt, um Cajal-Retzius- und Reelin-exprimierende Zellen darzustellen. Sp 142 färbt diese Zellen spezifisch. Reelin-exprimierende Zellen sind allerdings nicht nur auf Lamina I beschränkt. Sie sind in hoher Dichte über den gesamten Cortex verteilt. Auch subcorticale Areale, wie zum Beispiel der Hippocampus zeigt die Expression Reelin-positiver Zellen (Pesold *et al.* 1999; Pesold *et al.* 1998).

Da Lamina I bei den verwendeten Substanzen in den histologischen Färbungen im Bereich unter den Implantaten mit Zellen gefüllt war, sollte überprüft werden, ob sich aufgrund dessen die Verteilung der Cajal-Retzius-Zellen in dieser Schicht verändert haben könnte.

Im Vergleich zu den DMSO-Lösungsmittelkontrollen konnten keine Abweichungen in der Verteilung der Cajal-Retzius- und Reelin-positiven Zellen festgestellt werden.

Die Verteilung der Neurone war über den gesamten Bereich des Cortex normal.

Die tangential Orientierung der Zellen in der Marginalzone und deren Lage unter der pialen Oberfläche blieben erhalten.

Eine Verbreiterung des Cortex zeigte sich nach Applikation von MK 801 in zwei Fällen, nach Gabe von Bicuculline und Muscimol in allen Fällen und jeweils beiden Altersgruppen

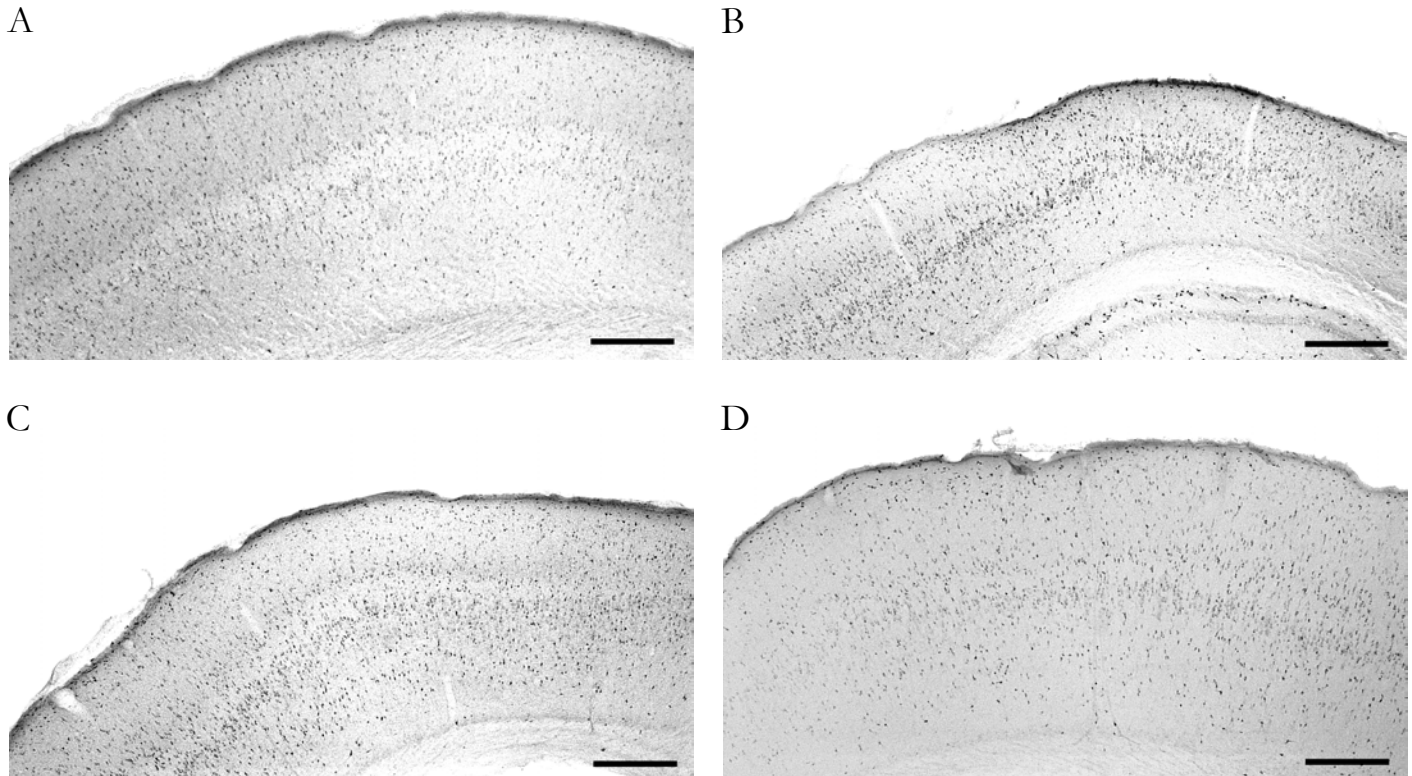


Abb. 3.38: Aufnahmen von Reelin-spezifischen Immunfärbungen. A. DMSO (P14), B. MK 801 (P14), B. BMI (P14), C. Muscimol (P7). Scale bar 500 μm . Die Färbung mit dem Antikörper gegen Reelin zeigte keine Abweichungen von den Kontrolltieren.

4. Diskussion

Neuronale Migration ist die elementare Voraussetzung in der Ontogenese des Gehirns. Im Verlauf der Entwicklung führt das Einwandern postmitotischer Neurone aus den tiefen Schichten des Cortex cerebri zur Ausbildung der später sechsschichtigen Großhirnrinde. Diese Wanderung der Zellen ist, wie in der Einleitung beschrieben, vom exakten Zusammenspiel einer Reihe von Faktoren abhängig (Ignacio *et al.* 1995; Rakic *et al.* 1994; Miller 1988; Rakic 1972).

Die Zellen migrieren von den Orten ihrer Entstehung in der Subventrikulärzone des Telencephalons - vorbei an schon etablierten Zellen - zu ihren Bestimmungsorten in den verschiedenen Schichten des Cortex. Dort angekommen differenzieren sie sich und bilden Konnektivitäten mit benachbarten Zellen und Neuronen in verschiedenen anderen corticalen und subcorticalen Arealen aus (Naqui *et al.* 1999; Valverde *et al.* 1995, Altman 1966). Treten Störungen im Verlauf dieser Prozesse auf, so resultiert dies in einer veränderten corticalen Architektur, die häufig mit Funktionsverlusten verbunden ist (Redecker *et al.* 2000, Lambert de Rouvroit and Goffinet 1998; Pearlman *et al.* 1998).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur Ontogenese des cerebralen Cortex der neugeborenen Ratte. Histologische und morphometrische Untersuchungen sollten die zelluläre Struktur des Cortex cerebri verdeutlichen und mögliche funktionelle Eigenschaften ableiten. Dies erfolgte unter physiologischen Bedingungen und nach gezielter Einflussnahme auf Faktoren, die essentiell für die Migration und Ausbildung des cerebralen Cortex sind.

***In-vitro* Untersuchungen zur Morphometrie des neonatalen Cortex der Ratte**

Zunächst wurden vier charakteristische Zelltypen im Bereich Par I, somatosensorischer Cortex, von neugeborenen Ratten untersucht. Die Entwicklung der Großhirnrinde verlief bei diesen Tieren unter physiologischen Bedingungen.

Es handelte sich um Cajal-Retzius-Zellen (CR), unreife und verzweigte Pyramidenzellen (IP und BP) und Subplatezellen (SP).

Der Vergleich von Oberflächen und Volumina, nicht nur der Somata, Dendriten und Axone, sondern auch der Gesamtoberflächen und -volumina der Neuronen, ergab signifikante Unterschiede zwischen IP, CR, BP und SP Zellen.

Die detaillierte Analyse der Dendriten, die neben Anzahl und Länge, auch Oberflächen und Volumina, sowie das dendritische Verzweigungsmuster erfasste, zeigte, dass neben den verzweigten Pyramidenzellen, Subplate- und Cajal-Retzius-Zellen die ausgeprägtesten dendritische Verzweigungen bilden und die am weitesten entwickelten Zelltypen sind.

Dies war aufgrund des Differenzierungsgrades des Cortex zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung anzunehmen und deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien, die sowohl strukturelle als auch funktionelle Daten lieferten (Schwartz *et al.* 1998; Zhou and Hablitz 1996, Valverde *et al.* 1989, Kristt 1978; Bradford *et al.* 1977; Marin-Padilla 1972).

Cajal-Retzius-Zellen und Subplatezellen sind während der Ontogenese des Cortex schon sehr früh zu finden und könnten ein frühes Netzwerk bilden (Meyer *et al.* 1998; Super *et al.* 1998; Jakobson 1991; Uylings *et al.* 1990). Dadurch könnten sie eine Art Rahmen darstellen, in dessen Inneren sich die corticale Platte entwickelt (McConnell *et al.* 1994; Miller *et al.* 1993; Woo *et al.* 1991, Shatz *et al.* 1990).

Die verzweigten Pyramidenzellen sind diejenigen Zellen, die nach der Migration an ihren Bestimmungsorten in den verschiedenen corticalen Schichten angekommen sind. Die Differenzierung schreitet fort und die Zellen beginnen synaptische Konnektivitäten auszubilden (Kasper *et al.* 1994; Marin-Padilla 1992; Larkman 1991c; Larkman 1991b; Larkman 1991a; Larkman and Mason 1990; Parnavelas *et al.* 1983, Marin-Padilla 1972). Die gewonnenen Daten zur dendritischen Morphologie scheinen dies zu bestätigen. Die größere Varianz der gemessenen Oberflächen könnte auf die sehr unterschiedlichen Differenzierungsgrade innerhalb dieser Zellpopulation hinweisen.

Unreife Pyramidenzellen besitzen eine Struktur, die der der migrierenden Neurone ähnelt. Da sich diese Zellen noch durch die corticale Platte bewegen, ist das Fehlen eines ausgeprägten dendritischen, wie auch axonalen Verzweigungsmusters zu erwarten (Marin-Padilla 1992; Marin-Padilla 1972). Auch handelt es sich bei ihnen, im Gegensatz zu den anderen Zelltypen, um sehr kleine Neurone. Dies wird von den Daten über die Gesamtoberfläche und das Gesamtvolumen bestätigt.

Es ist anzunehmen, dass Cajal-Retzius- und Subplatezellen aufgrund ihrer strukturellen Komplexität synaptische Informationen über einen größeren räumlichen Bereich verarbeiten können als unreife Pyramidenzellen. Verzweigte Pyramidenzellen könnten ebenfalls schon synaptische Informationen verarbeiten, allerdings in geringerem räumlichen Umfang als die ausdifferenzierten Pyramidenzellen im adulten Cortex.

Dies zeigt sich im Vergleich der Dendritenbäume und dendritischen Verzweigungen, die bei diesen adulten Neuronen wesentlich komplexer sind (Parnavelas et al, 1983 Marin-Padilla 1972).

Untersuchungen aus unserem Labor zu den intrinsischen Eigenschaften und den synaptischen Konnektivitäten der vier ausgewählten Zellgruppen stimmen mit dem hier beschriebenen morphologischen Komplexitätsgrad überein (Luhmann *et al.* 2000).

Abweichungen in den analysierten Parametern zu früheren Studien, die vor allem die Zelloberfläche betreffen, könnten daher rühren, dass die Erfassung der an den Dendriten befindlichen Spines (Dornfortsätze) mit der verwendeten Methode nicht möglich war. So konnten zum Beispiel Spines, die unter dem Dendriten lagen wegen der intensiven Färbung mit Biocytin nicht erkannt werden. Es handelt sich bei den Berechnungen demzufolge um eine Näherung an die tatsächlichen Gegebenheiten.

Das verwendete Modell des "oblate spheriod" zur Berechnung der Somaoberflächen und –volumina ergibt ebenfalls nur eine Näherung an die tatsächlichen Größen. Die Voraussetzungen, um etablierte stereotaktische Methoden anzuwenden (z.B. den Nucleator), waren wegen der eingesetzten Färbetechnik nicht gegeben (Gundersen *et al.* 1988).

Insgesamt gesehen, bieten die analysierten Daten jedoch einen guten Überblick über die Morphologie der einzelnen Zelltypen. Die dreidimensionale Darstellung der Zellen vermittelte einen Überblick über deren räumliche Ausdehnung im corticalen Gewebe.

Die hier diskutierten Untersuchungen zur Morphometrie zeigten strukturelle Eigenschaften von Zellen auf, die sich im normal entwickelten cerebralen Cortex von Ratten befinden. Die beschriebene corticale Architektur stellt damit eine Momentaufnahme der Ontogenese des Neocortex der Ratte in den ersten Tagen nach der Geburt dar. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse, die sich im Rahmen des zweiten Projekts dieser Arbeit ergeben haben.

***In-vivo* Untersuchungen zur Entwicklung des Neocortex neugeborener Ratten**

In diesem Projekt wurde die Entwicklung des Cortex cerebri nach lokaler Applikation von Aminosäuretransmitter-Agonisten und -Antagonisten untersucht.

Die verwendeten Substanzen waren der NMDA-Rezeptor Antagonist MK 801, der GABA_A-Agonist Muscimol und der GABA_A-Antagonist Bicucullin.

Nach subduraler Implantation eines wirkstoffhaltigen EVA-Kunststoffpolymers auf den parietalen Bereich des somatosensorischen Cortex, wurden die eingebetteten Stoffe chronisch freigesetzt.

Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von EVA war, dass es sich um einen chemisch inerten Stoff handelt, der biokompatibel ist und keine inflammatorische Wirkung hervorruft. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen die zu diesen Fragestellungen durchgeführt wurden (Christenson *et al.* 1991; Langer *et al.* 1981). Ein weiterer Vorteil ist, dass die Pharmaka lokal appliziert werden können und ihre Wirkung demzufolge nur am gewünschten Ort entfalten. Dies wurde durch Strukturveränderungen im cerebralen Cortex bestätigt, die lokal begrenzt waren.

Die verwendeten Substanzen wurden über einen Zeitraum von mindestens neun und maximal sechzehn Tagen aus den Implantaten freigesetzt. Die Abweichungen von den Ergebnissen aus der Literatur, die eine Freisetzung über mehrere Wochen beschreiben, resultieren aus einer abgewandelten Art, das substanzbeladene EVA herzustellen (Prusky and Ramoa 1999; Doulazmi *et al.* 1998; Schlaggar *et al.* 1993, During *et al.* 1989; Freese *et al.* 1989 und vgl. hierzu 2.7).

Es wurde nicht über längere Zeit gefriergetrocknet, die Eigenschaften des Polymers sind daher verändert. Die eingesetzten Stoffmengen variierten ebenfalls. Daraus resultiert die gemessene schnellere Freisetzung der eingebetteten Pharmaka.

Beim Vergleich der drei Substanzen fallen unterschiedlichen Zeiträume der Freisetzung auf. Diese sind in deren unterschiedlichen Molekulargewichten und chemischen Eigenschaften begründet (Balazs *et al.* 1985; Hsu and Langer 1985).

Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass alle eingesetzten Pharmaka über den gesamten Zeitraum der Migrationsprozesse freigesetzt wurden.

Nach erfolgreicher Implantation der wirkstoffhaltigen Implantate wurden die Tiere histologisch und immunhistologisch untersucht.

Der Cortex zeigte im histologischen Färbeverfahren innerhalb der beiden Altersgruppen deutliche strukturelle Veränderungen. Es traten Invaginationen der Schicht I, Heterotopien in Schicht I und Laminierungsstörungen, bis hin zu fehlender Laminierung im Bereich unter den Implantaten auf. Diese Effekte waren in ihrer Ausprägung jedoch inhomogen. Inhomogenität bezeichnet in diesem Fall das Auftreten von unterschiedlichen Störungen an verschiedenen Stellen im Bereich unter dem Implantat und zum Teil über dessen Breite hinaus. Beispielsweise befanden sich Invaginationen der Schicht I nicht genau unter der

Mitte des EVAs, sondern traten an beliebigen Stellen unterhalb der Implantate auf. Auch Schicht I war nicht immer über den gesamten Bereich der Substanzfreisetzung mit heterotopen Zellen gefüllt.

Diese Inhomogenität könnte aus mehreren Gründen entstehen:

- Das Beladen der EVA-Implantate mit den Substanzen verlief, bedingt durch die Art der Herstellung, nicht immer gleich.
- Die chemischen Eigenschaften der Pharmaka können die Freisetzung erheblich beeinflussen. Wie zum Beispiel die Szintillationsmessungen gezeigt hatte, war die Dauer der Freisetzung von BMI und Muscimol erheblich länger als die von MK 801. In einem Testversuch wurde Bicucullin über einen Zeitraum von vier Wochen freigesetzt (nicht gezeigte Daten). Bicucullin besitzt andere chemische Eigenschaften als MK 801 oder Muscimol und kann offenbar aus diesem Grund nicht so schnell aus dem Implantat freigesetzt werden.
- Während der Operation könnte die Dura eventuell nicht weit genug geöffnet worden sein und so nur ein Teil des Implantats auf dem Cortex der Tiere aufliegen. Die Applikation der Pharmaka würde in diesen Fällen über einen kleineren Bereich erfolgen.
- Bedingt durch die Form und die Struktur des Implantats könnten sich, je nach Diffusionsrate, oberhalb und innerhalb des Cortex Konzentrationsgradienten aufbauen. Ein solcher Gradient könnte die unterschiedlichen Effekte in den verschiedenen Bereichen unter den Implantaten erklären. Es ist beispielsweise bekannt, dass GABA konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auf die Migration der Neurone hat (Behar *et al.* 1998, Behar *et al.* 1996; Behar *et al.* 1994).

Nach Darstellung der beobachteten corticalen Dysgenesien wurden immunhistologische Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die aufgetretenen Heterotopien auf zellulärer Ebene zu charakterisieren und die Verteilung der immunpositiven Zellen zu überprüfen. Spezifische Färbungen gegen Gliazellen dienten dazu, mechanisch läsioniertes Gewebe zu identifizieren.

Es wurden weder Glianarben noch ein verstärktes Einwandern glialer Zellen gesehen. Die Ursache für die beobachteten Veränderungen liegt also nicht in der Läsionierung des Gewebes, nicht im substanzbedingten Einwandern von Gliazellen oder in inflammatorischen Prozessen.

Störungen der Cortexentwicklung können vielfältige Folgen haben. So können zum Beispiel Band- und diffuse Heterotopien in der weißen Substanz, noduläre Heterotopien in den corticalen Schichten, Ectopien der Marginalzone und Microgyrien entstehen (vgl. 1.2.3). Teilweise wurden diese Dysgenesien im Rahmen dieser Arbeit gezeigt.

Mehrere Mechanismen wären für die beobachteten pathologischen Veränderungen des cerebralen Cortex denkbar.

Veränderungen der glutamatergen und GABAergen Signalübertragung, und dadurch bedingt veränderte Ausschüttung der beiden Aminosäuretransmitter im corticalen Gewebe könnten erheblichen Einfluss auf die Migration nehmen.

Funktionell aktive NMDA- und GABA-Rezeptoren befinden sich zum Zeitpunkt der Implantation des EVAs auf den Zellen der Marginalzone (Schwartz TH *et al* 1998), sowie auf den Zellen der übrigen Schichten (Soria *et al.* 1999, del Rio *et al.* 1995). Zum Beispiel werden NMDA-Rezeptoren von den migrierenden Neuronen in der corticalen Platte schon vor der Ausbildung synaptischer Kontakte exprimiert und aktiviert. Sie sind allerdings nicht auf den Zellen der Ventrikulärzone zu finden (Dori and Parnavelas 1996; LoTurco *et al.* 1991, Dori *et al.* 1989). Im Gegensatz dazu werden GABA Rezeptoren bereits von diesen Zellen exprimiert (Behar *et al.* 2001).

Bei Blockade der NMDA-Rezeptoren mit MK 801 ist eine Verminderung der synaptischen und intrinsischen Aktivität der Zellen zu erwarten. Dies gilt nicht nur für die Zellen der Marginalzone / Schicht I, sondern auch für die Zellen der corticalen Platte und der unteren Cortexschichten. Chronische Applikation von MK 801 bewirkte in einer Studie eine Hochregulierung der NMDA-Rezeptoren in verschiedenen Gehirnarealen, darunter auch dem cerebralen Cortex (Gao and Tamminga 1995). Dies wäre im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht von großer Bedeutung, da die chronische Applikation von MK 801 auch diese Rezeptoren blockieren würden (vgl. 3.4, Substanzfreisetzung).

Die Blockade der GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin (BMI) könnte denselben Effekt wie Blockade der NMDA-Rezeptoren zeigen. Nicht nur Glutamat, sondern auch GABA wirkt zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung – im Gegensatz zum adulten Cortex – exzitatorisch (Staley and Smith 2001; Aamodt *et al.* 2000; Taketo and Yoshioka 2000; van den Pol *et al.* 1998, Ben Ari *et al.* 1997; Owens *et al.* 1996).

Die chronische Gabe des GABA_A-Agonisten Muscimol könnte durch Inaktivierung und Desensibilisierung die Akkomodation und damit Verminderung der synaptischen und intrinsischen Aktivität der Schicht I und GABAergen Neurone hervorrufen (Aguilo *et al.* 1999; Mienville 1998). Unter diesen Umständen wäre die Wirkung der von BMI vergleichbar.

Tritt diese Inhibierung bei chronischer Applikation von Muscimol nicht ein, wäre dagegen eine erhöhte Aktivität und, damit verbunden, synaptische Ausschüttung von GABA die Folge.

Aus oben genannten Punkten könnte sich folgendes für die Entwicklung des Cortex cerebri ergeben. Durch Applikation des NMDA-Rezeptor Antagonisten MK 801 und des GABA_A-Antagonisten Bicucullin könnte die Aktivität der Schicht I Neurone und damit auch deren spontane Netzwerkaktivität blockiert werden (Pesold *et al.* 1999; Schwartz *et al.* 1998). Die Zellen dieser Schicht exprimieren Reelin, ein Protein, das die neuronale Migration stoppt und dazu dient, die Ablösung der migrierenden Neurone von den Radialgliafasern zu ermöglichen (Dulabon *et al.* 2000). Reelin-Freisetzung ist jedoch nicht nur in Lamina I zu finden, auch die Zellen der unteren corticalen Schichten enthalten dieses Protein (Pesold *et al.* 1999, Alcantara *et al.* 1998). Durch Einsatz von MK 801 und BMI würde auch deren Aktivität erniedrigt. Somit könnte die Konzentration an Reelin in den entsprechenden Gebieten sinken und das Stopp-Signal für die Beendigung der Migration und die Ablösung von der Radialglia ausbleiben.

Für den Fall, dass die Adaption und folgende Inhibition der GABAergen Zellen durch die langanhaltende Muscimol-Wirkung nicht eintritt, könnte die daraus folgende tonische Exzitation eine erhöhte Ausschüttung von Reelin bewirken. Dies könnte durch die Aktivierung der Neuronen, unter Voraussetzung einer erhöhten Reelin-Ausschüttung, zur Verstärkung des Stopp-Signals führen und ebenfalls eine veränderte corticalen Struktur bewirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die das Auftreten von heterotopen Zellen in Lamina I zeigen (die sich direkt unter der pialen Oberfläche befinden), scheinen dies zu bestätigen. Ein insgesamt verändertes Migrationsverhalten und damit später auftretende Laminierungsstörungen könnten also, aufgrund einer veränderten Reelin-Konzentration entstanden sein.

Weiterhin hat Reelin einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Radialglia. Treten Störungen auf, resultiert dies in einer veränderten corticalen Struktur (Noctor *et al.* 1999, Anton *et al.* 1997).

Veränderungen der Reelin-Konzentration stehen deshalb in unmittelbarem Zusammenhang zu Störungen der Neuron-Glia- und Neuron-Neuron-Interaktion (Super *et al.* 2000, Noctor *et al.* 1999; Soriano *et al.* 1997).

Der Erhalt von Radialgliafasern, der in einigen Fällen nach Applikation der Pharmaka beobachtet wurde deutet darauf hin, dass Störungen in der Entwicklung der Radialglia aufgetreten sein könnten. Die ausbleibende Umwandlung von Radialgliazellen könnte daher ebenfalls den beobachteten Laminierungsstörungen beigetragen haben.

Die Hemmung der Schicht I Neurone durch chronische Applikation von MK 801 und BMI ergab einen Erhalt von Radialglia, was im Widerspruch zu früheren Studien steht, die bei Hemmung von Cajal-Retzius Zellen eine Veränderung des Phänotyps der Radialglia nachwiesen, welche vermehrt zu Astrocyten umgebaut wurde (Super *et al.* 2000, Soriano *et al.* 1997). Die Gabe von Muscimol, unter der Voraussetzung einer dauerhaft exzitatorischen Wirkung, könnte zur Anregung der Zellen in Lamina I führen und eine erhöhte Ausschüttung von Reelin zur Folge haben. Dies könnte den Erhalt der Radialgliafasern in diesem Modell erklären.

In den immunhistochemischen Untersuchungen trat keine Veränderung in Anzahl und Verteilung der Reelin-exprimierenden Zellen auf. Das Protein ist also nach wie vor vorhanden. Es ist aber nicht sicher, ob die Ausschüttung in den Extrazellulärraum, der für die Funktionalität des Reelins wichtig ist, bei reduzierter elektrophysiologischer Aktivität gegeben ist. Ferner kann wegen der im Vergleich zu den Kontrollexperimenten gleichen Verteilung auch davon ausgegangen werden, dass im vorliegenden Fall kein vermehrtes Einwandern von Cajal-Retzius-Zellen in die Marginalzone stattgefunden hat. Aus diesem Grund können keine Reparaturmechanismen in Gang gesetzt worden sein, die zur Wiederherstellung der Radialgliafasern hätten beitragen können (Super H *et al.* 1997).

Nicht nur die Ausbildung der normalen Topografie verschiedener Gehirnareale, sondern auch die Migration im cerebralen Cortex kann durch chronische Applikation von MK 801 gestört werden (Hirai *et al.* 1999; Marret *et al.* 1996; Schnupp *et al.* 1995, Cline and Constantine-Paton 1989). So führt die chronische Blockade der NMDA- und GABA-Rezeptoren zu einer erniedrigten Migrationsrate. Dies resultiert unter anderem aus

Veränderungen des intrazellulären Calcium-Spiegels. Ein verminderter Calcium-Einstrom über NMDA-Rezeptoren und N-Typ Calcium-Kanäle hat eine verminderte Migrationsrate zur Folge (Mienville and Pesold 1999, Komuro and Rakic 1993).

In der vorliegenden Untersuchung würde die Blockade von NMDA- und GABA_A-Rezeptoren (wie auch eine durch chronische Muscimol-Wirkung verringerte Depolarisation der migrierenden Neurone) zu einem vermindertem Calcium-Einstrom in die Zellen führen. Die Migrationsrate wäre daher vermindert.

Calcium ist für zahlreiche Proteine und deren Funktion wichtig. Änderungen in der Calcium-Konzentration können eine Veränderung der metabolischen Systeme der Zellen hervorrufen, Effekte auf den Zellzyklus haben und die genetische Kontrolle verändern (Hirai *et al.* 1999; Marret *et al.* 1996). Eine Reihe von Erkennungsproteinen benötigt Calcium, ebenso wie Tubulin, mit dessen Hilfe sich die Zellen bewegen (Rakic *et al.* 1996).

Schließlich hat intrazelluläres Calcium Einfluss auf die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel BDNF. BDNF und eine Reihe weiterer Faktoren sind für die Differenzierung von Neuronen und das gerichtete Einwachsen von Axonen in die entsprechenden Gebiete wichtig. In Gebieten, in denen die Entwicklung des Cortex fast abgeschlossen ist, findet man zunehmende Konzentrationen des Wachstumsfaktors und eine sinkende Konzentration von Reelin. Experimentell hat sich gezeigt, dass bei Entzug des Wachstumsfaktors BDNF der Reeler-Cortex ausgebildet wird und zahlreiche andere Störungen der Migration auftreten (Lotto *et al.* 2001; Rakic and Zecevic 2000; Lambert de Rouvroit and Goffinet 1998; Anton *et al.* 1997; Rio *et al.* 1997; Sheppard and Pearlman 1997, D'Arcangelo *et al.* 1995; Behar *et al.* 1994; Falconer 1991; Maisonpierre *et al.* 1990b; Maisonpierre *et al.* 1990a).

Untersuchungen haben gezeigt, dass auch Glutamat über NMDA- und muscarinerge Rezeptoren eine Konzentrationserhöhung der Wachstumsfaktoren BDNF und NGF bewirkt (Marmigere *et al.* 2001, Marini *et al.* 1998).

Applikation von MK 801 und BMI würde also das normale Gleichgewicht in den Konzentrationsverschiebungen zwischen Reelin und BDNF verschieben. Eine verlängerte Freisetzung von Reelin und Auswirkungen auf das Wachstum der Radialglia wären die Folge. In diesem Fall wäre mit Laminierungsstörungen und einer allgemein gestörten corticalen Struktur zu rechnen.

BDNF und NGF haben chemotaktische Wirkung auf migrierende Neurone. Sie induzieren die gerichtete Wanderung der Axone und das Auswachsen von Neuriten entlang eines Konzentrationsgradienten (Behar *et al.* 1994).

Im Fall der beschriebenen Konzentrations-erhöhungen könnten Störungen der Differenzierungsprozesse durch verändertes Einwachsen der Axone und durch Änderung des Neuritenwachstums auftreten. Damit würde ebenfalls eine Veränderung der corticalen Struktur einhergehen.

Auch GABA und Glutamat wirken in bestimmten Konzentrationen chemotaktisch auf migrierende Neurone. Auch in diesem Fall ist die Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentration und deren Wirkung auf G-Proteine wichtig.

Glutamat z.B. hatte in einer Untersuchung die höchste Migrationsrate im nanomolaren Bereich, micromolare Konzentrationen erzielten einen geringeren Effekt (Behar *et al.* 1999).

Es wurde nachgewiesen, dass femtomolare Konzentrationen von GABA oder dessen Agonisten Baclophen (ein GABA_B Agonist) eine Erhöhung der gerichteten und gradienten-abhängigen Migration (Chemotaxis) von Neuronen in der Ventrikulärzone bewirkte. Micromolare Konzentrationen beeinflussten die ungerichtete, zufällige Bewegung (Chemokinese) der Neuronen in der corticalen Platte (Behar *et al.* 1998).

GABA stimuliert die Migration über GABA_B-Rezeptoren. GABA_B- und GABA_C-Rezeptorantagonisten hemmen sie. Aktivierung von GABA_A Rezeptoren stoppt die Migration in der corticalen Platte, während die Blockierung dieser Rezeptoren zu einer Verstärkung der Migration führt (Behar *et al.* 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass, migrierende Neurone GABA_B Rezeptoren exprimieren. Die Zellen der corticalen Platte setzen GABA und Taurin in micromolaren Konzentrationen frei, wobei diese Transmitter dann als chemoattraktive Substanzen wirken können (Zhou *et al.* 2001).

Diese Mechanismen könnten zur Erklärung der erhaltenen Ergebnisse herangezogen werden. Chronische Applikation von MK 801 würde die neuronale Migration verlangsamen oder stoppen (Behar *et al.* 1999). Dies hätte erheblichen Einfluss auf die Entwicklung der normalen Architektur des cerebralen Cortex und könnte die beobachteten Laminierungsstörungen erklären.

Blockade der GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin würde in Übereinstimmung mit oben genannter Studie (Behar *et al.* 1998) zu einer erhöhten Migrationsrate führen. Auch dies hätte erheblichen Einfluss auf die Struktur des sich entwickelnden Cortex und könnte die beobachteten pathologischen Effekte erklären.

Nach Applikation von Muscimol könnte, bei Desensibilisierung der GABA_A Rezeptoren (Aguilo *et al.* 1999), derselbe Effekt erzielt werden wie unter Einsatz von Bicucullin. Eine erhöhte Migrationsrate wäre die Folge. Bei exzitatorischer Wirkung jedoch würde die Migration gestoppt (Behar *et al.* 1998).

In jedem Fall jedoch könnten Störungen der corticalen Entwicklung auftreten, wie sie auch nach Applikation von Muscimol nachgewiesen wurden.

Eine veränderte Migrationsrate nach Applikation von MK 801, BMI und Muscimol, bei gleichzeitiger Modulation der corticalen Netzwerkaktivität, könnte sowohl die Laminierungsstörungen, als auch die Heterotopien in Lamina I, sowie die Invagination der Schicht I in tiefere Cortexschichten erklären.

Ausblick

Zahlreiche Mechanismen sind für die normale Entwicklung des cerebralen Cortex wichtig. Um deren Zusammenspiel und die Interpretation der beobachteten Entwicklungsstörungen genauer zu erklären, wären elektrophysiologische Untersuchungen an Slice-Kulturen während chronischer Applikation der hier eingesetzten Pharmaka hilfreich.

„Calcium-Imaging“-Studien könnten die Vorgänge innerhalb der Zellen erhellen, da sie die vermuteten Konzentrationsveränderungen an intrazellulärem Calcium und deren Auswirkungen auf die Physiologie aufzeigen könnten.

Die Ergebnisse könnten mit derzeit geplanten funktionellen Studien mittels Rezeptorautoradiographie korreliert werden. Die Studien werden die Veränderungen, die sich während der Applikation der Substanzen zu den Zeitpunkten P1, P3, P7 und P14 auf Rezeptorebene abspielen, erfassen.

Die Herkunft der heterotopen Zellen in Schicht I und der Verbleib der migrierenden Neurone könnte durch BrdU-Markierung der Vorläuferzellen genauer bestimmt werden.

Die Applikation verschiedener anderer Substanzen wie Neurotransmitter oder neurotrophe Faktoren könnten schließlich helfen, weitere Mechanismen der Cortexentwicklung zu charakterisieren.

Zusammenfassung

Neuronale Migration ist die Voraussetzung für die Ontogenese der Großhirnrinde bei Säugetieren. Im Verlauf der Entwicklung führt das Einwandern postmitotischer Neurone aus den tiefen Schichten des Cortex cerebri zur Ausbildung des später sechsschichtigen Neocortex. Die Migration der Zellen ist vom exakten Zusammenspiel einer Reihe von Faktoren abhängig. Treten Störungen im Verlauf des Migrationsprozesses auf, so resultiert dies in einer veränderten corticalen Architektur, die häufig mit Funktionsverlusten verbunden ist.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur Ontogenese des cerebralen Cortex der neugeborenen Ratte. Histologische und morphometrische Methoden wurden angewendet, um die Struktur des Cortex darzustellen und mögliche funktionelle Eigenschaften abzuleiten. Die Untersuchungen erfolgten zunächst unter physiologischen Bedingungen.

Vier ausgewählte charakteristische Zelltypen im Bereich Par I, somatosensorischer Cortex der neugeborenen Ratte wurden morphometrisch analysiert. Es handelte sich um Cajal-Retzius-Zellen, unreife und verzweigte Pyramidenzellen, sowie um Subplatezellen.

Aufgrund der strukturellen Eigenschaften der Zellen ergab sich, dass es sich bei den unreifen Pyramidenzellen um migrierende Neurone handeln muss. Die verzweigten Pyramidenzellen sind schon relativ weit differenziert, besitzen aber noch nicht die strukturellen Eigenschaften der Zellen im adulten Cortex. Cajal-Retzius- und Subplatezellen zeigen Merkmale ausdifferenzierter Neurone und könnten synaptische Information über einen größeren räumlichen Bereich verarbeiten. Sie könnten Elemente eines frühen corticalen Netzwerkes darstellen, in dessen Rahmen sich die übrigen Schichten entwickeln.

Anschließend sollte der Einfluss zweier wichtiger Faktoren für die Migrationsprozesse und die Ausbildung der corticalen Architektur *in-vivo* näher untersucht werden.

Es sollte ein Tier-Modell etabliert werden, welches Untersuchungen zu möglichen Veränderungen der Cortexentwicklung nach Beeinflussung der physiologischen Konzentration der Aminosäuretransmitter GABA und Glutamat erlaubt.

Mittels eines Kunststoffpolymers, das die chronische Applikation von Pharmaka ermöglichte, wurde die Wirkung des GABA_A-Agonisten Muscimol, des GABA_A-Antagonisten Bicucullin und des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK 801 untersucht.

Unter Verwendung von histologischen und immunhistologischen Untersuchungsmethoden zeigte sich, dass die normale Struktur des Cortex verändert war.

Neben Laminierungsstörungen, die alle corticalen Schichten betrafen, traten Fehlbildungen der Schicht I auf. Weiterhin waren Heterotopien in Lamina I zu beobachten, die als Neurone identifiziert werden konnten. Die Morphologie der Zellen war ebenfalls betroffen, deren Umorientierung war häufig zu sehen.

GABA und Glutamat sind also von essentieller Bedeutung für die normale Entwicklung des Cortex cerebri.

Abkürzungen

ACSF	Artificial cerebral spinal fluid
BMI	Bicuculline methiodide, Bicucullin
BSA	Albumin, Bovine Fraction V, Rinderserum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumdichlorid
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EtOH	Ethanol
EVA	Ethylene-vinylacetate
GABA	γ-Aminobuttersäure
GBSS	Geys Balanced Salts Solution
h (hrs)	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasser / Aqua bidest.
Cl ⁻	Chlorid
HCl	Salzsäure (Hydrochloric acid)
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
min	Minute
MK 801	(+)-MK 801 maleat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
P0 – P14	Postnatale Tage 0 bis 14
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate balanced salt solution
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
sec	Sekunde
ZNS	Zentrales Nervensystem

[Terminologie:

Die Begriffe Presubplate und Subplate werden im Rahmen dieser Arbeit aus dem Englischen übernommen. Es stehen im Deutschen keine adäquaten Begriffe zur Verfügung, die o.g. Ausdrücke werden in Deutschland allgemein angewandt.]

Literaturverzeichnis

- Aamodt SM, Shi J, Colonnese MT, Veras W, Constantine-Paton M (2000) Chronic NMDA exposure accelerates development of GABAergic inhibition in the superior colliculus. *J Neurophysiol* 83: 1580-1591
- Acampora D, Barone P, Simeone A (1999) Otx genes in corticogenesis and brain development. *Cereb Cortex* 9: 533-542
- Aguilo A, Schwartz TH, Kumar VS, Peterlin ZA, Tsiola A, Soriano E, Yuste R (1999) Involvement of cajal-retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild-type and reeler mice. *J Neurosci* 19: 10856-10868
- Alcantara S, de Lecea L, del Rio JA, Ferrer I, Soriano E (1996) Transient colocalization of parvalbumin and calbindin D28k in the postnatal cerebral cortex: evidence for a phenotypic shift in developing nonpyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 8: 1329-1339
- Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127: 1359-1372
- Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17: 185-218
- Altman J (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* 16: 263-278
- Alvarez LA, Yamamoto T, Wong B, Resnick TJ, Llena JF, Moshe SL (1986) Miller-Dieker syndrome: a disorder affecting specific pathways of neuronal migration. *Neurology* 36: 489-493
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278: 474-476
- Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL (1999) Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of Dlx genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb Cortex* 9: 646-654
- Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P (1997) Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 124: 3501-3510

- Arimatsu Y, Ishida M, Takiguchi-Hayashi K, Uratani Y (1999) Cerebral cortical specification by early potential restriction of progenitor cells and later phenotype control of postmitotic neurons. *Development* 126: 629-638
- Arimatsu Y, Ishida M, Sato M, Kojima M (1999) Corticocortical associative neurons expressing latexin: specific cortical connectivity formed in vivo and in vitro. *Cereb Cortex* 9: 569-576
- Balazs AC, Calef DF, Deutch JM, Siegel RA, Langer R (1985) The role of polymer matrix structure and interparticle interactions in diffusion-limited drug release. *Biophys J* 47: 97-104
- Barth PG (1987) Disorders of neuronal migration. *Can J Neurol Sci* 14: 1-16
- Bayer SA, Altman J, Dai XF, Humphreys L (1991) Planar differences in nuclear area and orientation in the subventricular and intermediate zones of the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* 307: 487-498
- Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, 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, 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, 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
- Ben Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20: 523-529
- Bergeron L, Yuan J (1998) Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 8: 55-63
- Bradford R, Parnavelas JG, Lieberman AR (1977) Neurons in layer I of the developing occipital cortex of the rat. *J Comp Neurol* 176: 121-132
- Brose K, Tessier-Lavigne M (2000) Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol* 10: 95-102

- Brunstrom JE, Gray-Swain MR, Osborne PA, Pearlman AL (1997) Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 18: 505-517
- Caric D, Gooday D, Hill RE, McConnell SK, Price DJ (1997) Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development* 124: 5087-5096
- Castagne V, Gautschi M, Lefevre K, Posada A, Clarke PG (1999) Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* 59: 397-423
- Caviness VS Jr (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [³H] thymidine autoradiography. *Dev Brain Res* 4: 293-302
- Chevassus-au-Louis N, Robain O (1999) Cortical heterotopias: animal models and human disease. *Rev Neurol (Paris)* 155: 51-58
- Choung CM (1990) Differential roles of multiple adhesion molecules in cell migration: Granule cell migration in cerebellum. *Experientia*. Basel, CH-Switzerland
- Christenson L, Wahlberg L, Aebischer P (1991) Mast cells and tissue reaction to intraperitoneally implanted polymer capsules. *J Biomed Mater Res* 25: 1119-1131
- Chun JJ, Nakamura MJ, Shatz CJ (1997) Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide- immunoreactive neurons. *Nature* 325: 617-620
- Cline HT, Constantine-Paton M (1989) NMDA receptor antagonists disrupt the retinotectal topographic map. *Neuron* 3: 413-426
- Costa C, Harding B, Copp AJ (2001) Neuronal migration defects in the dreher (lmx1a) mutant mouse: role of disorders of the glial limiting membrane. *Cereb Cortex* 11: 498-505
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JL, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler [see comments]. *Nature* 374: 719-723
- De Bergeyck V, Nakajima K, de Rouvroit CL, Naerhuyzen B, Goffinet AM, Miyta T, Ogawa M, Mikoshiba K (1997) a truncated reelin protein is produced but not secreted in the Orleans reeler mutation (Re^{rl-Orl}). *Molecular Brain Research* 50: 85-90

- DeDiego I, Smith-Fernandez A, Fairen A (1994) Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* 6: 983-997
- DeFazio RA, Hablitz JJ (2000) Alterations in NMDA receptors in a rat model of cortical dysplasia. *J Neurophysiol* 83: 315-321
- Del Rio JA, Heimrich B, Borrell V, Forster E, Drakew A, Alcantara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385: 70-74
- del Rio JA, Martinez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex* 5: 13-21
- des Portes V, et al. (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar Heteropia and Lissencephaly Syndrome. *Cell* 92: 51-61
- Donoghue MJ, Rakic P (1999) Molecular gradients and compartments in the embryonic primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9: 586-600
- Dori I, Parnavelas JG (1996) The development of excitatory transmitter amino acid-containing neurons in the rat visual cortex. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Exp Brain Res* 110: 347-359
- Dori I, Petrou M, Parnavelas JG (1989) Excitatory transmitter amino acid-containing neurons in the rat visual cortex: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 290: 169-184
- Dou CL, Li S, Lai E (1999) Dual role of brain factor-1 in regulating growth and patterning of the cerebral hemispheres. *Cereb Cortex* 9: 543-550
- Doulazmi M, Karagogeos D, Gormand N, Ternynck MT, Delhay-Bouchaud N, Mariani J, Bailly YJ (1998) Sustained delivery of immunoglobulins from polymer microsources on a narrow surface of the developing rat brain. *J Neurosci Methods* 84: 17-28
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES (2000) Reelin binds $\alpha 3 \beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27: 33-44

- During MJ, Freese A, Sabel BA, Saltzman WM, Deutch A, Roth RH, Langer R (1989) Controlled release of dopamine from a polymeric brain implant: in vivo characterization. *Ann Neurol* 25: 351-356
- Eagleson KL, Levitt P (1999) Complex signaling responsible for molecular regionalization of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9: 562-568
- Edmondson JC, Hatten ME (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* 7: 1928-1934
- Enderlin S, Norman AW, Celio MR (1987) Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 177: 15-28
- Erickson CA, Reedy MV. Neural crest development: the interplay between morphogenesis and cell differentiation. *Curr.Top.Dev.Biol.* 1998; 40: 177-209.
- Falconer (1991) Two new mutants "trembler" and "reeler" with neurological actions in the house mouse (*mus musculus* l.). *Journal of Genetics* 50: 192-201
- Feldmeyer D, Cull-Candy S (1996) Functional consequences of changes in NMDA receptor subunit expression during development. *J Neurocytol* 25: 857-867
- Feng Y, Walsh CA (2001) Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci* 2: 408-416
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39: 451-458
- Ferrer I (1993) Experimentally induced cortical malformations in rats. *Childs Nerv Syst* 9: 403-407
- Ferrer I, Soriano E, del Rio JA, Alcantara S, Auladell C (1992) Cell death and removal in the cerebral cortex during development. *Prog Neurobiol* 39: 1-43
- Finney EM, Stone JR, Shatz CJ (1998) Major glutamatergic projection from subplate into visual cortex during development. *J Comp Neurol* 398: 105-118
- Fishell G, Mason CA, Hatten ME (1993) Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature* 362: 636-638
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17: 2469-2476

- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23: 247-256
- Freese A, Sabel BA, Saltzman WM, During MJ, Langer R (1989) Controlled release of dopamine from a polymeric brain implant: in vitro characterization. *Exp Neurol* 103: 234-238
- Frotscher M (1998) Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8: 570-575
- Frotscher M (1997) Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res* 290: 315-322
- Fulton BP (1995) Gap junctions in the developing nervous system. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 327-334
- Gao XM, Tamminga CA (1995) MK 801 induces late regional increases in NMDA and kainate receptor binding in rat brain. *J Neural Transm* 101: 105-113
- Germano IM, Sperber EF (1997) Increased seizure susceptibility in adult rats with neuronal migration disorders. *Brain Res* 777: 219-222
- Gilmore EC, Ohshima T, Goffinet AM, Kulkarni AB, Herrup K (1998) Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci* 18: 6370-6377
- Glazner GW, Mattson MP (2000) Differential effects of BDNF, ADNF9, and TNFalpha on levels of NMDA receptor subunits, calcium homeostasis, and neuronal vulnerability to excitotoxicity. *Exp Neurol* 161: 442-452
- Gleeson JG, Walsh CA (2000) Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci* 23: 352-359
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23: 257-271
- Goffinet AM (1984) Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice. *Brain Research Reviews* 7: 261-296
- Gonzalez JL, Russo CJ, Goldowitz D, Sweet HO, Davisson MT, Walsh CA (1997) Birthdate and cell marker analysis of scrambler: a novel mutation affecting cortical development with a reeler-like phenotype. *J Neurosci* 17: 9204-9211

- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287: 273-278
- Hannan AJ, Servotte S, Katsnelson A, Sisodiya S, Blakemore C, Squier M, Molnar Z (1999) Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. *Brain* 122 (Pt 2): 219-238
- Hartmann D, De Strooper B, Saftig P (1999) Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr Biol* 9: 719-727
- Hartmann D, Ziegenhagen MW, Sievers J (1998) Meningeal cells stimulate neuronal migration and the formation of radial glial fascicles from the cerebellar external granular layer. *Neurosci Lett* 244: 129-132
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22: 511-539
- Hatten ME (1990) Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13: 179-184
- Hatten ME (1993) The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 3: 38-44
- Hatten ME, Mason CA (1990) Neuronal growth cone migration. *Experientia*. Basel, CH-Switzerland
- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1994) Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature* 370: 216-218
- Haydar TF, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P (1999) The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cereb Cortex* 9: 621-626
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20: 5764-5774
- Heckroth JA, Goldowitz D, Eisenman LM (1989) Purkinje cell reduction in the reeler mutant mouse: a quantitative immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 279: 546-555
- Heffron DS, Golden JA (2000) DM-GRASP is necessary for nonradial cell migration during chick diencephalic development. *J Neurosci* 20: 2287-2294
- Hermanns S, Reiprich P, Müller HW (2001) A reliable method to reduce collagen scar formation in the lesioned rat spinal cord. *J Neurosci Methods* 110: 141-146

- Hestrin S, Armstrong WE (1996) Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J Neurosci* 16: 5290-5300
- Hicks SP, D'Amato CJ (1968) Cell migrations to the isocortex in the rat. *Anat Rec* 160: 619-634
- Hill E, Kalloniatis M, Tan SS (2001) Cellular diversity in mouse neocortex revealed by multispectral analysis of amino acid immunoreactivity. *Cereb Cortex* 11: 679-690
- Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sakamoto T, Sawada T, Fushike S (1999) Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. *Dev Brain Res* 114: 63-67
- Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S (1995) The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet* 10: 77-83
- Hof PR, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat* 16: 77-116
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 8: 1599-1610
- Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA (1997) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389: 733-737
- Hsu TT, Langer R (1985) Polymers for the controlled release of macromolecules: effect of molecular weight of ethylene-vinyl acetate copolymer. *J Biomed Mater Res* 19: 445-460
- Hu H (2001) Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat Neurosci* 4: 695-701
- Humphreys P, Rosen GD, Press DM, Sherman GF, Galaburda AM (1991) Freezing lesions of the developing rat brain: a model for cerebrocortical microgyria. *J Neuropathol Exp Neurol* 50: 145-160
- Ignacio MP, Kimm EJ, Kageyama GH, Yu J, Robertson RT (1995) Postnatal migration of neurons and formation of laminae in rat cerebral cortex. *Anat Embryol (Berl)* 191: 89-100
- Innocenti GM, Berbel P (1991a) Analysis of an experimental cortical network: I). Architectonics of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid; similarities with human microgyria. *J Neural Transplant Plast* 2: 1-28

- Innocenti GM, Berbel P (1991b) Analysis of an experimental cortical network: II). Connections of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid. *J Neural Transplant Plast* 2: 29-54
- Ishida A, Shimazaki K, Terashima T, Kawai N (1994) An electrophysiological and immunohistochemical study of the hippocampus of the reeler mutant mouse. *Brain Res* 662: 60-68
- Jacobs KM, Hwang BJ, Prince DA (1999) Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *J Neurophysiol* 81: 159-173
- Jakobson M (1991) Histogenesis and morphogenesis of cortical structures. In *Developmental Neurobiology*, Jacobson M (ed) pp 401-452. Plenum Press: New York & London
- Jellinger K, Rett A (1976) Agyria-pachygyria (lissencephaly syndrome). *Neuropadiatrie* 7: 66-91
- Jones EG (1990) Modulatory events in the development and evolution of primate neocortex. In *Cerebral Cortex*, Jones EG & Peters A (ed) pp 311-349. Plenum Press: New York & London
- Kageyama GH, Robertson RT (1993) Development of geniculocortical projections to visual cortex in rat: evidence early ingrowth and synaptogenesis. *J Comp Neurol* 335: 123-148
- Kakita A., Goldman JE (1999) Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living Progenitors in slice preparations. *Neuron* 23: 461-472
- Kalcheim C. Mechanisms of early neural crest development: from cell specification to migration. *Int.Rev.Cytol.* 2000; 200: 143-196.
- Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C (1994) Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *J Comp Neurol* 339: 459-474
- Kawano H, Fukuda T, Kubo K, Horie M, Uyemura K, Takeuchi K, Osumi N, Eto K, Kawamura K (1999) Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats. *J Comp Neurol* 408: 147-160
- Komuro H, Rakic P (1998a) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 18: 1478-1490
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260: 95-97
- Komuro H, Rakic P (1998b) Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol* 37: 110-130

- Komuro H, Rakic P (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257: 806-809
- Komuro H, Rakic P (1996) Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17: 275-285
- 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
- Kostovic I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* 297: 441-470
- Kristt DA (1978) Neuronal differentiation in somatosensory cortex of the rat. I. Relationship to synaptogenesis in the first postnatal week. *Brain Res* 150: 467-486
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 23: 291-297
- Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22: 667-676
- Kuchelmeister K, Bergmann M, Gullotta F (1993) Neuropathology of lissencephalies. *Childs Nerv Syst* 9: 394-399
- Kwon YT, Tsai LH (1998) A novel disruption of cortical development in p35(-/-) mice distinct from reeler. *J Comp Neurol* 395: 510-522
- Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (1998) A new view of early cortical development. *Biochem Pharmacol* 56: 1403-1409
- Langer R, Brem H, Tapper D (1981) Biocompatibility of polymeric delivery systems for macromolecules. *J Biomed Mater Res* 15: 267-277
- Larkman A, Mason A (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J Neurosci* 10: 1407-1414
- Larkman AU (1991a) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: I. Branching patterns. *J Comp Neurol* 306: 307-319
- Larkman AU (1991b) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: II. Parameter correlations. *J Comp Neurol* 306: 320-331

- Larkman AU (1991c) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306: 332-343
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99
- Liesi P (1990) Extracellular matrix and neuronal movement. *Experientia*. Basel, CH-Switzerland
- Lo NC, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH (1997) Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 6: 157-164
- Lom B, Hockberger PE (1997) Is laminin-1 a guidance cue for cerebellar granule cell migration? *J Neurobiol* 33: 72-84
- Lorente de Nó R (1949) Cerebral Cortex: Architecture, intracortical connections, motor projections. pp 288-311.
- Lotto RB, Asavaritikrai P, Vali L, Price DJ (2001) Target-derived neurotrophic factors regulate the death of developing forebrain neurons after a change in their trophic requirements. *J Neurosci* 21: 3904-3910
- LoTurco JJ, Blanton MG, Kriegstein AR (1991) Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J Neurosci* 11: 792-799
- LoTurco JJ, Kriegstein AR (1995) Neurotransmitter signaling before the birth of neurons. In *The cortical neuron*, Gutnick MJ, Modi I (eds) pp 197-209. Oxford University Press: New York, Oxford
- Luhmann HJ (1996) Ischemia and lesion induced imbalances in cortical function. *Prog Neurobiol* 48: 131-166
- Luhmann HJ, Mittmann T, Schmidt-Kastner R, Eysel UT, Mudrick-Donnon LA, Heinemann U (1996) Hyperexcitability after focal lesions and transient ischemia in rat neocortex. In *Progressive Nature of Epileptogenesis, (Epilepsy Research Suppl. 12)*, Heinemann U, et al. (eds) pp 119-128. Elsevier: Amsterdam
- Luhmann HJ, Raabe K, Qu M, Zilles K (1998) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. *Eur J Neurosci* 10: 3085-3094
- Luhmann HJ, Reiprich RA, Hanganu I, Kilb W (2000) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex: intrinsic membrane properties, sodium and calcium currents. *J Neurosci Res* 62: 574-584

- Mackarechtschian K, Lau CK, Caras I, McConnell SK (1999) Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex* 9: 601-610
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990a) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501-509
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990b) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247: 1446-1451
- Marin-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* 152: 109-126
- Marin-Padilla M (1992) Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J Comp Neurol* 321: 223-240
- Marin-Padilla M (1972) Prenatal ontogenetic history of the principal neurons of the neocortex of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. II. Developmental differences and their significances. *Z Anat Entwicklungsgesch* 136: 125-142
- Marret S, Gressens P, Evrard P (1996) Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids in hamster developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15463-15468
- Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P (1995) Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 358-370
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245: 978-982
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1994) Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex. *J Neurosci* 14: 1892-1907
- Meyer G, Goffinet AM (1998) Prenatal development of reelin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *J Comp Neurol* 397: 29-40
- Meyer G, Schaaps JP, Moreau L, Goffinet AM (2000) Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J Neurosci* 20: 1858-1868
- Meyer G, Soria JM, Martinez-Galan JR, Martin-Clemente B, Fairen A (1998) Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* 397: 493-518

- Meyer G, Goffinet AM, Fairen A (1999) What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. *Cereb Cortex* 9: 765-775
- Micheva KD, Beaulieu C (1994) Postnatal development of GABA neurons in the rat somatosensory barrel cortex: a quantitative study. *Eur J Neurosci* 7: 419-430
- Mienville JM (1998) Persistent depolarizing action of GABA in rat Cajal-Retzius cells. *J Physiol (Lond)* 512 (Pt 3): 809-817
- Mienville JM, Pesold C (1999) Low resting potential and postnatal upregulation of NMDA receptors may cause Cajal-Retzius cell death. *J Neurosci* 19: 1636-1646
- Miller B, Chou L, Finlay BL (1993) The early development of thalamocortical and corticothalamic projections. *J Comp Neurol* 335: 16-41
- Miller MW (1988) Development of projection and local circuit neurons in neocortex. In *Cerebral Cortex*, Peters A, Jones EG (eds) pp 133-175. Plenum Press: New York
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-540
- Mrzljak L, Uylings HB, Kostovic I, van Eden CG (1992) Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex. II. A quantitative Golgi study. *J Comp Neurol* 316: 485-496
- Mrzljak L, Uylings HB, Kostovic I, van Eden CG (1988) Prenatal development of neurons in the human prefrontal cortex: I. A qualitative Golgi study. *J Comp Neurol* 271: 355-386
- Murtomaki S, Trenkner E, Wright JM, Saksela O, Liesi P (1995) Increased proteolytic activity of the granule neurons may contribute to neuronal death in the weaver mouse cerebellum. *Dev Biol* 168: 635-648
- Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG (1997) Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J Neurosci* 17: 3096-3111
- Nakajima K, Mikoshiba K, Miyata T, Kudo C, Ogawa M (1997) Disruption of hippocampal development in vivo by CR-50 mAB against reelin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8196-8201
- Nakanishi S (1983) Extracellular matrix during laminar pattern formation of neocortex in normal and reeler mutant mice. *Dev Biol* 95: 305-316

- Naqui SZH, Harris BS, Thomaidou D, Parnavelas JG (1999) The noradrenergic system influences the fate of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex. *Dev Brain Res* 113: 75-82
- Noctor SC, Palmer SL, Hasling T, Juliano SL (1999) Interference with the development of early generated neocortex results in disruption of radial glia and abnormal formation of neocortical layers. *Cereb Cortex* 9: 121-136
- Noctor SC, Scholnicoff NJ, Juliano SL (1997) Histogenesis of ferret somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 387: 179-193
- O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258: 299-302
- 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
- O'Rourke NA, Chenn A, McConnell SK (1994) Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development* 124: 997-1005
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14: 899-912
- Oppenheim RW, Schwartz LM, Shatz CJ (1992) Neuronal death, a tradition of dying. *J Neurobiol* 23: 1111-1115
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, 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
- Park JK, Williams BP, Alberta JA, Stiles CD (1999) Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J Neurosci* 19: 10383-10389
- Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23: 126-131
- Parnavelas JG, Burne RA, Lin CS (1983) Distribution and morphology of functionally identified neurons in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 261: 21-29
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412: 90-94

- Pearlman AL, Faust PL, Hatten ME, Brunstrom JE (1998) New directions for neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 8: 45-54
- Pearlman AL, Sheppard AM (1996) Extracellular matrix in early cortical development. *Prog Brain Res* 108: 117-134
- Penschuck S, Giorgetta O, Fritschy JM (1999) Neuronal activity influences the growth of barrels in developing rat primary somatosensory cortex without affecting the expression pattern of four major GABAA receptor alpha subunits. *Brain Res Dev Brain Res* 112: 117-127
- Persico AM, Calia E, Keller F (1997) Implants for sustained drug release over the somatosensory cortex of the newborn rat: a comparison of materials and surgical procedures. *J Neurosci Methods* 76: 105-113
- Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ (1998) Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma- aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3221-3226
- Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ (1999) Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3217-3222
- Prusky GT, Ramoa AS (1999) Novel method of chronically blocking retinal activity. *J Neurosci Methods* 87: 105-110
- Rager G (1994) Entwicklung des menschlichen Nervensystems. In *Benninghoff Anatomie*, Drenckhahn D, Leuker W (eds) pp 397-433. Urban & Schwarzenberg:
- Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* 18: 383-388
- Rakic P (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia*. Basel, CH-Switzerland
- Rakic P, Cameron RS, Komuro H (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 4: 63-69
- 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, Knyihar-Csillik E, Csillik B (1996) Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9218-9222
- Rakic S, Zecevic N (2000) Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci* 12: 2721-2734
- Ramón y Cajal S (1990) *New Ideas on the Structure of the Nervous System in Man and Vertebrates*. The MIT Press: Cambridge, Massachusetts, London
- Redecker C, Hagemann G, Gressens P, Evrard P, Witte OW (2000) Kortikale Dysgenesien. *Nervenarzt* 71: 238-248
- Reeves RH, Crowley MR, Lorenzon N, Pavan WJ, Smeyne RJ, Goldowitz D (1989) The mouse neurological mutant weaver maps within the region of chromosome 16 that is homologous to human chromosome 21. *Genomics* 5: 522-526
- Reid CB, Liang I, Walsh C (1995) Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron* 15: 299-310
- Reiner O, Albrecht U, Gordon M, Chianese KA, Wong C, Gal-Gerber O, Sapir T, Siracusa LD, Buchberg AM, Caskey CT, . (1995) Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J Neurosci* 15: 3730-3738
- 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
- Rice FL, Gomez C, Barstow C, Burnet A, Sands P (1985) A comparative analysis of the development of the primary somatosensory cortex: interspecies similarities during barrel and laminar development. *J Comp Neurol* 236: 477-495
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19: 39-50
- Rosen GD, Sigel EA, Sherman GF, Galaburda AM (1995) The neuroprotective effects of MK-801 on the induction of microgyria by freezing injury to the newborn rat neocortex. *Neuroscience* 69: 107-114
- Rubenstein JL, Anderson S, Shi L, Miyashita-Lin E, Bulfone A, Hevner R (1999) Genetic control of cortical regionalization and connectivity. *Cereb Cortex* 9: 524-532

- Sanchez MP, Frassoni C, Alvarez-Bolado G, Spreafico R, Fairen A (1992) Distribution of calbindin and parvalbumin in the developing somatosensory cortex and its primordium in the rat: an immunocytochemical study. *J Neurocytol* 21: 717-736
- Sarkisian MR, Frenkel M, Li W, Oborski JA, LoTurco JJ (2001) Altered interneuron development in the cerebral cortex of the flathead mutant. *Cereb Cortex* 11: 734-743
- Sarkisian MR, Li W, Di Cunto F, D'Mello SR, LoTurco JJ. Citron-kinase, a protein essential to cytokinesis in neuronal progenitors, is deleted in the flathead mutant rat. *J* 2002.
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74: 1-20
- Schell MJ, Brady RO, Jr., Molliver ME, Snyder SH (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 17: 1604-1615
- Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM (1997) Reelin mRNA expression during mouse brain development. *Eur J Neurosci* 9: 1055-1071
- Schlaggar BL, Fox K, O'Leary DD (1993) Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature* 364: 623-626
- Schnupp JW, King AJ, Smith AL, Thompson ID (1995) NMDA-receptor antagonists disrupt the formation of the auditory space map in the mammalian superior colliculus. *J Neurosci* 15: 1516-1531
- Schwartz TH, Rabinowitz D, Unni V, Kumar VS, Smetters DK, Tsiola A, Yuste R (1998) Networks of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron* 20: 541-552
- Sefton MV, Brown LR, Langer RS (1984) Ethylene-vinyl acetate copolymer microspheres for controlled release of macromolecules. *J Pharm Sci* 73: 1859-1861
- Shatz CJ, Chun JJM, Luskin MB (1989) The role of the subplate in the development of the mammalian telencephalon. In *The subplate in cortex development*, pp 35-57.
- Shatz CJ, Ghosh A, McConnell SK, Allendoerfer KL, Friauf E, Antonini A (1990) Pioneer neurons and target selection in cerebral cortical development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 469-480
- Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T (1997) Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389: 730-733

- Sheppard AM, Pearlman AL (1997) Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 378: 173-179
- Sholl DA (1956) *The Organization of the Cerebral Cortex*. New York
- Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62: 1-35
- Smith AL, Cordery PM, Thompson ID (1995) Manufacture and release characteristics of Elvax polymers containing glutamate receptor antagonists. *J Neurosci Methods* 60: 211-217
- Soria JM, Fairen A (2000) Cellular mosaics in the rat marginal zone define an early neocortical territorialization. *Cereb Cortex* 10: 400-412
- Soria JM, Martinez-Galan JR, Lujan R, Valdeolmillos M, Fairen A (1999) Functional NMDA and GABAA receptors in pioneer neurons of the cortical marginal zone. *Eur J Neurosci* 11: 3351-3354
- Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rio JA, Sotelo C (1997) Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 18: 563-577
- Spitzer NC (1995) Regulation of excitability in developing neurons. In *Brain Development and Epilepsy*, pp 144-170.
- Staley K, Smith R (2001) A new form of feedback at the GABA(A) receptor. *Nat Neurosci* 4: 674-676
- Streuli C (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11: 634-640
- Super H, Del Rio JA, Martinez A, Perez-Sust P, Soriano E (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex* 10: 602-613
- Super H, Soriano E, Uylings HB (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Research Reviews* 27: 40-64
- Super H, Sust PP, Soriano E (1997) Survival of Cajal-Retzius cells after cortical lesions in newborn mice: a possible role for Cajal-retzius cells in brain repair. *Dev Brain Res* 98: 9-14

- Takahashi T, Goto T, Miyama S, Nowakowski RS, Caviness VS Jr (1999) Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* 19: 10357-10371
- Taketo M, Yoshioka T (2000) Developmental change of GABA(A) receptor-mediated current in rat hippocampus. *Neuroscience* 96: 507-514
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17: 8313-8323
- Tan SS, Breen S (1993) Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* 362: 638-640
- Tan SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PP, Reese BE, Faulkner-Jones B (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21: 295-304
- The Boulder Committee. (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat Rec* 166: 257-261
- Troy CM, Rabacchi SA, Hohl JB, Angelastro JM, Greene LA, Shelanski ML (2001) Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* 21: 5007-5016
- Uylings HBM, van Eden CG, Parnavelas JG, Kalsbeek A (1990) The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. In *The Cerebral Cortex of the Rat*, Kolb B & Tees RC (ed) pp 35-76. MIT Press: Cambridge
- Valverde F, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L (1995) Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat. *Cereb Cortex* 5: 483-493
- Valverde F, Facal-Valverde MV, Santacana M, Heredia M (1989) Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat: a correlated Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol* 290: 118-140
- van den Pol AN, Gao XB, Patrylo PR, Ghosh PK, Obrietan K (1998) Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons. *J Neurosci* 18: 10749-10761
- Walsh C, Cepko CL (1988) Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241: 1342-1345

- Walsh C, Cepko CL (1990) Cell lineage and cell migration in the developing cortex. *Experientia*. Basel, CH-Switzerland
- Walsh C, Cepko CL (1993) Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* 362: 632-635
- Walsh CA, Goffinet AM (2000) Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 10: 270-274
- Ware ML, Tavazoie SF, Reid CB, Walsh CA (1999) Coexistence of widespread clones and large radial clones in early embryonic ferret cortex. *Cereb Cortex* 9: 636-645
- Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ (1999) The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9: 627-635
- Woo TU, Beale JM, Finlay BL (1991) Dual fate of subplate neurons in a rodent. *Cereb Cortex* 1: 433-443
- Zaidi AU, D'Sa-Eipper C, Brenner J, Kuida K, Zheng TS, Flavell RA, Rakic P, Roth KA (2001) Bcl-X(L)-caspase-9 interactions in the developing nervous system: evidence for multiple death pathways. *J Neurosci* 21: 169-175
- Zecevic N, Milosevic A (1997) Initial development of gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 380: 495-506
- Zhao Y, Sheng HZ, Amini R, Grinberg A, Lee E, Huang S, Taira M, Westphal H (1999) Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene Lhx5. *Science* 284: 1155-1158
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996) Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. *J Comp Neurol* 376: 198-213
- Zilles K, Qu M, Schleicher A, Luhmann HJ (1998) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA(A) and GABA(B) receptors. *Eur J Neurosci* 10: 3095-3106

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. L. Luhmann für die Themenstellung, sowie für seine ständige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herzlich danke ich ebenfalls Herrn Professor Dr. U. Rüther für die freundschaftliche Betreuung der Dissertation und für viele hilfreiche Ratschläge.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. K. Zilles für manches helfendes Wort und die Möglichkeit, mich in seinem Institut in die Methodik der Autoradiographie einzuarbeiten.

Besonderer Dank gilt auch Frau P. Schwarz, die mir im Labor und bei der Durchführung meiner Versuche stets helfend zur Seite stand.

Schließlich danke ich all meinen Freunden für ihre enorme Geduld, für endlose Gespräche, gute Ratschläge und Hilfe in allen Lebenslagen. Besonders zu nennen sind hier Frau Dr. S. Hermanns, Frau Dr. K. Hofele, Frau Dr. A. Knoche, Herr Dr. S. Mager, Frau Dr. C. Masanneck, Frau Dr. N. Palomero-Gallagher und Herr Dr. Schell.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4095
Oktober 2003
ISSN 0944-2952