

***„Untersuchungen zur zellulären
Physiologie des unreifen Neokortex
der Ratte“***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Robert Alexander Reiprich

aus Bonn

Düsseldorf

2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Wolf-Rüdiger Schlue

Korreferent: Univ. Prof. Dr. rer. nat. Heiko J. Luhmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2002

Vorwort

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis von vier Jahren experimenteller Arbeit im Labor von Herrn Prof. Dr. Heiko Luhmann. Ich möchte ihm an dieser Stelle für die Schaffung des Rahmens danken, in dem ich die Freude am Experimentieren und Entdecken ausleben konnte. In der „Dekade des Gehirns“ an der Erforschung dieses komplexen Organs teilnehmen zu dürfen, war ohne Frage eine einmalige Chance und Erfahrung.

Trotz oder gerade wegen der stetig wachsenden Auseinandersetzung mit der Materie war das befruchtende Umfeld meiner Kollegen und der Rückhalt durch mein privates Umfeld unabdingbar für die Beendigung und das Gelingen der Arbeit.

Ich möchte daher meinen ehemaligen Kollegen Andreas Schlumberger-Schuff, Kristin Raabe, Petra Schwarz, Sven Haul, Jörn Gieler, Nic Karpouk, Dirk Schubert, Richie Brown und auch den Kollegiaten und Stipendiaten des Neurograduertenkollegs für Ihre Anregungen, ihre Geduld mit mir und einfach den Spaß inner- und außerhalb des Labors danken!

Sehr großer Dank gilt weiterhin Ria Uthoff für den enormen Rückhalt, den Sie mir in dieser anstrengenden Zeit gab. Ohne diese Sicherheit und ihre Flexibilität wäre die Arbeit möglicherweise nie beendet worden.

Der weitaus größte Dank aber gilt meinen Eltern. Sie haben mich in der langen und teuren Zeit meines Studiums und der Doktorarbeit großzügig finanziell unterstützt, so dass ich mich stets ohne materielle Sorgen meiner Arbeit widmen konnte. Diese Förderung wird häufig als selbstverständlich vorausgesetzt, gleichzeitig aber selten entsprechend gewürdigt.

Schließlich danke ich meiner Frau Petra für die Hilfe, den Spaß und die unendliche Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Unsere zahlreichen Diskussionen in- und außerhalb des Labors haben unsere Projekte sehr befruchtet und die Blickwinkel in bezug auf die Arbeit häufig sehr verändert. Ich bin froh, mit ihr mein Leben und das Interesse an der Erforschung des Gehirns teilen zu dürfen!

VORWORT	1
VERZEICHNIS HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN.....	2
1. EINLEITUNG	1
1.1 EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	1
1.2 ANATOMIE UND ARBEITSWEISE DES WIRBELTIERGehirNS	3
1.3. DIE EVOLUTION DES NEOKORTEX	4
1.4. DIE ONTOGENESE DES NEOKORTEX	6
1.5. DIE ZYTOARCHITEKTONISCHE ENTWICKLUNG DES NEOKORTEX.....	8
1.5.3 <i>Die kortikale Differenzierung</i>	12
1.6. DIE NEURONE DES PERINATALEN KORTEX	13
1.6.2 <i>Neurone der Marginalzone</i>	15
1.6.3 <i>Migrierende pyramidale Vorläuferzellen</i>	16
1.6.4. <i>Verzweigte Pyramidenzellen</i>	17
1.6.5. <i>Subplattenneurone</i>	17
1.7 DIE REGULATION DER KORTIKALen Tc-0	18
1.8. EINFLÜSSE ELEKTROPHYSIOLOGISCHER PARAMETER	23
1.9. MODULATION ELEKTROPHYSIOLOGISCHER PARAMETER	26
DIE ZIELE DI-OR ARBEIT.....	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1.1. <i>Die Tiere</i>	30
2.1.2. <i>Die Präparation</i>	31
2.2. LÖSUNGEN	32
2.3. DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHE VERSUCHSAUFBAU.....	34
2.3.1. <i>Die Messkammer</i>	34
2.3.2. <i>Die optischen Komponenten</i>	34
2.3.3. <i>Elektroden</i>	35
2.3.4. <i>Die elektronischen Komponenten</i>	36
2.3.5. <i>Die mechanischen Komponenten</i>	37
2.4. VISUELLE KLASSIFIKATIONSKRITERIEN	38
2.5. DIE VORGEHENSWEISE BEIM ABLEITEN VON IDENTIFIZIERTEN ZELLEN.....	39
2.5.1. <i>Die Bestimmung der Membraneigenschaften</i>	41
2.6. DIE STATISTIK.....	42
3. RESULTATE	43
3.1. IDENTIFIKATION NEOKORTIKALER NEURONE NACH VISUELLEN KRITERIEN	43
3.1.1. <i>Das Differenz-Interferenz Kontrastbild unter Infrarotbeleuchtung</i>	44
3.1.2. <i>Lucifer-Yellow (LY) markiert Zellen im Epifluoreszenzbild</i>	45
3.2. DIE INTRINSISCHEN EIGENSCHAFTEN FRÜH POSTNATALER NEURONE DES NEOKORTEX.....	46
3.2.1. <i>Cajal-Retzius Neurone</i>	46

Untersuchungen zur zellulären Physiologie des unreifen Neokortex der Ratte

3.2.3 Verzweigte Pyramidenzellen	56
3.2.4 Subplattenneurone	61
3.2.6. Beteiligung von Kaliumströmen an intrinsischen Membraneigenschaften	67
3.3. EINWÄRTSSTRÖME NEOKORTIKALER NEURONE NEUGEBORENER RATTEN	68
3.3.1. Natrium-Ströme	68
3.3.2. Spannungsabhängige Kalziumströme	74
3.4. DIE SYNAPTISCHE KONNEKTIVITÄT DES NEONATALEN NEOKORTEX	83
3.4.1. Verteilung postsynaptischer Antworten nach orthodromer Stimulation	84
3.4.2. Modulation polysynaptischer Netzwerkaktivität	86
3.4.3. Die Strom-Spannungs Beziehung polysynaptischer Antworten	88
3.5. TRANSMITTERSYSTEME DER NETZWERKE DES UNREIFEN NEOKORTEX	90
3.5.1. Die Natur monosynaptischer Verbindungen	90
3.5.2. Die Pharmakologie der Netzwerkaktivität des unreifen Neokortex	93
3.6. IST DIE NR2B-UNTEREINHEIT DES NMDA-REZEPTORS IM PERINATALEN NEOKORTEX FUNKTIONELL AKTIV?	98
3.7. DER EFFEKT VON SOMATOSTATIN AUF DIE PHYSIOLOGIE NEOKORTIKALER NEURONE	100
3.7.1 Der Effekt von SS14 auf passive Membraneigenschaften.....	102
3.7.2 Der Effekt von SS14 auf das Feuerungsverhalten	105
3.7.3 Der Effekt von SS14 auf evozierte postsynaptische Ströme	106
3.7.4 Der Effekt von MK678 auf evozierte NMDA -Rezeptor vermittelte Ströme.....	110
3.7.5 Der Effekt von MK678 auf evozierte AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme.....	113
4. DISKUSSION.....	117
4.1. MORPHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER NEURONE	117
4.2 PASSIVE MEMBRANEIGENSCHAFTEN DER NEURONE	118
4.3.1 Kaliumleitfähigkeiten	122
4.3.2 Transiente Natriumströme.....	124
4.3.3 „HVA -Kalziumströme	126
„Ca ²⁺ set-point Hypothese“ nach Franklin und Johnson:	129
4.4 BETEILIGUNG DER LEITFÄHIGKEITEN AM FEUERUNGSVERHALTEN	131
4.5 DIE FRÜHE KORTIKALE KONNEKTIVITÄT	132
4.5.1 Thalamo-kortikales und kortikokortikales Netzwerk	132
4.5.2 Modell zur neonatalen kortikalen Konnektivität	141
4.6 NEUROMODULATION DURCH SOMATOSTATIN IM JUVENILEN RATTENKORTEX	142
5. AUSBLICK.....	147
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	151
7. LISTE DER VERWENDETEN LITERATUR	152

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
AMPA	engl.: (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP	Aktionspotenzial
DL-APV	engl.: DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	engl.: bicuculline methiodide
CaM	engl.: calmodulin
CaRE	engl.: calcium responsive element
CR Neuron	<i>Cajal-Retzius</i> Neuron
DIC	engl.: difference interference contrast
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
GABA	γ -Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
HVA	engl.: high voltage activated calcium current
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
INHP	langsame Nachhyperpolarisation
LVA	engl.: low voltage activated calcium current
LY	engl.: lucifer yellow
NBQX	engl.: 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulphonamide
NMDA	engl.: N-methyl-D-aspartic acid
NPY	Neuropeptid Y
PPS	primordiale plexiforme Schicht
sNHP	schnelle Nachhyperpolarisation
SP Neuron	<i>Subplatten</i> neuron
SRE	engl.: serum responsive element
SS14	Somatostatin-14
SST	Somatostatin
TTX	Tetrodotoxin
UP Zelle	unverzweigte Pyramidenzelle
VP Zelle	verzweigte Pyramidenzelle
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

In populärwissenschaftlichen Veröffentlichungen ist immer häufiger von der Komplexität des Gehirns, seinen Leistungen und neuen therapeutischen Möglichkeiten bei dessen Erkrankungen die Rede. Das Interesse an dieser Thematik hat seit der Dekade des Gehirns in den 90er Jahren sprunghaft zugenommen. Das wurde nicht zuletzt auch durch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Arvid Carlsson, Paul Greengard und Eric Kandel im Jahr 2000 deutlich.

Das Großhirn und seine Funktionsweise ist auch das Objekt der vorliegenden Arbeit. Es stellt nach heutiger Lesart die höchstentwickelte und komplexeste neuronale Struktur im Tierreich dar und übertrifft in seiner Komplexität sämtliche bekannten materiellen Strukturen. Es verarbeitet aufgenommene Sinnesinformationen und entwirft am Ende einer langen Kette von Verarbeitungs- und Bewertungsschritten angepasste und kontrollierte Reaktionen darauf.

Lebewesen, die kortikale oder homologe neuronale Strukturen besitzen, ist es möglich, äußerst flexibel auf sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren. Sie besitzen dadurch einen wirksamen Überlebensvorteil. Es ist in der Entwicklungsreihe der Wirbeltiere die Tendenz festzustellen, das eigene Überleben und damit auch das der gesamten Art durch zunehmende Flexibilität des Handelns zu sichern. Neben dem Menschen und Primaten werden auch anderen höherentwickelten Wirbeltieren solche Fähigkeiten zugesprochen.

Es stellt sich die Frage, womit diese Entwicklung begründet werden kann. Eine Erklärung dafür liefert die Beobachtung, dass in der Stammesentwicklung (Phylogenese) der Wirbeltiere ein starkes Volumenwachstum und zahlreiche strukturelle Veränderungen des Hirns zu beobachten sind. Ausgehend von unserem heutigen Wissensstand folgern wir, dass diese neuen Strukturen für die höheren kognitiven Fähigkeiten verantwortlich sein müssen.

Dieses war jedoch nicht immer so. Ein Blick in die Medizingeschichte zeigt, dass es ein langer Weg war, bis die Bedeutung des Gehirns überhaupt deutlich wurde, und erst in der Gegenwart wurde es als das Substrat für das Denken und das Bewusstsein erkannt. „Bewusstsein ist kein Ding, sondern ein Prozess“, so drückte es der amerikanische Psychologe William James (1842 bis 1910) aus.

Heute, am Ende der Dekade des Gehirns, sind durch ein Orchester anatomischer, physiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden sehr viele strukturelle und funktionelle Details des Hirns untersucht und verstanden worden. Dabei stellte sich in vergleichenden Studien heraus, dass im Zuge der Evolution in der aufsteigenden phylogenetischen Reihe neue Fertigkeiten jeweils mit veränderten oder neuen Hirnstrukturen einhergehen.

Diese Entwicklung spiegelt sich auch in der individuellen Entwicklung (Ontogenese) der Säugetiere wieder, in der phylogenetisch alte Strukturen früh entstehen, während die jüngsten Strukturen, also auch der Neokortex, erst am Ende der Individualentwicklung angelegt werden. Liegen genetische Defekte vor oder kommt es durch äußere Noxen wie Fehl- oder Mangelernährung, traumatische Läsionen, Intoxikation der Mutter während der Schwangerschaft oder z.B. durch Komplikationen bei der Geburt zu Störungen der Hirnentwicklung, kann dieses zu Entwicklungsstörungen (Dysgenesien) gerade der spät angelegten Hirnstrukturen des Kindes führen. Die veränderten Strukturen können abhängig von der Art und Ausprägung zu pathophysiologischen Funktionsstörungen wie z.B. epileptischen Anfällen oder psychiatrischen Erkrankungen führen.

Anhand der Korrelation struktureller Deformationen mit vorangegangenen pathologischen Störgrößen wird deutlich, dass in der Entwicklung des Hirns genetische und epigenetische Faktoren Hand in Hand gehen. Auf der Grundlage eines genetisch determinierten Gerüsts unreifer neuronaler Vorläuferzellen entwickelt sich in einer konzertierten Aktion genetisch determinierter und epigenetischer Faktoren ein reifes und funktionierendes Gehirn. Ob und wie die genetischen Programme durch elektrophysiologische Parameter beeinflussbar sein könnten, soll die grundlegende Frage dieser Arbeit sein.

1.2 Anatomie und Arbeitsweise des Wirbeltiergehirns

Das Nervensystem gliedert sich in einen peripheren (PNS) und einen zentralen (ZNS) Anteil. Sensorische Reize werden in der Peripherie durch Rezeptoren (z.B. Mechanorezeptoren in der Haut) aufgenommen und in neuronale Aktivitätsmuster transformiert. Diese Aktivität wird über afferente Nervenfasern im Rückenmark an das ZNS weitergeleitet und dort verarbeitet.

Im Gegenzug werden effektorische Befehle in Form von neuronalen Aktivitätsmustern über efferente Nervenfasern vom ZNS über das Rückenmark an Effektorstrukturen (z.B. Muskeln) weitergeleitet. Dabei können jedoch schon innerhalb des PNS auf der Ebene des Rückenmarks einfache Reflexschaltkreise gebildet werden, die schnelle und unwillkürliche Reaktionen auf perzeptierte Reize ermöglichen. Im Bereich des Stammhirns geht das PNS in das zentrale Nervensystem über.

Das ZNS gliedert sich in entwicklungsgeschichtlich unterschiedlich alte Strukturen. Einfache lebenserhaltende Funktionen werden in subkortikalen Zentren initiiert und gesteuert. So werden die Atmung und vegetative Funktionen von relativ einfachen Strukturen des peripheren Nervensystems und des Stammhirns gesteuert. Die Möglichkeiten, auf diese Prozesse von "höherer Instanz", also z.B. vom Neokortex, bewusst oder willentlich Einfluss auszuüben, sind relativ bescheiden.

Der subkortikale Stammhirnbereich gliedert sich in das Nachhirn (Myelenzephalon) mit der Medulla oblongata und der Pons, das Hinterhirn (Metenzephalon) mit dem Cerebellum, das Mittelhirn (Mesenzephalon), das Zwischenhirn (Dienzephalon) mit der Hypophyse und dem Hypothalamus, sowie in die Endhirnkerne (Striatum, Klastrum, Korpus amygdaloideum), die auch Basalganglien genannt werden.

Sollen Körperbewegungen koordiniert werden, reichen die motorischen Zentren im Hirnstamm, dem Kleinhirn und den Basalganglien für die meisten einfachen Bewegungen aus. Bis zu den Reptilien bleiben die Basalganglien die oberste Kontrollinstanz für den situationsgerechten Einsatz einfacher motorischer Programme.

Im Verlaufe der Evolution wurde die erste kortikale Struktur, die Althirnrinde (Archi- und Palaeokortex), den Basalkernen als Kontrollinstanz vorangestellt. Diese Struktur bleibt bei höherentwickelten Säugetieren als Hippokampusformation erhalten, der schließlich in der weiteren Evolution eine weitere Kontrollinstanz, der Neokortex, vorgeschaltet wurde (vgl. Romer, Parsons, 1983).

Der Neokortex (auch Neopallium genannt) integriert die unterschiedlichen Informationen aller Sinnesorgane in räumlich-zeitlichen Abbildungen seiner Umwelt in distinkten kortikalen Arealen. In letzter Instanz werden aus diesen integrierten Informationen Handlungsstrategien zur Reaktion auf Umweltreize entworfen und über das PNS an ausführende Strukturen (Effektororgane) übermittelt.

Der Neokortex stellt damit die entscheidende phylogenetische Neuentwicklung des Gehirns dar, die höhere Wirbeltiere und den Menschen zum bewussten Handeln befähigen.

1.3. Die Evolution des Neokortex

Die vielfältigen Baupläne der Wirbeltiergehirne weisen zahlreiche Gemeinsamkeiten auf. Alle Gehirne entstehen in der Embryogenese aus einem einschichtigen, plattenförmigen Epithelgewebe, das sich durch Invagination zu einer dorsal gelegenen Röhre verschließt. Am anterioren Ende verdickt sich diese zu mehreren Vesikeln, den Zerebralganglien, die das eigentliche spätere ZNS hervorbringen werden. Das vorderste Zerebralganglion wird sich später zum Großhirn entwickeln.

Aber nicht nur in der Ontogenese, sondern auch in der Phylogenese wird der Neokortex mit dem Auftreten der Säugetiere als neueste Hirnstruktur angelegt.

Es sind jedoch bereits bei niederen Wirbeltieren Strukturen zu finden, in denen ein ähnlich hohes Maß an Integration neuronaler Aktivität möglich ist. So besitzen Fische und Reptilien eine „kortikale Platte“, in der die höchste funktionelle Ebene des ZNS dieser Tiere gesehen werden kann. Im histologischen Bild können in dieser Struktur drei Schichten unterschieden werden.

Damit ähnelt die *kortikale Platte* dieser Tiere der Althirnrinde (auch Archaekortex oder Archipallium) der Säuger.

Bei Vögeln kann man dagegen das Neo- und Ektostriatum als homologe Struktur zum Neokortex betrachten. Hier kann man bereits spezifische sensorische Felder, einen visuellen Wulst sowie einen somatosensorischen und auditorischen Kortex differenzieren. Diese Strukturen verarbeiten jeweils eine Sinnesmodalität, sind also hoch spezialisiert.

Ausgehend von Fischen und Reptilien werden in der aufsteigenden Wirbeltierreihe einerseits die olfaktorischen Einzugsbereiche stark verkleinert (bei Säugern bleiben sie auf den Palaeokortex beschränkt) und andererseits die Endstationen der übrigen Afferenzen zunehmend in das Vorderhirn verlagert.

Erst mit dem Auftreten der Säuger beginnt der neokortikale Mantel, dramatisch an Größe zuzunehmen. Zeitgleich nimmt das Volumen des Thalamus, eine Struktur, welche die afferenten Eingänge der Sinnesorgane auftrennt, stark zu. Mit dem Wachstum des kortikalen Mantels und seinen zahlreicher werdenden intra- und subkortikalen Verbindungen geht eine Verlagerung der motorischen Kontrolle und der gesamten Verhaltenssteuerung in diesen "neuen" Teil des Vorderhirns einher. Weiterhin werden die zunehmende Größe und Komplexität des Neokortex von einer starken Ausdehnung efferenter Projektionsbahnen zu älteren Hirnstrukturen begleitet. Damit gewinnt der Neokortex mehr und mehr Modulationsmöglichkeiten anderer Bereiche des Gehirns. Bei Amphibien ist das Vorderhirn unmittelbar nur mit dem Dienzephalon verbunden, bei Reptilien wird jedoch bereits das Mesenzephalon erreicht. Bei Säugetieren verlaufen absteigende kortikale Efferenzen zu allen „niederer“ Hirnteilen. Die motorischen Pyramidenbahnen des motorischen Kortex ziehen zum Beispiel ohne synaptische Umschaltung bis ins Rückenmark (siehe zu dieser Thematik z.B. : Romer, Parsons, 1983).

1.4. Die Ontogenese des Neokortex

Die „biogenetische Grundregel“ besagt, dass die Entwicklung des Individuums von der befruchteten Eizelle bis zum ausgewachsenen Organismus eine verkürzte, beschleunigte Wiederholung der Stammesentwicklung sei, einander folgende Embryonalstadien also adulte Zustandsbilder anzeustraler Gruppen repräsentieren (Haeckel, 1866).

Viele Strukturen, die denen von phylogenetisch „niedereren“ Tieren ähnlich sind, werden daher auch in der Ontogenese höherer Säugetiere transient angelegt. In der weiteren Ontogenese werden diese in andere Strukturen überführt oder eliminiert. Diese Mechanismen gelten auch für die Entwicklung des Nervensystems.

In der Embryonalentwicklung wird die Entwicklung des Nervensystems (beim Menschen etwa in der dritten Schwangerschaftswoche) mit der Neurulation eingeleitet. Dabei wird die Entstehung einer Neuralplatte aus dem ektodermalem Keimblatt des Embryos durch diffusible, Chorda-mesodermale Signalstoffe induziert (Raballo et al., 2000).

Die lateralen Ränder der Neuralplatte falteten sich (beim Menschen im Verlauf der vierten Schwangerschaftswoche) zu Neuralfalten auf, in deren Mitte die Neuralrinne liegt. Die Neuralfalten wandern aufeinander zu und verschmelzen ausgehend von der Halsregion in kranialer und kaudaler Richtung zum Neuralrohr.

Der kraniale, breitere Teil des Neuralrohrs weitet sich (beim Menschen zum Ende der vierten Schwangerschaftswoche) zu drei Bläschen auf, die von kranial nach kaudal als Prosenzephalon (pro = vorder-, enzephalon = Kopf), Mesenzephalon (mes = mittel) und Rhombenzephalon (rhomb = länglich) bezeichnet werden.

Aus den lateralen Wänden des Prosenzephalon entstehen in Form zweier Ausstülpungen die späteren Großhirnhemisphären. Zusammen mit dem medialen Teil, der Lamina terminalis, bilden sie das Telenzephalon. Die innenliegenden Hohlräume bilden die späteren Seitenventrikel.

Der unpaarige Teil des Prosenzephalons entwickelt sich zum Dienzephalon. Am

Boden der Seitenventrikel entstehen (beim Menschen in der sechsten Schwangerschaftswoche) die Basalganglien, die sich in das Lumen der Seitenventrikel vorwölben. Die übrige Hemisphärenwand stellt die Anlage der Großhirnrinde (auch *palliale Anlage* genannt) dar.

Im Bereich, in dem die Hemisphären mit dem Dach des Mesenzephalons verschmelzen, bleibt die Hemisphärenwand sehr dünn und es finden sich keine neuronalen Zellen. Statt dessen entwickelt sich hier ein Gefäßmesenchym, der Plexus choroideus, der in das Lumen der Seitenventrikel hineinragt und für den Liquorhaushalt verantwortlich ist.

Der medio-dorsale Bereich der Großhirnrinde, das Archipallium, verdickt sich zur Hippokampusformation und wölbt sich in die Seitenventrikel vor. Mit der Entwicklung des Corpus callosums, der medio-dorsalen Verbindung der Großhirnhemisphären im Telenzephalon, verschieben sich die Hippokampi nach lateral.

Der Neokortex entwickelt sich zuletzt in der Ontogenese, dehnt sich weiter frontal, dorsal und occipital aus, und bedeckt schließlich die lateralen Bereiche des Dienzephalons und Mesenzephalons sowie den kranialen Bereich des Mesenzephalons.

Beim Menschen differenzieren sich anatomisch abgrenzbare Stirn-, Schläfen- und Hinterhauptslappen. Bis zum Zeitpunkt der Geburt vergrößert sich zugleich die kortikale Oberfläche durch die Bildung von Windungen (Gyri), die durch Furchen (Sulci) voneinander getrennt werden.

Mit dem Wachstum des Großhirns gehen die Zunahme und das Wachstum afferenter und efferenter Axone einher. Diese bilden zusammen die Capsula interna, die den Neokortex mit dem Hirnstamm und dem Rückenmark verbindet. Die darin verlaufenden Bahnen durchdringen auf ihrem Weg die Basalganglien und unterteilen diese in den Schalenkörper (Putamen) und den Schweifkörper (Nukleus caudatus). Zusammen bilden beide Kerne und die durchlaufenden Fasern wegen des gestreiften histologischen Bildes das Corpus striatum (vgl. Forssman, Heym, 1985; Uylings et al., 1990).

Wie bereits beschrieben, ist der Archäekortex der Säugetiere dem histologischen Bild der *kortikalen Platte* der Fische und Reptilien äußerst ähnlich. Beide Strukturen sind dreischichtig aufgebaut und weisen zytoarchitektonische Gemeinsamkeiten auf (Butler, 1994; Nieuwenhuys, 1994). Auch in der Entwicklung des Neokortex findet man vorübergehend eine dreischichtige Struktur, welche dem adulten Archäekortex der Säuger bzw. der *kortikalen Platte* der Fische und Reptilien ähnelt (Blanton & Kriegstein 1991a, 1991b).

Diese drei transienten Schichten werden von der pialen Oberfläche her gesehen als *Marginalzone*, *kortikale Platte* und *Subplatte* bezeichnet und lassen sich durch spezifische zytoarchitektonische Merkmale beschreiben. Auf diese Merkmale, ihre strukturelle Entwicklung und ihre Funktion soll im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.5. Die zytoarchitektonische Entwicklung des Neokortex

Obwohl heute sehr viele neuroanatomische Befunde über die Kortikogenese vorliegen, ist gegenwärtig recht wenig über die Mechanismen, die an der frühen kortikalen Differenzierung beteiligt sind bekannt. Experimentelle Arbeiten an Primaten und niederen Säugetieren haben jedoch Erkenntnisse über die Art und zeitliche Abfolge grundlegender Entwicklungsvorgänge erbracht und zum Entwurf kortikaler Entwicklungsmodelle geführt.

Die Entwicklung der Hirnrinde lässt sich in drei zeitliche Abschnitte unterteilen, die abhängig von der betrachteten Region zu unterschiedlichen Zeitpunkten beginnen, sich aber zeitlich und räumlich überschneiden können. Es lässt sich eine Phase gesteigerter Neuroblastenproliferation in der *Ventrikulärzone* von einer Phase der radialen und tangentialen Migration unreifer Neurone und von einer anschließenden Phase der Differenzierung und kortikalen Organisation unterscheiden. Im Folgenden sollen diese drei Stadien der Kortikogenese erläutert werden.

1.5.1 Die Bildung unreifer neuronaler Vorläuferzellen

Im Neuroepithel der Großhirnrinde werden pluripotente Vorläufer- oder Stammzellen gebildet. Im Zuge der Embryonalentwicklung entstehen aus diesen durch proliferative Zellteilungen neuronale Vorläuferzellen und Gliazellen.

Die Proliferation wird durch diffusible epidermale oder fibroblastische Wachstumsfaktoren aus den umgebenden Epithelien induziert (Tropepe et al., 1999; Raballo et al., 2000). Dieses geschieht in den *Ventrikulär-* und *Subventrikulärzone* genannten Laminae des Großhirns (Berry et al., 1965; Davies & Temple, 1995; Williams & Price, 1995; Lavdas et al., 1996).

Es stellt sich die Frage, welche der Stammzellen sich zu welchem Zeitpunkt teilen, welche sich davon zu Neuronen, welche zu Gliazellen differenzieren und welche Faktoren daran beteiligt sind.

Die Aufklärung des Schicksals undifferenzierter Neuroblasten wäre möglich, wenn man *die* Entwicklung einzelner Zellen *in vivo* verfolgen könnte. Dieses ist z.B. durch dauerhafte radioaktive Markierung undifferenzierter Stammzellen möglich, deren Tochterzellen zu späteren Zeitpunkten auf diese Markierung hin überprüft werden können. Solche Untersuchungen ergaben, dass bei Ratten (21 Tage Tragezeit) zwischen dem 11. embryonalen Tag (E11) und der Geburt (P0) alle neokortikalen Neurone aus pluripotenten Stammzellen entstehen (Sidman & Rakic, 1973).

Es konnte weiterhin in Transplantationsversuchen gezeigt werden, dass die spätere laminare Zugehörigkeit der neuronalen Vorläuferzellen bereits in der Proliferationsphase vor Abschluss der Migrationsphase determiniert und damit zumindest teilweise genetisch bestimmt wird (McConnell & Kaznowski, 1991; Frantz & McConnell, 1996).

1.5.2 Neuronale Zellmigration und Laminierung

Die postmitotischen Tochterzellen der *Ventrikulärzone* (VZ) stellen unreife neuronale und gliale Vorläuferzellen mit sehr einfacher Morphologie dar. Sie müssen ihre endgültige Position in der dreidimensionalen Struktur des Neokortex erst finden. Die erste Leitstruktur des entstehenden Neokortex wird von Gliazellen der *Ventrikulärzone* gebildet, die eine längliche Morphologie annehmen und sich zur pialen Oberfläche hin ausstrecken. Wegen ihrer radialen Anordnung werden sie *Radialgliazellen* (RG) genannt.

Unreife neuronale Vorläuferzellen der *Ventrikulärzone* beginnen (bei der Ratte ab dem 10. bis 15. Tag post conceptionem, beim Menschen von Tag 35 bis Woche 9 post conceptionem), entlang der *Radialgliazellen* in Richtung auf die piale Oberfläche hin zu migrieren, um die erste kortikale Lamina, die *palliale Anlage* (von verschiedenen Autoren auch primordiale plexiforme Schicht, Präplatte oder frühe *Marginalzone* genannt) mit den *Pionierneuronen* zu bilden (Marín-Padilla, 1970; 1971; 1978; Rickmann et al., 1977; Uylings et al., 1990; O'Leary & Borngasser, 1992, Wood et al., 1992) (siehe Abb. 1). Die Dicke der Neuralrohrwand und daher auch die Wanderstrecke der Neurone beträgt zu dieser Zeit einige Hundert Mikrometer.

Einwandernde Axone aus subkortikalen Bereichen bilden zusammen mit *Pionierneuronen* zwischen der *Ventrikulärzone* und der *pallialen Anlage* (bei der Ratte ab dem 16. embryonalen Tag) zwei *Intermediärzone* (IZ) und *Subventrikulärzone* (SZ) genannte Schichten aus. Neuronale Vorläuferzellen, die weiterhin aus der *Ventrikulärzone* einwandern, bewegen sich entlang der Radialgliazellen durch die *Intermediärzone* und bilden ab dem 17. embryonalen Tag in der *pallialen Anlage* die *kortikale Platte* (CP). Diese trennt nun unter anderem die nach ihrem Entdecker benannten *Cajal-Retzius* (CR) Neurone (Ramon y Cajal 1891; Retzius 1893) der von nun an *Marginalzone* (MZ) genannten oberflächennahen Schicht von den Neuronen der nun *Subplatte* (SP) genannten Schicht (Marin-Padilla, 1978; Luskin & Shatz, 1985; Uylings, 1990).

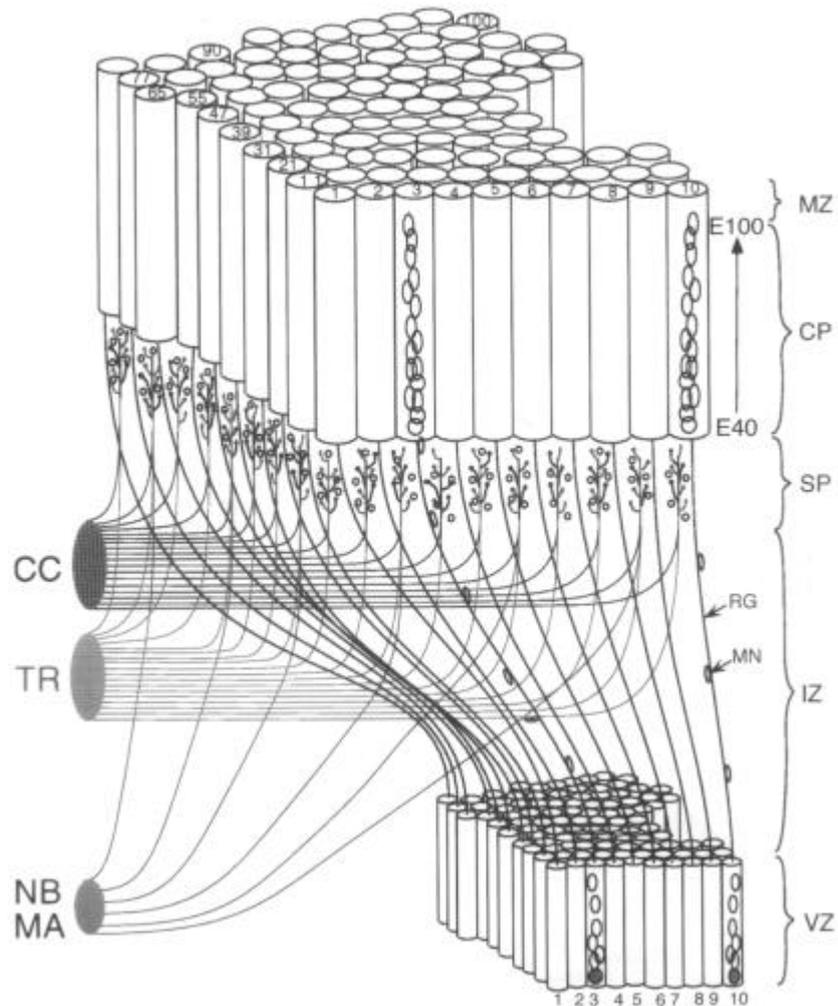


Abb. 1 Die neuronale Migration in der Entwicklung des Neokortex des Affen. Postmitotische migrierende Neurone (MN) der Ventrikulärzone (VZ) migrieren entlang der Radiärgliaszellen (RG) durch die Intra- und Subventrikulärzone (IZ) in die kortikale Platte (CP) ein, bis sie Kontakt mit Neuronen der Marginalzone (MZ) aufnehmen.

In der kortikalen Platte werden die inneren Schichten zuerst, die äußeren Schichten zuletzt gebildet. Die migrierenden Neurone müssen also durch die früh gebildeten Schichten hindurch wandern. Aus der kortikalen Platte entstehen so im Laufe der Zeit die Laminae VI bis II.

CC und TR bezeichnen Eingänge aus anderen Kortexbereichen bzw. aus dem Thalamus, NB und MA kennzeichnen weitere subkortikale Afferenzen (aus: Rakic, 1988).

Die *kortikale Platte* differenziert sich in die späteren adulten Schichten II bis V. Dabei werden tiefe Schichten zuerst gebildet, während die Schichten III und II gegen Ende der neuronalen Migrationsphase entstehen ("*inside first-outside last layering*") (Abb. 1).

Verschiedenste notwendige Faktoren sind für die Sicherstellung des geordneten Ablaufs der komplexen Migrationsvorgänge bisher identifiziert worden. Eine entscheidende Aufgabe während der neuronalen Migration entlang von *Radialgliazellen* haben z.B. Moleküle wie Reelin, gliale Wachstumsfaktoren, Neureguline, *h*-tegrine, oder Astrotaktin und ihre entsprechenden Rezeptoren auf der glialen und neuronalen Zellmembran. Diese, zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle zählenden Substanzen, dienen der Kontaktaufnahme, Haftung, Induktion und der Beendigung der Migration.

Die Migration selbst beruht auf einer Kaskade zytoskelettaler Auf- und Abbauvorgänge (Gleeson & Walsh, 2000). Als Stoppsignal für migrierende Neurone dient vermutlich das Protein Reelin, das von CR- und nicht CR-Neuronen der *Marginalzone* freigesetzt wird (Meyer & Goffinet, 1998; Dulabon et al., 2000).

Neben der radialen Migration gibt es tangentielle Migrationsbewegungen neuronaler Vorläuferzellen, deren Mechanismus zum Teil noch unklar ist. Während die späteren Projektionsneurone durch radiale Migration aus der *Ventrikulärzone* einwandern, gelangen vor allem die späteren GABAergen Interneurone aus subkortikalen Bereichen durch tangentielle Migration an ihren späteren Bestimmungsort (Tan & Breen, 1993; Anderson et al., 1997; Walsh & Cepko, 1988, 1992, 1993). Neuere Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die späteren Interneurone des adulten Neokortex aus der lateralen ganglionären Eminenz des ventralen Telenzephalons entlang der sich entwickelnden kortikofugalen axonalen Projektionen einwandern (Parnavelas, 2000).

1.5.3 Die kortikale Differenzierung

Nach dem Erreichen ihrer Zielgebiete unterliegen die postmigratorischen Neurone der verschiedenen kortikalen Laminae der weiteren morphologischen Differenzierung.

rung. Verbunden damit ist eine Zunahme der synaptischen Konnektivität und der neuronalen Aktivität. Es bilden sich funktionell aktive Schaltkreise, sowie zunehmend mehr und weitreichende afferente und efferente Projektionen (Ghosh et al., 1990; Ghosh & Shatz, 1992a, 1992b, 1993; Erzurumlu & Jhaveri, 1992; Miller et al., 1993; Kageyama & Robertson, 1993; Catalano et al., 1991; Allendoerfer et al., 1994).

Im Verlauf der späteren Entwicklung unterliegen die kortikalen Neurone weiteren synaptischen und subsynaptischen Veränderungen. Zum einen geschieht dieses auf der Ebene der Neuriten, zum anderen auf der Ebene der Rezeptoren und ihnen nachgeschalteter Strukturen.

Nach einer Phase erhöhter Plastizität in der juvenilen Phase kommt es in der Regel in der weiteren Reifung des Neokortex zu einer Reduktion synaptischer Konnektivität, die für die Herstellung der Funktionalität von großer Bedeutung zu sein scheint. Ähnliche plastische Veränderungen in der Konnektivität können auch nach Abschluss der Hirnentwicklung z.B. bei Lernvorgängen oder bei Regenerationsvorgängen nach Verletzungen von Hirngewebe stattfinden.

1.6. Die Neurone des perinatalen Kortex

Es gibt viele Möglichkeiten, die Neurone des neonatalen Kortex zu klassifizieren. Möglich ist eine Einteilung nach Alter, Lage, Morphologie, Konnektivität, Ursprung, Ausstattung mit bestimmten Transmittersystemen und/oder anderen spezifischen Molekülen, oder eine funktionelle Klassifizierung.

Hier soll das Augenmerk auf die ontogenetische Persistenz und Relevanz der Neurone gelenkt werden. Einerseits gibt es transiente, im Verlauf der Kortikogenese nachweisbare Populationen von Neuronen, die im weiteren Verlauf der Hirnentwicklung (in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies) nicht mehr oder nur noch schwer nachweisbar sind. Andererseits finden sich persistierende Neurone, die relativ spät in der Ontogenese angelegt werden und in der ausgereiften Hirnrinde die Majorität der Projektions- und Interneurone darstellen werden.

Zu den transient nachweisbaren Neuronen gehören die *Pionierneurone* der *pallialen Anlage*, *Cajal-Retzius* Neurone der *Marginalzone* und die *Subplattenneurone*. Diese Zellpopulationen werden in der Phase der kortikalen Proliferation als erste Neurone generiert. In den ersten postnatalen Wochen reduziert sich jedoch ihre Zahl beständig, bis sie schließlich kaum oder nicht mehr nachzuweisen sind (Wahle & Meyer, 1987). Die Mehrzahl dieser Neurone enthalten den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA), ähneln in dieser Eigenschaft also den Interneuronen des adulten Neokortex (Mason et al., 1991; Bauer et al., 1991).

Neben diesen transienten Zellpopulationen entstehen in der späteren embryonalen und perinatalen Kortikogenese in der Mehrzahl persistierende Neurone, welche die Nervenzellen des reifen Neokortex darstellen werden.

Die pyramidalen Neurone des adulten Neokortex sind Derivate der *kortikalen Platte*, zum Teil aber auch der *Subplatte*, während die meisten Interneurone tangential aus der lateralen ganglionären Eminenz einwandern (Parnavelas 2000). Im adulten Kortex stellen glutamaterge Pyramidenzellen etwa 80% der gesamten Neuronenpopulation dar, während etwa 20% aller Neurone GABAerge Interneurone sind. Mit ihren weitverzweigten, lokalen Axonkollateralen stellen die Interneurone des adulten Großhirns ein Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition im Neokortex her.

Die Bedeutung der transienten Neuronenpopulationen stellt ein großes Rätsel dar. Zum einen ähneln sie sehr den persistierenden Neuronen niederer Wirbeltiere und könnten daher auch funktionell aktive Strukturen wie bei diesen Tieren bilden, zum anderen ist aber auch bekannt, dass sie im "reifen" Gehirn der Säuger keine wichtige funktionelle Rolle spielen. Weshalb also sollten so hoch geordnete Strukturen in der Entwicklung überhaupt auftreten? Stellen Sie lediglich ein stammesgeschichtliches Relikt dar, dienen sie der Entwicklung des Neokortex oder haben sie eine Aufgabe in transienten kortikalen Schaltkreisen? In den folgenden Abschnitten sollen die bisher bekannten wesentlichen Eigenschaften der Neuronenpopulationen des perinatalen Neokortex ausführlicher dargestellt werden.

1.6.1 Pionierneurone

Die ersten postmigratorischen Neurone bilden oberhalb der *Ventrikulärzone* eine dünne Schicht, die *palliale Anlage*. Die darin enthaltenen Neurone werden *Pionierneurone* genannt, da sie als erste gebildet werden und als erste reifen. Später liegen diese Zellen jedoch außerhalb der *kortikalen Platte*. Sie stellen eine sehr heterogene neuronale Population dar. Sie bilden in der Embryogenese eine transiente, kortikale Struktur und sind vermutlich funktionell aktiv (Marin-Padilla, 1978, 1988; Bayer & Altmann, 1990, Kostovic & Rakic, 1990; Uylings, 1990).

1.6.2 Neurone der *Marginalzone*

Lange Zeit wurden lediglich *Cajal-Retzius* (CR) Neurone als neuronaler Bestandteil der *Marginalzone* genauer untersucht. Allerdings hat sich in jüngerer Zeit gezeigt, dass in der frühen kortikalen Entwicklung verschiedenen Populationen von mono- oder bipolaren Neuronen in dieser Schicht vorliegen, von denen sich die meisten, jedoch nicht alle durch die Expression des Proteins Reelin auszeichnen (Meyer & Goffinet, 1998). Diese Neurone spielen vermutlich eine wichtige Rolle in einem perinatalen neurotropisch wirksamen Netzwerk (Kim et al. 1995; Hestrin & Armstrong, 1996; Zhou & Hablitz, 1996; Mienville & Barker, 1997; Schwartz et al. 1998; Mienville 1998).

CR Neurone der *Marginalzone* sind als Derivat der *pallialen Anlage* unter den ersten postmitotischen Zellen des zerebralen Kortex (Uylings et al., 1990; Soriano et al., 1994). CR Neurone sind tangential in der *Marginalzone* orientiert und bilden dort ein dichtes Axonnetzwerk mit Kollateralen, die teilweise auch in tiefere Schichten projizieren (Bradford et al., 1977; Marin-Padilla, 1990; Hestrin & Armstrong, 1996; Zhou & Hablitz, 1996c). In jüngerer Zeit wurde postuliert, dass zumindest ein Teil der horizontal orientierten Zellen der *Marginalzone* aus der lateralen ganglionären Eminenz einwandern (Lavdas et al., 1999).

CR Neurone enthalten neben dem Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) Neuropeptide, wie z.B. Cholecystinin (CCK) und zahlreiche Kalzium-bindende Proteine wie Calbindin, Calretinin und Parvalbumin (Chun et al., 1987; Imamoto et

al., 1994; Verney & Derer, 1995; Uylings et al., 1997; Marin-Padilla 1998, Pesold et al. 1998). Ein wesentliches Merkmal der CR Neurone ist, wie eingangs beschrieben, die Expression und Sekretion des extrazellulären Matrixproteins Reelin, dessen Abwesenheit in der Mausmutante *reeler* zu einem veränderten Migrationsverhalten später gebildeter Neurone, und dadurch zu schweren kortikalen Deformationen führt (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Vermutlich sind CR Neurone daher unter anderem durch die Reelin-Sekretion für die Steuerung der frühen unspezifischen Phase der kortikalen Ontogenese verantwortlich. In dieser Zeit migrieren postmitotische Zellen aus dem periventrikulären Bereich in die *kortikale Platte* ein. Reelin wird dabei eine repulsive Funktion zugeschrieben, das den migrierenden Neuronen als Stoppsignal dient (Schiffmann et al., 1997). Für die gesteuerte Migration und die endgültige Laminierung sind die Reelin-positiven CR- und nicht CR-Neurone daher unabdingbar (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al. 1995; Rakic & Komuro, 1995; Rakic & Caviness, 1995; Marín-Padilla, 1998).

Aus der *Marginalzone* wird in der weiteren Entwicklung die Schicht I hervorgehen. CR Neurone jedoch sind im adulten Neokortex kaum noch nachzuweisen. Es ist bisher nicht sicher entschieden, ob dieser Zelltyp durch Apoptose verschwindet (Meyer & Gonzales-Hernandez, 1993; Del Rio et al., 1996), oder lediglich durch die Volumenzunahme des reifenden Großhirns bis unter die Nachweisgrenze verdünnt wird (siehe dazu Marin-Padilla, 1998).

1.6.3 Migrierende pyramidale Vorläuferzellen

Neokortikale Pyramidenzellen entstammen den pluripotenten Neuroblasten der *Ventrikulär-* und *Subventrikulärzone*. Kurz nach Durchlauf des mitotischen Zellzyklus sind die Tochterzellen einfach strukturiert. Diese unreifen Neurone wandern entlang der *Radiärgliazellen* in die *kortikale Platte* ein und bilden schließlich einen prominenten apikalen Dendriten aus. Nach Abschluss der Migration beginnen sie, die typische Morphologie der Pyramidenzellen anzunehmen. Abhängig vom Zeitpunkt ihrer mitotischen Teilung und der Dauer ihrer Migration verharren die Vorläufer der Pyramidenzellen mit ihren Somata in Höhe der späteren Schichten VI bis II (Marín-Padilla, 1992; 1998).

1.6.4. Verzweigte Pyramidenzellen

Wenn die *unverzweigten Pyramidenzellen* ihre endgültige Position in der *kortikalen Platte* bzw. in „ihrer“ Lamina erreicht haben, beginnen sie mit verstärktem Neuri-tenwachstum. In der Regel haben die „reiferen“ Pyramidenzellen daher einen api- kalen, häufig auch einen basalen Dendriten ohne Dornfortsätze und ein fusiformes Soma. Der apikale Dendrit verzweigt sich, abhängig von der laminären Lokalisati- on, in den darüber gelegenen Schichten. Daraufhin löst sich das Neuron von der Radiärglia. Durch die zunehmende Ramifizierung nimmt die räumliche Ausdeh- nung, in der synaptische Eingänge dieses Neuron erreichen können, zu. *Verzweig- te Pyramidenzellen* haben bereits ein deutlich erkennbares Axon mit Kollateralen und sind damit in ein synaptisches Netzwerk integriert (Marín-Padilla, 1992; 1998).

1.6.5. Subplattenneurone

Diese Population von Neuronen zeichnet sich durch ihre große Heterogenität aus. Gleichzeitig mit den CR Neuronen entstehen die *Subplattenneurone* (SP) sehr früh in der Ontogenese aus pluripotenten Neuroblasten und bilden mit ersteren die primordiale plexiforme Schicht, noch bevor die Neurone der *kortikalen Platte* gene- riert werden. In der weiteren Entwicklung sind ihre Somata direkt unterhalb der früh entstehenden Schicht VI in der weißen Substanz zu finden (Valverde & Facal- Valverde 1987; Valverde et al., 1989; Chun & Shatz, 1989). Eine Gruppe von Zel- len zeichnet sich durch ihre horizontale Orientierung und bipolare Struktur aus, andere Zelltypen sind invertierten oder horizontalen Pyramidenzellen ähnlich, deren dendritische Ramifizierungen innerhalb der weißen Substanz verlaufen (Valverde et al., 1989).

Subplattenneurone enthalten diverse Neuropeptide, wie z.B. Cholecystokinin (CCK), Neuropeptid Y (NPY) oder Somatostatin (SST) (Chun et al., 1987). Neuro- ne der *Subplatte* sind unter den ersten transienten kortikalen Anlaufstellen für einwachsende afferente Axone aus subkortikalen, insbesondere thalamischen Strukturen (Ghosh et al; 1990; Ghosh & Shatz, 1992a, 1992b, 1993; Erzurumlu & Jhaveri, 1992; Miller et al., 1993; Kageyama & Robertson, 1993; Catalano et al., 1991; Allendoerfer et al., 1994). Auch die ersten kortiko-kortikalen Projektionen

über das Korpus Kallosum knüpfen zunächst Kontakt zu *Subplattenneuronen* (Norris & Kalil, 1992).

Andererseits stellen diese Neurone mit ihren axonalen Projektionen zum Thalamus und zur kontralateralen kortikalen Hemisphäre, sowie zum Kollikulus superior die ersten efferenten Verbindungen her (Allendoerfer et al. 1994; McConnell et al., 1989; Norris & Kalil, 1992; Molnar & Blakemore, 1995). Möglicherweise dienen kortiko-thalamische Efferenzen und thalamo-kortikale Afferenzen in der Entwicklung als Leitstrukturen (Molnar et al., 1995). Damit stellen *Subplattenneurone* die ersten kortikalen Elemente dar, die sensorische Informationen nicht nur verarbeiten, sondern auch Rückmeldung an untergeordnete Strukturen geben können. Aus der *Subplatte* entsteht bei Nagetieren vermutlich die tiefe Schicht VIb (oder VII) (Uylings et al., 1990). Bei Primaten sind die Abkömmlinge der *Subplatte* im reifen Kortex nicht mehr nachweisbar (Kostovic et al., 1990).

1.7 Die Regulation der Kortikogenese

Die Entwicklung des Neokortex kann nicht monokausalistisch entweder als genetisch determinierter oder epigenetisch gesteuerter Prozess gesehen werden. Vielmehr handelt es sich in der Kortikogenese um ein komplexes System interagierender und rückkoppelnder Gene und Genprodukte und von Außen einwirkender Störgrößen. Es ist daher wichtig, die Verknüpfungspunkte dieser Faktoren zu finden und zu charakterisieren, um eine Beschreibung der Vorgänge während der Kortikogenese zu ermöglichen. An dieser Stelle soll nicht auf die bislang bekannten, genetisch determinierten Entwicklungsvorgänge zu Beginn der Individualentwicklung eingegangen werden. Hierzu sei auf die umfangreiche Fachliteratur zu dieser Thematik verwiesen.

Beispielhaft soll aber im Folgenden die Interaktion zwischen genetischen und epigenetischen Faktoren auf der Ebene neuronaler Aktivität erläutert werden, die in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Entwicklungsstufe eine Rolle spielen könnte. Vermutlich sind beide Elemente im Verlauf der Ontogenese über eine Vielzahl von Verknüpfungen an der Entstehung und Reifung des Gehirns gleichermassen betei-

ligt. Ein wichtiges Bindeglied zwischen diesen Faktoren können sekundäre Botenstoffe darstellen, deren intrazelluläre Homöostase durch physiologische Parameter, also gerade auch durch die Aktivität von Neuronen, beeinflusst wird.

Über biochemische Signalkaskaden können durch sie Prozesse wie die Genregulation, die Transkription oder Translation oder die posttranslatorische Modifikation exprimierter Genprodukte beeinflusst werden.

Viele Hinweise deuten darauf hin, dass neben extrinsischen Stimuli, z.B. durch Wachstumsfaktoren, die intrazelluläre Kalziumhomöostase einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung ausübt. So können schnell aktivierbare Gene („immediate early genes“), die in der Regel Transkriptionsfaktoren kodieren, aber auch später antwortende Effektorgene („delayed response genes“), durch räumlich-zeitliche zytosolische Schwankungen der Kalziumkonzentration beeinflusst werden.

Ein wichtiges Element in der Kalzium-beeinflussten Genexpression ist der Transkriptionsfaktor CREB, der zu der bZIP Familie gehört und unter Beteiligung von Kalziumionen phosphoryliert und aktiviert wird. Er wird durch die Phosphorylierung eines Ser¹³³ und/oder Ser¹²⁹ mittels CaM Kinasen aktiviert und bindet dann an bestimmte Kalzium-antwortende Elemente („calcium-responsive elements (CaRE)“) im Promotorbereich diverser Gene, wodurch deren Transkription kontrolliert werden kann. Die zusätzliche oder alleinige Phosphorylierung des Ser¹⁴² dagegen kann diese Wirkung von CREB inaktivieren. Interessant ist nun, dass z.B. in hippocampalen Neuronen CaRE abhängige Gene durch Kalzium aktiviert werden können, das durch spannungsgesteuerte Kanäle einströmt, nicht aber über solches, das durch NMDA-Rezeptorkanäle einströmt. Möglicherweise beruht diese Unfähigkeit auf einer Phosphorylierung der inhibitorischen Ser¹⁴² Stelle oder auf einer fehlenden Phosphorylierung des Ser¹²⁹. Kalzium, das über letzteren Weg in die Zelle gelangt, kann aber wiederum durch andere Kalzium-responsive Elemente, wie z.B. „serum responsive element (SRE)“, zur transkriptionellen Kontrolle diverser Gene beitragen (Ghosh & Greenberg, 1995). Interessanterweise scheint also CREB einen Anstieg an nukleärem Kalzium, SRE dagegen einen zytoplasmati-

schen Kalziumanstieg für die Aktivierung zu benötigen (Hardingham et al., 1997). In Neuronen des Striatums konnte gezeigt werden, dass Kalzium, das durch L-Typ-Kalziumkanäle in die Zelle gelangt, die CREB Phosphorylierung und als Folge die c-fos Genexpression steuert (Rajadhyaksha et al., 1999).

Dieser Sachverhalt zeigt auf, dass die räumlich-zeitliche intrazelluläre Verteilung der sekundären Botenstoffe, hier des Kalziums, sehr wichtig für deren Wirkung ist. Diese Verteilung kann durch die Zusammensetzung, Dichte und Kinetik beteiligter regulatorischer Elemente gesteuert werden. So werden Kalzium-bindende Proteine, wie Calbindin und Calretinin, die als Kalzium-Puffer für die zytosolische Kalziumhomöostase von entscheidender Bedeutung sind, transient in Subpopulationen des perinatalen Kortex exprimiert.

Das Protein Calbindin D28k wird im somatosensorischen Kortex embryonaler Ratten vom Tag E14 an in fast allen Neuronen der primordially plexiformen Schicht exprimiert, verschwindet aber immunologisch in den daraus abgeleiteten Schichten I und VIb des postnatalen Neokortex (Sánchez et al., 1992).

Das Protein Calretinin wird im perinatalen Kortex in den transienten *Cajal-Retzius* Neuronen der *Marginalzone* und in *Subplattenneuronen* exprimiert, die später evtl. eliminiert werden (Fonseca et al., 1995).

Kalziumionen können aus dem Extrazellulärraum über aktive Transportprozesse, spannungsabhängige Kalziumkanäle, Liganden-gesteuerte Kanäle oder aus intrazellulären, Kalzium-speichernden Kompartimenten in das Zytoplasma gelangen. *In vitro* Experimente am Kleinhirn haben gezeigt, dass migrierende Neurone durch die Blockade von N-Typ Kalziumkanälen mit ω -Conotoxin und/oder die Blockade von NMDA-Rezeptoren mit DL-APV oder MK-801 verlangsamt werden können. Dagegen hat die Blockade von L- und T-Typ Kalziumkanälen, sowie die Blockade von Natrium- oder Kaliumkanälen, keinen signifikanten Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit.

Weiterhin treten die intrazellulären Erhöhungen des Kalziumspiegels und die Migrationsschübe synchron auf. Erhöhungen der extrazellulären Kalziumkonzentration führen dagegen zu beschleunigter Migration.

Es ist bekannt, dass freies intrazelluläres Kalzium in der Zytoskelettbildung und der Aktivierung Aktin-bindender, kontraktiler Proteine eine wichtige Rolle spielt (Kater & Mills, 1991). Auch ist bekannt, dass der zytosolische Kalziumspiegel eng an die Regulation bestimmter Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. Cadherine oder Integrine gekoppelt ist, die für die Migration und morphologische Differenzierung von Bedeutung sind (Doherty & Walsh, 1992).

Kalziumionen regulieren also in der Kortikogenese unter anderem die Initiierung, Aufrechterhaltung und Termination der Migration (Komuro & Rakic, 1992, 1993; Rakic et al., 1994; Rakic & Komuro, 1995; Rakic & Caviness, 1995).

Ein weiteres Beispiel für die Interaktion zwischen genetischen und epigenetischen Faktoren ist der natürliche Untergang transienter kortikaler Neuronenpopulationen. Der programmierte Zelltod ist ein weit verbreitetes, regulierendes Element der normalen Ontogenese. Aufgrund verschiedener Kriterien wird zwischen der Apoptose und der Nekrose als zwei Formen des Zelltodes unterschieden. Dabei stellen diese beiden Mechanismen die Extrema eines Kontinuums neurodegenerativer Prozesse dar (Portera-Cailliau et al., 1997). Während die Nekrose eher als pathologische Erscheinung angesehen wird, ist die Apoptose ein aktiver und „beabsichtigter“ Prozess, der einem genetischen Programm folgt.

Aus Untersuchungen ist bekannt, dass etwa 50% aller Interneurone und 20% aller Prinzipalneurone des Neokortex zwischen P6 und P60 durch Apoptose sterben (Miller, 1995). Der Mechanismus der Generierung überzähliger unreifer neuronaler Zellen und deren Reduktion durch Apoptose ist im Nervensystem weit verbreitet. Dabei werden solche Zellen zerstört, die entweder nicht den passenden Zielort finden, oder nicht in einem spezifischen zeitlichen Entwicklungsfenster ihr Ziel erreichen.

Nur die Neurone, die beide Kriterien erfüllen, werden durch Wachstumsfaktoren, die an ihren Zielgebieten zu bestimmten Zeiten freigesetzt werden, vor Apoptose geschützt (Levi-Montalcini, 1987).

Bei der Apoptose wird die DNA von Zellen mittelbar durch die Wirkung von Proteasen (Caspase-3) zerstört, die wiederum über Zytocrom c aktiviert werden. Eine Möglichkeit der "neurophysiologischen" Induktion der Apoptose scheint die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials zu sein. In der Folge tritt ein Anschwellen der Mitochondrien sowie ein starker ATP-Verlust im Zytosol ein. Die Permeabilität der Mitochondrialmembran für Zytocrom c wird stark erhöht. Dieses gelangt in das Zytoplasma, aktiviert dort Caspasen und führt so schließlich zum Zelltod (Budd et al., 2000).

Ein anderer Weg führt über die Aufnahme des nach apoptotischem Stress gebildeten Proteins Bax aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien (Murphy et al., 2000). Auch dabei wird Zytocrom c freigesetzt und aktiviert im Zytosol verschiedene Caspasen. Dieser Weg kann jedoch durch die Expression von Proteinen der Bcl-2 Familie unterdrückt werden (Kuan et al., 2000).

Wie bei der Migration, spielt bei der Apoptose die intrazelluläre Kalziumhomöostase eine entscheidende Rolle für deren Auslösung oder Verhinderung. Blockiert man die Aktivität kultivierter neokortikaler Neurone mit Tetrodotoxin (TTX) oder durch die Erhöhung der extrazellulären Magnesiumkonzentration, so verhindert man intrazelluläre Kalziumoszillationen. Gleichzeitig erhöht sich die Zahl apoptotischer Zellen nach sechs Tagen in Kultur signifikant. Dagegen führt eine permanente Depolarisation der Zellen durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zu einer Verringerung der Zahl apoptotischer Zellen nach sechs Tagen in Kultur (Voigt et al., 1997).

Kalziumionen scheinen zusammengefasst als sekundärer Botenstoff ein ubiquitär benutztes, jedoch sehr fein differenzierendes Element der Koppelung physiologischer Aktivität an Entwicklungsprozesse unterschiedlicher Art zu sein.

1.8. Einflüsse elektrophysiologischer Parameter

Die eingangs genannten Beispiele regulatorischer Prozesse verdeutlichen, dass es eine enge Interaktion genetischer Programme und physiologischer Parameter z.B. über Kalziumionen gibt. Es stellt sich daher weniger die Frage ob, sondern wie die zelluläre physiologische Aktivität der Neurone auf die Entwicklung des Neokortex einwirken könnte.

Es müssen zur weiteren Klärung dieser Zusammenhänge die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der beteiligten Neuronenpopulationen möglichst genau beschrieben werden, um eine Abschätzung des Einflusses dieser Parameter auf Entwicklungsvorgänge vornehmen zu können. Dabei spielt die Dokumentation intrinsischer Parameter, wie z.B. Ruhemembranpotenzial und Erregbarkeit, sowie die Charakterisierung der interzellulären Kommunikation über Neurotransmitter eine zentrale Rolle.

Zum leichteren Verständnis sollen nun zunächst die wesentlichen Etappen und Merkmale neuronaler Erregungsweiterleitung beschrieben werden.

Neurone leiten überschwellige elektrische Aktivität durch chemische Botenstoffe, *Neurotransmitter* genannt, an andere Neurone weiter. Neurotransmitter werden aktivitätsabhängig sezerniert und binden an spezifische, membrangebundene Rezeptoren. In der Regel geschieht dieser Vorgang an axonalen Endigungen, den Synapsen.

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass gerade in der Entwicklung des Gehirns Neurotransmitter unspezifisch sezerniert werden und an extrasynaptische Rezeptoren binden können (Flint et al., 1998; Mohrmann et al., 2000).

Neurotransmitter werden bei der synaptischen Übertragung an der präsynaptischen Membran exozytotisch in definierten Mengen (Quanten) freigesetzt, diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden schließlich an Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Diese Rezeptoren sind entweder direkt oder über sekundäre Botenstoffe mit bestimmten Ionenkanal-Proteinen verbunden und können diese öffnen. Die daraus resultierenden Ionenströme durch die Membran der postsynaptischen Zelle führen in Abhängigkeit von der permeierten Ionensorte und

dem gegenwärtigen Membranpotenzial zu *exitatorischen postsynaptischen Potenzialen* (EPSPs) oder *inhibitorischen postsynaptischen Potenzialen* (IPSPs). Erstere verringern das Potenzialgefälle zwischen Zellinneren und der Umgebung (Depolarisation), letztere verstärken den Potenzialunterschied (Hyperpolarisation).

Die Depolarisation beruht auf der Tatsache, dass viele ionotropen Rezeptoren, wie z.B. die glutamatergen AMPA/Kainat- und NMDA-Rezeptoren für Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen permeabel sind, was am Ruhepotenzial der meisten Neurone zu einem Nettoeinwärtsstrom dieser Ionen führt. Im Falle inhibitorisch wirkender Transmitter, wie z.B. GABA, öffnen sich Ionenkanäle, die für K^+ - oder Cl^- -Ionen permeabel sind und am Ruhepotenzial adulter Neurone zu einem Nettoauswärtsstrom dieser Ionen führen.

Diese Veränderungen des Membranpotenzials sind in Amplitude und Zeitverlauf graduiert und breiten sich passiv entlang der Zellmembran aus, weshalb sie als *elektrotonische Potenziale* bezeichnet werden. Der initiale Strom an der postsynaptischen Membran wird von der Kinetik und der Dichte der Rezeptor- bzw. Kanalproteine determiniert. Gleichzeitig eingehende EPSPs und IPSPs werden räumlich und zeitlich summiert. Die Summe dieser Potenzialveränderungen entscheidet über den Effekt in der postsynaptische Zelle.

Die Summation ist einerseits stark von den passiven Eigenschaften der Neurone (Größe, Komplexität, Eingangswiderstand, Membranzeitkonstante etc.), andererseits von der Ionenkanalausstattung, der Ausstattung mit Ionenpumpen und weiteren aktiven Komponenten abhängig.

Form und Zeitverlauf postsynaptischer Potenziale werden entscheidend von den intrinsischen Zelleigenschaften wie Membranwiderstand und Membrankapazität der postsynaptischen Zelle geprägt. Je mehr Ionenkanäle es pro Flächeneinheit in der Membran gibt, desto geringer wird der Membranwiderstand. Je kleiner der Durchmesser des Nervenfortsatzes ist, desto größer wird der innere Längswiderstand. Zusätzlich zu dem dadurch bewirkten resistiven Stromverlust muss ein Teil des Ionenstromes auch zur Umladung der Membrankapazität genutzt werden (kapazitiver Stromverlust).

Führt eingehende exzitatorische Aktivität nun zu einer Depolarisation der neuronalen Zellmembran, die über einem bestimmten Schwellenwert liegt, baut sich eine rasche und selbstständig ablaufende Depolarisationswelle auf.

Diese *Aktionspotenzial* genannten Depolarisationswellen beruhen in den meisten erregbaren Zellen auf der Abfolge von schnellen Natrium- und Kaliumströmen über die Zellmembran durch die entsprechenden Spannungs-sensitiven Kationenkanäle. Der transiente Natriumstrom depolarisiert, der auswärtsgerichtete Kaliumstrom repolarisiert das Membranpotenzial.

Die Aktionspotenziale wandern entlang des Axons bis hin in die präsynaptischen Endigungen des Neurons. Dort führt die Depolarisation während eines Aktionspotenzials zum Einstrom von Kalziumionen durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle. Frequenz, Amplitude und Dauer der Aktionspotenziale bestimmt daher die Menge der einströmenden Kalziumionen. Diese Parameter werden wiederum von der Dichte und der Kinetik der beteiligten Ionenkanäle beeinflusst, aber auch durch modulatorische Effekte intrazellulärer Signalkaskaden.

Die Höhe des Kalziumspiegels in der präsynaptischen Endigung bestimmt anschließend darüber, ob auch dieses Neuron Neurotransmitter ausschütten wird. Der Kreis der neuronalen Erregungsfortleitung schließt sich damit.

Über aktivitätsabhängig freigesetztes Kalzium ist aber auch eine Einflussnahme auf die Genexpression von Neuronen denkbar, womit ein Anknüpfungspunkt zu den im vorigen Abschnitt genannten Mechanismen der kortikalen Regulation besteht.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner Netzwerkkomponenten beeinflussen also die Erregungsweiterleitung in neuronalen Verbänden und als Folge, zumindest theoretisch, auch Entwicklungsvorgänge.

Im Vergleich zum adulten Neokortex der Ratte liegen bisher relativ wenig elektrophysiologische Daten zur Physiologie des unreifen Neokortex vor. Dieser Sachverhalt ist auf technische Limitierungen zurückzuführen. Frühere Untersuchungen bei

Ratten wurden vorwiegend an dissoziierten Neuronen in der Altersklasse von P0 bis P4 durchgeführt (Hamill et al., 1991).

1.9. Modulation elektrophysiologischer Parameter

Die elektro-chemische Signalverarbeitung neuronaler Verbände kann durch Substanzen verändert werden, die als *Neuromodulatoren* bezeichnet werden. Diese können aktivitätsabhängig zusammen mit den klassischen Neurotransmittern entweder unspezifisch oder in der Nähe des Bestimmungsortes freigesetzt werden und dann an spezifischen Bindungsstellen in der prä- und postsynaptischen Membran binden.

Dort wirken sie entweder über die Bindung an G-Protein gekoppelten Rezeptoren mittels sekundärer Signalkaskaden (über cAMP, cGMP, Diacylglycerin, Inositoltriphosphat, Kalzium/Calmodulin oder Arachidonsäure) als metabotrope Rezeptoren oder über die Bindung an Tyrosinkinasen, die mittels der zytoplasmatischen Domäne andere Proteine an Tyrosinresten phosphorylieren kann.

Dadurch können die Neuromodulatoren z.B. die Kinetik von Neurotransmitterrezeptoren verändern und so die Erregbarkeit der Zelle hemmen oder auch fördern.

Beispiele für Neuromodulatoren sind einfache Ionen (z.B. Mg^{2+}), Aminosäuren (z.B. Glyzin oder Taurin), Peptide (z.B. Somatostatin oder Cholestozystokinin), oder Neurotrophine (z.B. BDNF, NT-3 oder NT-4). Die größte Gruppe der Neuromodulatoren bilden die Neuropeptide.

Diese Peptide werden in vielen Interneuronen des adulten Kortex, aber auch bereits in den transienten Zellpopulationen des unreifen Neokortex gebildet (Shiosaka et al., 1982; Chun et al., 1987). Im Gegensatz zu den klassischen Neurotransmittern erfolgt die Synthese der Neuropeptide nicht im Zytoplasma in der Nähe des Freisetzungsortes, sondern an den Ribosomen im Soma, von wo sie durch den schnellen axonalen Transport an den Freisetzungsort in Synapsen gelangen.

Unter den Neuropeptiden des unreifen Neokortex stellt Somatostatin (SS14) einen ontogenetisch früh verbreiteten Vertreter dar. Das Peptid wurde ursprünglich in hypothalamischen Extrakten entdeckt. Es hemmt die Freisetzung des Wachstums-

hormons Somatotropin aus Zellen des Hypophysenvorderlappens, weshalb es auch als Somatotropin inhibierendes Hormon bezeichnet wird.

Als Neuromodulator wurde SST erstmals 1986 von Epelbaum vorgeschlagen (Epelbaum, 1986). Das Peptid besteht aus 14 Aminosäuren und hat eine zyklische Struktur. Neben SS14 existiert auch ein bioaktives SS28 aus 28 Aminosäuren.

Beide Somatostatine entstehen aus einem gemeinsamen, 116 Aminosäuren langen Präprohormon, das von einem einzigen Gen kodiert wird (Patel, 1995; De Lecea et al., 1996)

In der Entwicklung des Neokortex der Ratte sind ab E19 die ersten Somatostatin-positiven Neurone in der *Subplatte* zu entdecken, deren Dichte bis zum Alter von P10 bis P15 ansteigt. In Kolokalisationsuntersuchungen wurde gezeigt, dass diese Neurone zu einer Untergruppe GABAerger Interneurone gehören (Somogyi et al., 1984). Immunhistochemische Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass Somatostatin in diesen Neuronen, an denen die so genannten Martinottizellen einen großen Anteil haben, neben GABA häufig mit Neuropeptid Y (NPY) und Calbindin kolokalisiert ist (Kawaguchi et al., 1997).

Das Peptid wurde weiterhin in invertierten Pyramidenzellen und *Cajal-Retzius* Neuronen des unreifen Neokortex gefunden (Yamashita et al., 1989). Für SS14 sind verschiedene Rezeptoren in menschlichen und tierischen Geweben bekannt, die unterschiedliche Effekte vermitteln können. Es sind 5 humane, 5 Rezeptoren der Ratte und 4 Rezeptoren der Maus beschrieben worden, die als sst1, sst2, sst3, sst4 und sst5 bezeichnet werden (Hoyer et al., 1995). Experimente an unterschiedlichen Geweben ergaben, dass diese Rezeptoren zu der Familie der metabotropen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen gehören. Beide biologisch aktiven Somatostatine werden von diesen Rezeptoren mit hoher Affinität gebunden (Jacobs et al., 1983).

Vergleicht man die Sequenz aller fünf Rezeptoren, so kann man sie in zwei Gruppen einteilen. In der einen Gruppe werden sst1 und sst4 zusammengefasst (SRIF1), in der anderen die Rezeptoren sst2, sst3 und sst5 (SRIF2). Diese Klassifizierung wird auch durch pharmakologische Daten unterstützt (Hoyer et al., 1995).

Im adulten Neokortex der Ratte sind die Rezeptor-mRNAs für sst1, sst2, sst3 und sst4 gefunden worden. In der Ontogenese des Neokortex dagegen konnte mit der semiquantitativen RT-PCR ein vorübergehendes Maximum an mRNAs für sst1-4 am Tag P7 gefunden werden (Wulfsen et al., 1993).

Somatostatin-Rezeptoren können in der neokortikalen Entwicklung vom Tag E16 an gefunden werden. In der *Marginalzone*, in Neuronen der *Subplatte* und der *kortikalen Platte* wurden Somatostatin-Rezeptoren ab dem Tag E16 nachgewiesen, deren Dichte zwischen P10 und P15 ein Maximum erreicht, um anschließend wieder etwas abzufallen (Gonzalez et al., 1991). In der *Marginalzone* der *pallialen Anlage* der E14 Ratte wurde in einigen Zellen sowohl sst1-mRNA, als auch das Neuropeptid nachgewiesen, in der *Subplatte* vom Tag E16 an. Neurone der *kortikalen Platte* enthalten ab dem Tag E18 durchgängig sst1-mRNA (Chun et al., 1987).

Allen SS14 bindenden Rezeptoren gemeinsam ist die nachgeschaltete Hemmung des Enzyms Adenylatzyklase durch Pertussistoxin(PTX)-sensitive G-Proteine. Bis auf sst4 ist bei allen SST Rezeptoren eine Stimulation der Phospholipase C über ein PTX-sensitives G-Protein beschrieben worden. Die sst1- und sst2-Rezeptoren aktivieren außerdem das Enzym Phosphotyrosin-Phosphatase über PTX-sensitive G-Proteine.

In verschiedenen Geweben konnten unterschiedliche elektrophysiologische Effekte von Somatostatin oder entsprechenden spezifischen Agonisten gefunden werden. Die Rezeptoren sst2 und sst5 sind z.B. bei Neuronen der Hypophyse über G_o -Proteine an Kalzium-Kanalproteine gekoppelt und inhibieren diese bei Aktivierung. Bestimmte Kaliumkanäle dagegen werden durch sst2-Rezeptoraktivierung über G_{i3} -Proteine potenziert (Tallent et al., 1996). Darüber hinaus wurde an embryonalen hypothalamischen Neuronen der Maus durch spezifische sst1-Rezeptor Aktivierung eine Erhöhung der Glutamatsensitivität, bei sst2-Rezeptor Aktivierung dagegen eine Verminderung derselben gemessen (Viollet et al., 1997). In adulten neokortikalen Neuronen der Schichten II und III wurde durch iontophoretisch appliziertes SS14 eine Reduktion GABAerger und Glutamaterger Ströme, sowie bei einigen Neuronen eine leichte Hyperpolarisation (<3 mV) beschrieben (Vidal et al.,

1989). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass SS14 in kultivierten Körnerzellen des Kleinhirns die Neurofilamentsynthese und das Auswachsen von Neuriten anregt, also auch neurotrophe Funktionen ausüben kann (Taniwaki & Schwartz, 1995).

Die oben beschriebenen transienten Erhöhungen, sowohl der Dichte Somatostatin-erger Neurone, als auch dessen Rezeptoren bei juvenilen Ratten im Alter von P10 bis P15 legen die Vermutung nahe, dass dieses Peptiderge System für die Physiologie und/oder die Entwicklung des Neokortex vorübergehend von besonderer Bedeutung sein könnte.

Die Ziele dieser Arbeit

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen hatten die Beschreibung der Neurophysiologie des sich entwickelnden Neokortex neugeborener Ratten in der Zeit zwischen der Geburt und dem Abschluss der neuronalen Migration (etwa am 4. Tag nach der Geburt) zum Ziel.

Zwischenziele der zugrundeliegenden Experimente:

1. Etablierung neurophysiologischer Ableitungen von identifizierten Neuronen in Hirnschnitten des neonatalen somatosensorischen Kortex von Ratten
2. Beschreibung der intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften von *Cajal-Retzius* Neuronen, *unverzweigten Pyramidenzellen*, *verzweigten Pyramidenzellen*, und von Neuronen der *Subplatte*.
3. Beschreibung wichtiger Ionenströme in den vier Neuronenklassen
4. Beschreibung der synaptischen Konnektivität dieser Neurone
5. Beschreibung der Pharmakologie der synaptischen Rezeptoren

Neben der Untersuchung der früh postnatalen Neurone war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Somatostatin und dem sst2-Rezeptor spezifischen Agonisten MK678 auf elektrophysiologische Parameter des juvenilen Neokortex der Ratte zu untersuchen. Dabei wurden insbesondere Pyramidenzellen der Schichten II-VI des Neokortex im Alter zwischen P4 und P20 untersucht.

Auf der Grundlage dieser Daten sollen in dieser Arbeit die Funktionalität, die funktionelle Konnektivität und mögliche Interaktionen zwischen elektrophysiologischen und entwicklungsbiologischen Parametern im sich entwickelnden Neokortex diskutiert werden. Ein Teil der in dieser Arbeit erhobenen Daten wurde im Jahr 2000 bereits publiziert (Luhmann et al., 2000).

2. Material und Methoden

2.1.1. Die Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurden Untersuchungen an Rattengehirnen durchgeführt. Dabei wurde die Belastung für die Tiere durch die Verwendung akuter Himschnitte, einem etablierten in-vitro Modell, weitestgehend reduziert. Wenn in dieser Arbeit physiologische Daten diskutiert werden, muss die Übertragung dieser Befunde auf den Menschen gewiss mit Einschränkungen vorgenommen werden.

Für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden männliche und weibliche Wistar Ratten verwendet, die aus der Tierversuchsanlage (TVA) der Universität Düsseldorf stammten. Die Muttertiere wurden in der TVA in einem künstlichen 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus unter konstanten äußeren Bedingungen gehalten (Temperatur $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$).

Die embryonale Altersbestimmung erfolgte zum einen Mittels des Nachweises von Spermien im Uterus der Mutter, zum anderen durch das vorsichtige Abtasten des Bauches der Mutter während der Tragezeit. Der Tag der Befruchtung wird als Tag 0 post coitum, post conceptionem oder auch als E0 (**E**mbrional), der Tag der Geburt als P0 (**P**ostnatal) bezeichnet. Alle weiteren Altersangaben beziehen sich auf

den Geburtstag. Für die hier aufgeführten Experimente wurden Tiere im Alter zwischen P0 und P20 verwendet.

2.1.2. Die Präparation

Die Untersuchungen wurden an koronalen Hirnschnittpräparaten durchgeführt. Dazu wurden embryonale Tiere oder solche der Altersstufe P0 bis P4 schnell mit einer scharfen Schere dekapitiert. Ältere Tiere wurden vor der Dekapitation mit Diethylether für einige Minuten betäubt. Die Kopfhaut wurde anschließend mit einem Skalpell entlang des Medians aufgetrennt und zu den Seiten geklappt. Weiterhin wurde mit einer feinen Augenschere der Schädelknochen von kaudal nach rostral entlang des Medians aufgeschnitten und zu den Seiten geklappt.

Durch einen kaudalen und einen rostralen koronalen Schnitt durch das gesamte Hirn wurde ein kortikaler Block isoliert, der unter anderem den primären somatosensorischen Kortex enthielt.

Anschließend inkubierte der Block für einige Minuten in einem Gefäß mit eiskalter, Karbogen-begaster (5% CO₂, 95% O₂) künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (Ringer). Die Ringerlösung wurde zu Beginn eines jeden Versuchstages aus einem 10-fach Konzentrat der Stammlösungen I und II (siehe Tab. 1) angesetzt und mit Karbogen begast, um den pH-Wert auf 7,4 einzustellen und eine Sauerstoffsättigung zu erreichen. Die Osmolarität der Ringerlösung betrug etwa 330 mOsm.

Anschließend wurde der Block mit der kaudalen Schnittfläche mit Hilfe eines kleinen Tropfens Zyanoacrylat-Kleber auf den Teflon-Stempel einer Vibratomkammer geklebt. Überflüssige Feuchtigkeit wurde mit einem Filterpapier zuvor von der Schnittfläche entfernt. Die Vibratomkammer wurde anschließend mit eiskaltem, begastem Ringer randvoll gefüllt.

Nun wurden koronale Hirnschnitte mit einer nominalen Dicke von 400 µm bei höchster Vibrationsfrequenz und sehr langsamen Vortrieb angefertigt. Die Schnitte wurden mit der stumpfen Seite einer Pasteur-Pipette in eine mit eiskaltem und begastem Ringer gefüllte Petrischale übertragen und dort durch einen Schnitt

durch das Korpus Kallosum in die beiden Hemisphären getrennt. Die so getrimmten Schnitte wurden umgehend auf dem Siebboden eines Vorratsbehälters platziert.

Der Vorratsbehälter bestand aus einem Teflonsieb, das in ein 500 ml Becherglas gehängt wurde. Unterhalb des Siebes befand sich ein Plastikschlauch mit feinsten Löchern, durch den kontinuierlich Karbogengas in die Ringerlösung perlen konnte. Dabei war darauf zu achten, dass die Gasbläschen möglichst fein austraten, um eine Verwirbelung der Schnitte zu verhindern. In einem Wasserbad wurde die Temperatur der Vorratslösung für etwa 60 Minuten auf etwa 33°C eingestellt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden vor jedem Versuch etwa eine Stunde in dem Vorrat belassen und konnten, bemessen an optischen und physiologischen Kriterien, 6 bis 8 Stunden ohne Verschlechterung aufbewahrt werden.

2.2. Lösungen

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (Ringer Stamm I)	NaCl	124 mM
	NaH ₂ PO ₄	1,25 mM
	MgCl ₂	1,8 mM
	CaCl ₂	1,6 mM
	KCl	3,0 mM
	D-Glucose	20-25,0 mM
künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (Ringer Stamm II)	NaHCO ₃	26,0 mM
Lösung für die Messung von Natrium- und Kalziumströmen	Cholin-Cl	110 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Na-HEPES	10 mM
	TTX	0,001 mM

Tab. 1 Extrazellulärlösungen (Alle Chemikalien von SIGMA, Deisenhofen, Deutschland)

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
KCl-Lösung (physiologische Lösung)	KCl	140,0 mM
	MgCl ₂	2,0 mM
	EGTA	10,0 mM
	K-HEPES	10,0 mM
	Na-ATP	2,0 mM
		pH 7,3 mit KOH 315 mOsm
TRIS-Lösung (ohne permeables Kation)	TRIS-PO ₄ (dibasisch)	110,0 mM
	TRIS	28,0 mM
	EGTA	11,0 mM
	MgCl ₂	2,0 mM
	CaCl ₂	0,5 mM
	Mg-ATP	4,0 mM
		pH 7,3 mit CsOH
Kaliumglukonat-Lösung (niedriger Chloridgehalt)	Kaliumglukonat	130,0 mM
	KCl	10,0 mM
	K-HEPES	10,0 mM
	EGTA	10,0 mM
	MgCl ₂	2,0 mM
	CaCl ₂	1,0 mM
	Mg-ATP	4,0 mM
	Na-GTP	0,5 mM
		pH 7,4 mit KOH

Tab. 2 Intrazellulärlösungen (Alle Chemikalien von SIGMA, Deisenhofen, Deutschland)

Die Intrazellulärlösungen wurden auf Eis angesetzt und der pH-Wert titriert. Die Osmolarität wurde anschließend auf 290 bis 300 mOsm eingestellt. Dann wurden die Lösungen in 2 ml-Portionen aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren. Etwa alle 2 Monate wurden die Lösungen neu angesetzt, um eine Degradation des ATPs und GTPs zu vermeiden. Alle intrazellulären Lösungen wurden am Versuchstag für ca. 30 s gevortext, kurz in ein Ultraschallbad getaucht und vor den Experimenten durch einen Spritzenfilter mit $0,2\ \mu\text{m}$ Porenweite (Nalgene Company, Rochester, New York, USA) filtriert, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen.

Während der Versuche wurden die Lösungen auf Eis gelagert, um einen enzymatischen Abbau des ATPs und GTPs zu verhindern bzw. zu verlangsamen. In einigen Experimenten wurde 1% des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer-Yellow (SIGMA, Deisenhofen, Deutschland) als Lithiumsalz hinzugefügt, um die untersuchten Zellen

mit Hilfe der Epifluoreszenzbeleuchtung sichtbar zu machen. In Versuchen zum Einfluss von Somatostatin auf die synaptische Übertragung im juvenilen Neokortex wurde eine Kaliumglukonatlösung verwendet, der zusätzlich 5 mM QX-314 zugesetzt war, um Natrium- und einige Kaliumleitfähigkeiten zu blockieren.

2.3. Der elektrophysiologische Versuchsaufbau

2.3.1. Die Messkammer

Die Messkammer war eine so genannte „submerged“-Kammer, d.h. der Hirnschnitt wurde vollständig von Ringerlösung um- und überspült. Sie bestand aus einem Deckgläschen, das unter einen Teflonring mit etwa 25 mm innerem Durchmesser geklebt wurde. Der Ring verbreiterte sich nach oben hin konisch auf etwa 35 mm Durchmesser. Die Kammer fasste bei einer durchschnittlichen Füllhöhe von 4 mm ein Volumen von etwa 0,5 ml und war auf einen in der X- und Y-Ebene manuell verstellbaren Mikroskoptisch befestigt, der mittels eines Peltierelements und einer Temperatursteuerung beliebig temperiert werden konnte (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland).

Die Kammer wurde durch Schwerkraftperfusion oder durch die Verwendung einer Schlauchpumpe (Minipuls3, Abimed Gilson, Villiers, Frankreich) mit einer Rate von etwa 1 bis 3 ml/Min Ringerlösung durchspült.

Der Hirnschnitt wurde durch einen U-förmigen Platindraht, über den im Abstand von etwa 1 mm feine Nylonfäden geklebt waren, am Boden der Kammer fixiert. Pharmaka wurden in der Regel über die Badlösung eingewaschen und erreichten eine stabile Konzentration, gemessen am Wirkungsmaximum, nach etwa 10 Minuten.

2.3.2. Die optischen Komponenten

Zur visuellen Identifikation einzelner Zellen diente ein aufrechtes Mikroskop, das mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit 40facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 0,75, sowie einer Differenz-Interferenz Kontrast (DIC) Optik ausgerüstet war (Zeiss Axioskop-FS, Zeiss, Jena, Deutschland).

In den Beleuchtungsgang konnte ein Infrarot-Bandpassfilter mit einem Frequenzgang von $750 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ (Oriol, Darmstadt) eingeführt werden, mit dessen Hilfe eine Identifikation auch in Tiefen von etwa $50 \mu\text{m}$ liegender Zellen des Hirnschnittes möglich war. Das Infrarot-DIC Bild wurde mit einer digitalen CCD-Kamera (HAMAMATSU C4505, HAMAMATSU Photonics K.K., Hamamatsu-City, Japan), die über eine Steuereinheit mit Kontrastverstärkung (Hamamatsu C2400-60) verfügte, auf einen Schwarzweißmonitor projiziert.

Für die permanente Sicherung und die Erstellung von Abbildungen konnte das Kamerabild entweder laufend auf einem Videorecorder (Mitsubishi HS-M23, Mitsubishi, Japan) aufgezeichnet werden, oder einzelne Bilder mit einer Framegrabber-Karte (Fast screen machine II, Fast Multimedia, München) per Personalcomputer erfasst und abgespeichert werden. Die Bilder wurden für Abbildungszwecke digital nachbearbeitet. Für Abbildungen verzweigter Zellen wurden Aufnahmen verschiedener fokaler Ebenen zu einem Bild montiert.

2.3.3. Elektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas-Rohlingen mit einem äußeren Durchmesser von $2,00 \text{ mm}$ und einem inneren Durchmesser von $1,16 \text{ mm}$, sowie einer Länge von 80 mm hergestellt (GB 200 8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland). Die Rohlinge wurden in ein Vertikal-Elektrodenziehgerät eingespannt (PP83, Narashige, Tokio, Japan) und in einem ersten Behandlungsschritt durch ein U-förmiges, glühendes Platinfilament um etwa 8 mm ausgezogen. In einem zweiten Schritt bei niedrigerer Temperatur wurde der Rohling zu zwei fertigen Pipetten verarbeitet. Der Spitzendurchmesser der Elektroden betrug etwa $1\text{-}2 \mu\text{m}$ und die Länge der konisch zulaufenden Spitze etwa $4 \text{ bis } 6 \text{ mm}$.

Die Spitzen der Elektroden wurden zum Befüllen kurz in ein mit Intrazellulärlösung gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß getaucht. Anschließend wurden die Elektroden durch die hintere Öffnung mit einer 1 ml Insulinspritze, der ein $0,2 \mu\text{m}$ -Filter und eine flexible dünne Kunststoffkanüle aufgesetzt war (MicroFil MF28G-5, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA), mit etwa $10 \mu\text{l}$ Intrazellulärlösung

befüllt. Eventuell in der Spitze verbliebene Luftblasen konnten gegen einen hellen Hintergrund sichtbar gemacht werden. Sie waren in der Regel durch leichtes Beklopfen der Elektrode mit den Fingerspitzen zu lösen, stiegen auf und entwichen zur hinteren Öffnung.

Die so hergestellten Elektroden hatten in Ringer-Lösung einen Widerstand von etwa 2 bis 8 M Ω . Je nach Zelltyp wurden Elektroden mit verschiedenen hohen Widerständen verwendet. Für Ableitungen von kleinen Zellen wurden hochohmige Elektroden verwendet, während größere Neurone auch die Verwendung einer niederohmigen Elektrode zuließen.

2.3.4. Die elektronischen Komponenten

Die verwendete Verstärkungselektronik setzte sich zusammen aus dem Patch-Clamp Verstärker EPC-7 (List-electronic, Darmstadt, Deutschland) und einem Vorverstärker, der je nach Verstärkungsfaktor einen Widerstand von 500 M Ω oder 50 G Ω hatte.

Die Ausgänge für die Strom- bzw. Spannungsregistrierung wurden mit BNC-Kabeln an selbstgebaute Zwischenverstärker mit integrierten Filtern weitergegeben. Von dort gelangten die Signale zum einen an ein Digitaloszilloskop (Tektronix TDS 210, DataTec, Reutlingen, Deutschland), zum anderen an einen Analog-/Digitalwandler (Instrutech ITC-16, HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland). Der A/D-Wandler war durch eine AT-16-Steckkarte direkt mit einem Pentium-kompatiblen Personalcomputer (Silber, Düsseldorf) verbunden.

Auf diese Weise war es möglich, mit der Software Wintida (Version 4.01 (HEKA elektronik, Lambrecht, Deutschland)) Kommandosignale an den Stimulus-Eingang des Patch-Clamp-Verstärkers anzulegen, Triggersignale für alle Geräte zu erzeugen und Messdaten permanent zu registrieren.

Für die Auslösung synaptischer Netzwerkaktivität konnte eine selbstgebaute Reiz-Isolationseinheit mit 50 bis 200 μ s langen Pulsen getriggert werden. Die Stimulation erfolgte mit selbstgebaute bipolaren Wolframelektroden, die in Thetaglas-

Kapillaren geklebt wurden. Der Spitzenabstand betrug etwa 0,5 bis 1,0 mm, der Widerstand je Draht 2-5 M Ω .

Zur permanenten Sicherung konnten alle Daten auf einen Netzwerkserver transferiert und von dort auf Streamer-Bänder oder auf Compact-Disks gespeichert werden.

2.3.5. Die mechanischen Komponenten

Der Patch-Clamp Vorverstärker mit dem Pipettenhalter war in einem Winkel von etwa 20 Grad auf einem elektrischen Mikromanipulator montiert (mini25, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland). Dieser erlaubte die ferngesteuerte Einstellung aller drei Achsen. Mit der gleichen Steuereinheit war es auch möglich, die Höhe n-achse des Mikroskops aus der Ferne zu bedienen.

Neben der ergonomischeren Arbeitsweise erlaubte die Fernsteuerung sehr stabile Ableitungen über mehrere Stunden. Manipulatoren für die Ableitkammer und die Reizelektroden konnten manuell bedient werden. Alle optischen und mechanischen Komponenten waren auf einer 3 cm dicken Aluminiumplatte fest verschraubt. Diese Platte stand auf einem pneumatisch gedämpften Schwingungstisch (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einer 10 cm dicken Granitplatte und automatischer Niveauregulierung. Der gesamte Aufbau wurde durch einen selbstgebauten Faraday'schen Käfig vor elektromagnetischen Störeinflüssen weitgehend abgeschirmt.

2.4. Visuelle Klassifikationskriterien

Cajal-Retzius Neurone waren in Kortex neugeborener Ratten sehr leicht durch ihre tangential orientierten, spindel- bis karottenförmigen Somata in der *Marginalzone* zu identifizieren. Die Zellkörper lagen etwa 50 bis 100 µm unter der pialen Oberfläche des Neokortex. Von den Somata ausgehend, ließen sich in der Regel zwei horizontale dendritische Ausläufer über mehrere hundert Mikrometer verfolgen. Dabei verjüngte sich der spitze Pol des Zellkörpers zu einem dickeren Fortsatz, während ein dünnerer, häufig mit Varikositäten besetzter Fortsatz vom stumpfen Pol entsprang.

Die unreifen Pyramidenzellen waren durch ihre sehr einfache Morphologie zu identifizieren. Die vertikal orientierten Zellen besaßen kugel- bis kegelförmige Somata, deren apikaler Pol in einen unverzweigten Dendriten mündete. Dieser konnte entweder gerade sein korkenzieherartig gewunden sein. Lucifer-Yellow markierte Zellen zeigten entweder kein oder nur ein sehr kurzes Axon, das senkrecht vom basalen Pol des Zellkörpers entsprang. Dieser Zelltyp war in der gesamten *kortikalen Platte* zu finden.

Verzweigte Pyramidenzellen hatten ein mehr oder weniger kegelförmigen Zellkörper, von dem ein apikaler und häufig ebenfalls ein basaler dendritischer Fortsatz entsprang. Die Dendriten waren stets mehr oder weniger stark verzweigt. Im Fluoreszenzbild sah man teilweise Fortsätze, die entweder am Soma oder am basalen Dendriten entsprangen und möglicherweise Axone waren.

Die *Subplattenneurone* stellten eine heterogen Population von Nervenzellen dar, die durch ihre Lage, nicht aber durch die Morphologie identifiziert wurden. Die Zellkörper lagen zwischen der weißen Substanz und der *kortikalen Platte* und waren rund, spindel- oder auch kegelförmig. Zwei oder mehrere dendritische Ausläufer gingen vom Zellkörper ab. Häufig waren diese Fortsätze horizontal orientiert. Im Fluoreszenzbild sah man verzweigte Axone, deren Verlauf und Ursprung aber stark variierte.

2.5. Die Vorgehensweise beim Ableiten von identifizierten Zellen

Die Elektrodenhalter waren aus Teflon und Acrylglas gefertigt und mit einer Anschlussmöglichkeit für eine externe Über- bzw. Unterdruckapplikation versehen. Für jeden Versuch wurden frisch hergestellte Elektroden verwendet. Ein an den Elektrodenhalter geflanschter Schlauch ermöglichte es, einen konstanten Überdruck von etwa 50 mbar anzulegen. Nach dem Einspannen wurde die Spitze der Elektrode unter dem 40x Objektiv in die Mitte des Blickfeldes gebracht und senkrecht in die Badlösung gefahren. Der EPC-7 Verstärker wurde in den "search"-Modus geschaltet, in dem der durch die Pipette fließende Strom auf dem Wert 0 gehalten wurde.

Zwischen der Pipette und der Badelektrode vorhandene Potenzialunterschiede konnten mit einem Offsetregler abgeglichen werden. Mit Hilfe des Aufnahmeprogramms wurden dann kontinuierlich Spannungssprünge von 1 mV Amplitude und 10 ms Dauer an die Pipette angelegt und der resultierende Stromfluss am Oszilloskop gemessen. Nach dem Ohmschen Gesetz wurde dann der Elektrodenwiderstand R_{pip} ermittelt. Es wurden nur Elektroden verwendet, die einen Widerstand zwischen 2 und 10 M Ω hatten. Ein zu geringer Widerstand (entsprechend einer großen Pipettenöffnung) bereitet Schwierigkeiten beim Erreichen eines möglichst großen Abdichtewiderstandes (engl. "Gigaseal") zwischen Zellmembran und Glasrand. Ein sehr großer Widerstand (entsprechend einer kleinen Pipettenöffnung) dagegen wirkt sich ungünstig auf die späteren Ableitungen aus.

Die Pipette wurde nun langsam unter Sichtkontrolle am Videomonitor bis kurz über die Oberfläche des Schnittes abgesenkt. Dann wurde die Fokusebene des Mikroskops so gewählt, dass mit dem X,Y-Mikroskoptisch eine gewünschte Zelle in den Blickfeld-Mittelpunkt positioniert werden konnte.

Im Folgenden wurde die Pipette vorsichtig auf die Membran des Zellkörpers abgesenkt, bis diese deutlich durch ausströmende Pipettenlösung eingedellt wurde. Bei diesem Vorgang erschien die Zellmembran unter der Pipettenspitze weißlich. Dann wurde der Überdruck von der Pipette abgelassen und die Membran legte sich an

die Öffnung der Glaselektrode. Die Amplitude des Rechteckstromes nahm dabei schlagartig ab. Durch einen leichten Unterdruck an der Pipette, der durch leichtes Saugen an dem angeflanschten Schlauch erzeugt wurde, erhöhte sich der Abdichtwiderstand zwischen der Elektrode und der Membran bis in den Bereich von einem Gigaohm. In der englischen Terminologie wird dieser Zustand als "Gigaseal" bezeichnet. Am Oszilloskop war nun nur noch eine glatte Linie mit kapazitiven Transienten zu Beginn und zum Ende des 10 ms Rechtecksignals zu sehen. Diese Transienten konnten nun mit dem Regler für die schnelle Kapazitätskompensation abgeglichen werden.

Der Verstärker wurde auf den Spannungsklemm-Modus umgeschaltet und ein Komandopotenzial von -60 mV angelegt. Durch sehr vorsichtiges Saugen (unter ständiger Beobachtung des Oszilloskop-Bildes) gelang es nun, ein Loch in die Zellmembran zu reißen und einen elektrischen Zugang zum Zytoplasma zu erhalten. Dieses machte sich durch das schlagartige Auftreten kapazitiver Transienten bemerkbar. Deren Amplitude ließ die Ermittlung des Serienwiderstandes R_S zu, der dem Widerstand zwischen der Elektrode und dem Zellinneren entspricht. Für eine möglichst unverfälschte Membranpotenzial-Bestimmung wurde nun schnellstmöglich in den Stromklemm-Modus umgeschaltet und der entsprechende Wert am Verstärker abgelesen und notiert. Dann wurde, wiederum in der Spannungsklemme, versucht, die kapazitiven Transienten durch die Kompensationsregler am Verstärker zu minimieren.

Nach der Kapazitätskompensation wurde der Serienwiderstand durch den entsprechenden Kompensationsregler so weit kompensiert, dass gerade keine unerwünschten Oszillationen auftraten. Anschließend konnte mit den Versuchen begonnen werden.

2.5.1. Die Bestimmung der Membraneigenschaften

Mit Hilfe der Infrarot-Videomikroskopie konnten individuelle Neurone aufgrund ihrer Lage und Morphologie unterschieden werden. Für die weitere Charakterisierung wurde zunächst versucht, den morphologisch definierten Zelltypen bestimmte Entladungsmuster zuzuordnen. Dazu wurden die Zellen von einem Membranpotential in der Nähe des Ruhepotenzials (-60 bis -75 mV) durch zunehmende depolarisierende Strominjektionen in 10 pA Schritten überschwellig depolarisiert. Die Rheobaseströme lagen in der Regel zwischen -20 und -30 pA. Die Entladungsmuster wurden nach der Anzahl der Aktionspotenziale (APs) pro Sekunde in stark adaptierend-phasische (1 AP/s), nicht adaptierend-tonische (4 bis 10 APs/s) und hochfrequent-tonische (>10 APs/s) Entladungstypen eingeteilt.

Diese Ableitungen dienten ebenfalls der Bestimmung der Aktionspotenzialkinetik. Dazu wurde jeweils das initiale Aktionspotenzial einer Entladungsserie analysiert. Anschließend wurden die wesentlichen intrinsischen Parameter der Neurone, wie Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand, Membranzeitkonstante und Membranpotential, bestimmt. Diese Parameter wurden durch die Antworten auf geringe Hyperpolarisationen (<10 mV) ausgehend vom Ruhemembranpotential der Zelle im Stromklemm-Modus bestimmt. Mit diesem Protokoll konnte die Aktivierung von Ionenströmen, welche die passiven Parameter Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante verzerren würden, vermieden werden. Das Ruhemembranpotential wurde direkt nach dem Durchbruch in den Ganzzell-Modus bestimmt, bevor durch die Vermischung des Zytoplasmas mit der Elektrodenlösung der Wert zu stark modifiziert werden konnte. Der Eingangswiderstand wurde nach dem Ohmschen Gesetz ermittelt, indem das Membranpotential in der Plateauphase der induzierten Hyperpolarisation bestimmt und anschließend durch die Amplitude des injizierten Stroms dividiert wurde. Die Membranzeitkonstanten wurden durch eine nichtlineare Regression während der kapazitiven Umladephase der Ableitungen ermittelt.

Die Membrankapazität wurde in der Spannungsklemme bestimmt. Hier wurde nach dem Durchbruch in den Ganzzell-Modus die Fläche unter den unkompensierten Kapazitätstransienten integriert, die durch kleine hyperpolarisierende Spannungs-

sprünge bei -60 mV Haltepotenzial evoziert wurden. Dieser Wert gibt die Zahl der Ladungsträger an, die für die schnelle Umladung der Zellmembran notwendig sind. Da biologische Membranen einheitlich dick sind, gilt die Faustregel, dass 100 μm^2 Membranfläche 1 pF Ladungen aufnehmen kann. Durch eine einfache Dreisatzberechnung kann so die Membranfläche kalkuliert werden.

Aktive Membraneigenschaften, spezifische Ionenströme oder die synaptische Transmission wurden stets mit spezifischen Stimulusprotokollen und Ableitanordnungen untersucht, welche der Übersicht wegen im Ergebnissteil an den entsprechenden Stellen genauer dargestellt und erläutert werden.

2.6. Die Statistik

Bei allen elektrophysiologischen Untersuchungen (abgesehen vom Membranpotenzial) wurden 2 bis 10 Messungen wiederholt und gemittelt, um Fehler durch zufällige Fluktuationen zu vermeiden.

Alle in dieser Arbeit untersuchten metrischen Messparameter entstammen dem rationalskalierten Zahlenniveau. Daher konnten für die statistische Analyse der Daten parametrische Prüfverfahren herangezogen werden. Alle Resultate wurden mit Methoden der deskriptiven Statistik (Nennung absoluter Häufigkeiten, Mittelwerte, Standardabweichungen oder Standardfehler) und schließenden Statistik (Nennung statistisch signifikanter Effekte von Pharmaka oder Gruppenunterschieden) beschrieben. Der Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit α betrug in allen statistischen Berechnungen dieser Arbeit 0,05, sofern kein anderer Wert angegeben wird. Für die Auswertung verbundener Stichproben wurde der Zweistichproben T-Test für verbundene Stichproben verwendet. Bei unverbundenen Stichproben wurde beim Vergleich zweier Gruppen der T-Test für unverbundene Stichproben oder beim Vergleich mehrerer Stichproben die einfaktorielle Varianzanalyse verwendet. Alle Abbildungen statistischer Daten in dieser Arbeit zeigen Mittelwerte mit dem dazugehörigen **Standard Error of Mean (SEM)**. In Fällen, in denen der Mittelwert mit der Standardabweichung gezeigt wird, wird dieses erwähnt.

3. Resultate

3.1. Identifikation neokortikaler Neurone nach visuellen Kriterien

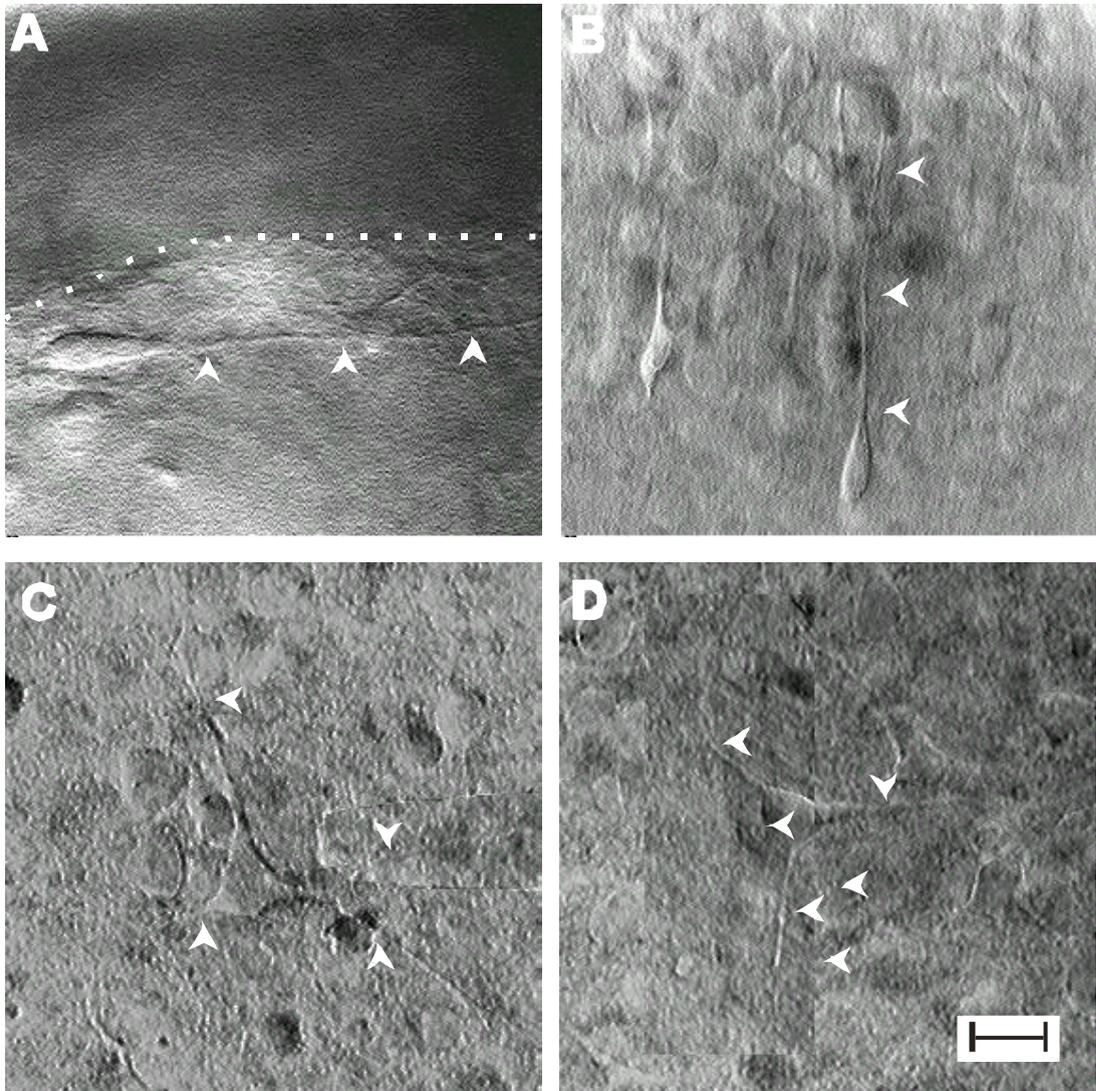


Abb. 2 Differenz-Interferenz Kontrast (DIC) Bilder der vier Zelltypen. Das Bild wurde auf einem s/w-Monitor dargestellt, mit einer Framegrabber Karte digitalisiert und gespeichert. Diese Technik erlaubte es, post hoc Bilder verschiedener Fokusebenen digital zu einem Bild zu montieren. In A ist eine P3 *Cajal-Retzius* (CR) Zelle dargestellt, die sich durch die horizontale Orientierung des Dendriten in der *Marginalzone* auszeichnet. Die gestrichelte Linie gibt die piale Oberfläche wieder. In B ist eine unverzweigte Pyramidenzelle (P1) (UP) der *kortikalen Platte* dargestellt, die durch noch nicht vorhandene Ramifizierung des apikalen Dendriten und dessen vertikale Orientierung gekennzeichnet ist. C zeigt eine verzweigte Pyramidenzelle (P1) der tiefen *kortikalen Platte* und D einen Vertreter der sehr heterogenen *Subplattenneurone* in der *Subplatte* (P1) mit invertierter Orientierung. Der Maßstab in D entspricht 10 Mikrometern, die Pfeile markieren Dendriten.

3.1.1. Das Differenz-Interferenz Kontrastbild unter Infrarotbeleuchtung

Mit Hilfe der Infrarot-Videomikroskopie konnten in neokortikalen Hirnschnitten neugeborener Ratten vier Zelltypen nach zytoarchitektonischen Kriterien eindeutig erkannt werden.

Cajal-Retzius Neurone, unreife Pyramidenzellen, *verzweigte Pyramidenzellen* und *Subplattenneurone* waren aufgrund ihrer Lage, Orientierung der Neuriten und Morphologie gut zu unterscheiden. In Abb. 2 sind für jeden Zelltyp typische Differenz-Interferenzkontrast Aufnahmen wiedergegeben.

Cajal-Retzius Neurone waren stets 50-100 µm unterhalb der pialen Oberfläche in der *Marginalzone* zu finden. Die Somata hatten eine kegel- oder spindelförmige Gestalt, von dessen einen Pol ein horizontal orientierter, weitreichender Dendrit abging (Abb. 2A).

Unverzweigte Pyramidenzellen waren in der gesamten *kortikalen Platte* zu finden. Ihre Dichte nahm innerhalb der untersuchten Altersgruppe von P0 bis P4 rapide ab. Sie hatten eine einfache Morphologie mit tropfenförmigen Somata und einem langen apikalen Dendriten, der im DIC-Bild keine weiteren Verzweigungen zeigte (Abb. 2B).

Im Gegensatz dazu hatten *verzweigte Pyramidenzellen* mehrere Neuriten, die von einem mehr oder weniger pyramidenförmigen Soma abgingen. Diese Zellen waren stets in der tiefen *kortikalen Platte* bzw. der entstehenden Schicht VI, aber auch in der *Subplatte* zu finden (Abb. 2C).

Subplattenneurone schließlich befanden sich in einer Bande zwischen der weißen Substanz und der *kortikalen Platte*. In dieser Schicht waren stets sehr unterschiedlich gebaute und orientierte Neurone mit großen Somata und starker Ramifizierung zu finden. In Abb. 2D ist ein Vertreter gezeigt, der sich durch eine invertierte Orientierung seiner Neuriten in Richtung weißer Substanz auszeichnete.

3.1.2. Lucifer-Yellow (LY) markiert Zellen im Epifluoreszenzbild

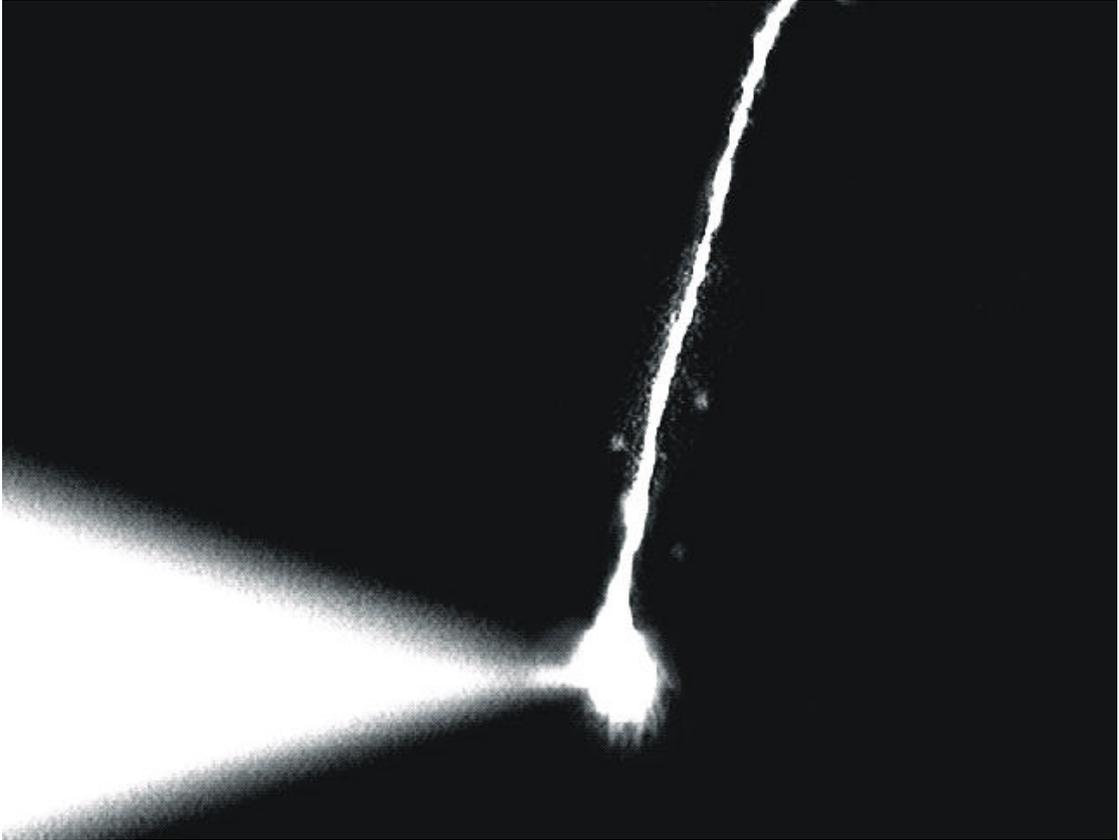


Abb. 3 Darstellung einer unverzweigten Pyramidenzelle (P2) der *kortikalen Platte*, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff „lucifer yellow“ (LY) gefüllt wurde. Links im Bild ist die Elektrode zu erkennen, die am Soma positioniert wurde. Deutlich ist die angesaugte Membran in der Elektrodenspitze zu erkennen. Die Skalierung entspricht 10 Mikrometern.

In einigen Experimenten wurde zur genaueren Identifizierung der Neurone der Fluoreszenzfarbstoff „Lucifer yellow“ (LY) zu der Pipettenlösung gegeben. Nach einigen Minuten konnten die Zellen dann mit der Epifluoreszenzeinrichtung des Mikroskopes sichtbar gemacht werden. So war es möglich, Axone und weit distale Ramifizierungen zu erkennen.

In Abb. 3 ist das Soma und ein Teil des apikalen Dendriten einer unverzweigten Pyramidenzelle der *kortikalen Platte* gezeigt, die während der Ableitung mit LY gefüllt wurde.

3.2. Die intrinsischen Eigenschaften früh postnataler Neurone des Neokortex

3.2.1. Cajal-Retzius Neurone

Nach visueller Identifizierung wurden *Cajal-Retzius* Neurone durch überschwellige

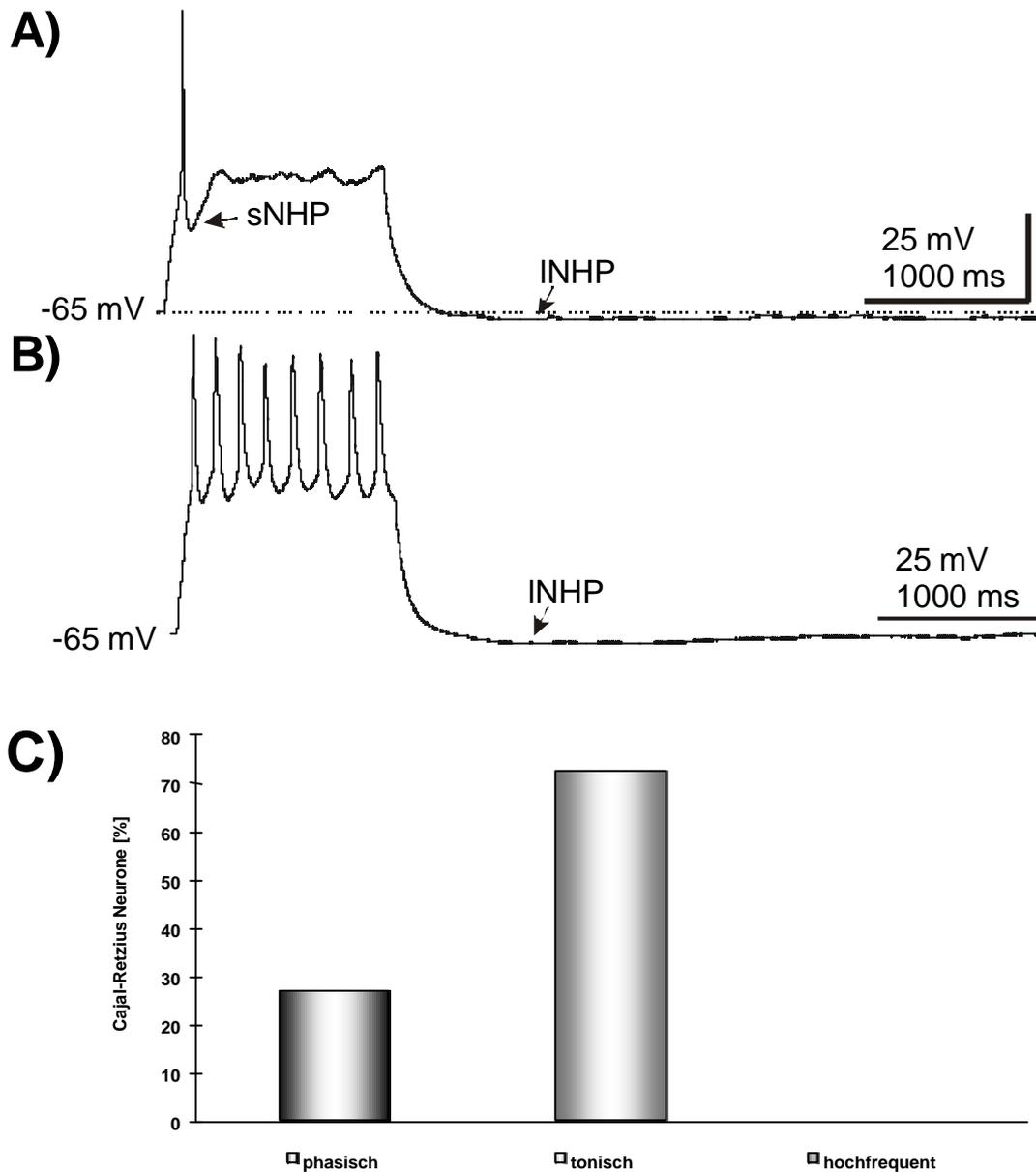


Abb. 4 Depolarisierende 23 pA Strominjektionen (1s) in der Stromklemme führten in Neuronen der *Marginalzone* zu einzelnen Aktionspotentialen (A) oder zu tonischen, nicht adaptierenden Serien von Entladungen (B). (C) Prozentuale Verteilung der Entladungsmuster.

Depolarisationen zur Generierung von Aktionspotenzialen angeregt (Abb. 4). Dieser Zelltyp konnte durch seine horizontale Orientierung in der sonst sehr zellarmen *Marginalzone* ausgemacht werden. Axone, die durch Lucifer-Yellow in-situ dargestellt wurden, verliefen in der Regel innerhalb der *Marginalzone* und bildeten zahlreiche Kollateralen.

Charakteristisch für diesen Zelltypen sind nicht adaptierende Entladungsmuster nach langanhaltender überschwelliger Depolarisation. Überschwellige Strominjektionen führten in 27% aller CR Neurone zu stark adaptierenden langsamen Aktionspotenzialen (phasischer Entladungstyp) (Abb. 4A+C). In den übrigen 73% der CR Neurone traten nicht adaptierende Entladungsmuster auf (phasischer Entladungstyp) (Abb. 4B+C).

Alle Aktionspotenziale konnten bei beiden Entladungstypen durch die Applikation von 1 μM Tetrodotoxin reversibel blockiert werden, wodurch die Annahme bestätigt wurde, dass die Aktionspotenziale auf dem schnellen Einstrom von Natriumionen beruhen.

Die Aktionspotenziale wurden beim schnellen Entladungstyp stets von schnellen Nachhyperpolarisationen (sNHP) gefolgt (vgl. Pfeil in Abb. 4A), während alle CR Neurone eine langsame Nachhyperpolarisation (INHP) nach Beendigung einschüßiger überschwelliger Depolarisation zeigten (vgl. Pfeil in Abb. 4A +B).

Das initiale Aktionspotenzial beider Entladungstypen wurde von einer hohen Anstiegsgeschwindigkeit und einer relativ langsamen Abfallsgeschwindigkeit geprägt (Abb. 5A +B auf der folgenden Seite). Es bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Kinetik der einzelnen Aktionspotenziale, weshalb die Daten der initialen Aktionspotenziale im Folgenden zusammen ausgewertet wurden. Die mittlere Anstiegsgeschwindigkeit der Aktionspotenziale betrug $14,7 \text{ V/s} \pm 3,7$ ($n=11$), die mittlere Abfallsgeschwindigkeit $5,2 \pm 0,9 \text{ V/s}$ ($n=11$).

Beim tonischen Entladungstypus nahmen unmittelbar nach dem initialen AP sowohl die Anstiegs- und die Abfallsgeschwindigkeiten, als auch die Amplituden der APs auf konstante Werte ab (Abb. 5B).

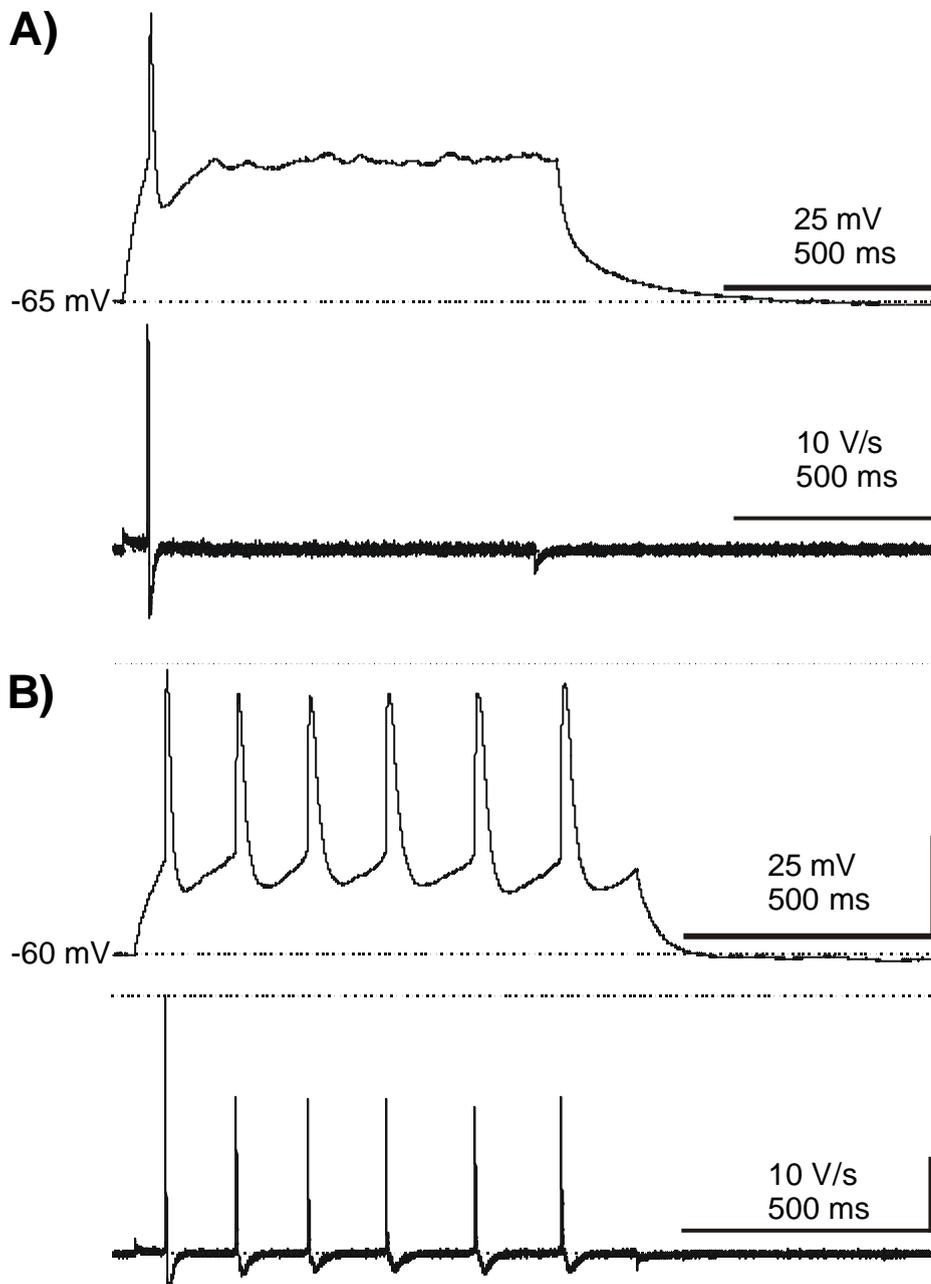


Abb. 5 Phasische Entladung einer P1 CR Zelle (A) und tonische Entladung einer P1 CR Zelle (B) nach 29 pA Strominjektionen von einer Sekunde Dauer. Die Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten der Aktionspotenziale wurden durch die Bildung der 1. Ableitung der Aufnahmen in (A) und (B) ermittelt und sind jeweils in der unteren Spur dargestellt.

Die Frequenz der Entladungen konnte beim tonischen Entladungstypus durch stärkere Strominjektionen erhöht werden (Abb. 6A). Es ist zu sehen, dass zunehmend depolarisierende Stromstärken die Entladungsfrequenz der CR Neurone leicht erhöhten. Dieser Zusammenhang war im getesteten Bereich in etwa linear. Abhängig von der Stärke der Strominjektion traten bei vier von sieben CR Neurone Aktionspotenziale auch nach Beendigung der hyperpolarisierenden Strominjektionen auf.

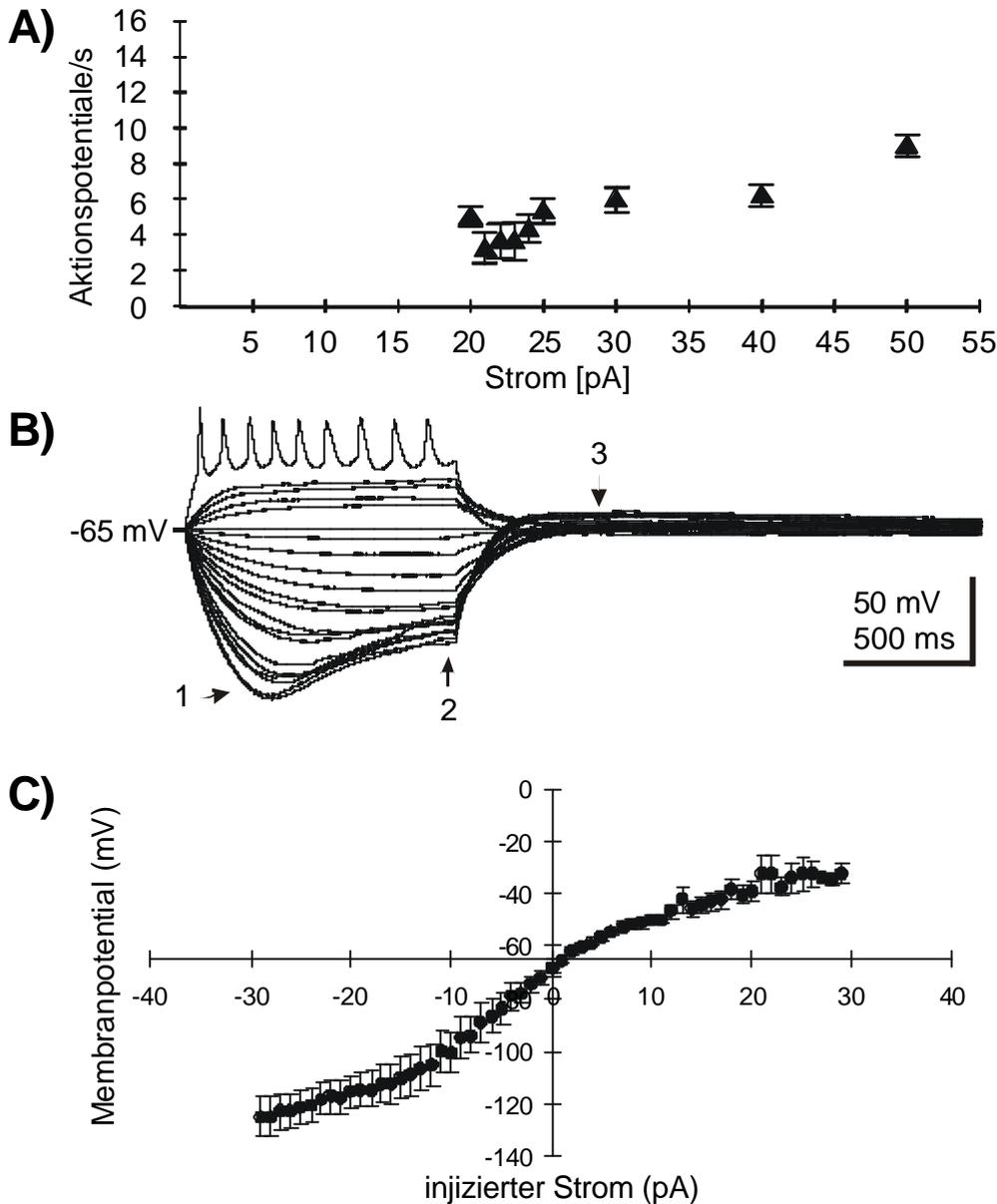


Abb. 6 (A) Lineare Abhängigkeit der Entladungsfrequenz von der injizierten Stromstärke. (B) De- und hyperpolarisierende Strominjektionen verschiedener Amplitude wurden für die Bestimmung der Strom-Spannungsbeziehung neokortikaler Neurone benutzt. Hier ist die Reaktion einer P1 CR Zelle gezeigt, die in der Stromklemme bei -65 mV gehalten wurde. (C) Die gemittelte Strom-Spannungsbeziehung von fünf CR Neuronen. Die Spannungen wurden im Bereich des Pfeiles 2 in Abb. 6B ermittelt.

Die Strom-Spannungsbeziehung von CR Neuronen ist im Membranpotenzial-Bereich von etwa -55 mV bis -100 mV linear (Abb. 6C). Starke Membranhyperpolarisationen führten in den CR Neuronen ab etwa -100 mV zu einer charakteristischen Einwärtsgleichrichtung (Pfeil 1 in Abb. 6B). Weiterhin fällt die nach Beendi-

gung der Hyperpolarisation auftretende langanhaltende Depolarisation auf (Pfeil 3). Das Membranpotenzial der CR Neurone lag im Mittel bei $-45,2 \pm 2,4$ mV (n=11), der mittlere Eingangswiderstand betrug 1330 ± 230 M Ω (n=10). Von allen untersuchten Zelltypen zeigten *Cajal-Retzius* Neurone die längste Membranzeitkonstante von $75,9 \pm 11,4$ ms (n=10). Die mittlere Membranfläche betrug 2616 ± 361 μm^2 (n=13). Die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotenzials lag im Mittel bei $-31,5 \pm 2,5$ mV (n=10) und die mittlere Amplitude betrug $79,4 \pm 5,2$ mV (n=10). Die Breite der Aktionspotenziale betrug an der Basis im Schnitt $16,8 \pm 2,4$ ms (n=10). Im Mittel betrug die höchste Anstiegsgeschwindigkeit $14,7 \pm 3,7$ V/s (n=11) und die höchste Abfallsgeschwindigkeit $5,2 \pm 0,9$ V/s (n=11). Daraus resultiert ein Verhältnis von Anstiegsgeschwindigkeit zu Abfallsgeschwindigkeit von $2,6 \pm 0,2$ (n=11). Diese Resultate sind in Tab. 3 zusammengefasst.

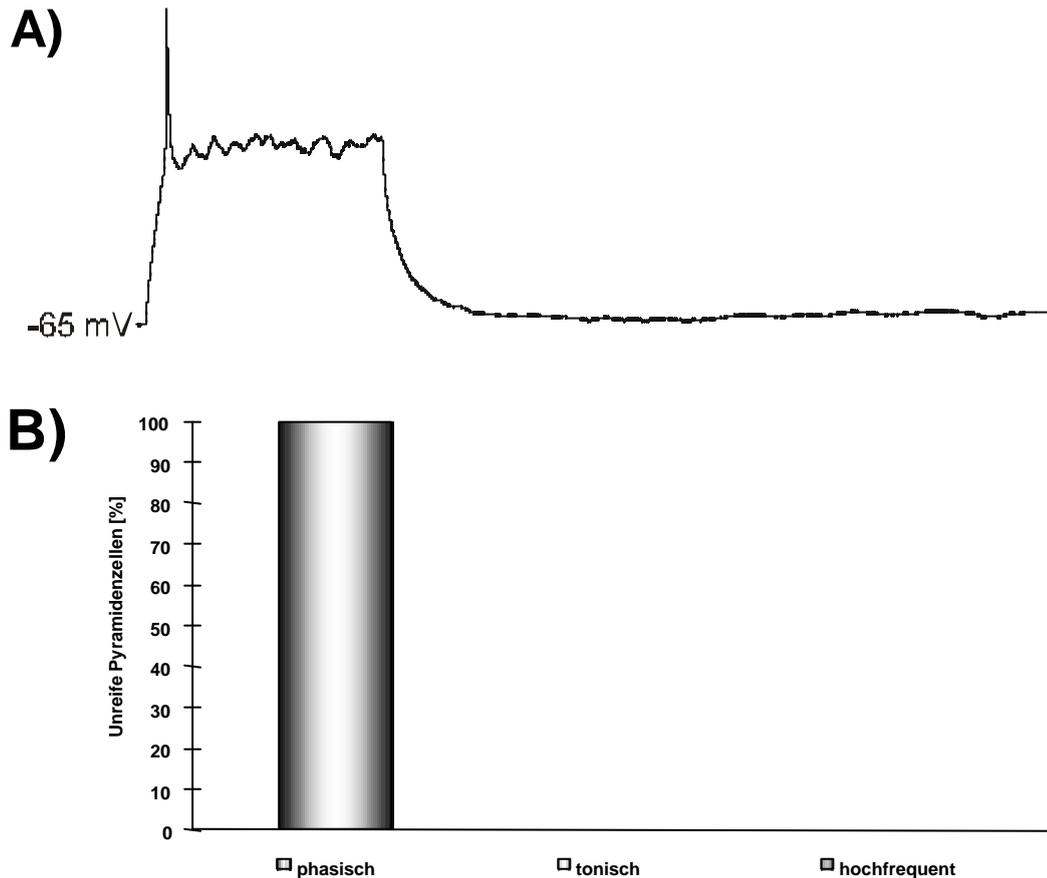
Parameter	Subparameter	Mittelwert	Standardfehler	N
Entladungsmuster	tonisch	73%		11
	phasisch	27%		11
passive Eigenschaften	Membranoberfläche [μm^2]	2616	361	13
	Membranzeitkonstante [ms]	75,9	11,4	10
	Eingangswiderstand [M Ω]	1330	230	10
	Membranruhepotenzial [mV]	-45,2	2,4	11
Aktionspotenzial-Kinetik	Schwelle [mV]	-31,5	2,5	10
	Amplitude [mV]	79,4	5,2	10
	Dauer (Basis) [ms]	16,8	2,4	10
	Anstiegsgeschwindigkeit [V/s]	14,7	3,7	11
	Abfallsgeschwindigkeit [V/s]	5,2	0,9	11
	Verhältnis Anstieg/Abfall	2,6	0,2	11

Tab. 3 Zusammenfassung der intrinsischen Eigenschaften von P0-P4 *Cajal-Retzius* Neuronen der *Marginalzone*

3.2.2 Unverzweigte Pyramidenzellen

Unverzweigte Pyramidenzellen (UP Zellen) sind durch ihre Lage in der *kortikalen Platte* und ihre „tropfenförmige“ Morphologie definiert. Mit Lucifer-Yellow gefüllte Zellen hatten kein oder nur ein kurzes, unverzweigtes Axon.

Abb. 7 (A) Unreife Pyramidenzellen reagierten auf depolarisierende Strominjektionen mit der



Generierung einzelner Aktionspotenziale. Hier ist ein Aktionspotenzial als Folge einer 15 pA Strominjektion in eine unreife Pyramidenzelle, die bei -65 mV gehalten wurde zu sehen. Die Zelle entstammte der oberen *kortikalen Platte* einer P0 Ratte. (B) Alle 11 getesteten unreifen Pyramidenzellen reagierten auf depolarisierende Strominjektionen lediglich mit einzelnen Aktionspotenzialen.

Überschwellige depolarisierende Strominjektionen führten in diesen Zellen stets zu stark adaptierendem Entladungsverhalten (Abb. 7A). Diese Neurone gehören also ausschließlich zu dem phasischen Antworttyp. Auch stärkere Strominjektionen konnten bei diesem Zelltyp keine weiteren Aktionspotenziale auslösen (Abb. 7B).

Unverzweigte Pyramidenzellen generierten bei überschwelliger Depolarisation jedoch in der Regel sehr charakteristische langsame Aktionspotenziale, die durch TTX blockierbar waren (Abb. 8).

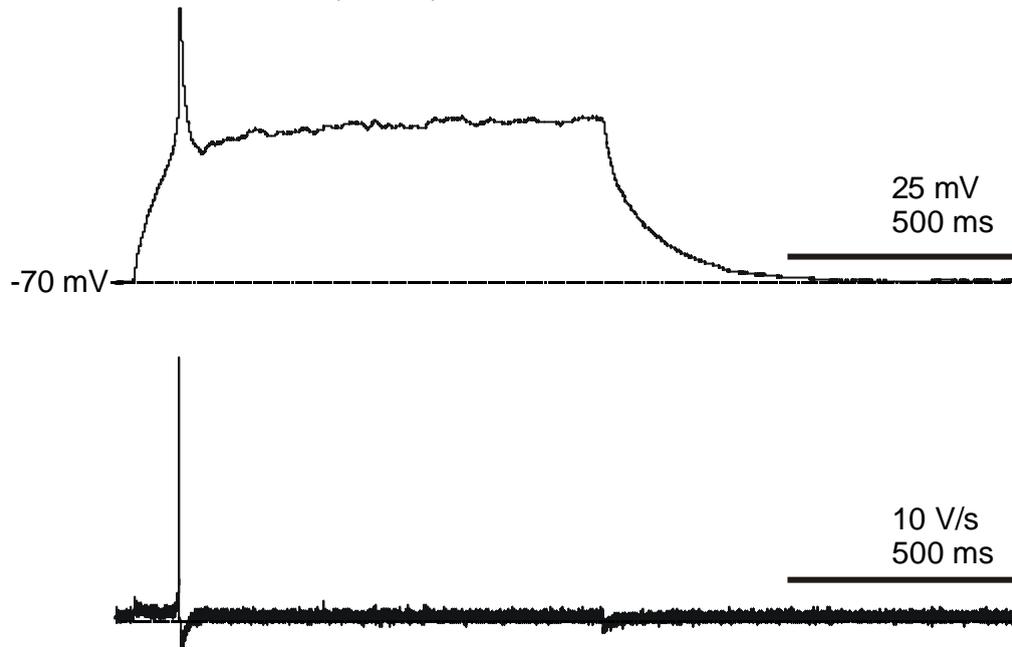


Abb. 8 Phasische Entladung einer UP Zelle (P0) nach 15 pA Strominjektionen von einer Sekunde Dauer. Die Anstiegs- und Abfallsgeschwindigkeiten des Aktionspotenzials wurde durch die Bildung der 1. Ableitung der oben dargestellten Spur ermittelt und ist in der unteren Abbildung dargestellt.

Die 1. Ableitung der Spur in Abb. 8 zeigt, dass der Anstieg und Abfall der Aktionspotenzialflanken vergleichsweise niedrige Maximalgeschwindigkeiten erreicht. Die mittlere Anstiegsgeschwindigkeit von Aktionspotenzialen in UP Zellen betrug $13,6 \pm 2,6$ V/s ($n=11$), die mittlere Abfallsgeschwindigkeit betrug $3,9 \pm 0,7$ V/s ($n=11$).

Insbesondere die Abfallsgeschwindigkeit ist im Verhältnis zu den anderen Zelltypen dieser Studie sehr niedrig, was durch eine langsamere Kinetik der Repolarisationsmechanismen zu erklären ist und somit zu einer relativ langen Depolarisationsphase führt.

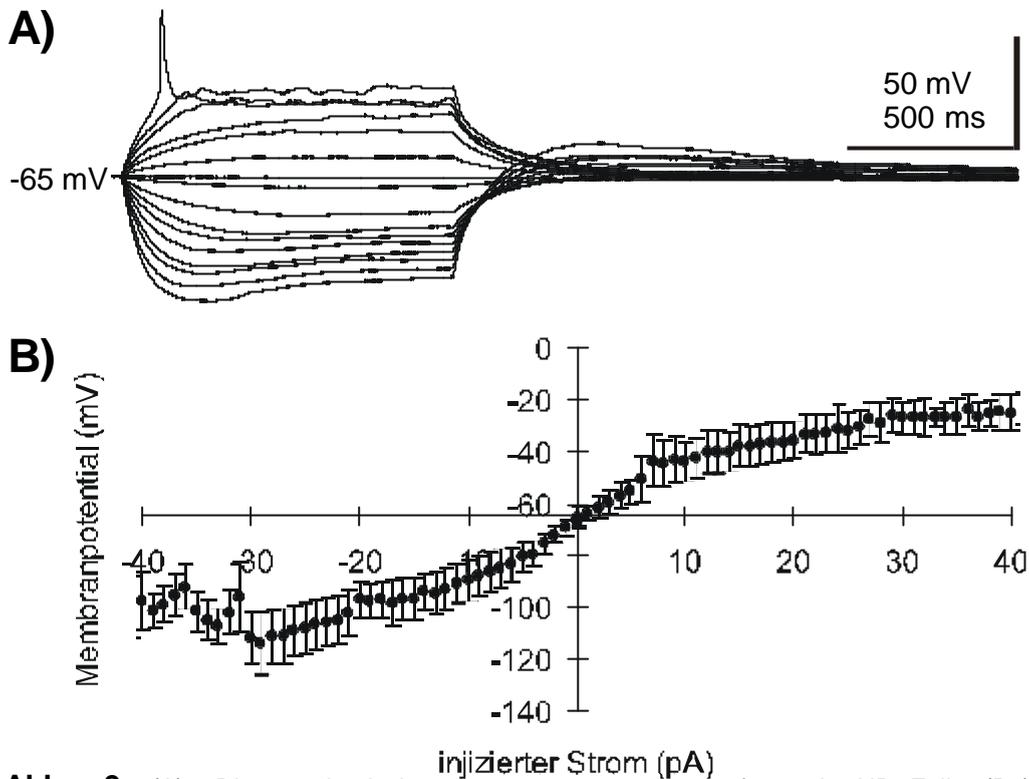


Abb. 9 (A) Diese phasisch feuernde UP Zelle (P0) reagierte auf zunehmende depolarisierende Strominjektionen bei einem Haltepotential von -65 mV mit der Generierung eines Aktionspotenzials. (B). Hier ist die gemittelte Strom-Spannungsbeziehung von UP Zellen dargestellt. Die Spannungswerte wurden gegen Ende der Plateauphase in (A) ermittelt und gegen die injizierte Stromstärke aufgetragen.

Die Strom-Spannungsbeziehung von UP Zellen wurde am Ende der einsekündigen Strominjektion ermittelt. Die daraus resultierende gemittelte I-U Kurve ist in Abb. 9B dargestellt. Die I-U-Beziehung ist im Membranpotential-Bereich von etwa -40 mV bis -80 mV linear.

Eine zusammenfassende Darstellung der intrinsischen Parameter der UP Zellen ist in Tabelle 4 auf der folgenden Seite dargestellt. Das Membranpotential dieses Zelltyps lag im Mittel bei $-44,1 \pm 3,3$ mV ($n=14$) und der mittlere Eingangswiderstand betrug 1829 ± 358 M Ω ($n=11$). Von allen untersuchten Zelltypen zeigten UP Zellen damit den höchsten Eingangswiderstand. Die Membranzeitkonstante der UP Zellen betrug gemittelt $52,5 \pm 10,0$ ms ($n=8$).

Die mittlere Membranfläche betrug $1574 \pm 210 \mu\text{m}^2$ ($n=11$), womit diese Neurone die kleinste Membranoberfläche aller untersuchten Neurone hatten.

Parameter	Subparameter	Mittelwert	Standardfehler	N
Entladungsmuster	tonisch	0%		11
	phasisch	100%		11
passive Eigenschaften	Membranoberfläche [μm^2]	1574	210	11
	Membranzeitkonstante [ms]	52,5	10,0	8
	Eingangswiderstand [$\text{M}\Omega$]	1829	358	11
	Membranruhepotenzial [mV]	-44,1	3,3	14
Aktionspotenzial-Kinetik	Schwelle [mV]	-29,3	2,6	6
	Amplitude [mV]	64	9,7	11
	Dauer (Basis) [ms]	31,1	6,6	8
	Anstiegsgeschwindigkeit [V/s]	13,6	2,6	11
	Abfallsgeschwindigkeit [V/s]	3,9	0,7	11
	Verhältnis Anstieg/Abfall	3,6	0,3	11

Tab. 4 Zusammenfassung der intrinsischen Eigenschaften von P0-P4 *unverzweigten* Pyramidenzellen der *kortikalen Platte*.

Die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotenzials lag im Mittel bei $-29,3 \pm 2,6$ mV ($n=6$) und die mittlere Amplitude betrug $64,0 \pm 9,7$ mV ($n=11$). Die Breite der Aktionspotenziale betrug an der Basis im Schnitt $31,1 \pm 6,6$ ms ($n=6$). Damit generierten diese Zellen die längsten Aktionspotenziale des unreifen Neokortex. Im Mittel betrug die höchste Anstiegsgeschwindigkeit $13,6 \pm 2,6$ V/s ($n=11$) und die höchste Abfallsgeschwindigkeit $3,9 \pm 0,3$ V/s ($n=11$). Daraus resultierte ein Verhältnis Anstiegsgeschwindigkeit/Abfallsgeschwindigkeit von $3,6 \pm 0,3$ ($n=11$) (Tab. 4).

3.2.3 Verzweigte Pyramidenzellen

Verzweigte Pyramidenzellen (VP Zellen) konnten vor allem in den früh gebildeten Schichten VI und V bzw. der unteren *kortikalen Platte* gefunden werden.

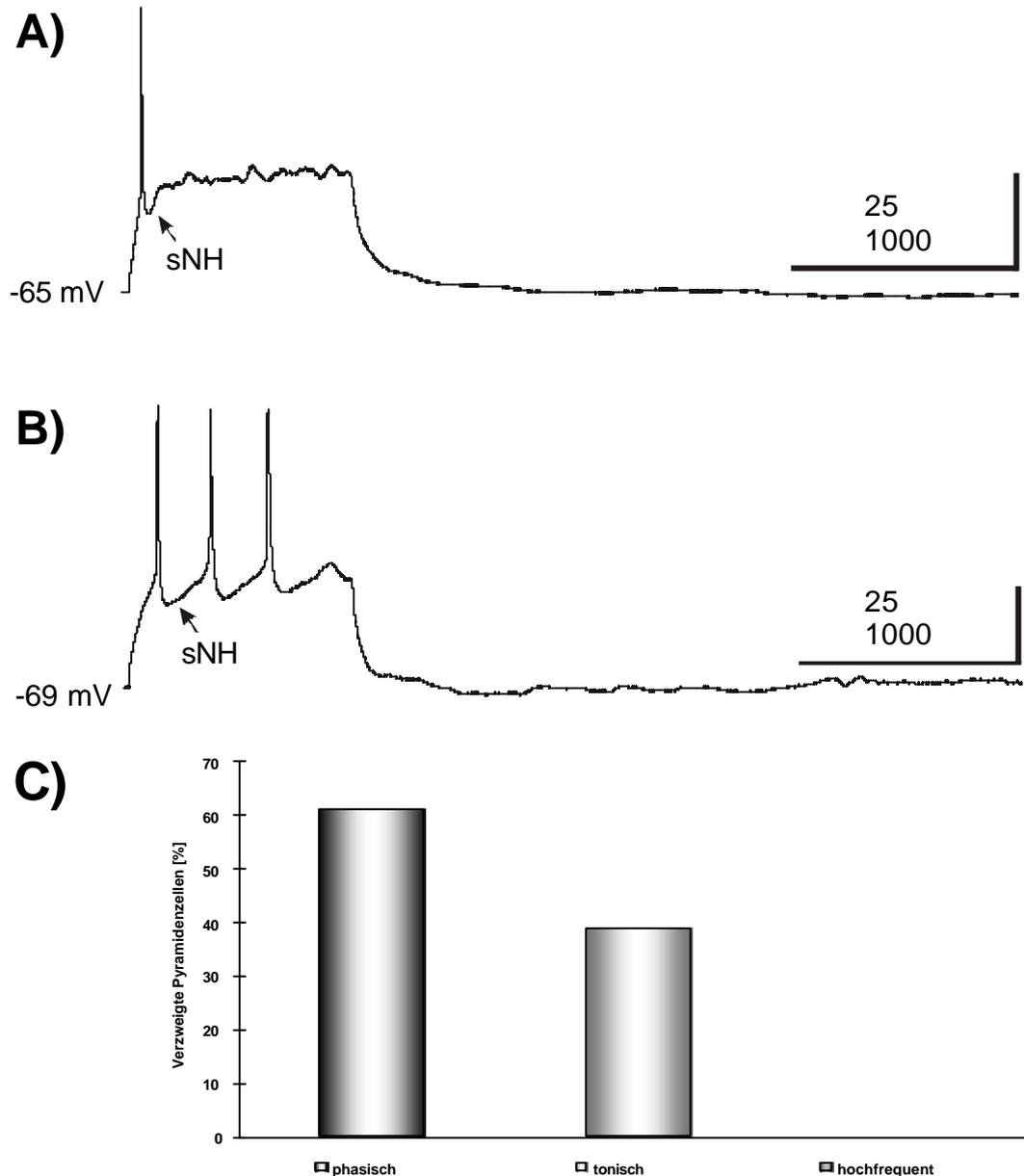


Abb. 10 (A) Reaktion verzweigter Pyramidenzellen auf depolarisierende Strominjektionen (P1 Pyramidenzelle der unteren *kortikalen Platte*; 23 pA Strominjektion bei einem Haltepotenzial von -65 mV). (B) Antwort einer anderen verzweigten Pyramidenzelle auf eine Strominjektion von 43 pA bei einem Haltepotenzial von -69 mV. Mit sNH sind schnelle Nachhyperpolarisationen gekennzeichnet. (C) Prozentuale Verteilung der Entladungsmuster verzweigter Pyramidenzellen (n=18).

Diese vertikal orientierten Zellen unterschieden sich neben der Lage optisch von den unreifen Pyramidenzellen durch eine in situ erkennbare Ramifizierung der basalen und apikalen Dendriten und ein deutlich voluminöseres Soma.

Neben der optischen Unterscheidung diente die elektrophysiologische Charakterisierung der Entladungsmuster als Unterscheidung dieser Neurone von den unreifen Pyramidenzellen.

Im Gegensatz zu den unreifen Pyramidenzellen traten bei überschwelliger Depolarisation neben phasischen Entladungsmustern auch solche mit schwach adaptierenden tonischen Entladungsmustern auf. Allen Aktionspotenziale folgten stets schnelle Nachhyperpolarisationen, die für die Regulation der Feuerungsrate verantwortlich sind (Abb. 10A und B).

Von allen 18 getesteten Zellen zeigten 61% phasische und 39% tonische Entladungsmuster (Abb. 10C).

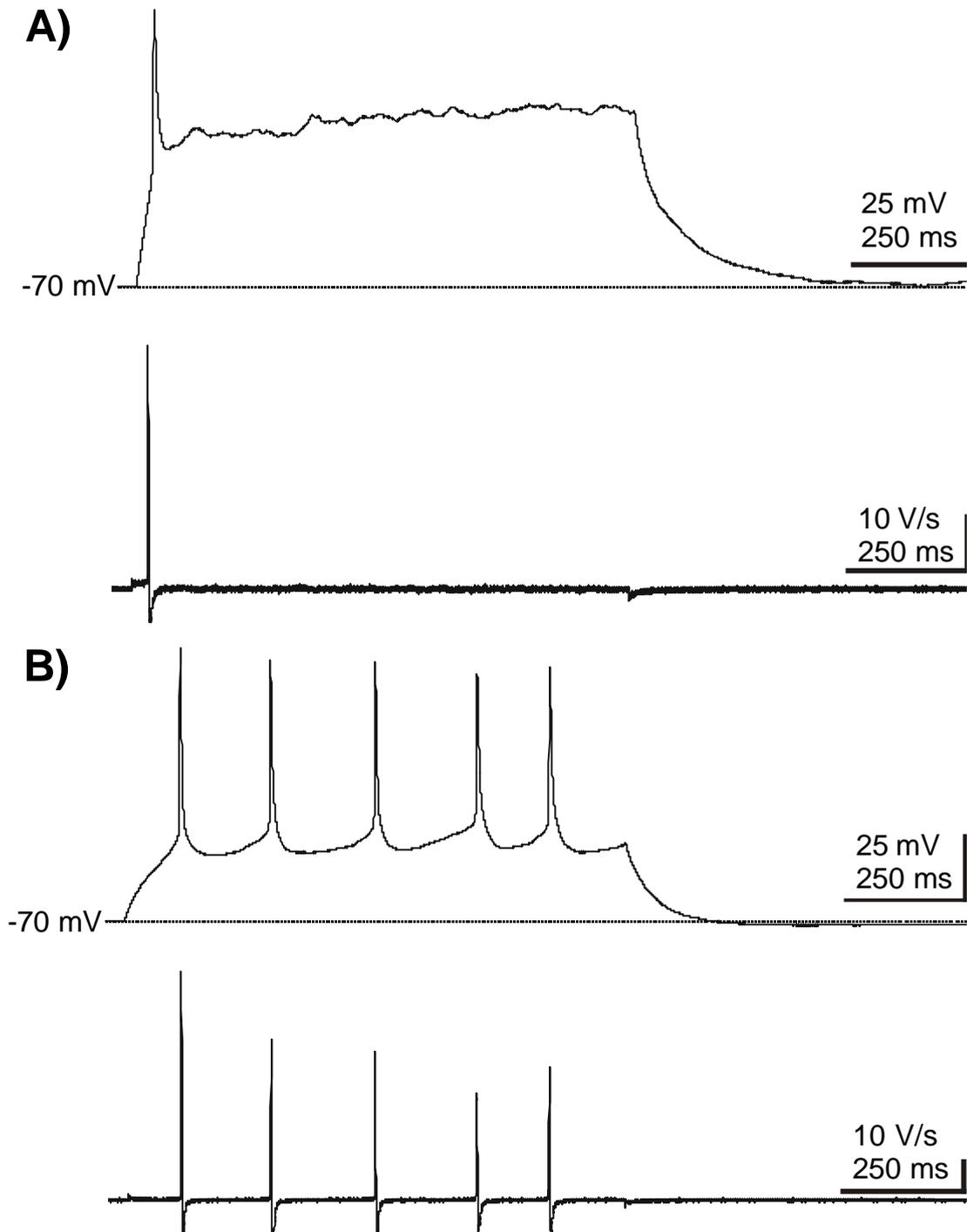


Abb. 11 Phasische (A) und tonische (B) Entladungsmuster zweier verzweigter Pyramidenzellen der tiefen *kortikalen Platte* nach 38 pA bzw. 28 pA Strominjektionen von einer Sekunde Dauer. In der unteren Spur ist jeweils die 1. Ableitung der Originalspuren dargestellt.

Bei beiden Entladungstypen wurde das initiale AP durch hohe Anstiegs- und Abfallsgeschwindigkeiten geprägt (Abb. 11A, B, nächste Seite). Beim tonischen Entladungstyp nahmen die Maximalgeschwindigkeiten der Aktionspotenziale kontinuierlich ab, die Zellen adaptierten langsam (11B).

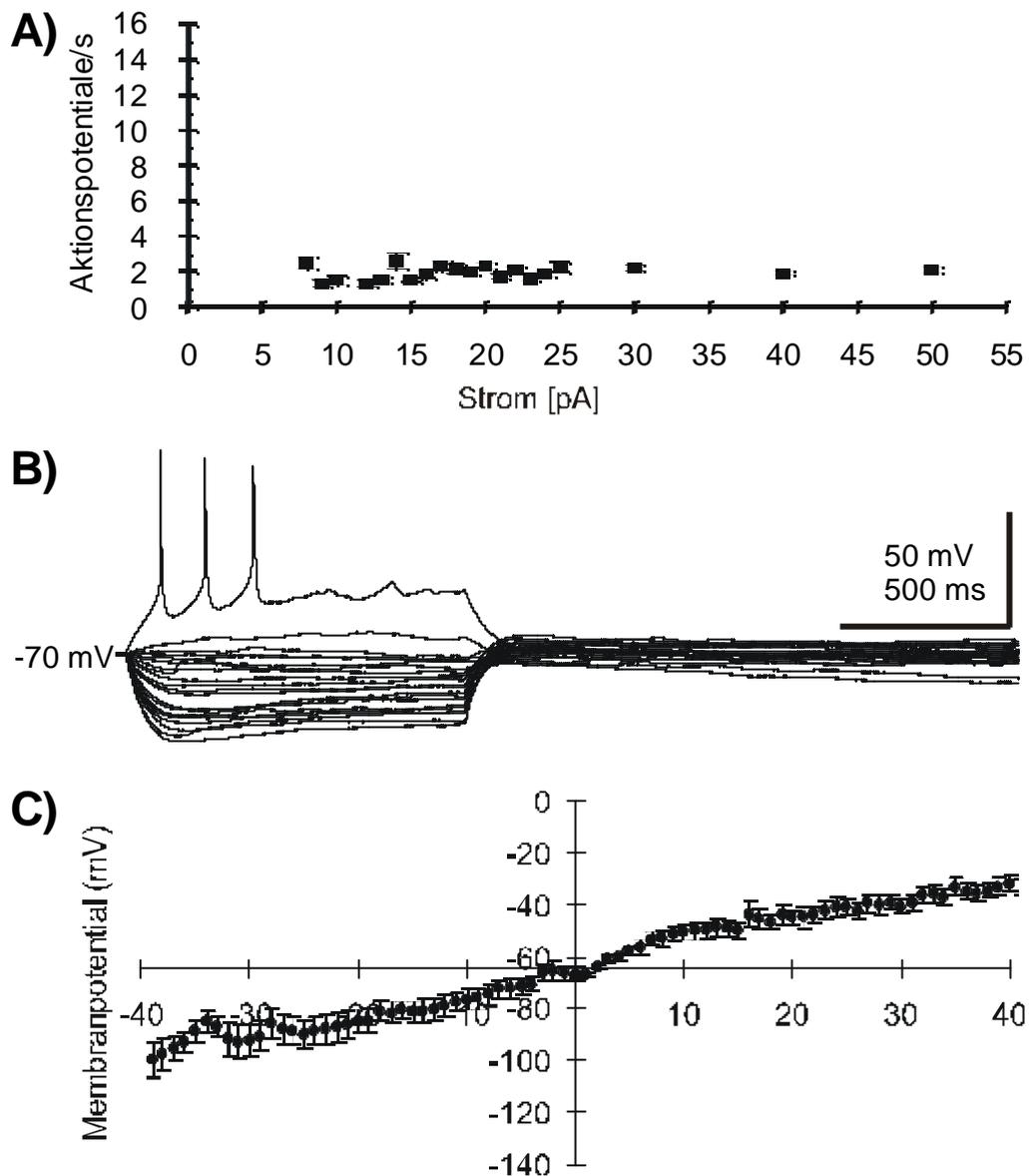


Abb. 12 (A) Reaktion verzweigter Pyramidenzellen auf zunehmende depolarisierende Strominjektionen. (B) Ableitung von einer VP Zelle bei de- und hyperpolarisierende Strominjektionen verschiedener Amplituden in der Stromklemme bei -70 mV Haltepotenzial. (C) Gemittelte I-U-Beziehung von VP Zellen ermittelt gegen Ende der Plateauphase.

Die Entladungsrate des tonische Typus lag in der Regel bei etwa 2 Hz und war nicht oder nur sehr schwach von der injizierten Stromstärke abhängig (Abb. 12A). In Abb. 12B ist die Reaktion einer verzweigten Pyramidenzelle auf zunehmend stärker werdende Hyperpolarisationen dargestellt. Die gemittelte I-U Beziehung von VP Zellen schließlich ist in Abb. 12C dargestellt. Eine transiente, aber kleine Gleichrichtung ist bei stark negativen (>-80 mV) Membranpotenzialen zu erkennen.

Das durchschnittliche Membranruhepotenzial verzweigter Pyramidenzellen lag bei $-46,6 \pm 2$ mV (n=38). Der Eingangswiderstand lag bei 828 ± 105 M Ω (n=27) und zeigte damit die niedrigsten Werte aller untersuchten Zelltypen. Die Membranoberfläche lag im Mittel bei 4286 ± 445 μm^2 (n=19), die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotenzials betrug im Mittel $-30,9 \pm 1,2$ mV (n=17). Die Amplitude der Aktionspotenziale betrug durchschnittlich $56,1 \pm 3,8$ mV (n=24) und ihre mittlere Breite an der Basis $18,2 \pm 2,6$ ms (n=24). Die maximale Anstiegsgeschwindigkeit von $14,3 \pm 1,8$ V/s (n=18) wurde von einer vergleichsweise hohen durchschnittlichen Abfallsgeschwindigkeit von $6,8 \pm 0,8$ V/s (n=18) begleitet. Diese Resultate sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Parameter	Subparameter	Mittelwert	Standardfehler	N
Entladungsmuster	tonisch	39%		18
	phasisch	61%		18
passive Eigenschaften	Membranoberfläche [μm^2]	4286	445	19
	Membranzeitkonstante [ms]	39,6	3,1	25
	Eingangswiderstand [M Ω]	828	105	27
	Membranruhepotenzial [mV]	-46,6	2	38
Aktionspotenzial-Kinetik	Schwelle [mV]	-30,9	1,2	17
	Amplitude [mV]	56,1	3,8	24
	Dauer (Basis) [ms]	18,2	2,6	24
	Anstiegsgeschwindigkeit [V/s]	14,3	1,8	18
	Abfallsgeschwindigkeit [V/s]	6,8	0,8	18
	Verhältnis Anstieg/Abfall	2,4	0,3	18

Tab. 5 Zusammenfassende Darstellung der intrinsischen Eigenschaften von verzweigten Pyramidenzellen der *kortikalen Platte*.

3.2.4 Subplattenneurone

Subplattenneurone (SP Neurone) stellen eine morphologisch heterogene Neuronenpopulation dar, die sich vor allem durch ihre Lage und allgemein komplexe Morphologie kennzeichnen lässt. Die untersuchten Neurone waren in der Regel multipolar und zeigten nach Füllung mit Lucifer-Yellow stark verzweigte axonale Projektionen.

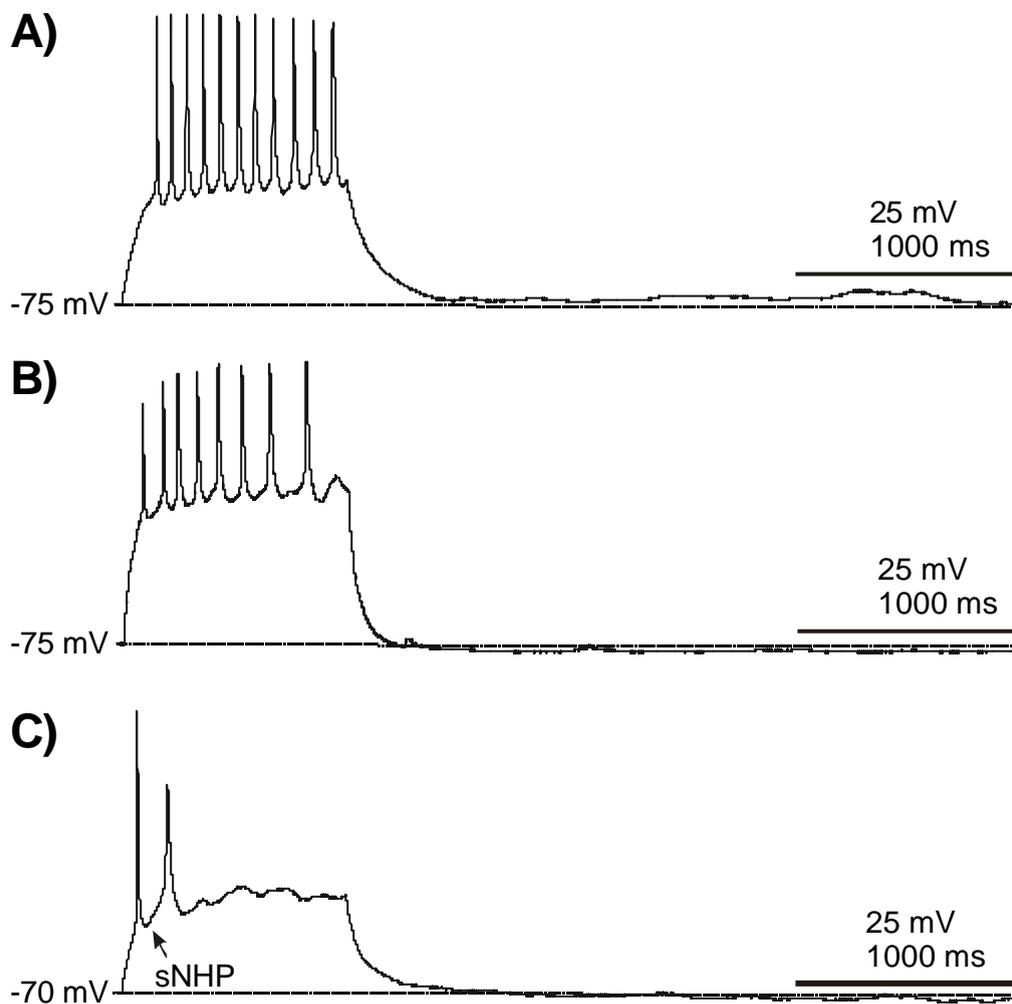


Abb. 13 Depolarisierende Strominjektionen in SP Neurone führten zu verschiedenen Antwortmustern. (A) Entladungsmuster einer P1 SP Zelle, die bei einem Haltepotenzial von -75 mV durch eine 23 pA Strominjektion depolarisiert wurde. Das SP Neuron in (B) antwortet zwar auf eine 49 pA Strominjektion bei -75 mV Haltepotenzial ebenso tonisch wie die Zelle in Abb.(A), feuert aber niederfrequenter und mit breiteren Aktionspotenzialen. (C) SP Neuron bei einer depolarisierenden Strominjektion von 23 pA und einem Haltepotenzial von -70 mV. Auf das erste Aktionspotenzial folgt eine schnelle Nachhyperpolarisation (Pfeil).

Überschwellige depolarisierende Strominjektionen in *Subplattenneuronen* führten zu verschiedenen Antwortmustern. Die meisten *Subplattenneurone* generieren tonische Aktionspotenzialserien. Dabei kann man hochfrequente (>10 Hz) und „normale“ tonische (<10 Hz) Entladungsmuster unterscheiden.

In Abb. 13A ist ein hochfrequent feuerndes *Subplattenneuron* mit 11 Aktionspotenzialen/s dargestellt, in Abb. 13B eine tonisch feuernde Zelle mit 8 Aktionspotenzialen/s. Wie bei den verzweigten Pyramidenzellen gab es auch in der *Subplatte* stark adaptierende, phasisch feuernde Zellen mit schnellen Nachhyperpolarisationen (sNHPs) (Abb. 13C).

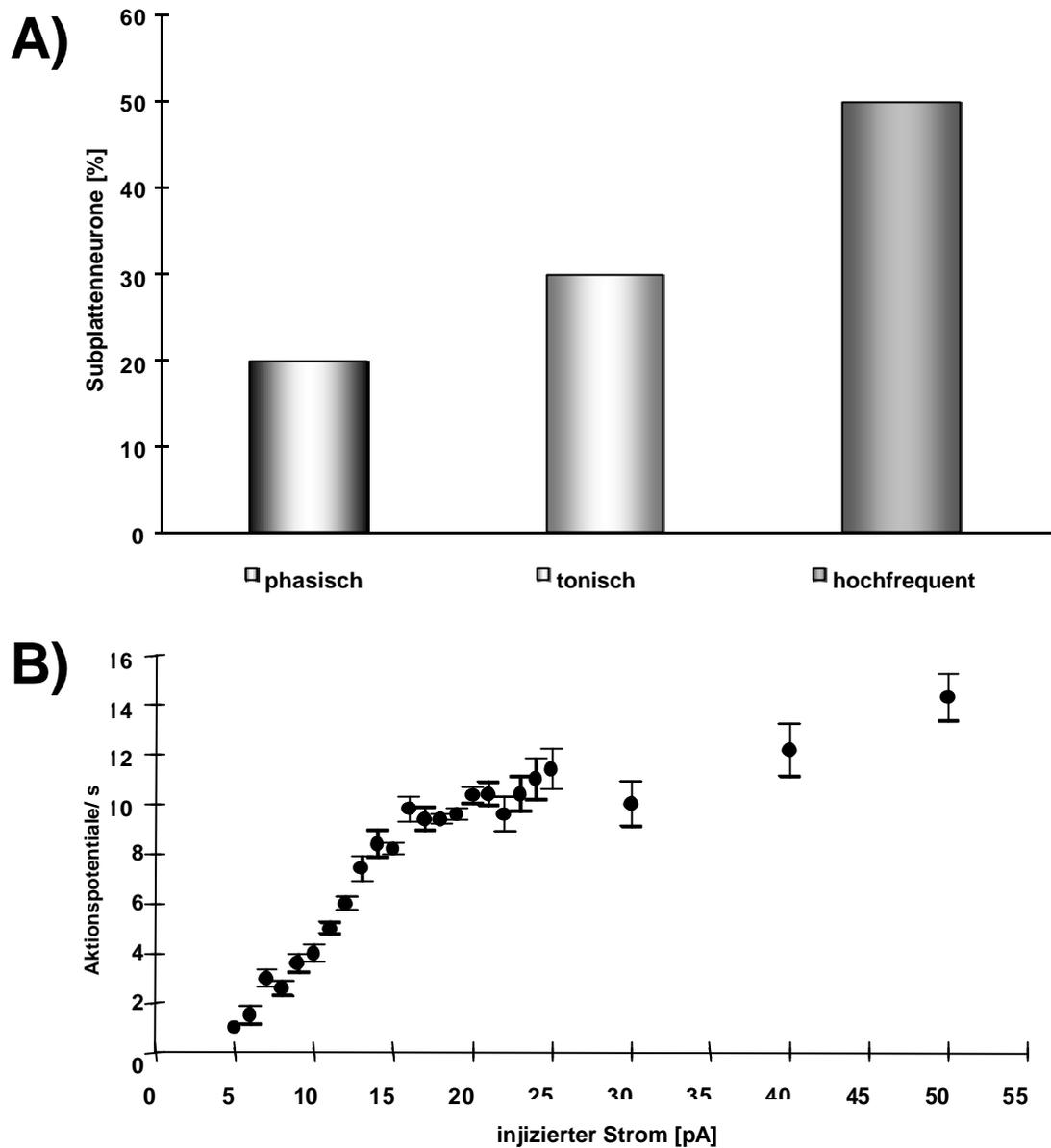


Abb. 14 (A) Verteilung phasischer, langsam tonischer und hochfrequent tonischer Entladungsmuster bei *Subplattenneuronen*. In (B) ist die Abhängigkeit der Zahl der Aktionspotenziale pro Sekunde eines *Subplattenneurons* vom injizierten Strom dargestellt.

70% der getesteten Neurone feuerten tonische Aktionspotenzialserien, wobei 50% dem hochfrequent und 20% dem tonisch feuernden Typ angehörten. Die übrigen 30% entluden sich phasisch mit wenigen Aktionspotenzialen (Abb. 14A). Zunehmende Depolarisation führte bei tonisch feuernden Zellen zu zunehmender Aktionspotenzialfrequenz (Abb. 14B).

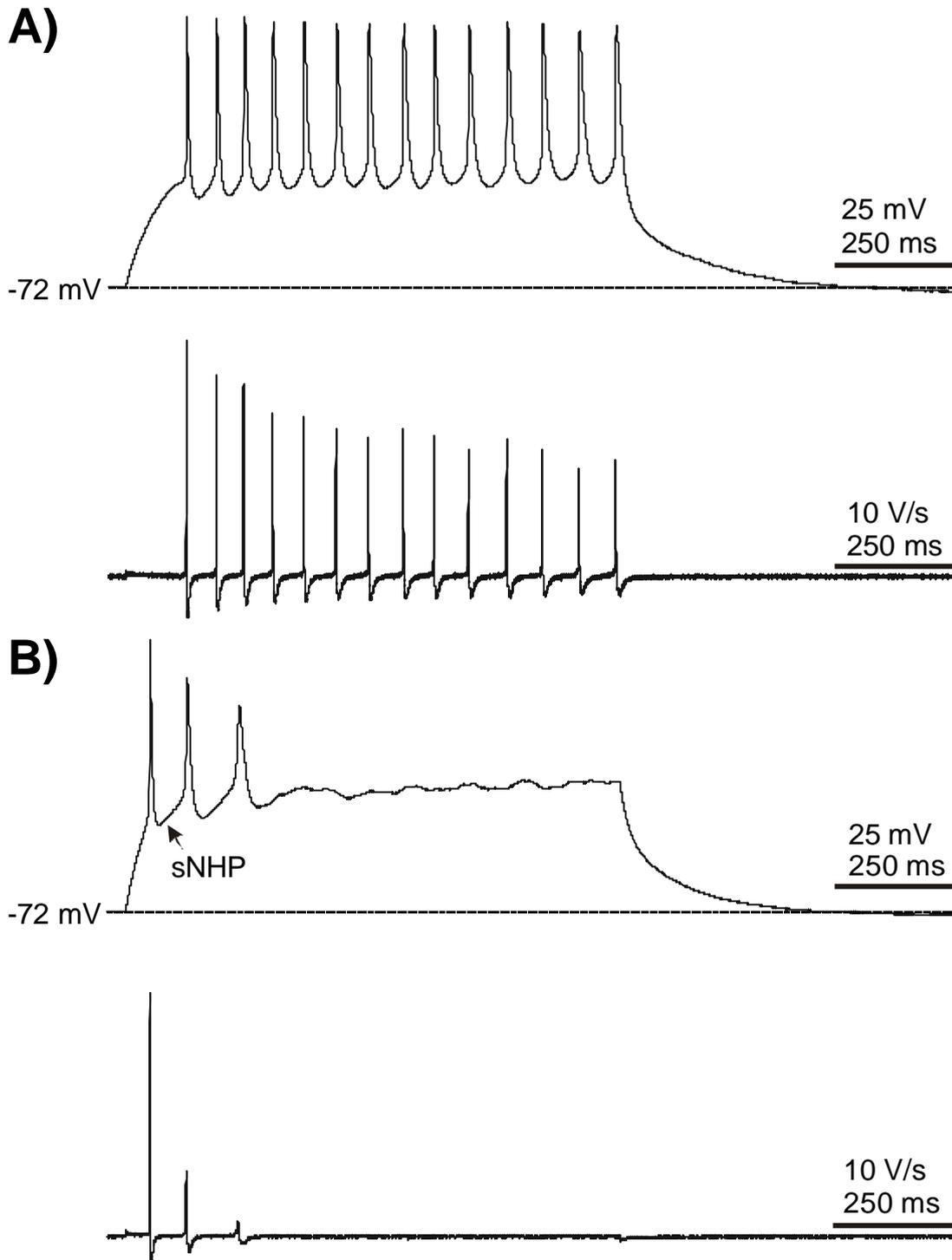


Abb. 15 (A) und (B) Entladungsmuster phasisch und tonisch feuender SP Neurone, sowie deren 1. Ableitung. In (A) wurde in ein SP Neuron bei einem Haltepotenzial von -72 mV ein Strom von 25 pA, in (B) in ein anderes SP Neuron ein Strom von 38 pA bei -72 mV injiziert.

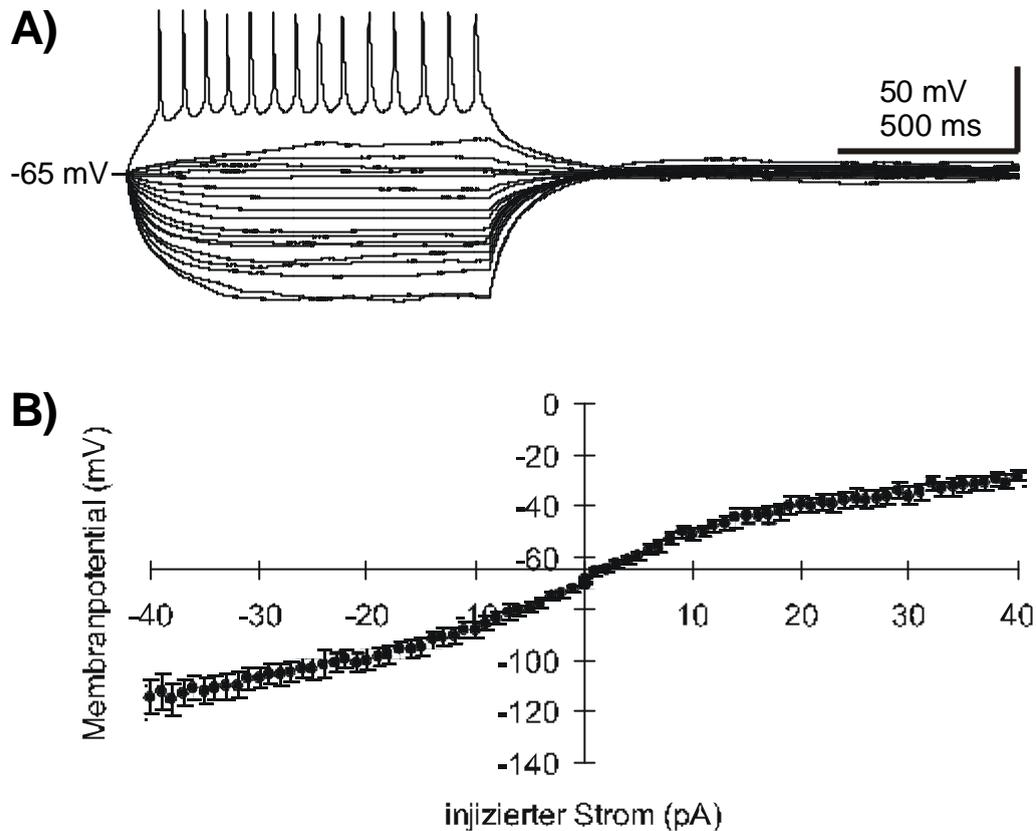


Abb. 16 (A) Antwort eines P0 *Subplattenneurons* mit hochfrequentem Entladungsmuster auf de- und hyperpolarisierende Strominjektionen verschiedener Stärke bei einem Haltepotenzial von -65 mV zur Ermittlung der Strom-Spannungsbeziehung. In (B) sind die gemittelten Strom-Spannungsbeziehungen von 12 *Subplattenneuronen* dargestellt.

Die hochfrequent entladenden SP Neurone zeigen hohe maximale Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten der initialen Aktionspotenziale, die in der Folge langsam abnehmen, so dass es zu einer Verbreiterung der Aktionspotenziale kam (Abb. 15A). Wesentlich ausgeprägter ist die Abnahme der Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten der Aktionspotenziale dagegen bei den phasisch feuernenden SP Neuronen (Abb. 15B).

In Abb. 16A ist die Reaktion einer hochfrequent feuernenden SP Zelle auf Depolarisationen und Hyperpolarisationen zunehmender Stärke dargestellt. Im Gegensatz zu den übrigen Zelltypen ist hier keine Einwärtsgleichrichtung festzustellen. Die gemittelten Strom-Spannungsbeziehungen von SP Neuronen ist in Abb. 16B wiedergegeben. Im Membranpotential-Bereich zwischen -50 mV und -100 mV ist der Verlauf annähernd linear. Bei stärkerer Hyperpolarisation ist nur eine schwache

Einwärtsgleichrichtung zu erkennen. Das Membranpotenzial der *Subplattenneurone* lag im Mittel bei $-50 \pm 2,3$ mV (n=20) und war damit von allen Zelltypen am stärksten polarisiert. Die mittlere Membranfläche der SP Neurone betrug 6224 ± 886 μm^2 (n=14).

Damit stellten die *Subplattenneurone* unter allen untersuchten Typen diejenigen mit der größten Oberfläche dar. Parallel dazu ist der mittlere Eingangswiderstand dieser Zellen mit 1014 ± 95 M Ω (n=10) relativ niedrig. Die Membranzeitkonstante betrug im Mittel $64,9 \pm 6,8$ ms (n=10). Aktionspotenziale konnten ab einem Membranpotenzial von $-35 \pm 1,7$ mV (n=10) ausgelöst werden, die mittlere Amplitude betrug $69,9 \pm 3,7$ mV (n=10). Die initialen Aktionspotenziale dauerten im Mittel $8,6 \pm 0,1$ ms (n=10) und waren somit schneller als die der anderen Zelltypen. Die Geschwindigkeit resultierte aus den sehr hohen maximalen Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten von $17 \pm 6,7$ V/s (n=10) bzw. $6,7 \pm 1,2$ V/s (n=10). Das Verhältnis von Anstiegsgeschwindigkeit zu Abfallsgeschwindigkeit betrug im Mittel $2,2 \pm 0,4$ (n=10). Diese Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefasst dargestellt.

Parameter	Subparameter	Mittelwert	Standardfehler	N
Entladungsmuster	tonisch	20%		10
	phasisch	30%		10
	hochfrequent	50 %		10
passive Eigenschaften	Membranoberfläche [μm^2]	6224	886	14
	Membranzeitkonstante [ms]	64,9	6,8	10
	Eingangswiderstand [M Ω]	1014	95	10
	Membranruhepotenzial [mV]	-50	2,3	20
Aktionspotenzial-Kinetik	AP-Schwelle [mV]	-35,0	1,7	10
	AP-Amplitude [mV]	69,9	3,7	10
	AP-Breite (Basis) [ms]	8,6	0,1	10
	Anstiegsgeschwindigkeit [V/s]	17,0	6,7	10
	Abfallsgeschwindigkeit [V/s]	6,7	1,2	10
	Verhältnis Anstieg/Abfall	2,2	0,4	10

Tab. 6 Zusammenfassende Darstellung der intrinsischen Eigenschaften von *Subplattenneuronen*.

3.2.6. Beteiligung von Kaliumströmen an intrinsischen Membraneigenschaften

In einer Serie von Experimenten wurden in der intrazellulären Lösung Kaliumionen durch Cäsiumionen ausgetauscht, um den Einfluss von Kaliumströmen, die teilweise durch Cäsiumionen blockiert werden können, auf die intrinsischen Parameter der untersuchten Neurone abschätzen zu können.

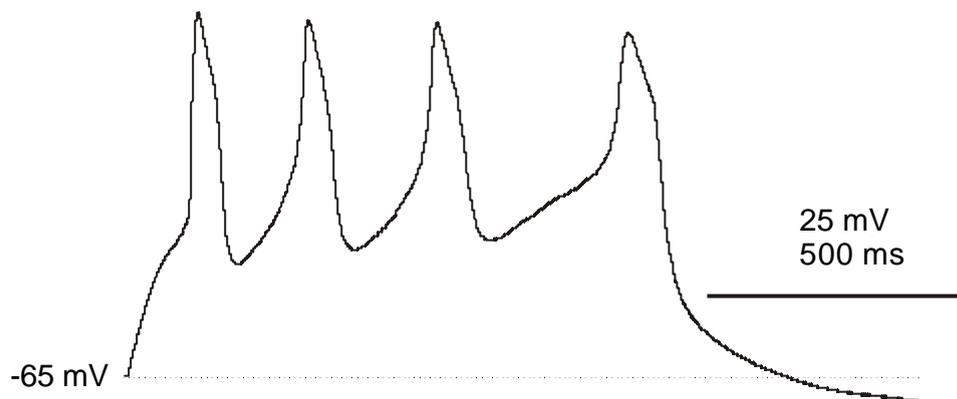


Abb. 17 Die depolarisierende Strominjektion von 50 pA in ein P1 *Subplatten*neuron bei einem Haltepotenzial von -65 mV unter Verwendung einer intrazellulären Lösung, bei der Kaliumionen durch Cäsium ausgetauscht wurden.

Verglichen mit Kaliumhaltiger Lösung lag bei diesen Ableitungen von einer gemischten Population aller vier Zelltypen zwischen P0 und P4 das Membranpotential bei im Mittel bei deutlich positiveren Werten von $-36,4 \pm 4,2$ mV (n=18) im Vergleich zu $-40,8 \pm 3,5$ mV (n=20) bei Kaliumhaltiger Intrazellulärlösung.

Der Eingangswiderstand war bei Verwendung von Cäsiumhaltiger Lösung höher als bei Verwendung von Kaliumchloridlösung (1543 ± 324 M Ω (n=11) im Vergleich zu 1138 ± 231 M Ω (n=22)). Überschwellige depolarisierende Strominjektionen unter Verwendung von Cäsiumhaltigen Lösungen führten zur Generierung von Aktionspotenzialen, die allerdings in ihrer Dauer verlängert waren (Abb. 17). Bei noch stärkerer Depolarisation kam es zur Ausbildung eines depolarisierten Plateaus, ohne dass ein initiales Aktionspotenzial ausgelöst werden konnte.

3.3. Einwärtsströme neokortikaler Neurone neugeborener Ratten

3.3.1. Natrium-Ströme

Schnelle transiente Natriumströme wurden nach der erfolgreichen Beschreibung passiver und aktiver elementarer Membraneigenschaften in den vier Zelltypen analysiert.

Diese Natriumströme können in Neuronen durch die überschwellige Depolarisation des Membranpotenzials evoziert werden. Durch die Öffnung von Natriumkanälen können Natriumionen in die Zelle gelangen. Sie stellen damit die Basis für die Aktionspotenzial-induzierte Depolarisation dar.

Zu diesem Zweck wurde das in Abb. 18A eingefügte Pulsprotokoll in der Stromklemme verwendet. Die Zellen wurden für drei Sekunden bei -70 mV gehalten und dann für 300 ms in 10 mV Schritten zunehmend depolarisiert. Die Inaktivierung von Natriumströmen wurde durch Pausen von mindestens drei Sekunden zwischen zwei Spannungssprüngen und ein hyperpolarisiertes Haltepotenzial vermieden. Auf diese Art und Weise konnte zuverlässig ein transienter, TTX-sensitiver Einwärtsstrom in allen Neuronen gemessen werden.

In der Regel konnte ein schneller Natriumeinstrom bei einem Membranpotenzial zwischen -50 und -30 mV aktiviert werden (Abb. 18A +B).

Die unterbrochene Linie in Abb. 18B stellt die Extrapolation der gemessenen Ströme bis +40 mV Membranpotenzial dar. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt ein geschätztes Umkehrpotenzial von -70 mV für diese Messung an einer unverzweigten Pyramidenzelle.

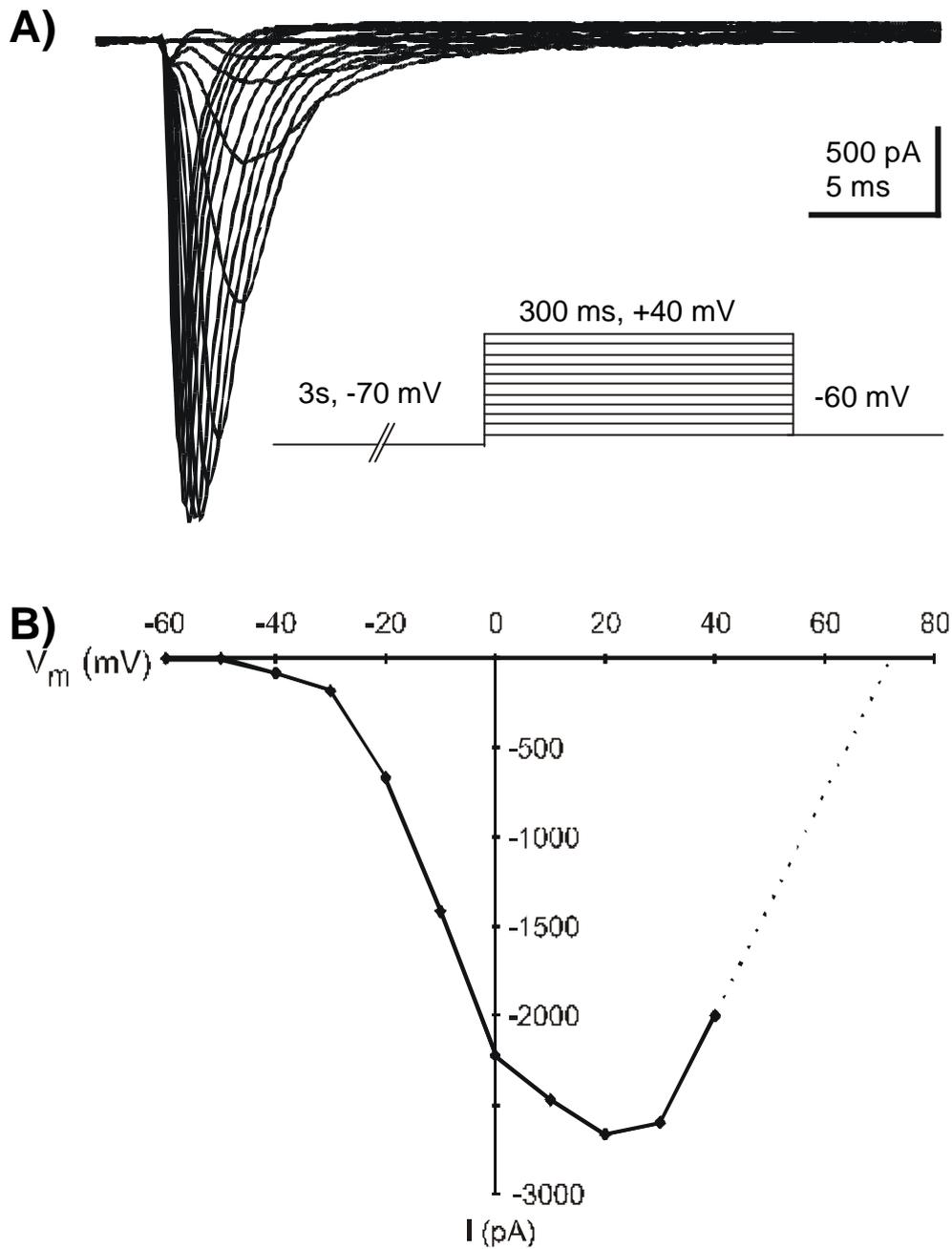


Abb. 18 (A) Natriumströme in der Spannungsklemme. Die Ableitung stammt von einer unverzweigten Pyramidenzelle (P0). (B) Strom-Spannungsbeziehung für die in (A) gezeigte Ableitung.

Die Resultate dieser Untersuchungen an den verschiedenen Zelltypen sollen im Folgenden genauer dargestellt werden.

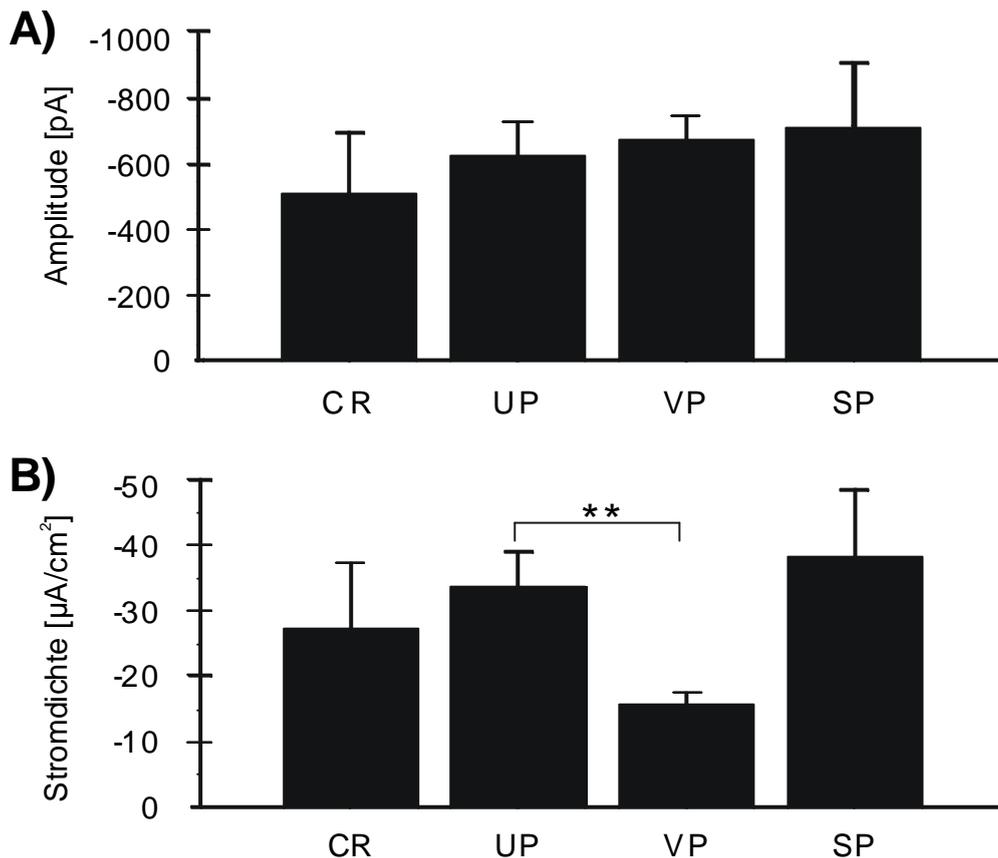


Abb. 19 In (A) sind die Spitzenwerte der Natriumstrom-Amplituden aufgeteilt nach den untersuchten Zelltypen dargestellt. In (B) sind die Daten aus Abb. 19 A in Relation zu der Membranoberfläche der Zellen dargestellt.

Cajal-Retzius Neurone zeigten mit durchschnittlich -512 ± 185 pA ($n=4$) die niedrigsten Amplituden. Die Amplituden der unreifen Pyramidenzellen lagen bei -627 ± 102 pA ($n=13$), die der verzweigten Pyramidenzellen bei -674 ± 74 pA ($n=26$). Die größten Amplituden konnten in *Subplattenneuronen* gemessen werden. Hier lag der Durchschnitt bei -714 ± 194 pA ($n=8$) (Abb. 19A).

Da die Amplitude des Natriumstroms von der Kinetik und der Anzahl der Natrium-

kanäle pro Flächeneinheit abhängig ist, wurden die absoluten Amplituden anschließend in Relation zur gemessenen Membranoberfläche gesetzt.

Die so ermittelten Stromdichten ergaben eine etwas andere Verteilung als die absoluten Amplituden. CR Neurone zeigten im Mittel eine Stromdichte von $-27,4 \pm 9,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=3), *unverzweigte Pyramidenzellen* $-33,5 \pm 5,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=6), *verzweigte Pyramidenzellen* den niedrigsten Wert von $-15,7 \pm 1,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=14) und *Subplattenneurone* den höchsten Wert von $-38,2 \pm 10,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=6).

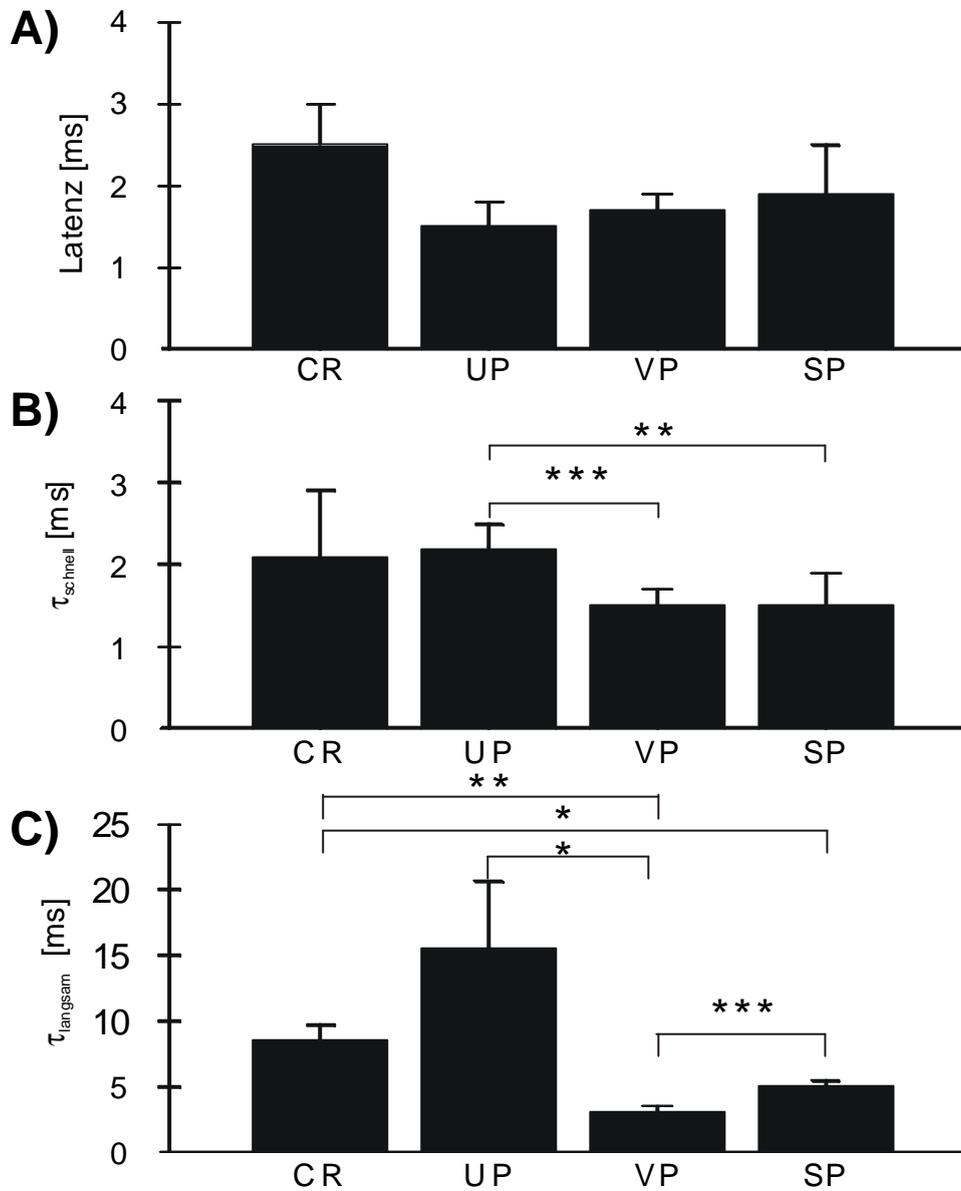


Abb. 20 In (A) ist als Maß der Aktivierungskinetik die Latenz vom Beginn der Depolarisation bis zu der Maximalamplitude dargestellt. In (B) ist die schnelle Inaktivierungs-Zeitkonstante für die vier Zelltypen dargestellt, in (C) die langsame Inaktivierungs-Zeitkonstante.

Die Aktivierungskinetik der Natriumströme, die z.B. für die Anstiegsgeschwindigkeit der Aktionspotenziale von Bedeutung ist, kann näherungsweise durch die Latenz zwischen dem Beginn der Depolarisation und dem Zeitpunkt der maximalen Natriumstromamplitude beschrieben werden.

CR Neurone zeigten mit $2,5 \pm 0,5$ ms ($n=4$) die größte, UP Zellen dagegen mit $1,5 \pm 0,3$ ms ($n=10$) die kürzeste Latenz. *Verzweigte Pyramidenzellen* und *Subplattenneurone* lagen mit $1,7 \pm 0,2$ ms ($n=22$) bzw. $1,9 \pm 0,6$ ms ($n=6$) zwischen diesen Werten (Abb. 20A). Diese Differenzen zwischen den Latenzen waren statistisch nicht signifikant ($\alpha = 0,05$).

Neben der Aktivierungskinetik interessierte der Zeitverlauf der Inaktivierung. Dieser Parameter konnte durch eine biexponentielle Regressionsanalyse gewonnen werden. Die Inaktivierung wurde am besten durch eine schnelle (τ_{schnell}) und eine langsame Inaktivierungskomponente (τ_{langsam}) beschrieben. τ_{schnell} der CR Neurone betrug im Mittel $2,1 \pm 0,8$ ms ($n=4$), τ_{langsam} $8,5 \pm 1,2$ ms ($n=3$). UP Zellen zeigten mit $2,2 \pm 0,3$ ms ($n=11$) bzw. $15,5 \pm 5,1$ ms ($n=7$) die längsten Inaktivierungszeitkonstanten.

Die Natriumströme der verzweigten Pyramidenzellen und *Subplattenneurone* dagegen inaktivierten mit einer schnellen Inaktivierungszeitkonstante von $1,5 \pm 0,2$ ms ($n=20$) und einer langsamen Inaktivierungszeitkonstante von $3,1 \pm 0,4$ ms ($n=11$), bzw. $1,5 \pm 0,4$ ms ($n=5$) und $5 \pm 0,4$ ms ($n=7$) signifikant schneller als CR und UP Zellen ($\alpha = 0,05$) (Abb. 20B +C).

3.3.2. Spannungsabhängige Kalziumströme

Die Untersuchung der Kalziumströme beschränkte sich auf solche Ströme, die bei relativ positiven Membranpotenzialen aktiviert werden konnten (*high-voltage-activated (HVA)*) Kalziumströme. Ströme, die bereits bei niedrigen Membranpotenzialen induziert werden können, waren in der untersuchten Altersgruppe entweder nicht zu evozieren, oder es konnten keine hinreichend guten Ableitungsbedingungen geschaffen werden.

Spannungsabhängige Kalziumströme wurden durch schrittweise Depolarisationen in 10 mV-Schritten von -60 mV bis +20 mV Membranpotenzial induziert (siehe Pulsprotokoll in Abb. 21). Dadurch wurden spezifisch die Komponenten der Kalziumströme isoliert, die erst bei starker Depolarisation aktivieren, da andere Kalziumströme bei -60 mV Membranpotenzial bereits vollständig inaktiviert sind (Sayer et al., 1990; Brown et al., 1993). Zwischen zwei Depolarisationen wurde eine Pause von mindestens 10 Sekunden bei -60 mV eingelegt. Dadurch konnte eine Inaktivierung bzw. ein „run-down“ der Ströme minimiert werden.

Kalziumströme waren in allen Zelltypen messbar. Die HVA Kalziumströme konnten durch die Applikation von 100 μ M Kadmium vollständig blockiert werden (n=25, hier nicht dargestellt).

Nur solche Einwärtsströme wurden weiter ausgewertet, die langsam zwischen -50 und -40 mV Membranpotenzial aktivierten. Nur so konnte ein zu großer Fehler durch ungenügende Ableitbedingungen ausgeschlossen werden. In einem Strom-Spannungsdiagramm zeigt eine diesen Kriterien entsprechende Ableitung eine angenähert U-förmige Kurve.

Die abgeleiteten Kalziumströme bestanden aus einer frühen transienten Komponente und einer langanhaltenden persistierenden Komponente.

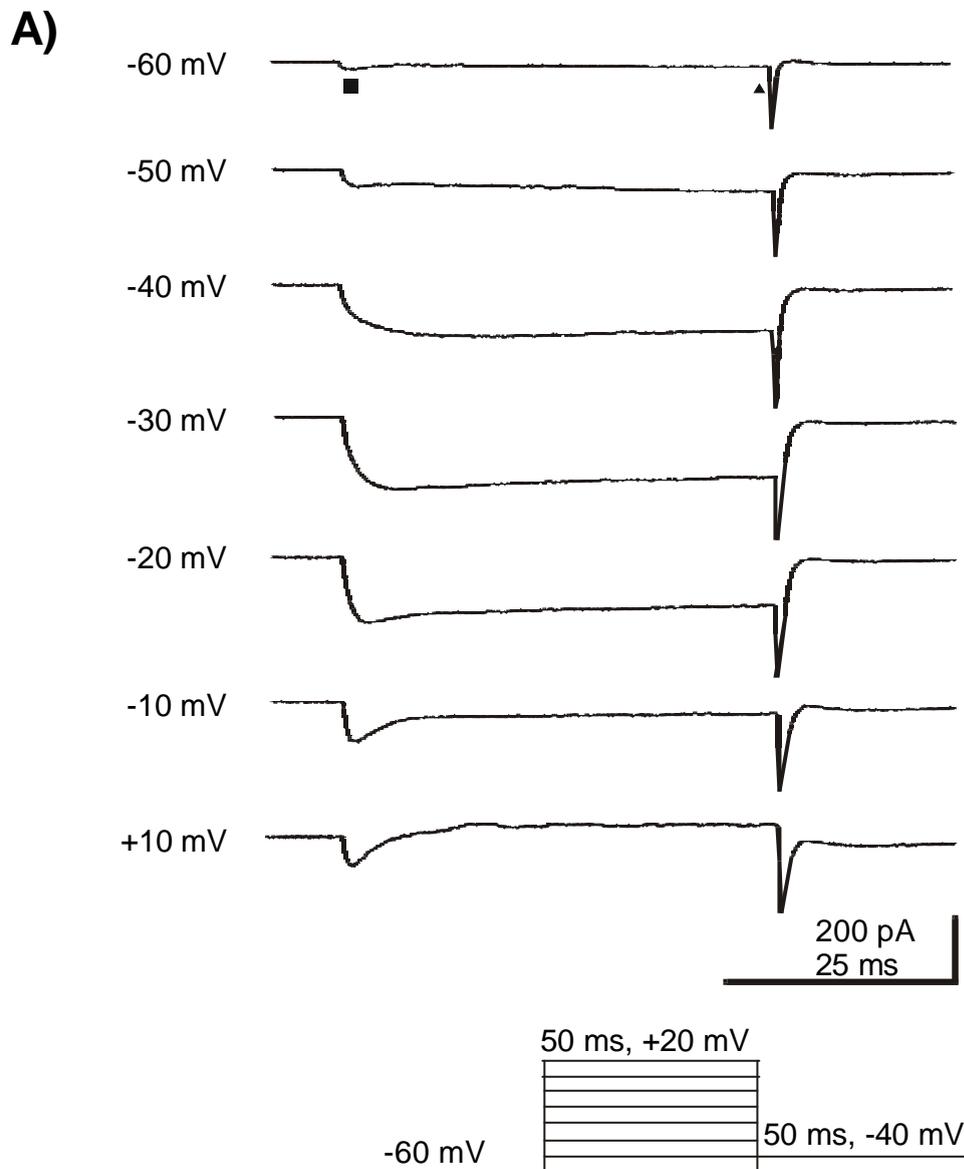


Abb. 21 Ableitung des HVA Kalziumstrom von einer verzweigten Pyramidenzelle eines P5 Tieres. Unten in der Abbildung ist das verwendete Pulsprotokoll wiedergegeben. Das Rechteck bzw. das Dreieck in der oberen Spur markiert den Zeitpunkt der Amplitudenbestimmung für die Erstellung der Strom-Spannungsbeziehung in Abb. 22.

Beide Komponenten aktivierten bei Membranpotenzialen zwischen -50 und -40 mV und waren maximal aktiviert bei Membranpotenzialen zwischen -20 und -10 mV

(siehe Spuren in Abb. 21 und die I-U-Beziehung in Abb. 22). Das Umkehrpotenzial lag in der Regel zwischen +10 mV und + 50 mV.

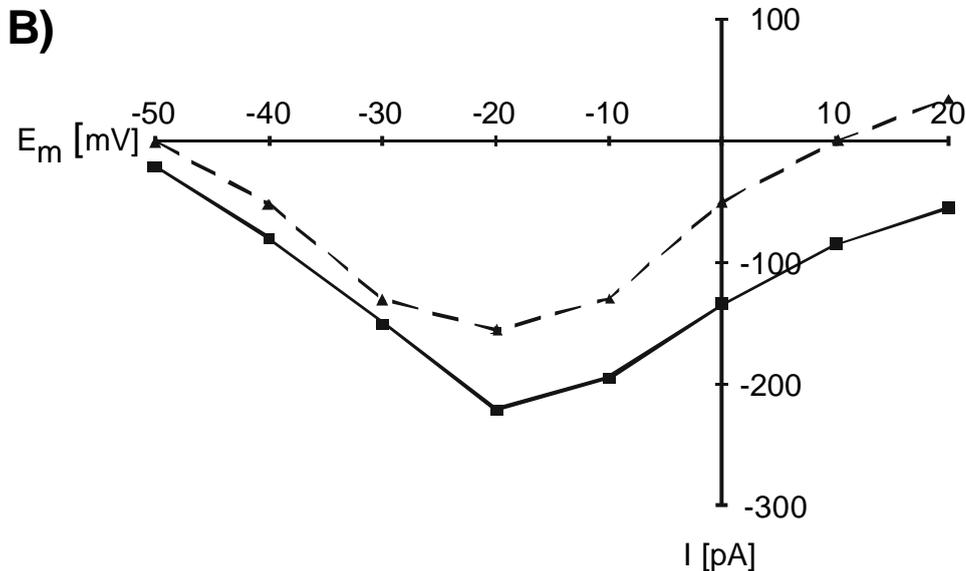


Abb. 22 Hier ist die Strom-Spannungsbeziehung der Ableitung aus Abb. 21 dargestellt. Die Amplituden der transienten und der persistierenden Komponenten wurden zu den Zeitpunkten bestimmt, die in der obersten Spur der Abb. 21 mit einem Rechteck bzw. Dreieck markiert sind.

Cajal-Retzius Neurone hatten mit -126 ± 27 pA ($n=7$) die niedrigsten Amplituden des transienten Kalziumstromes. Dieser Wert war signifikant niedriger gegenüber allen untersuchten Zelltypen ($\alpha = 0,05$).

Unverzweigte Pyramidenzellen hatten Spitzenamplituden von durchschnittlich -275 ± 48 pA ($n=9$), während dieser Werte für *verzweigte Pyramidenzellen* -246 ± 38 pA ($n=12$) betrug. *Subplattenneurone* hatten mit -283 ± 51 pA ($n=7$) die größten Maximalamplituden von allen untersuchten Zelltypen (Abb. 23A).

Nach der Relativierung dieser Amplituden in Bezug auf die Membranfläche der Neuronen veränderten sich die Verhältnisse untereinander. Nun zeigten die resultierenden Spitzenstromdichten bei *unverzweigten Pyramidenzellen* mit $25,5 \pm 8,4$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=9$) die höchsten Werte. Dieser Parameter war schwach signifikant höher im Vergleich zu den übrigen Neuronenpopulationen ($\alpha = 0,05$).

Die Spitzenstromdichte der transienten Komponente von CR und SP Neuronen war mit $-4,9 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=7) bzw. $-4,9 \pm 1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=7) etwa um das fünffache niedriger. *Verzweigte Pyramidenzellen* hatten eine etwas höhere Spitzenstromdichte von $-6,3 \pm 1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=11) (Abb. 23B).

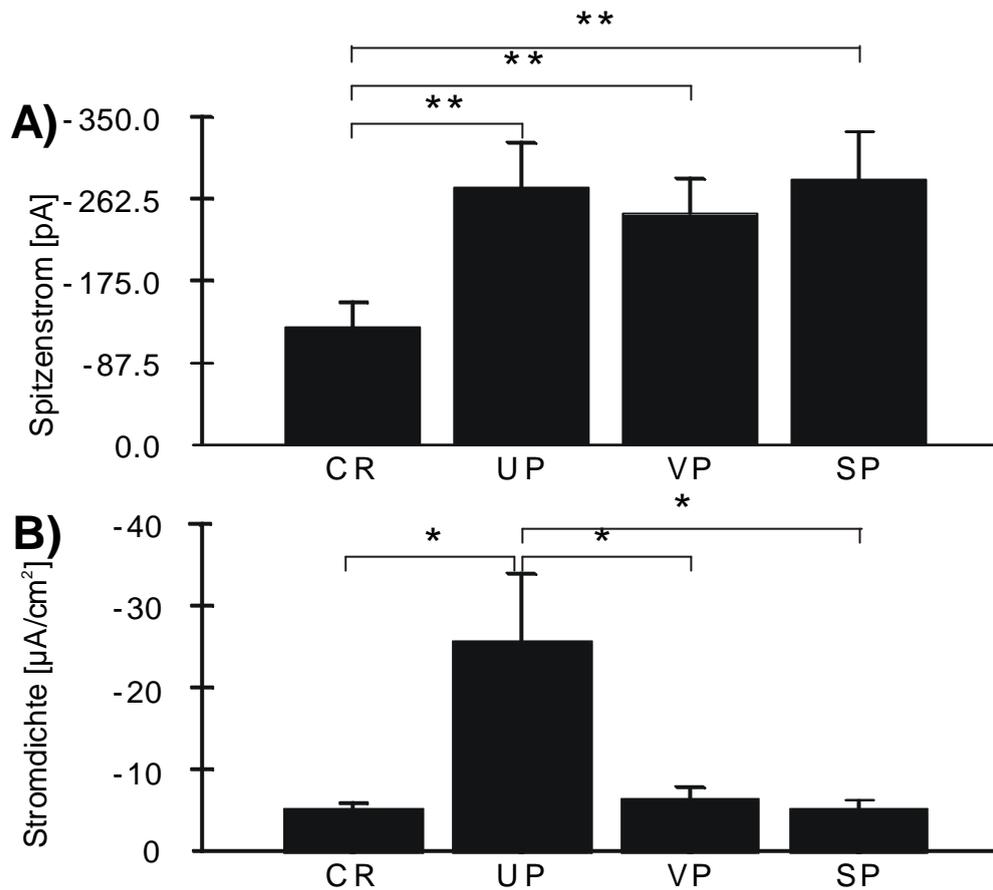


Abb. 23 Die Amplituden der transienten Kalziumkomponente (Spitzenstrom) wurden bei dem Potenzial ermittelt, an dem der jeweilige Einwärtsstrom maximal war. In (A) sind die mittleren Amplituden für die vier Zelltypen dargestellt. Stellt man die Maximalamplitude in Relation zu der Membranoberfläche der Zellen, erhält man die Stromdichte, die in (B) ebenfalls für alle Zelltypen wiedergegeben ist.

Die Aktivierungskinetik der transienten Kalziumströme der untersuchten Zelltypen konnte nur näherungsweise durch die Bestimmung der Latenz zwischen dem Beginn der Depolarisation und dem Zeitpunkt des Auftretens der Maximalamplitude bestimmt werden.

Die resultierenden Werte unterschieden sich nicht signifikant, waren jedoch mit $18,9 \pm 4,9$ ms ($n=9$) am höchsten bei den verzweigten Pyramidenzellen und mit $13,0 \pm 3,9$ ms ($n=7$) am niedrigsten bei *Subplattenneuronen* ($\alpha = 0,05$).

Cajal-Retzius Neurone und *unverzweigte Pyramidenzellen* lagen mit $14,7 \pm 6,7$ ms ($n=7$) bzw. $16,9 \pm 5$ ms ($n=8$) zwischen diesen beiden Extremen (Abb. 24A).

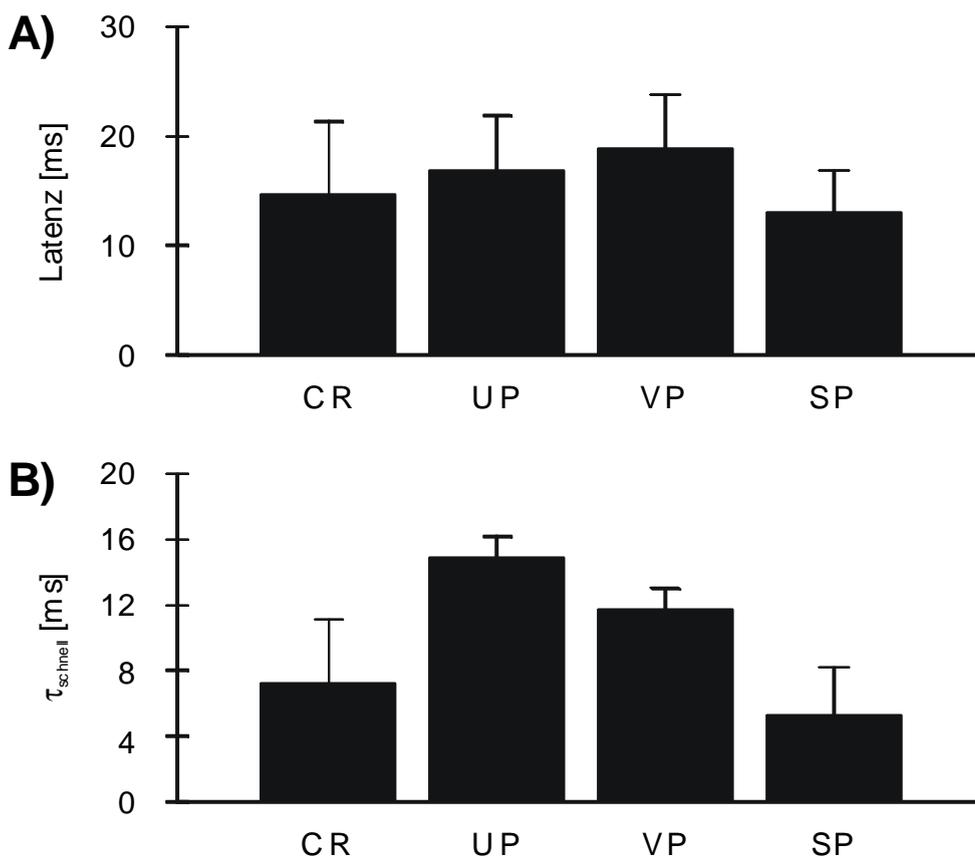


Abb. 24 Die Aktivierungskinetik der transienten Kalziumkomponente kann durch die Latenz zwischen Beginn der Depolarisation und Zeitpunkt des Spitzenstroms dargestellt werden. In (A) ist diese Latenz für alle Zelltypen dargestellt. In (B) sind die schnellen Inaktivierungszeitkonstanten der transienten Komponente wiedergegeben.

Die Inaktivierungskinetik der transienten und persistierenden Komponenten konnte durch eine biexponentielle Regressionsanalyse bestimmt werden. Eine solche biexponentielle Regression ist in Abb. 25 dargestellt. Auf diesem Weg erhielt man eine schnelle (τ_{schnell}) und eine langsame (τ_{langsam}) Inaktivierungszeitkonstante für die transiente bzw. die persistierende Komponente.

Die transiente Kalziumstrom-Komponente inaktivierte mit einer τ_{schnell} von $7,2 \pm 3,9$ ms (n=5) bei CR Neuronen, $14,9 \pm 1,3$ ms (n=5) bei UP Zellen, $11,7 \pm 1,3$ ms (n=6) bei VP Zellen und $5,3 \pm 2,9$ ms (n=5) bei SP Neuronen (Abb. 24B).

Die Unterschiede in Bezug auf diesen Parameter waren nicht signifikant verschieden. Auffällig ist jedoch der Unterschied zwischen der Gruppe der Pyramidenzellen und den CR und SP Neuronen. Letztere zeigten deutlich kürzere Inaktivierungszeitkonstanten.



Abb. 25 Die Inaktivierung der transienten und der persistierenden Komponente wurde untersucht, indem eine biexponentielle Regressionsanalyse, dargestellt durch die gestrichelte Linie, durchgeführt wurde. Dadurch wurden eine schnelle (t_s) und eine langsame (t_t) Inaktivierungszeitkonstante bestimmt.

Die Amplituden der persistierenden Komponente wurden bei dem Depolarisationsschritt mit der höchsten Spitzenstromamplitude bestimmt (Abb. 26A). Wie bei der transienten Komponente hatten CR Neuronen mit -74 ± 11 pA (n=10) die niedrigsten Amplituden des Plateau Kalziumstromes. Diese Abweichungen war signifikant niedriger als bei verzweigten Pyramidenzellen mit -116 ± 18 pA (n=16) ($\alpha = 0,05$). Gegenüber den anderen Zelltypen war jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen. *Unverzweigte Pyramidenzellen* hatten Plateauamplituden von durchschnittlich -87 ± 20 pA (n=8), während dieser Parameter bei *Subplattenneuronen* -93 ± 20 pA (n=9) betrug. Wie bei der transienten Kalziumstrom Komponente wurde auch bei der Plateaukomponenten die Amplitude im Verhältnis zur Membranfläche relativiert. Es ergab sich dabei eine ähnliche Verteilung wie bei der Stromdichte der transienten Komponente. CR Neurone mit durchschnittlich $-3,3 \pm 0,7$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

(n=10), *verzweigte Pyramidenzellen* mit $-3,1 \pm 0,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=15) und *Subplattenneurone* mit $-3,1 \pm 1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=5) differierten nicht signifikant voneinander. *Unverzweigte Pyramidenzellen* zeigten mit durchschnittlich $-7,6 \pm 2,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=8) die größte Stromdichte der Plateaukomponente und unterschieden sich in diesem Parameter signifikant von den verzweigten Pyramidenzellen (Abb. 26B).

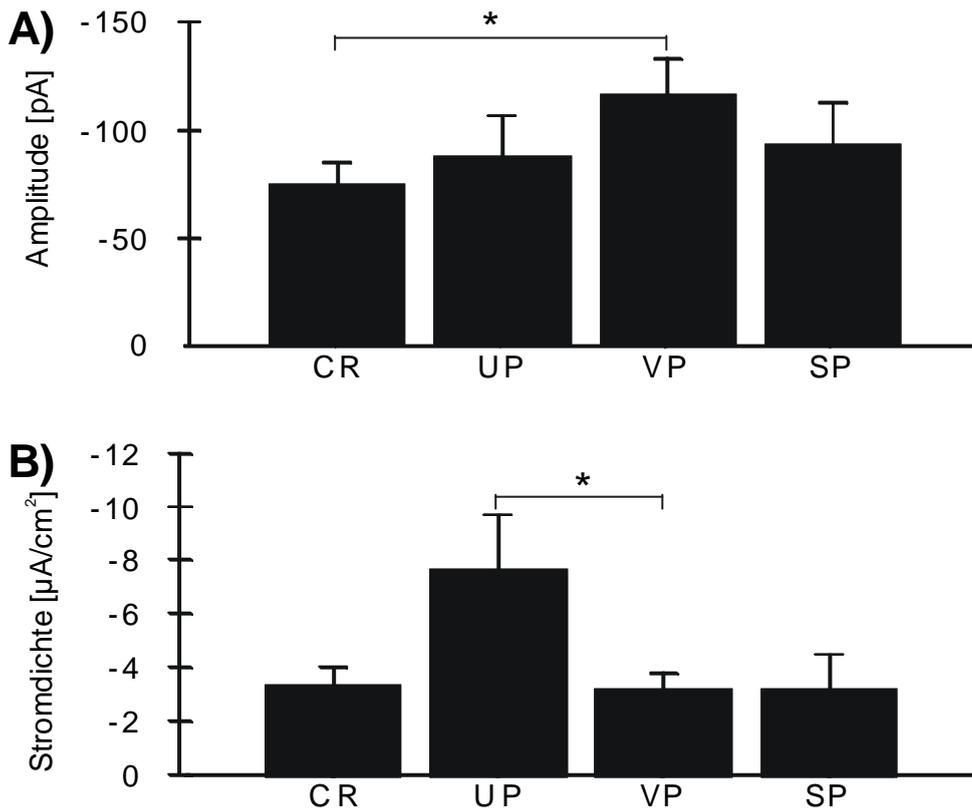


Abb. 26 Maximale Amplituden (A) und relativierten Stromdichten (B) der Plateaukomponente. Damit stellt dieser Parameter eine Möglichkeit dar, *unverzweigte Pyramidenzellen* von den reiferen und stärker ramifizierten Pyramidenzellen nach elektrophysiologischen Kriterien zu unterscheiden.

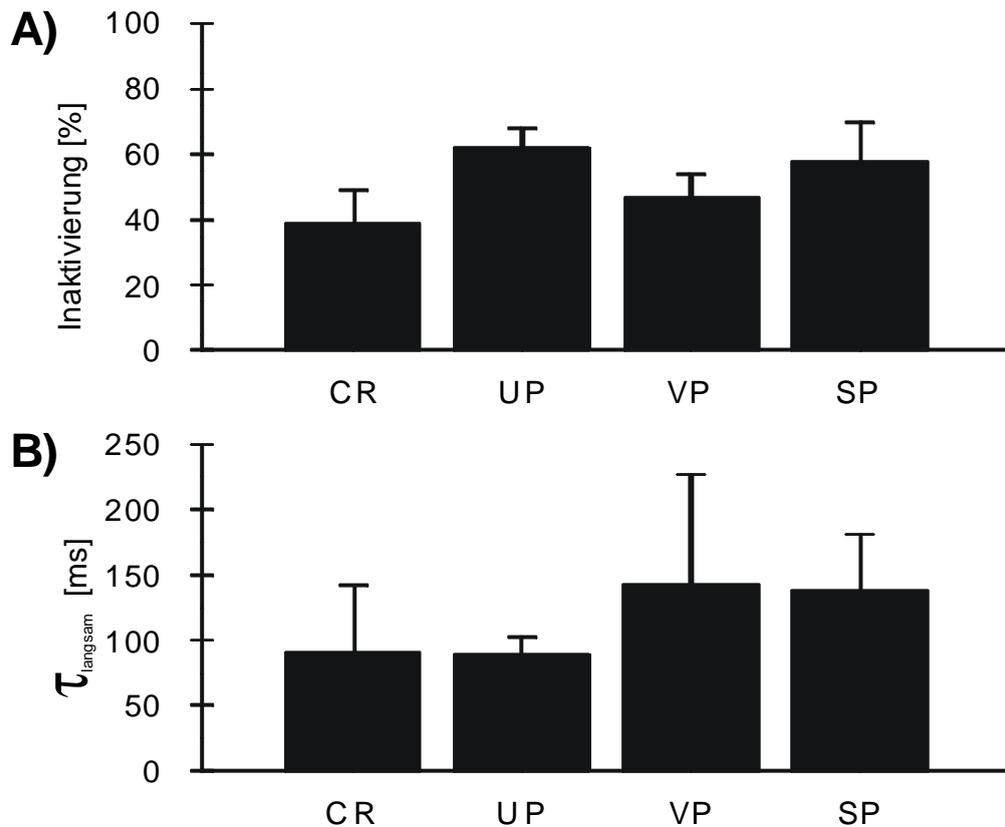


Abb. 27 In Abb. (A) ist das prozentuale Verhältnis der Amplitude der persistierenden Komponente am Ende der Depolarisation zur Spitzenstromamplitude dargestellt. Abb. B stellt die Inaktivierungszeitkonstante τ_{langsam} der persistierenden Komponente für alle Zelltypen dar.

Das Größenverhältnis der Amplituden der transienten Komponente zu der Plateaukomponente wird als prozentuale Inaktivierung bezeichnet. Dieser Wert lässt eine Aussage über den Anteil der transienten Komponente am Gesamtkalziumstrom zu. CR Neurone hatten mit $39 \pm 10 \%$ ($n=6$) den geringsten prozentuellen Inaktivierungsgrad. Die Inaktivierung bei UP Zellen dagegen war mit $62 \pm 6 \%$ ($n=8$) am stärksten. VP Zellen und SP Neurone bewegten sich mit $47 \pm 7 \%$ ($n=12$) und $58 \pm 12 \%$ ($n=7$) Inaktivierung zwischen CR und UP Zellen (Abb. 27 A). Diese Werte differierten somit zwischen den vier Zelltypen nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$). Die Zeitkonstante für die Inaktivierung der langsamen Kalziumstromkomponente betrug bei CR Neuronen und UP Zellen etwa 90 ms, während dieser Wert für VP Zellen und CR Neurone bei etwa 140 ms lag (Abb. 27B). Diese Differenz war statistisch nicht signifikant ($\alpha = 0,05$).

Die Deaktivierungskinetik der Kalziumströme wurde untersucht, indem durch ein

Spannungssprung von +10 mV auf -50 mV Nachströme aktiviert wurden. Durch eine biexponentielle Regressionsanalyse dieser evozierten Nachströme ergab sich eine schnelle ($\tau_{\text{schnelle Deaktivierung}}$) und eine langsame ($\tau_{\text{langsame Deaktivierung}}$) Zeitkonstante. In der Population der CR Neurone belief sich $\tau_{\text{schnelle Deaktivierung}}$ auf $0,36 \pm 0,03$ ms (n=6), bei UP Zellen auf $0,43 \pm 0,08$ ms (n=4), bei VP Zellen auf $0,39 \pm 0,02$ ms (n=6) und bei SP Neuronen auf $0,85 \pm 0,21$ ms (n=6). Diese Unterschiede zwischen den Zellpopulationen waren statistisch nicht signifikant ($\alpha = 0,05$) (Abb. 28A).

Der Wert für $\tau_{\text{langsame Deaktivierung}}$ betrug bei CR Neuronen $3,4 \pm 0,4$ ms (n=6), bei UP Zellen $4,2 \pm 1,2$ ms (n=3), bei VP Zellen $4,5 \pm 0,8$ (n=4) und bei SP Neuronen $6 \pm 0,9$ ms (n=6). CR und SP Neuronen unterscheiden sich damit in diesem Parameter signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$) (Abb. 28B).

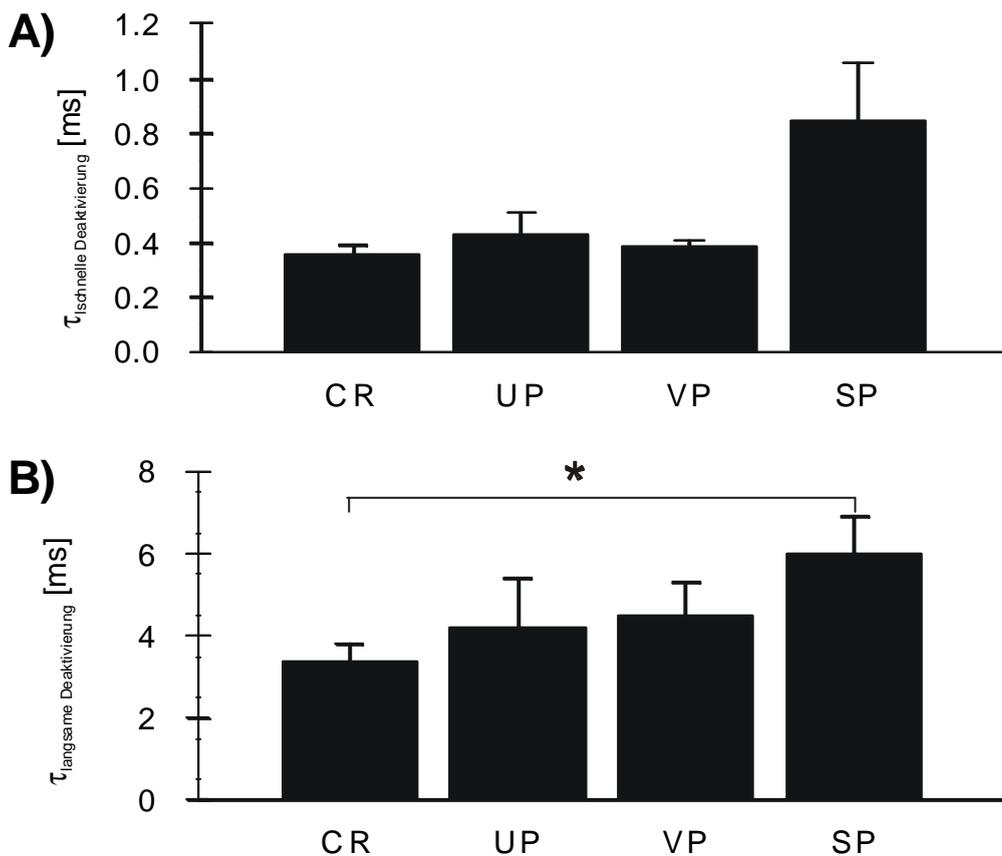


Abb. 28 In (A) sind die schnellen und in (B) die langsamen Deaktivierungszeitkonstanten für die vier untersuchten Zelltypen dargestellt.

3.4. Die synaptische Konnektivität des neonatalen Neokortex

Neben der Charakterisierung intrinsischer Parameter ist die Beschreibung der interzellulären Kommunikation über Transmitter von essentieller Bedeutung für das Verständnis der Physiologie des unreifen Neokortex. Synaptische Netzwerkaktivität wurde durch extrazelluläre Stimulation mit einer bipolaren Reizelektrode und unterschiedlichen Ladungsmengen in der tiefen *Subplatte* angeregt.

Durch die Wahl dieses Reizortes wurden verschiedene Elemente des Netzwerkes stimuliert. Es wurden neben orthodromer Stimulation thalamo-kortikaler afferenter Axone, kortiko-kortikale Verbindungen ortho- und antidrom und *Subplattenneurone* direkt stimuliert. Möglicherweise vorhandene kortiko-thalamische Efferenzen würden durch diesen Stimulationsort ebenfalls erregt.

Für die Reizung wurde eine bipolare Reizelektrode verwendet und 50 bis 200 μ s lange Reizimpulse zunehmender Stärke in der tiefen *Subplatte* gegeben, bis maximale Antworten gemessen werden konnten. Dann wurde in der Regel die Reizstromstärke um ca. 50% vermindert, um eine schnelle Ermüdung des Netzwerkes zu verhindern.

Die Ableitungen wurden im Ganzzellmodus in der *Marginalzone*, *kortikalen Platte* und *Subplatte* oberhalb der Reizelektrode vorgenommen. Die Amplitude und Dauer postsynaptischer Antworten war durch die Reizintensität, Reizdauer und der Reizfrequenz zu beeinflussen. Es wurden zwischen zwei Reizen in der Regel Pausen von >30s eingelegt, um die Antworten zu stabilisieren und einen „run-down“ zu verhindern. Kürzere Interstimulusintervalle führten regelmäßig zu einer sehr starken Verminderung und häufig sogar zum irreversiblen Erlöschen der postsynaptisch nachweisbaren Aktivität.

3.4.1. Verteilung postsynaptischer Antworten nach orthodromer Stimulation

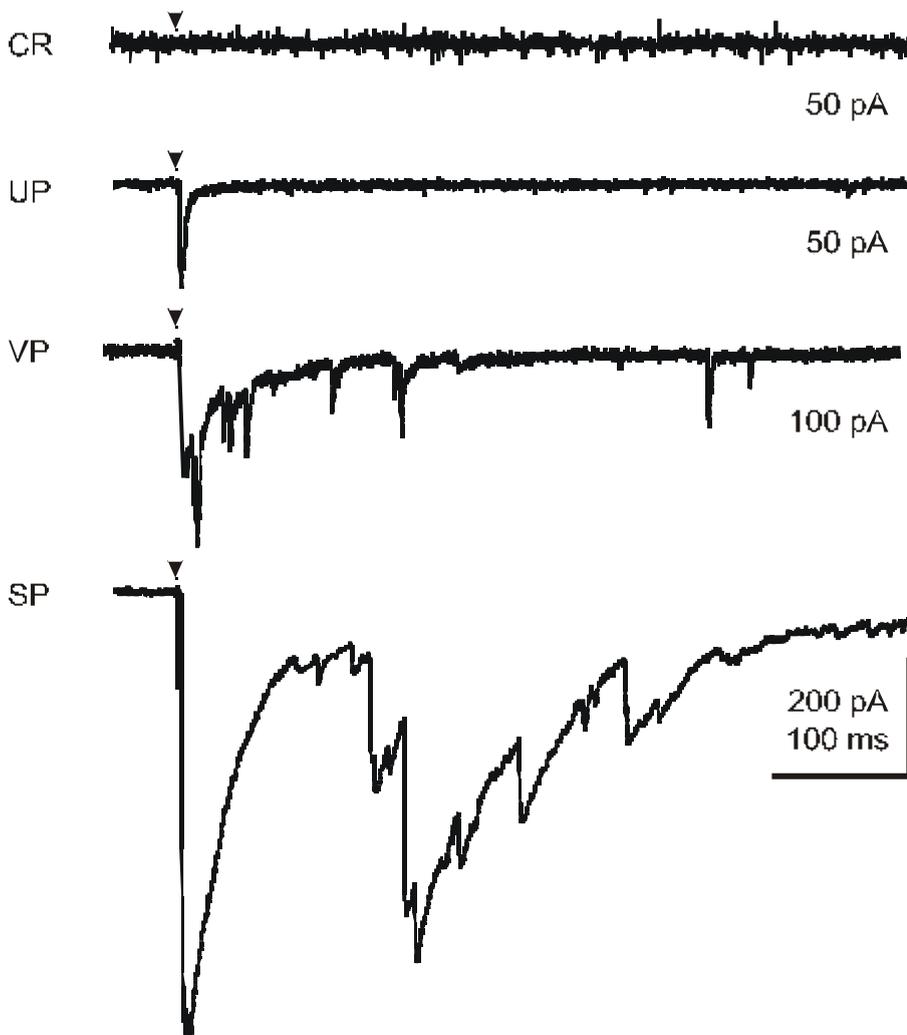


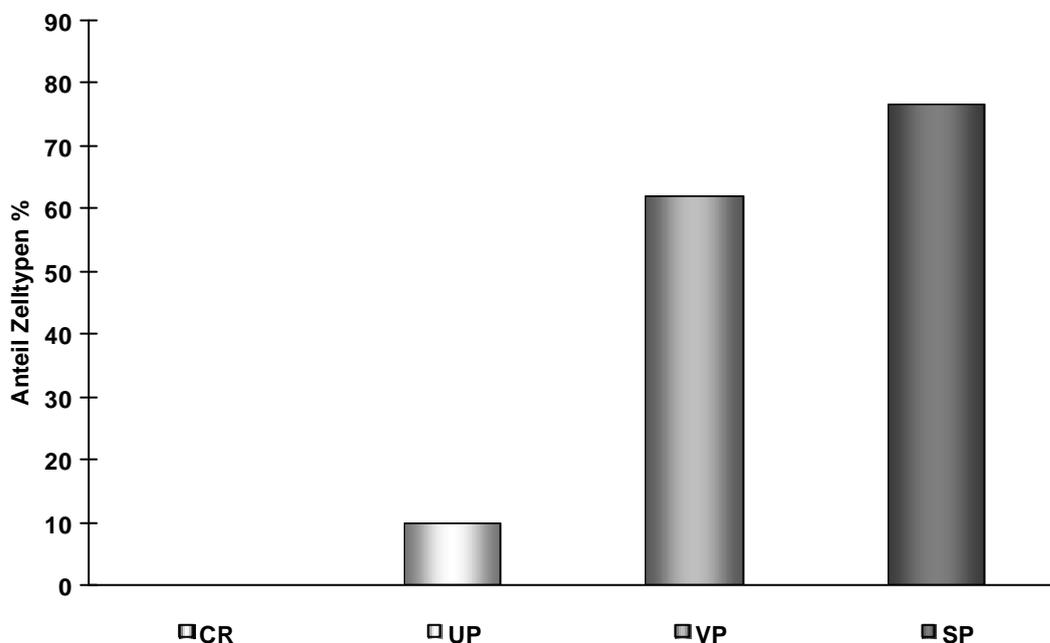
Abb. 29 In dieser Abbildung sind (von oben nach unten) typische Antwortmuster eines P4 CR Neurons der *Marginalzone*, einer P2 UP Zelle der *kortikalen Platte*, einer P2 VP Zelle der tiefen *kortikalen Platte* und eines P0 SP Neurons bei orthodromer Stimulation dargestellt. Alle Zellen wurden bei einem Membranpotenzial von -90 mV gehalten. Der Zeitpunkt der Stimulation ist durch Pfeile markiert.

Typische postsynaptische Ströme und Potenziale dauerten mehrere hundert Millisekunden und bestanden aus mehreren übereinandergelagerten Komponenten.

Dabei waren diese langen mehrphasigen Antworten, abhängig von der Reizstärke und Reizfrequenz vorwiegend in *Subplattenneuronen* und verzweigten Pyramidenzellen der tieferen *kortikalen Platte* zu messen.

Unverzweigte Pyramidenzellen zeigten in der Regel lediglich monosynaptische Antworten, während *Cajal-Retzius* Neurone bei Stimulation in der darunter liegenden *Subplatte* keine postsynaptische Antworten zeigten (Abb. 29 und 30).

Nur eine von acht untersuchten *unverzweigten Pyramidenzellen* zeigte eine polysynaptische Antwort, während dieses bei 62 % der verzweigten Pyramidenzellen



der Fall war (n=34) (Abb. 30). Unter den gleichen Bedingungen konnte in 76,6 % aller *Subplattenneurone* ein polysynaptischer Eingang festgestellt werden (n=33) (Abb. 30).

Abb. 30 Die prozentuale Verteilung polysynaptischer postsynaptischer Aktivität der verschiedenen Neuronentypen nach überschwelliger orthodromer Stimulation in der tiefen *Subplatte* bzw. weißen Substanz.

Wegen der ungleichen synaptischen Konnektivität nach orthodromer Stimulation in den darunter liegenden Schichten bei SP und BP Zellen einerseits, und UP und CR Neurone andererseits, wurden im Folgenden nur Ableitungen von VP und SP Neuronen zur weiteren Charakterisierung der langanhaltenden polysynaptischen

Aktivität vorgenommen. Entscheidenden Faktoren, die Einfluss auf Dauer und Intensität der synaptischen Aktivität haben, werden im Folgenden genauer dargestellt.

3.4.2. Modulation polysynaptischer Netzwerkaktivität

Wie in Abb. 31A gezeigt wird, ist die Amplitude und Dauer der postsynaptischen Ströme stark von der vorausgehenden Reizintensität abhängig. Eine Erhöhung der Reizstärke vom Schwellenwert aus, führte zu einer Verstärkung der postsynaptischen Aktivität.

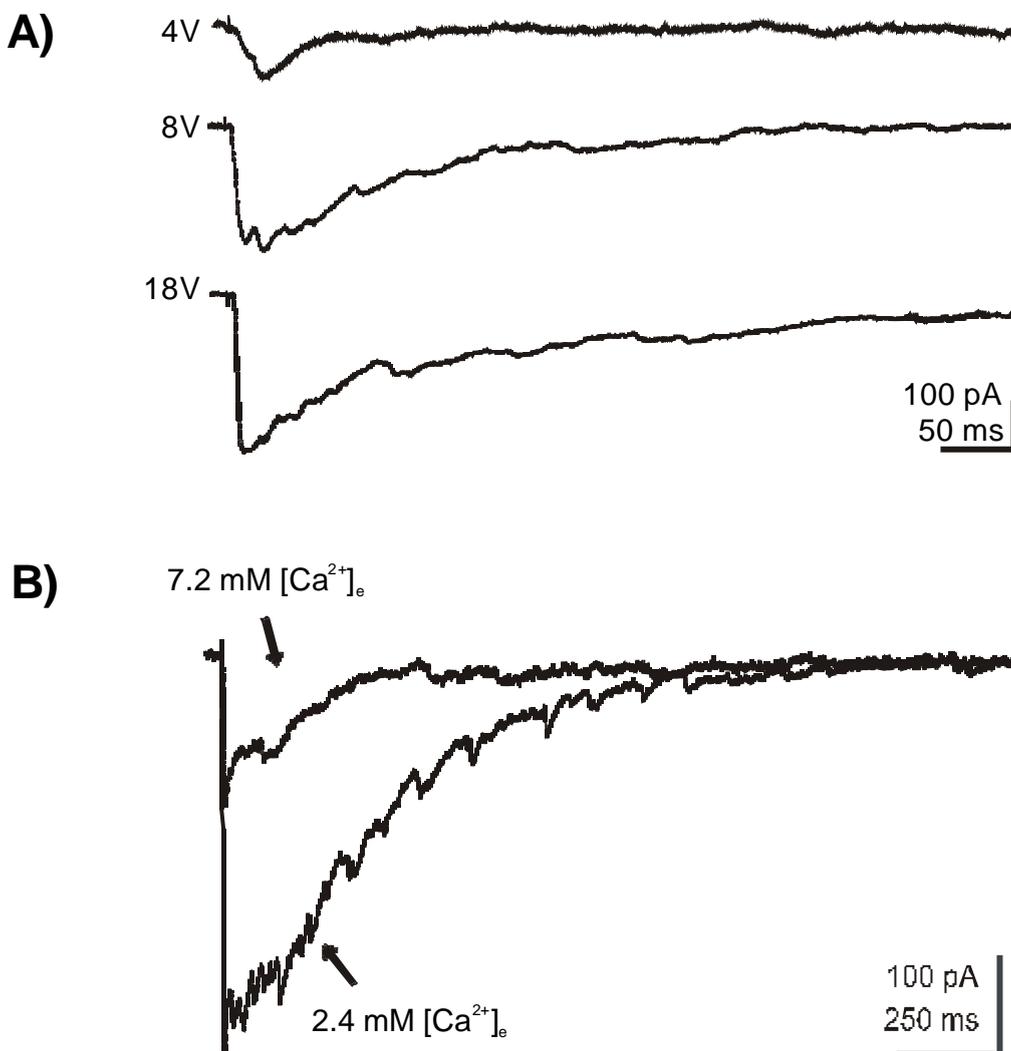


Abb. 31 (A) Postsynaptische Ströme einer P5 VP Zelle nach Stimulation in der tiefen *Subplatte*. Die Zelle wurde bei -90 mV Membranpotenzial gehalten. Die Stimulusintensität wurde graduell von

4 auf 18 V erhöht. In (B) ist die Ableitung von einem P4 SP Neurons zu sehen, das bei -90 mV Membranpotenzial gehalten wurde. Die Stimulation fand in der darunter liegenden tiefen *Subplatte* statt. Gezeigt sind polysynaptische Ströme bei 2,4 und 7,2 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration unter ansonsten identischen Reiz- und Ableitbedingungen.

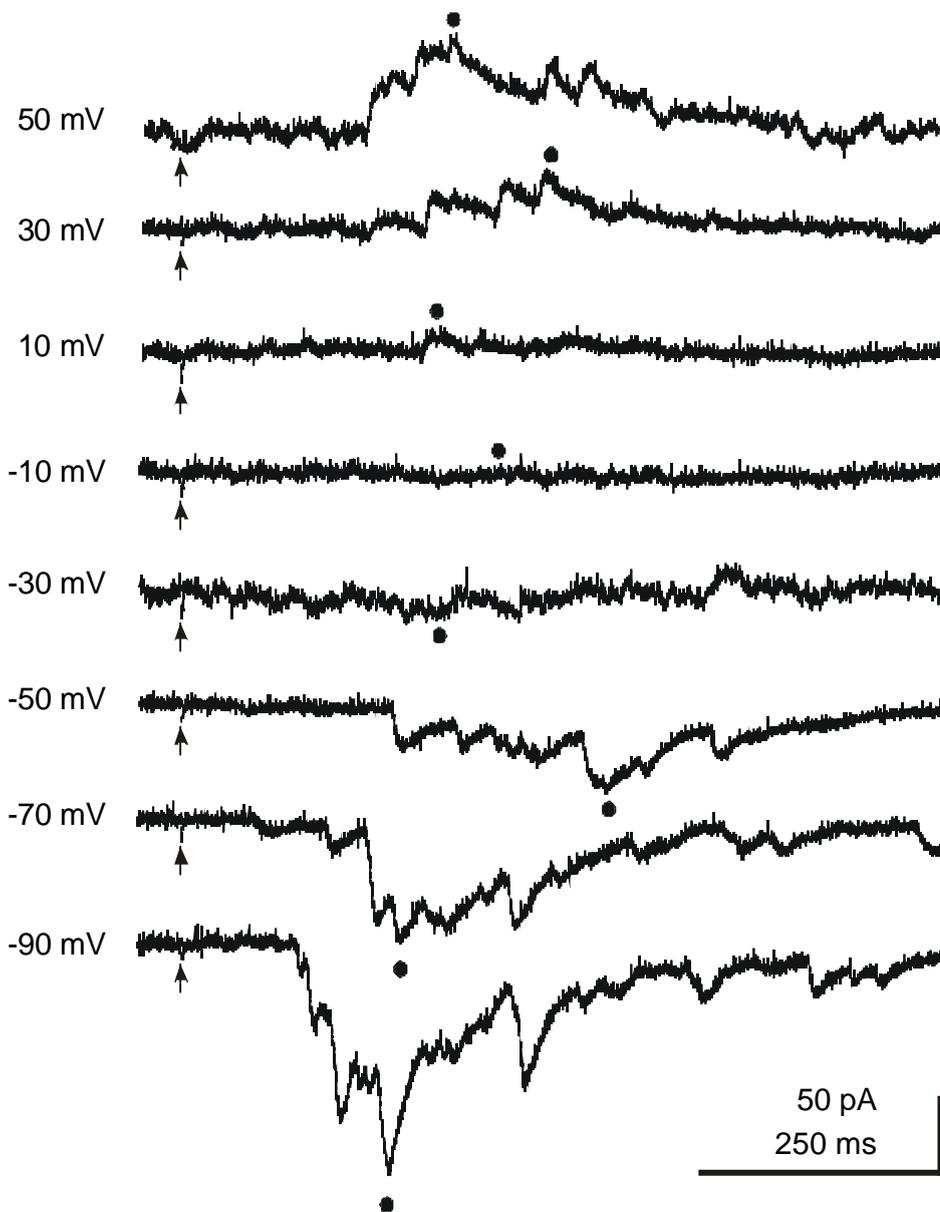
Die Verstärkung der synaptischen Aktivität machte sich sowohl durch eine zunehmende Erhöhung der Amplituden, als auch durch eine zunehmender Dauer der postsynaptischen Ströme bemerkbar. Nicht selten konnte die Aktivität bis zu 1000 ms andauern.

Sehr häufig konnte weiterhin ab einer bestimmten Reizintensität das Auftreten deutlicher polysynaptischer Ströme beobachtet werden, was sich durch mehrgipflige postsynaptische Ströme oder Potenziale bemerkbar machte.

Oft war es nicht möglich, durch eine Reduktion der Reizstärke oder der Reizdauer die polysynaptische Aktivität zu unterbinden. In diesen Fällen konnten die Aktivität zum Teil durch eine Veränderung des Stimulusortes reduziert werden.

Wenn auch diese nicht gelang, wurde zu einem weiteren Mittel gegriffen. Durch eine Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration von 2,4 auf 7,2 mM konnte in allen Fällen eine Reduktion von Amplitude und Dauer postsynaptischer Ströme erreicht werden (Abb. 31B).

Unter den erhöhten externen Kalziumkonzentrationen „ermüden“ polysynaptische Verbindungen eher als direkte monosynaptische Verbindungen zwischen gepaarten Neuronen. Damit stellt diese pharmakologische Beeinflussung eine adäquate Möglichkeit zur Reduktion unerwünschter polysynaptischer Aktivität dar.



3.4.3. Die Strom-Spannungs Beziehung polysynaptischer Antworten

Abb. 32 In dieser Abbildung ist die Ableitung evozierter postsynaptischer Ströme von einer VP Zelle (P2) der *kortikalen Platte* nach Stimulation in der tiefen *Subplatte* bei verschiedenen Membranpotenzialen dargestellt (KCl-Lösung). Zu den Zeitpunkten, die mit einem Punkt markiert sind, wurden die Amplituden für die Strom-Spannungsbeziehung ermittelt.

In Abb. 32 ist die Ableitung von einer VP Zelle der *kortikalen Platte* einer Ratte (P2) dargestellt, bei der polysynaptische postsynaptische Ströme bei verschiedenen Membranpotenzialen evoziert wurden. Deutlich ist die polysynaptische Natur der Ströme an den mehrgipfeligen Kurvenformen zu erkennen.

Bei negativen Membranpotenzialen handelte es sich um Einwärtsströme, bei positiven Membranpotenzialen um Auswärtsströme. Das Umkehrpotenzial der Ströme betrug etwa 0 mV.

Da das Membranpotenzial unter physiologischen Bedingungen negativ ist, sind diese polysynaptischen Ströme in der untersuchten Altersgruppe stets Einwärtsströme und damit exzitatorisch. Die mit einem gefüllten Kreis markierten Amplituden wurden für die Darstellung der Strom-Spannungsbeziehung in Abb. 33 ausgewertet.

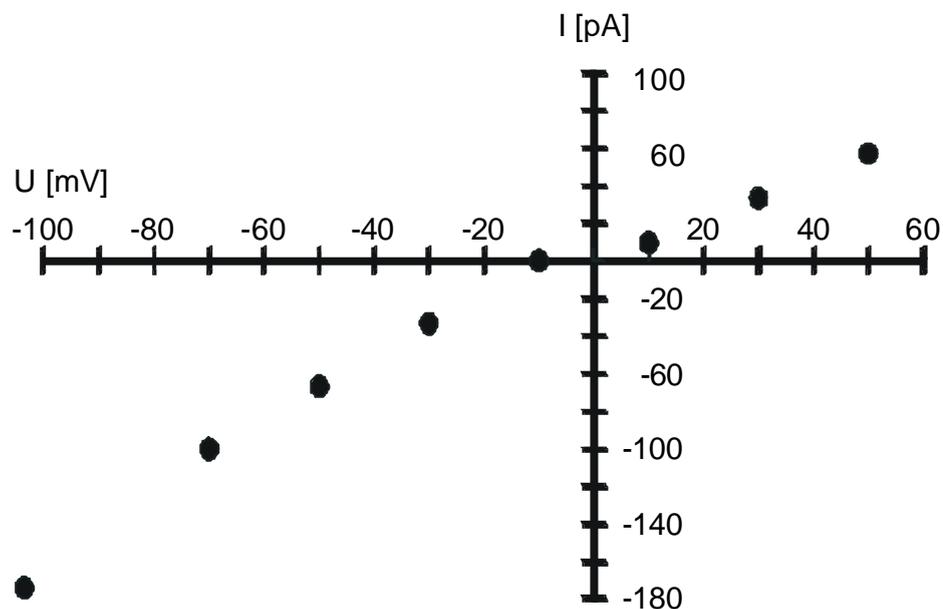


Abb. 33 Hier ist die Strom-Spannungsbeziehung der Ableitung aus Abb. 31 dargestellt. Dazu wurden die Amplituden einzelner Ereignisse der postsynaptischen Ströme zu den markierten Zeitpunkten bestimmt und gegen das Haltepotenzial aufgetragen.

Im Bereich von -100 mV bis +50 mV war die I-U Beziehung nahezu linear (Abb. 33). Dieser Befund impliziert, dass die polysynaptischen postsynaptischen Ströme keine ausgeprägte Mg^{2+} -abhängige NMDA-Komponente enthielten, oder wenn diese vorhanden war, kein spannungsabhängiger Block bei negativen Membranpotenzialen vorlag.

3.5. Transmittersysteme der Netzwerke des unreifen Neokortex

3.5.1. Die Natur monosynaptischer Verbindungen

Die Natur der involvierten rezeptorvermittelten Ströme wurde im Folgenden durch pharmakologische Studien weitergehend untersucht.

Zu diesem Zweck wurde mit einer bipolaren Reizelektrode in der tiefen *Subplatte* kurz oberhalb der weißen Substanz mit Pulsen von 50 - 200 μ s gereizt und von darüber liegenden *Subplattenneuronen* und verzweigten Pyramidenzellen im Ganzzellmodus bei einem Haltepotenzial von -90 mV abgeleitet.

Die Reizstärke wurde so gewählt, dass nur postsynaptische Ströme (EPSCs) mit monoexponentiell abfallender Flanke und kurzer Latenz, also monosynaptische Antworten evoziert wurden.

Dieses wurde erreicht, indem die Reizstärke von deutlich überschwelligen Stärken langsam verringert wurde, bis lediglich isolierte, monoexponentiell abfallende Ströme zu messen waren.

Anschließend wurden die Glutamatrezeptor-Antagonisten NBQX (10 μ M), DL-APV (30 μ M) oder der GABA_A-Rezeptor Antagonist BMI (5 μ M) zu der Badlösung hinzugefügt.

Der Effekt der Pharmaka auf die maximale Amplitude wurde bei dieser Untersuchung als auszuwertender Parameter gewählt.

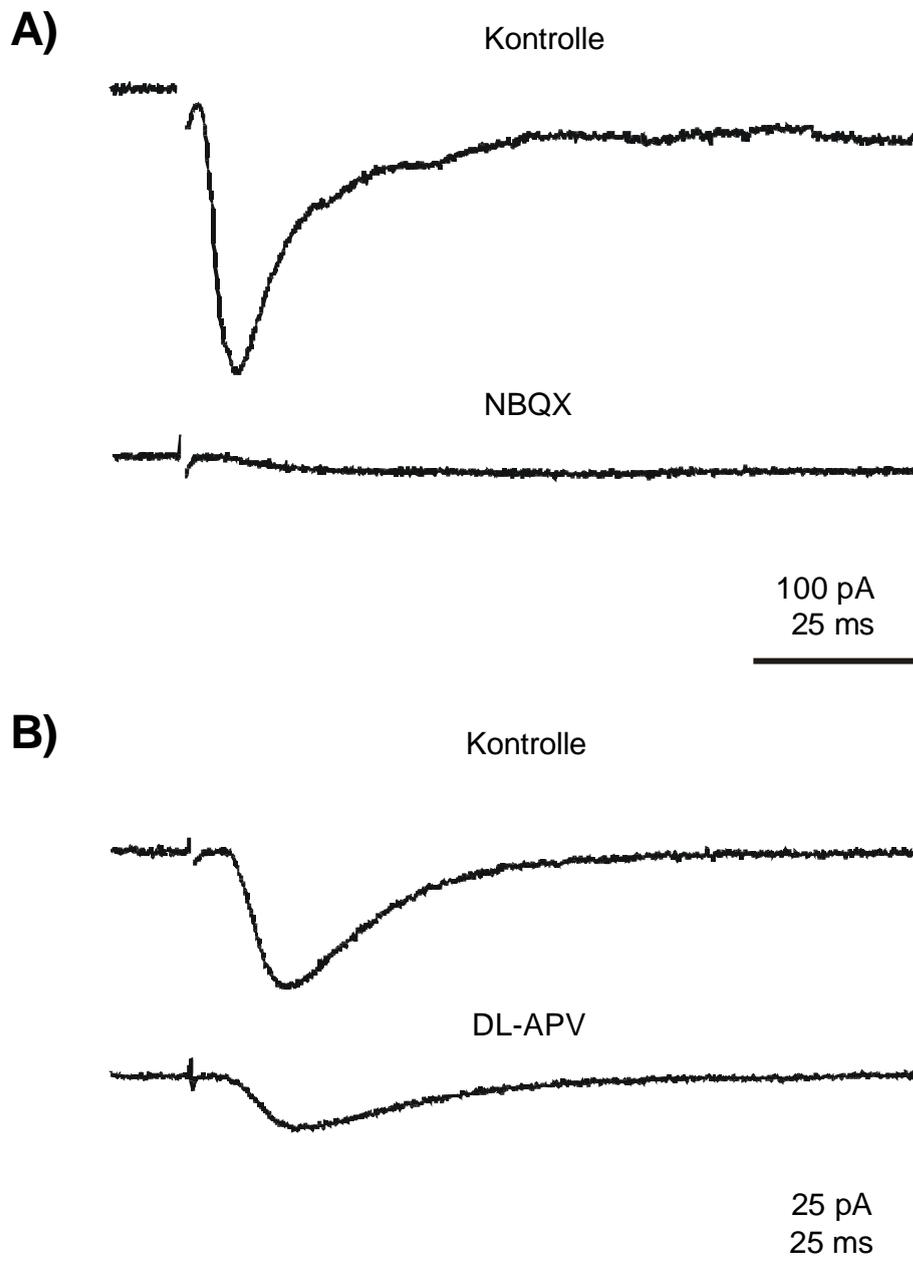


Abb. 34 (A) Monosynaptischer postsynaptischer Strom in einer P1 VP Zelle bei -90 mV Membranpotenzial. Durch die Applikation von $10 \mu\text{M}$ NBQX konnte der postsynaptische Strom blockiert werden. (B) Effekt von $25 \mu\text{M}$ DL-APV auf den evozierten postsynaptischen Strom in einer PO VP Zelle bei -90 mV Membranpotenzial.

Der AMPA-Antagonist NBQX hatte einen starken inhibitorischen Effekt auf die Spitzenamplitude der monosynaptischen Antwort. Nur eine kleine späte Komponente blieb nach der Applikation des Antagonisten übrig (Abb. 34A). Im Gegensatz

zu NBQX hatte der NMDA-spezifische Antagonist DL-APV einen geringeren inhibitorischen Einfluss auf die EPSCs (Abb. 34B).

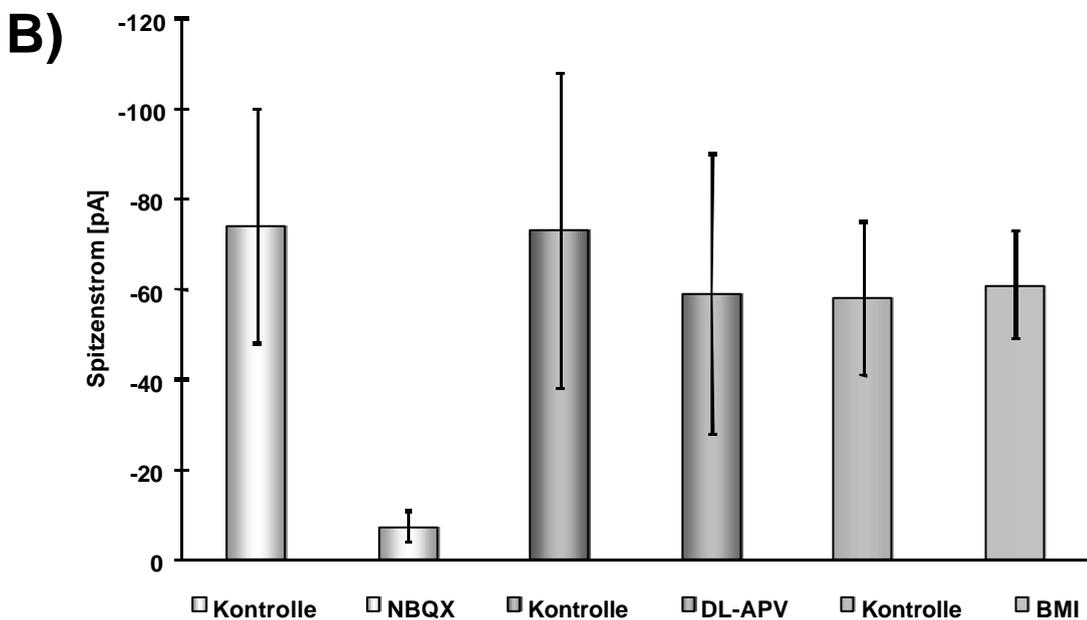
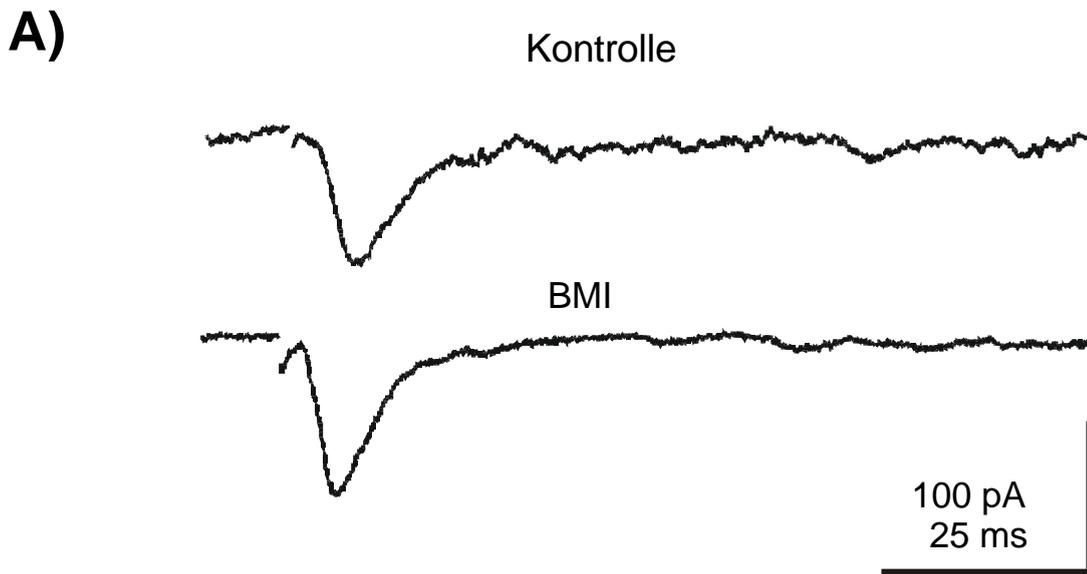


Abb. 35 (A) Effekt von 10 μ M BMI auf einen monosynaptischen postsynaptischen Strom in einem P1 *Subplatten*neuron. Die Zelle wurde bei einem Membranpotential von -90 mV gehalten. In (B) sind die Wirkungen von 10 μ M NBQX (n=11), 25 μ M DL-APV (n=8) und 10 μ M BMI (n=5) auf monosynaptische postsynaptische Ströme dargestellt.

Der Anteil GABAerger Komponenten an postsynaptischen Antworten wurde durch die Applikation des spezifischen GABA_A-Antagonisten BMI bei einer verzweigten Pyramidenzelle und 4 *Subplattenneuronen* untersucht. Die Resultate wurden gepoolt.

An der gezeigten Ableitung in Abb. 35A ist zu sehen, dass dieser Antagonist keinen deutlichen inhibitorischen Effekt auf monosynaptische Ströme hatte. BMI zeigte im Mittel bei einer Badkonzentration von 10 µM eine im Zweistichproben T-Test nicht signifikante Vergrößerung ($\alpha=0,05$) der postsynaptischen Stromamplituden von -58 ± 17 pA auf -61 ± 12 pA (n=5) (Abb. 35B).

An insgesamt 2 *Subplattenneuronen*, 2 *unverzweigten Pyramidenzellen* und 7 verzweigten Pyramidenzellen wurde die Wirkung des AMPA/Kainat-Rezeptorantagonisten NBQX untersucht. Die Resultate wurden gepoolt. Diese Versuche zeigten, dass 10 µM Bad-appliziertes NBQX monosynaptische postsynaptische Ströme von durchschnittlich -74 ± 26 pA auf $-7,5 \pm 3,4$ pA (n=11) reduzierte (Abb. 35B). Diese starke Reduktion der Amplituden war im Zweistichproben T-Test signifikant ($\alpha = 0,05$).

Die spezifische Blockade von NMDA-Rezeptoren mit DL-APV wurde an insgesamt 6 *Subplattenneuronen* und 2 verzweigten Pyramidenzellen untersucht. Die Ergebnisse wurden gemeinsam ausgewertet. In Konzentrationen von 25 bis 30 µM verringerte Bad-appliziertes DL-APV die Amplituden postsynaptischer Ströme im Zweistichproben T-Test nicht signifikant von durchschnittlich -73 ± 35 pA auf -59 ± 31 pA (n=8) (Abb. 35B) ($\alpha = 0,05$).

3.5.2. Die Pharmakologie der Netzwerkaktivität des unreifen Neokortex

Wie oben beschrieben wurde, konnte nur ein schwacher Effekt des GABA_A-Rezeptor Antagonisten BMI auf isolierte monosynaptische Ströme gefunden werden.

Es ist jedoch bekannt, dass im Neokortex GABA z.B. in *Cajal-Retzius* Neuronen und Neuronen der *Subplatte* vorliegt. Möglicherweise wurden bei der Untersu-

chung der monosynaptischen Verbindungen diese Neurone nicht ausreichend stimuliert.

Weitere Versuche wurden daher unternommen, um die Netzwerkeigenschaften des unreifen Neokortex zu analysieren. Dazu wurde in einem ähnlichen Versuchsparadigma die Reizstärke stark überschwellig gewählt. Die Folge waren polyphasische Ströme in den untersuchten VP und SP Neuronen.

Da diese Antworten stark von der Reizstärke abhingen und durch eine Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration reduziert werden konnten (vgl. Abb. 31A +B), handelte es sich hier um eine massive polysynaptische Netzwerkaktivität.

Bei einem Haltepotenzial von -90 mV wurde bei diesen Ableitungen der prozentuale Effekt der drei Glutamat- und GABA-Antagonisten, DL-APV, NBQX und BMI auf den postsynaptischen Stromfluss untersucht.

Der Gesamtstromfluss setzt sich aus mehreren beteiligten Ionenströmen zusammen. Er wurde durch die Integration der Fläche zwischen der Basislinie und der Spur ermittelt.

Der AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonist NBQX zeigte im Gegensatz zu der starken Inhibition isolierter monosynaptischer Ströme in diesem Versuchsparadigma nur einen relativ geringen Einfluss auf polysynaptische postsynaptische Ströme. Dies wird in der exemplarischen Ableitung in Abb. 36A deutlich.

Im Mittel reduzierte die Gabe von 10 μ M NBQX den Stromfluss in den postsynaptischen Neuronen von 100 ± 35 % auf 62 ± 22 % ($n=8$) (Abb. 37B). Die Reduktion war in dem verwendeten Zweistichproben T-Test jedoch nicht signifikant verschieden von den Kontrollableitungen ($\alpha= 0,05$). Die beobachtete Reduktion stützt aber die Beobachtung, dass AMPA/Kainat-Rezeptoren bereits in unreifen kortikalen Netzwerken eine Rolle bei der schnellen synaptischen Transmission spielen können.

Neben den AMPA/Kainat-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Strömen wurden die NMDA-Rezeptor vermittelten Ströme durch den spezifischen Antagonisten DL-APV untersucht.

Eine deutlich stärkere, im Zweistichproben T-Test signifikante Reduktion polysynaptischer Stromflüsse konnte durch die Applikation des NMDA-spezifischen An-

tagonisten DL-APV erreicht werden ($\alpha = 0,05$). Durch die Bad-Applikation von 25 bis 30 μM DL-APV wurde in diesen Versuchen eine Reduktion des postsynaptischen Gesamtstromflusses von $100 \pm 38 \%$ auf $38 \pm 14 \%$ erreicht ($n=7$) (Abb. 37B).

Wie der Ableitung in Abb. 36B zu entnehmen ist, bewirkte dieser Antagonist vor allem eine Inhibition der späten polysynaptischen Antworten, während die initialen monosynaptischen Antworten jedoch weitgehend unbeeinflusst blieben. Wegen der lang anhaltenden späten Komponenten der polysynaptischen Ströme von bis zu 1000 ms wurde das Integral der Stromamplitude über die Zeit mit dem NMDA-Antagonisten besonders stark reduziert.

Der Anteil einer GABAerger Netzwerkkomponente wurde durch die Blockade GABAerger Rezeptoren nach Applikation des spezifischen GABA_A-Antagonisten BMI untersucht. Obwohl in den Versuchen zu isolierten monosynaptischen Strömen kein nennenswerter Effekt von BMI beobachtet werden konnte, bewirkte BMI in diesen Versuchen stets eine starke Reduktion der polysynaptischen Antworten, wie in der Ableitung in Abb. 36A zu sehen ist.

An insgesamt 7 *Subplattenneuronen* und 6 verzweigten Pyramidenzellen wurde der Effekt von BMI untersucht. Bei Applikation von 5 μM BMI verringerten sich die Maximalamplituden der postsynaptischen Ströme im Zweistichproben T-Test signifikant von $-195,8 \pm 58,7 \text{ pA}$ auf $-57,8 \pm 15,3 \text{ pA}$ ($n=13$) ($\alpha= 0,05$). Gleichzeitig verringerte sich der polysynaptische postsynaptische Stromfluss im Zweistichproben T-Test signifikant von $71,3 \pm 14,4$ auf $24,1 \pm 7,3 \text{ pAs}$ ($\alpha= 0,05$). Dieser Wert entspricht einer prozentualen Reduktion von $100 \pm 28 \%$ auf durchschnittlich $36 \pm 10 \%$ ($n=13$) (Abb. 37B). Diese prozentuale Reduktion war statistisch ebenfalls signifikant.

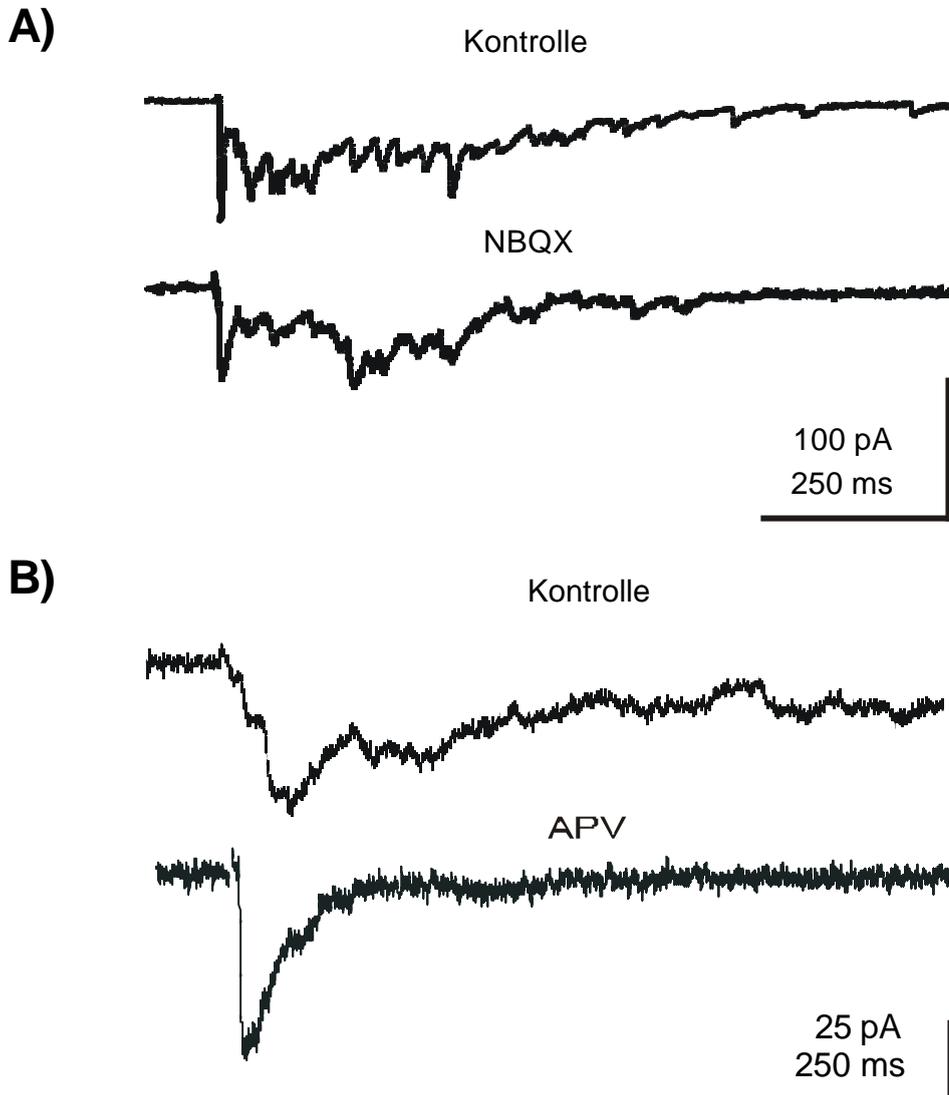


Abb. 36 In dieser Abbildung sind die Effekte der Glutamaterezeptor-Antagonisten NBQX (10 μ M) und DL-APV (30 μ M) auf polysynaptische postsynaptische Ströme in P1 (A) und P0 (B) VP Neuronen der *kortikalen Platte* dargestellt. Die Ströme wurden durch Stimulation in der tiefen *Subplatte* evoziert.

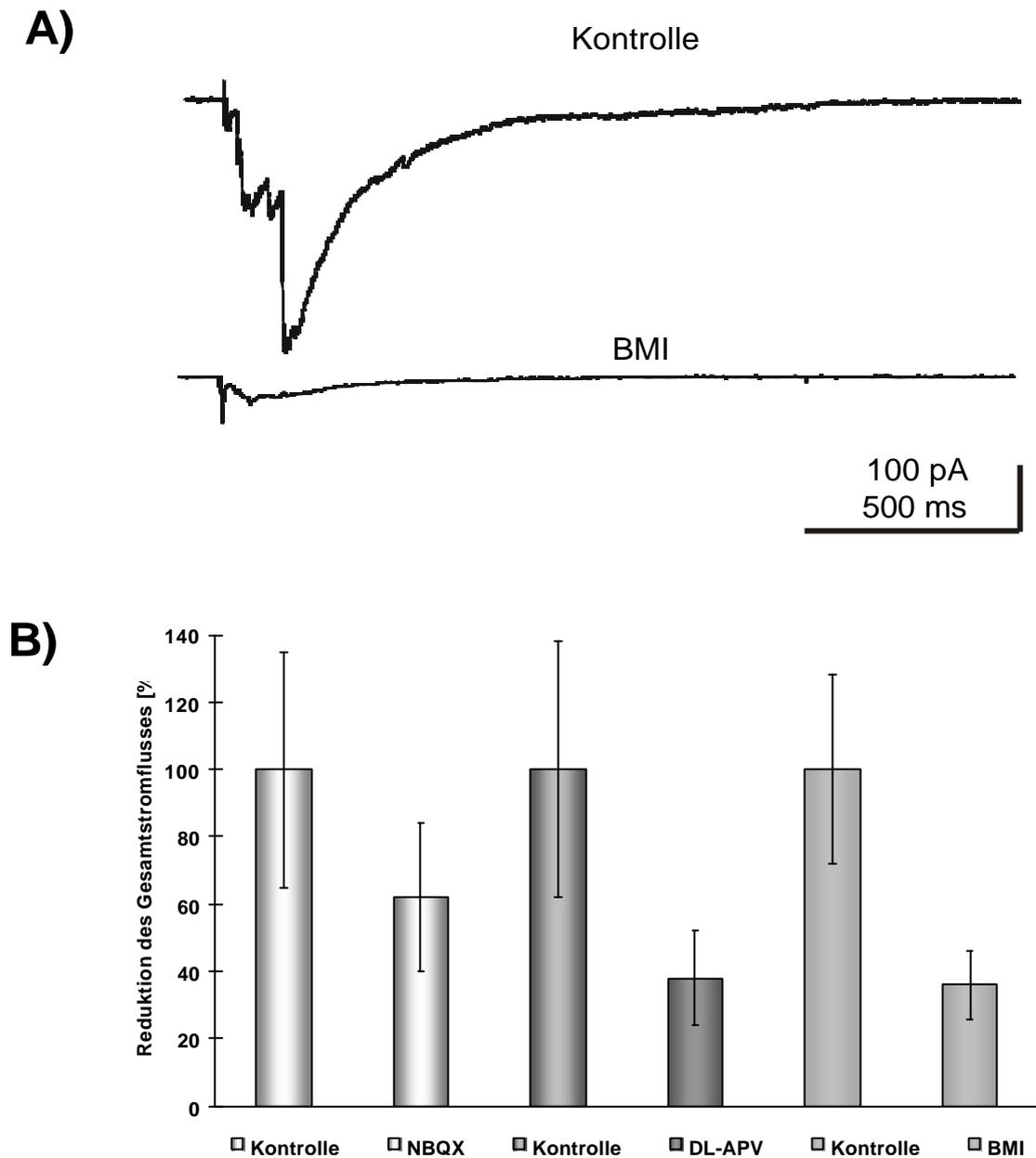


Abb. 37 (A) Effekt von 5 μ M BMI auf polysynaptische postsynaptische Ströme einer P4 verzweigten Pyramidenzelle der *kortikalen Platte*. Die Stimulation erfolgte in der darunter liegenden *Subplatte*. (B) Quantitative Effekte von Bad-appliziertem NBQX (n=8), DL-APV (n=7) und BMI (n=13) auf den polysynaptischen postsynaptischen Stromfluss. Die Ergebnisse sind normalisiert dargestellt.

3.6. Ist die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im perinatalen Neokortex funktionell aktiv?

Nachdem die Beteiligung des NMDA-Rezeptors an der Netzwerkaktivität des unreifen Neokortex in den vorangegangenen Versuchen verdeutlicht wurde, stellte sich die Frage, welche Untereinheitenkonstitution dieser Rezeptor im neonatalen Kortex hat.

Die Untereinheitenzusammensetzung ist von entscheidender Bedeutung für die Kinetik des Ionenkanals.

Daher wurde in einer weiteren Untersuchung die Anwesenheit der NR2B Untereinheit des NMDA Rezeptors pharmakologisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Effekt von 10 μM Ifenprodil, einem NR2B-spezifischen Antagonisten, auf monosynaptische postsynaptische Ströme getestet. Die Resultate sind auf der folgenden Seite dargestellt.

Ähnlich wie DL-APV inhibierte Ifenprodil die Spitzenamplitude der monosynaptischen Antwort (Abb. 38A). In dieser Studie führte der Antagonist zu einer Verringerung der Amplituden bei -90 mV Membranpotenzial von durchschnittlich -35 ± 13 pA auf -25 ± 13 pA ($n=10$) (Abb. 38B).

Diese Inhibition zeigte mit den verwendeten statistischen Testverfahren keine Signifikanz.

Durch den beobachteten Effekt konnte jedoch trotzdem gezeigt werden, dass die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im neonatalen Kortex entscheidend an der Zusammensetzung des funktionellen NMDA-Rezeptor-Kanalproteins beteiligt ist.

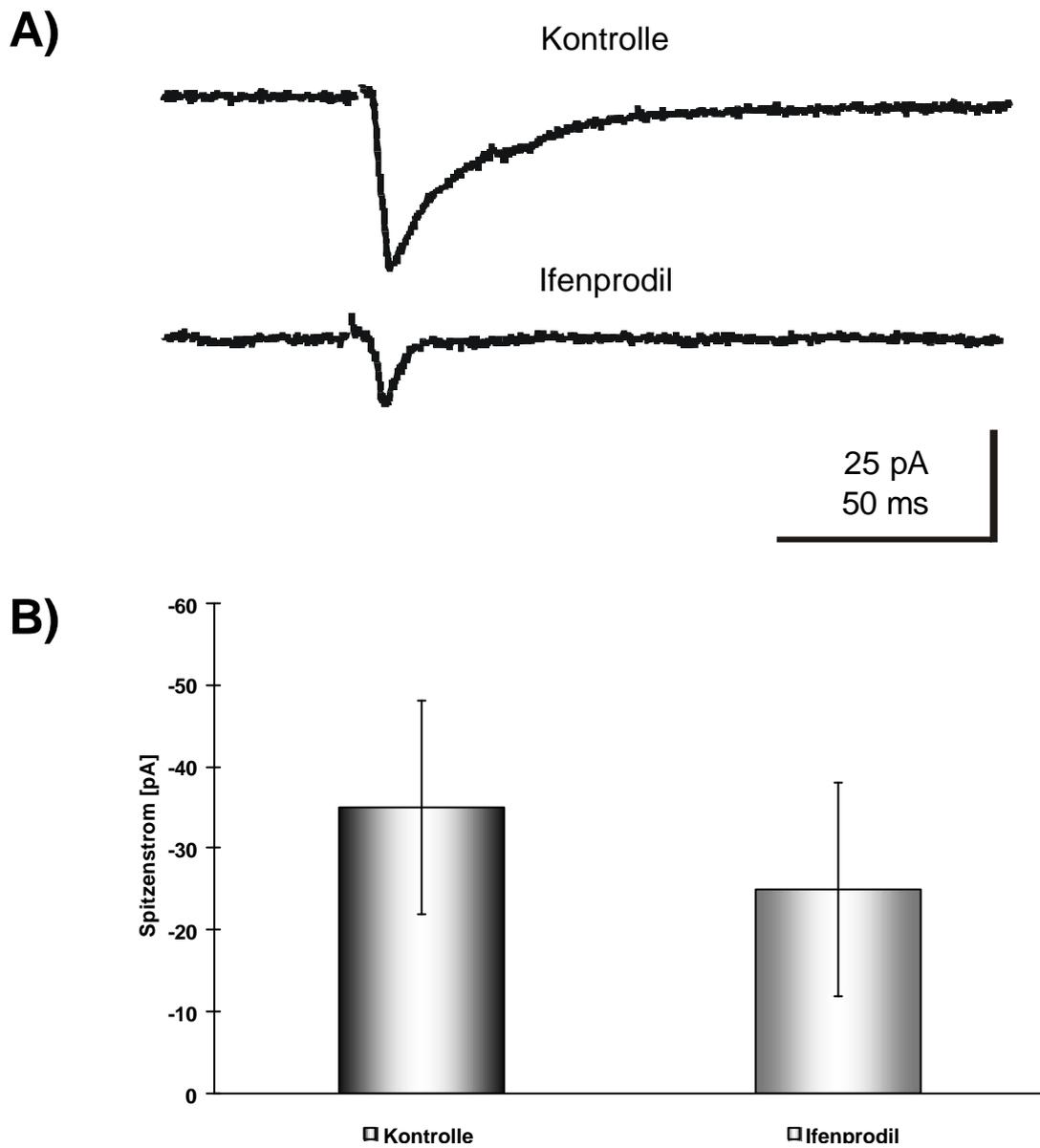


Abb. 38 Effekt des NR2B-spezifischen Antagonisten Ifenprodil (10 μ M) auf monosynaptische postsynaptische Ströme. In (A) ist die Wirkung auf einen monosynaptischen postsynaptischen Strom in einem P3 *Subplatten*neuron dargestellt, die bei -90 mV Membranpotenzial gehalten wurde. Die Stimulation erfolgte in der tiefen *Subplatte* lateral von der abgeleiteten Zelle. In (B) ist der Effekt von 10 μ M Ifenprodil auf die Spitzenamplituden monosynaptischer postsynaptischer Ströme in 10 Neuronen der *kortikalen Platte* und der *Subplatte* zusammenfassend dargestellt.

3.7. Der Effekt von Somatostatin auf die Physiologie neokortikaler Neurone

Ob und wie die bisher beschriebenen intrinsischen und synaptischen Eigenschaften juveniler neokortikaler Neurone durch Neuromodulatoren beeinflusst werden, wurde beispielhaft an insgesamt 223 vorwiegend pyramidalen kortikalen Neuronen juveniler Ratten im Alter von P1 bis P20 untersucht. In diesen Experimenten wurde die Wirkung des Neuropeptides Somatostatin auf elektrophysiologische Parameter untersucht.

In diesen Untersuchungen wurde der Effekt von Somatostatin-14 (SS14), einem zyklischen, aus 14 Aminosäuren bestehendem Peptid und MK678 (Seglitid), einem Agonisten mit hoher Affinität zum sst2-Rezeptor auf intrinsische und synaptische Parameter untersucht. Die untersuchten Parameter waren zum einen die intrinsischen passiven Membraneigenschaften (Ruhemembranpotenzial, Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante), zum anderen die intrinsischen aktiven Membraneigenschaften (Feuerungsverhalten, Aktionspotenziallatenz, Aktionspotenzialschwelle, -amplitude, -halbwertszeit, -frequenz etc.), aber auch die synaptischen Übertragungseigenschaften (Kinetik postsynaptischer Glutamaterger und GABAerger Ströme (Latenz, Amplitude, Fläche unter der Kurve, Zeitkonstante)). Ein Beispiel für den Effekt von SS14 auf juvenile Pyramidenzellen ist in Abb. 39 dargestellt.

Bei der Ableitung in Abb. 39 trat nach der Applikation von 200 nM SS14 eine starke, aber reversible Depolarisation des Membranpotenzials von etwa 25 mV und eine damit verbundene überschwellige Antwort auf synaptische Stimulation auf. Neben der reversiblen Depolarisation verkleinerten sich jedoch im Anschluss an die Applikation die exzitatorischen postsynaptischen Potenziale. Somit wurde erkennbar, dass sowohl intrinsische, als auch synaptische Parameter neokortikaler Neurone durch SS14 verändert werden können. Daher wurden in der Folge systematische Untersuchungen zu diesen Parametern durchgeführt. Zunächst wurden die Untersuchungen auf den Alterszeitraum P0 bis P4 eingeschränkt, um möglichst vergleichende Aussagen zu den bisher gewonnenen Daten zu ermöglichen.

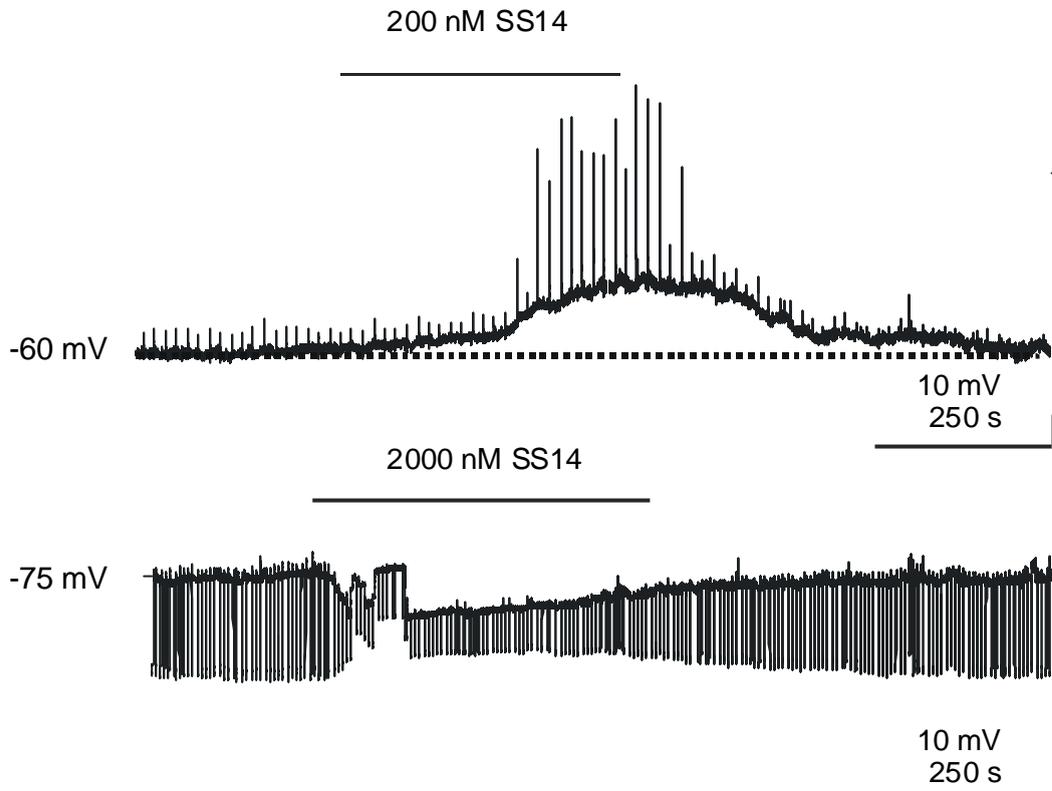


Abb. 39 In der oberen Spur ist eine Ableitung von einer verzweigten Pyramidenzelle der Schicht VI (P4) im Stromklemm-Modus bei -60 mV Haltepotenzial dargestellt. In der unterhalb gelegenen weißen Substanz wurden in regelmäßigen Abständen Stimuli mit einer Spannung von 20V und einer Dauer von 200 μ s gegeben. Die postsynaptischen Potenziale sind bei dieser Zeitauflösung als vertikale Linien zu erkennen. Der Balken zeigt die Dauer der Badapplikation von 200 nM Somatostatin-14 (SS14). In der unteren Spur ist die Ableitung von einer P16 Pyramidenzelle der Schicht V bei -75 mV Membranpotenzial dargestellt. Zur Bestimmung des Eingangswiderstandes wurden hyperpolarisierende Strominjektionen gegeben. Der Balken zeigt die Dauer der Badapplikation von 2000 nM SS14. Nach Beginn der SS14-Wirkung wurde kurzzeitig ein depolarisierender Strom injiziert, um das Membranpotenzial dem ursprünglichen Ruhepotenzial Nahezubringen.

In den 37 untersuchten Neuronen dieser Altersklasse waren zwar nach Applikation von SS14 oder MK678 teilweise de- und hyperpolarisierende Ereignisse erkennbar, jedoch waren diese seltener und nicht eindeutig von natürlichen Membranpotenzialfluktuationen zu unterscheiden (Amplitude <2 mV). Auf eine weitere Untersuchung der Wirkung des Peptids in dieser Altersgruppe wurde aufgrund der indifferenten Aussagekraft daher verzichtet und im Anschluss daran weitere Untersuchungen an juvenilen Tieren (P4-P20) vorgenommen. In dieser Gruppe zeigten sich in der Tendenz vergleichbare, gleichzeitig jedoch stabilere und ausgeprägtere

Effekte. Die Ergebnisse beider Altersklassen wurden zusammen ausgewertet und werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.7.1 Der Effekt von SS14 auf passive Membraneigenschaften

An insgesamt 24 Pyramidenzellen juveniler Rattenkortexes wurde der Einfluss von 100 bis 2000 nM SS14 auf die intrinsischen Membraneigenschaften untersucht. Dazu wurden die Neurone in der Stromklemme zunächst am Ruhepotenzial gehalten und das Membranpotenzial anschließend über einen Zeitraum von mehreren Minuten vor, während und nach der Badapplikation des SS14 aufgezeichnet. In der Regel wurden dabei durch niedrigamplitudige hyperpolarisierende Strominjektionen gleichzeitig die passiven Membraneigenschaften analysiert. Es zeigte sich, dass SS14 das Ruhemembranpotenzial sowohl in depolarisierender, als auch in hyperpolarisierender Richtung verändern kann.

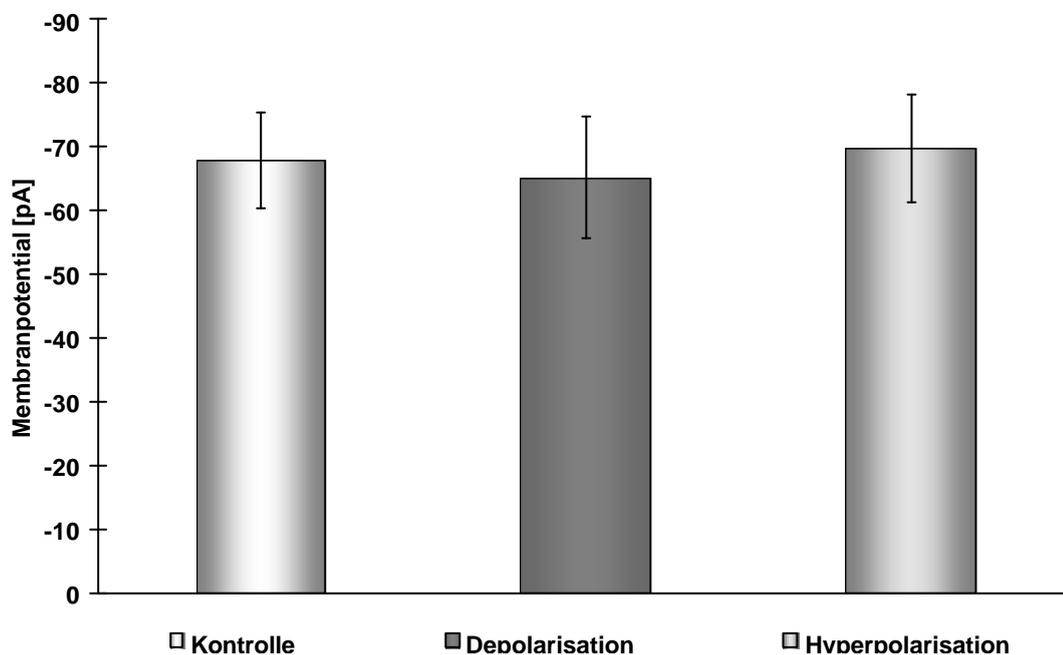


Abb. 40 Der Effekt von 100 bis 2000 nM SS14 auf das Ruhemembranpotenzial neokortikaler Pyramidenzellen bei juvenilen Ratten.

In 11 von 24 Neuronen, bei denen der Effekt des Peptides auf das Ruhemembranpotential untersucht wurde, konnte eine messbare Depolarisation des Membranpotentials beobachtet werden. Die Neurone wurden um durchschnittlich 2,6 mV von $-67,8 \pm 7,5$ mV (n=24) auf $-65,2 \pm 9,5$ mV (n=24) depolarisiert. Im T-Test Paarvergleich für abhängige Stichproben war diese Differenz hochsignifikant ($\alpha=0,05$) (Abb. 39). Bei 7 der 11 depolarisierenden Neuronen war der beobachtete Effekt vollständig reversibel, bei den übrigen dagegen irreversibel, so dass die Messungen abgebrochen werden mussten. In 12 von 24 Neuronen wurde eine messbare Hyperpolarisation des Membranpotentials gemessen. Diese Neurone wurden im Durchschnitt um 1,8 mV von $-67,8 \pm 7,5$ mV (n=24) auf $-69,7 \pm 8,4$ mV (n=24) hyperpolarisiert. Diese Veränderung war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 39). Bei 7 der 12 Neurone war der beobachtete Effekt vollständig reversibel, bei den übrigen dagegen vollständig irreversibel. In 5 von 24 Neuronen konnte im Rahmen einer biphasischen Antwort sowohl eine Depolarisation als auch eine Hyperpolarisation des Membranpotentials festgestellt werden.

Im Rahmen der beschriebenen Versuche wurde neben dem Membranpotential auch der Eingangswiderstand und die Membranzeitkonstante untersucht. Darüber hinaus wurden die vorher genannten Parameter und das aktive Feuerungsverhalten der Pyramidenzellen untersucht, indem die Neurone in der Stromklemme ausgehend vom Ruhemembranpotential schrittweise für eine Sekunde hyper- und depolarisiert wurden. Bei überschwelliger Stimulation konnten so die Aktionspotentialparameter untersucht werden.

Der Eingangswiderstand der Pyramidenzellen wurde durch die Badapplikation von 100 bis 2000 nM SS14 bei 18 von 22 Neuronen verringert, bei 4 von 22 Neuronen jedoch leicht erhöht. Durchschnittlich verminderte sich der Eingangswiderstand der Neurone nicht signifikant um 7,3% ($=42$ M Ω) von 583 ± 438 M Ω (n=22) auf 541 ± 428 M Ω (n=22).

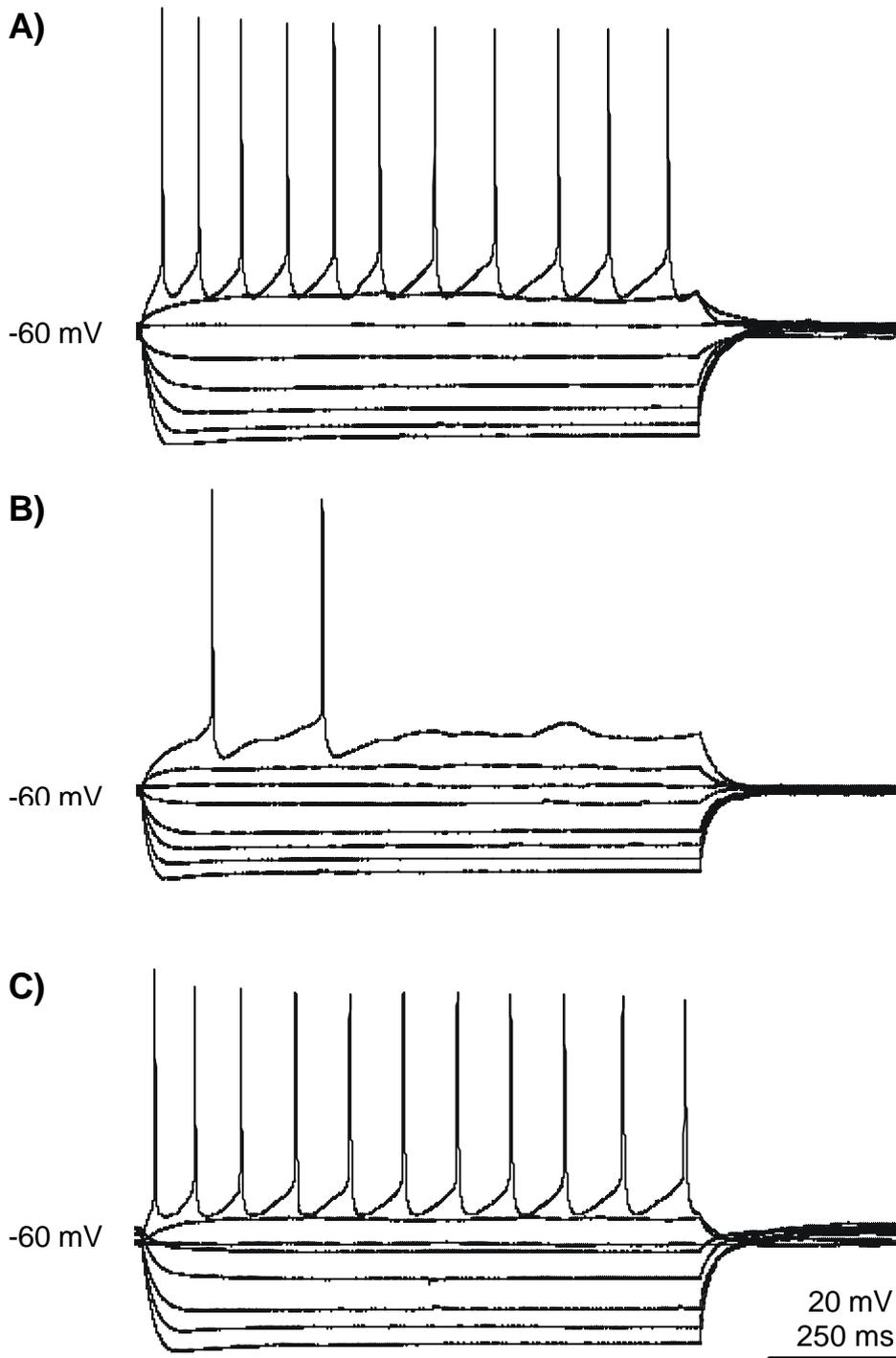


Abb. 41 Der Effekt von SS14 auf die intrinsischen Membraneigenschaften und das Feuerungsverhalten einer P18 Pyramidenzelle der Schicht V. Es wurden bei einem Haltepotenzial von -60 mV in der Stromklemme Ströme von 0, +6, +16, -6, -16, -26, -36 und -46 pA injiziert. In A) ist die Ableitung unter Kontrollbedingungen, in B) während der Badapplikation von 1000 nM SS14 und in C) nach 60 Minuten Auswaschphase dargestellt. Deutlich sichtbar ist die reversible Reduktion der Feuerungsrate und die teilweise reversible Reduktion des Eingangswiderstandes durch SS14.

Dieser Effekt war in dem untersuchbaren Zeitraum stets nur teilweise reversibel. In Abb. 41 B) wird dieser Effekt durch die Abnahme der Membranpotenzialauslenkungen bei hyperpolarisierenden Strominjektion während der SS14-Applikation sichtbar.

Die Membranzeitkonstante der Pyramidenzellen wurde durch Applikation des Neuropeptids nicht signifikant um durchschnittlich 10,1% ($=5,4$ ms) von $53,9 \pm 44,5$ ms ($n=21$) auf $48,5 \pm 41,9$ ms ($n=21$) reduziert. Dieser Effekt war in dem untersuchbaren Zeitraum stets irreversibel. Die Richtung oder Stärke dieser beobachteten Effekte korrelierten bei keinem der untersuchten intrinsischen Parameter mit der Peptidkonzentration.

3.7.2 Der Effekt von SS14 auf das Feuerungsverhalten

Neben den Effekten auf intrinsische Membraneigenschaften interessiert die Frage, ob SS14 das Feuerungsverhalten der Pyramidenzellen beeinflussen kann. Dazu wurden die Neurone eine Sekunde lang überschwellig depolarisiert und die Eigenschaften der generierten Aktionspotenziale bestimmt. Anschließend wurde die gleiche Messung nach Applikation von SS14 beim gleichen Membranpotenzial wiederholt.

Bei insgesamt 5 Pyramidenzellen konnten hinreichend stabile Antworten über den notwendigen Zeitraum hinweg abgeleitet werden. Der sichtbarste Effekt auf das Feuerungsverhalten war stets die reversible, aber starke Reduktion der Feuerungsrate (siehe Abb. 40) bei gleich starker Depolarisation. Von im Mittel $11 \pm 6,5$ Aktionspotenzialen pro Sekunde ($n=5$) nahm dieser Wert um 33,7% auf durchschnittlich $7,3 \pm 8,2$ Aktionspotenziale pro Sekunde ab.

Die Kinetik des jeweils ersten Aktionspotenzials wurde im Anschluss genauer analysiert und verglichen. So verringerte sich die durchschnittliche Amplitude der Aktionspotenziale von $85,7 \pm 26$ mV ($n=5$) um 6,3% ($=5,3$ mV) auf $80,3 \pm 35,2$ mV ($n=5$). Das Schwellenpotenzial, bei dem ein Aktionspotenzial ausgelöst werden kann, verschob sich durch die Applikation von SS14 von durchschnittlich $-36,6 \pm$

7,5 mV (n=5) um 5,5% (=2 mV) auf durchschnittlich $-34,6 \pm 11,2$ mV (n=5). Gleichzeitig damit vergrößerte sich die im Anschluss an ein Aktionspotenzial messbare Nachhyperpolarisation um durchschnittlich 11,5% (=2,7 mV) (n=5). Die Dauer der Aktionspotenziale bei halbmaximaler Amplitude verlängerte sich unwesentlich um durchschnittlich 2,3% (=0,05 ms) von $2,1 \pm 1,4$ ms (n=5) auf $2,15 \pm 1,5$ ms (n=5). Dabei nahm die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit von durchschnittlich $98,7 \pm 92,7$ V/ms (n=5) um 0,3% (=0,6 V/ms) auf $99 \pm 96,6$ V/ms (n=5) zu, während die maximale Repolarisationsgeschwindigkeit von $26,1 \pm 23,9$ V/ms (n=5) um 2,2% (=0,6 V/ms) auf $25,5 \pm 24,5$ V/ms abnahm. Keiner der untersuchten Parameter veränderte sich statistisch signifikant (bei $\alpha=0,05$).

3.7.3 Der Effekt von SS14 auf evozierte postsynaptische Ströme

Die Wirkung von SS14 auf gemischte evozierte postsynaptische Ströme wurde an 9 Pyramidenzellen des juvenilen Neokortex untersucht. Dazu wurden die Neurone in der Nähe des natürlichen Ruhemembranpotenzials bei etwa -50 mV in der Spannungsklemme gehalten und durch Stimulation mit einer bipolaren Reizelektrode in der darunter liegenden weißen Substanz durch sorgfältige Wahl der Reizintensität monophasische postsynaptische Ströme evoziert. Keiner der möglichen synaptischen Ströme wurde pharmakologisch blockiert. Zur Blockade von Aktionspotenzialen wurde der intrazellulären Lösung bei diesen Experimenten 5 mM QX-314 zugefügt. Damit können Natriumströme und einige Kaliumströme blockiert werden. Es wurden für die Auswertung jeweils mehrere Spuren aufgenommen und anschließend das Neuropeptid in Konzentrationen zwischen 100 und 2000 nM mit der Badlösung appliziert. Nach einigen Minuten Wartezeit wurden die Messungen dann wiederholt. Anschließend wurde wieder normale Badlösung zugeführt. In regelmäßigen Abständen wurde überprüft, ob evtl. beobachtete Effekte des Neuropeptids wieder rückgängig gemacht werden konnten. In der Auswertung wurden die Parameter Latenz (Zeit zwischen Reiz und postsynaptischer Antwort), Amplitude, Zeitkonstante der abfallenden Flanke und die Fläche unter der Kurve (Integral des gesamten Stromflusses) bei -60 mV Membranpotenzial bestimmt. Abbildung 42 zeigt ein typisches Beispiel einer solchen Ableitung.

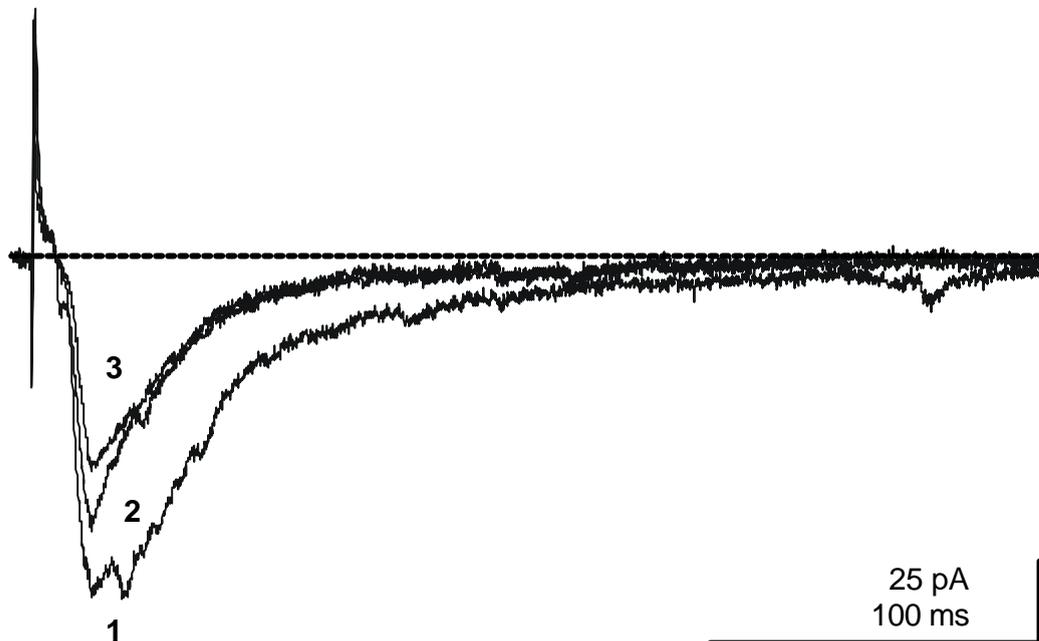


Abb. 42 Effekt von SS14 auf postsynaptische Ströme in einer P16 Pyramidenzelle der Schicht III bei einem Membranpotenzial von -60 mV. Die postsynaptische Antwort wurde durch Stimulation in der darunter liegenden weißen Substanz mit einer Spannung von 18V und 200 μ s Stimulationsdauer und einer Frequenz von 0,3 Hz evoziert. Die mit 1 gekennzeichnete Spur zeigt die Ableitung unter Kontrollbedingungen, die mit 2 gekennzeichnete Spur die nach Badapplikation von 100 nM SS14 und die mit 3 gekennzeichnete Spur eine Ableitung während der Auswaschphase. Deutlich sichtbar ist die irreversible Reduktion der Spitzenstromamplitude und der langsamen Zeitkonstante der abfallenden Flanke.

SS14 verlängerte die Latenz zwischen Reiz und dem Beginn der postsynaptischen Antwort geringfügig um 1,7% ($=0,3$ ms) von durchschnittlich $17,1 \pm 6,7$ ms ($n=9$) auf $17,4 \pm 6,6$ ms ($n=9$). Auffällig war die hochsignifikante Reduktion der Maximalamplituden von durchschnittlich -128 ± 185 pA ($n=9$) um 40% ($=51$ pA) auf -77 ± 103 pA ($n=9$) (Abb. 42 und 43).

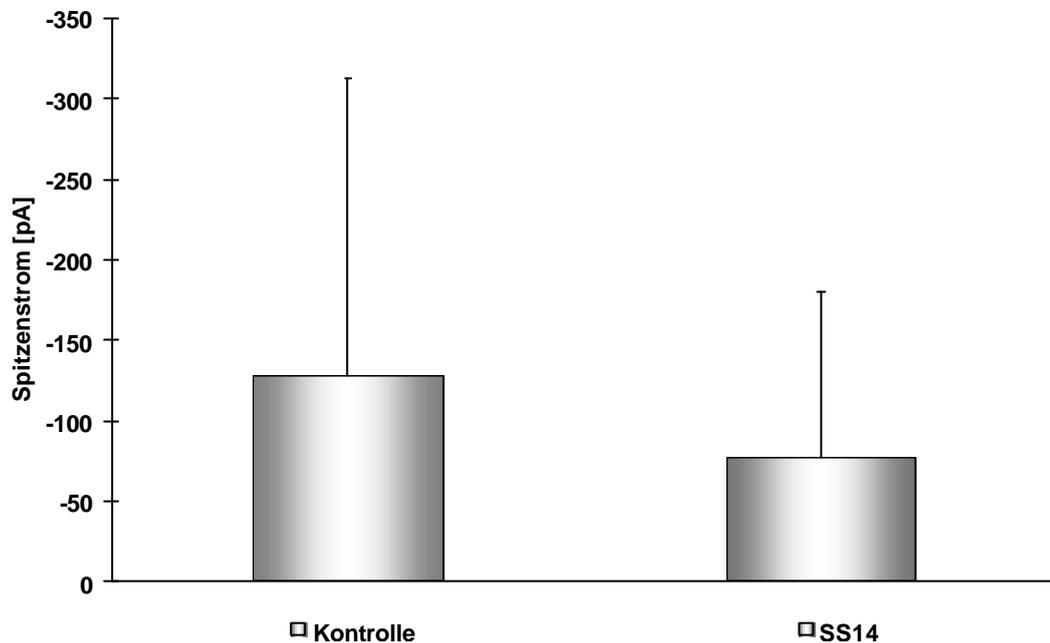


Abb. 43 Reduktion der Spitzenstromamplituden evozierter postsynaptische Ströme in neokortikalen Pyramidenzellen nach Applikation von 100 bis 2000 nM SS14. Die Wirkung wurde bei einem Membranpotenzial von -60 mV untersucht.

Damit einher ging eine starke Reduktion der Zeitkonstante der abfallenden Flanke von $44,8 \pm 37$ ms ($n=7$) um 39% auf $27,2 \pm 9$ ms ($n=7$). Als Resultat der Reduktion der beiden genannten Parameter verringerte sich der über die Zeit integrierte Stromfluss insgesamt von $7,6 \pm 11,5$ pAs ($n=8$) um 57% (=4,4 pAs) auf $3,2 \pm 3,7$ pAs ($n=8$). Die Veränderung der Zeitkonstante und des Gesamtstromflusses waren nicht statistisch signifikant verschieden von den Kontrollableitungen. Die beobachteten Veränderung evozierter postsynaptischer Ströme waren nicht nur in der Regel im Laufe der gesamten Auswaschzeit irreversibel, sondern nahmen häufig sogar noch zu (Abb. 42). Dabei konnte die Auswaschphase zum Teil bis zu einer Stunde verfolgt werden, bevor die Ableitungen instabil wurden.

3.7.4 Der Effekt von SS14 auf evozierte NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme

Wie im vorigen Versuch wurden in dieser Versuchsreihe postsynaptische Ströme evoziert und bei einem Membranpotenzial von -50 mV ausgewertet.

Jedoch wurden für diese Experimente der Badlösung kontinuierlich 10 μM BMI und 30 μM DL-APV hinzugefügt, um GABA-A- und AMPA/Kainat-Rezeptor vermittelte Ströme zu blockieren und so vorwiegend NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme zu isolieren.

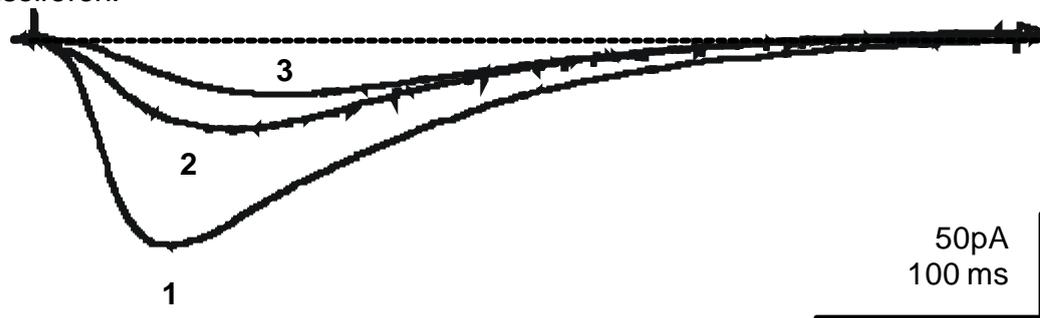


Abb. 44 Effekt von SS14 auf evozierte NMDA-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme in einer P17 Pyramidenzelle der Schicht III bei einem Membranpotenzial von -50 mV. Die postsynaptische Antwort wurde durch laterale Stimulation mit einer Spannung von 5V und 50 μs Stimulationsdauer und einer Reizfrequenz von 0,3 Hz unter pharmakologischer Blockade von AMPA/Kainat- und GABA-A-Rezeptoren evoziert. Die mit 1 gekennzeichnete Spur zeigt die Ableitung unter Kontrollbedingungen, die mit 2 gekennzeichnete Spur die nach Badapplikation von 100 nM SS14 und die mit 3 gekennzeichnete Spur eine Ableitung 11 Minuten nach Start der Auswaschphase. Deutlich sichtbar ist die irreversible Reduktion der Spitzenstromamplitude und der Fläche unter der Kurve.

SS14 verlängerte die Latenz zwischen Reiz und dem Beginn der postsynaptischen Antwort auffällig und signifikant um 32% (=39 ms) von durchschnittlich 118 ± 113 ms ($n=6$) auf 157 ± 141 ms ($n=6$) ($\alpha = 0,05$). Auffällig war darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Maximalamplituden von durchschnittlich -55 ± 45 pA ($n=6$) um 26% (=14 pA) auf -41 ± 33 pA ($n=6$) ($\alpha = 0,05$) (Abb. 44 und 45).

Mit diesen Effekten ging in diesen Untersuchungen eine Verlängerung der Zeitkonstante der abfallenden Flanke von $91,3 \pm 55$ ms ($n=4$) um 10% auf $100,8 \pm 87$ ms ($n=4$) einher. Trotzdem verringerte sich als Resultat der über die Zeit integrierte Stromfluss nicht signifikant von $8,3 \pm 7,7$ pAs ($n=4$) um 53% (=4,4 pAs) auf $3,9 \pm 3,4$ pAs ($n=4$) ($\alpha = 0,05$).

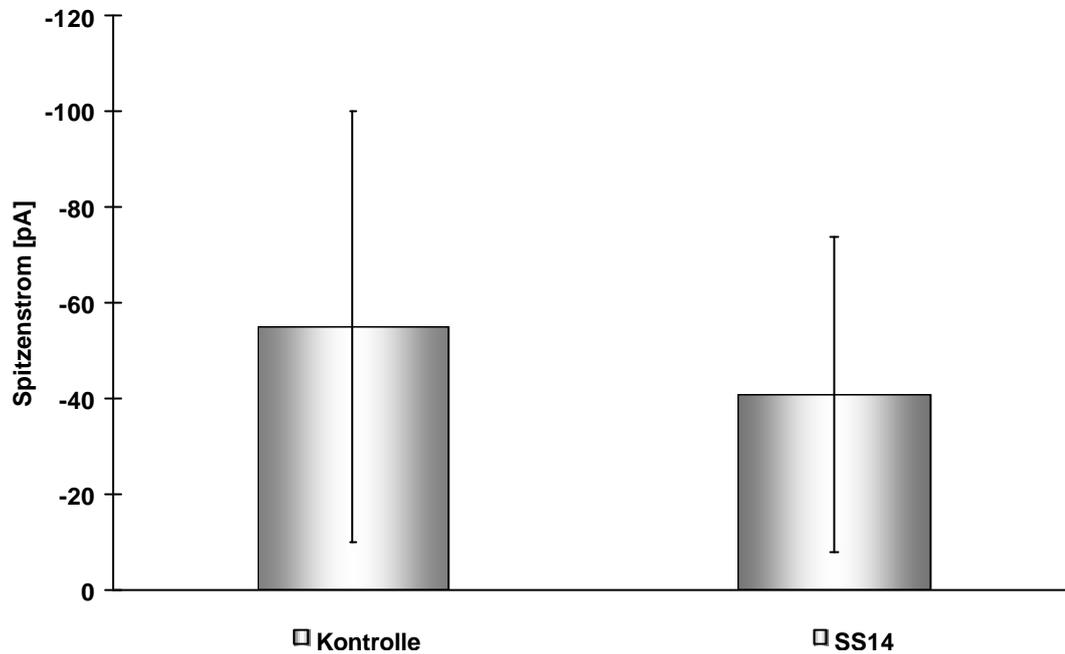


Abb. 45 Reduktion der Spitzenstromamplituden isolierter NMDA-Rezeptor vermittelter postsynaptischer Ströme in neokortikalen Pyramidenzellen nach Applikation von 100 bis 2000 nM SS14.

3.7.4 Der Effekt von MK678 auf evozierte NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme

Es gibt für die Bindung von Somatostatin bislang mehrere beschriebene Rezeptoren. Die Substanz MK678 (Oktreotid) bindet mit einer hohen Spezifität an sst2-Rezeptorproteine und wurde in anderen Untersuchungen als spezifischer sst2-Agonist eingesetzt. Daher wurde in einer Reihe von Versuchen die mögliche Beteiligung dieses Rezeptors an den wichtigsten beobachteten SS14 Effekten untersucht.

Wie in den Versuchen mit SS14 wurden in dieser Versuchsreihe postsynaptische Ströme evoziert und bei einem Membranpotenzial von -50 mV ausgewertet. Der Badlösung wurde in diesen Experimenten 10 μ M BMI und 10 μ M NBQX hinzugefügt, um GABA-A- und AMPA/Kainat-Rezeptor vermittelte Ströme zu blockieren und NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme zu isolieren. In der Auswertung wurden die Parameter Latenz (Zeit zwischen Reiz und postsynaptischer Antwort), Amplitude, Zeitkonstante der abfallenden Flanke und die Fläche unter der Kurve (Integral

des gesamten Stromflusses) bestimmt. MK678 wurde in sättigender Konzentration zwischen 10 und 1000 nM eingesetzt, wodurch sich in diesen Konzentrationen keine Unterschiede in den gefundenen Effekten zeigten.

Abbildung 46 zeigt ein typisches Beispiel einer solchen Ableitung. MK678 verlängerte die Latenz zwischen Reiz und dem Beginn der postsynaptischen Antwort statistisch signifikant um 17,8% (=6,3 ms) von durchschnittlich $35,2 \pm 17,6$ ms (n=14) auf $41,5 \pm 18,3$ ms (n=14) ($\alpha = 0,05$).

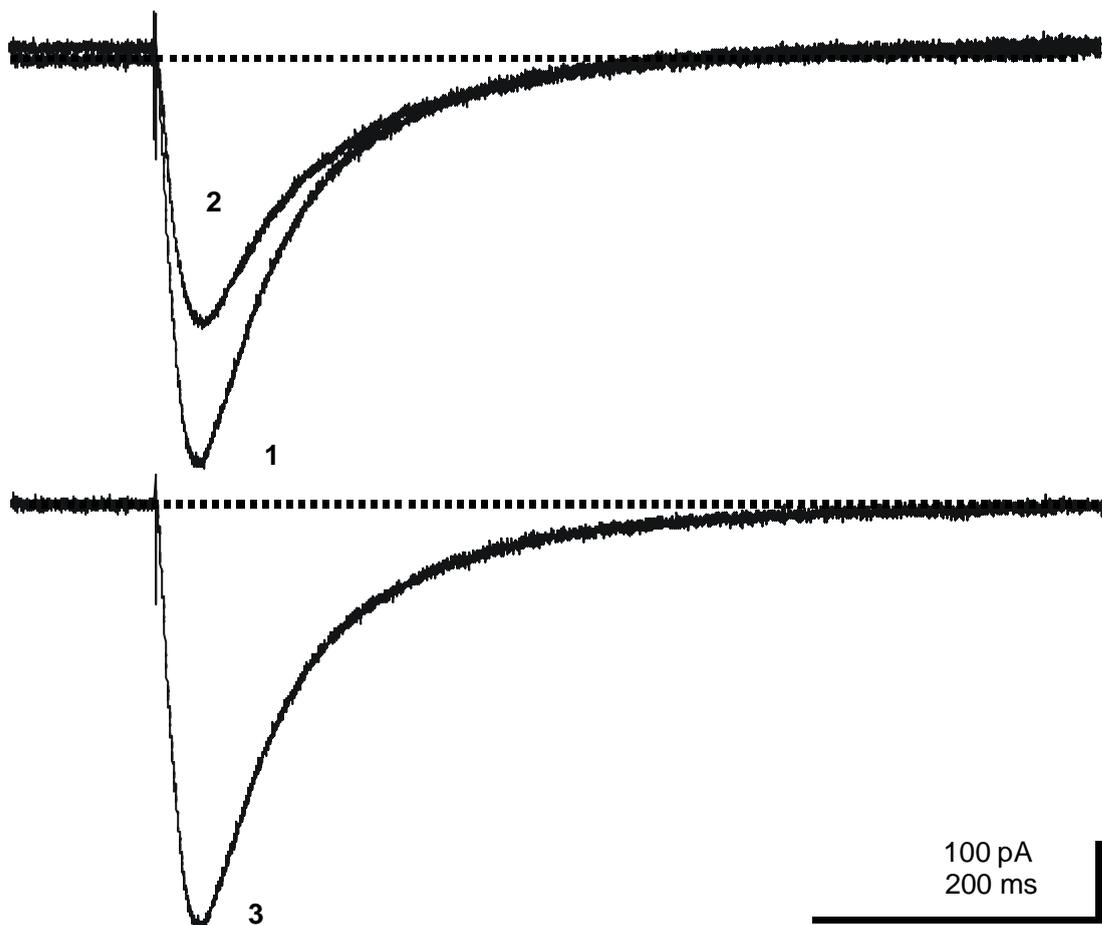


Abb. 46 Effekt von MK678 auf evozierte NMDA-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme in einer P17 Pyramidenzelle der Schicht III bei einem Membranpotenzial von -50 mV. Die postsynaptische Antwort wurde durch laterale Stimulation mit einer Spannung von 5 V und 50 μ s Stimulationsdauer und einer Reizfrequenz von $0,3$ Hz unter pharmakologischer Blockade von AMPA/Kainat- und GABA-A-Strömen durch NBQX und BMI evoziert. Es sind jeweils mehrere Ableitungen gemittelt worden. Die mit 1 gekennzeichnete Spur zeigt die Ableitung unter Kontrollbedingungen, die mit 2 gekennzeichnete Spur die nach Badapplikation von 100 nM SS14 und die mit 3 gekennzeichnete Spur eine Ableitung 11 Minuten nach Start der Auswaschphase. Deutlich sichtbar ist die reversible Reduktion der Spitzenstromamplitude und der Fläche unter der Kurve.

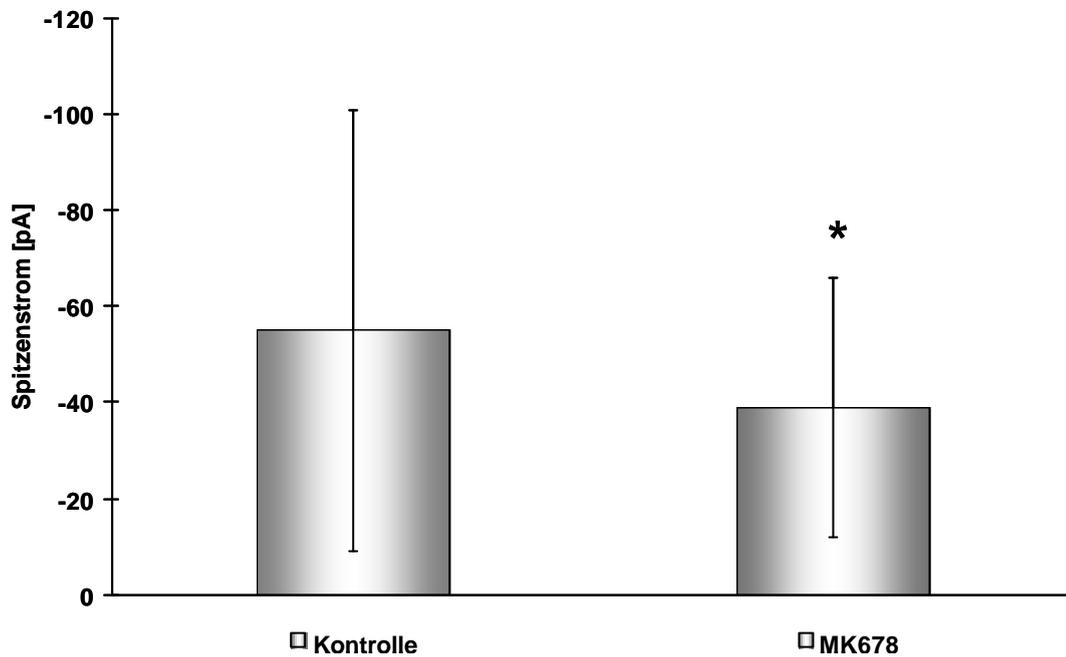


Abb. 47 Reduktion NMDA-Rezeptor vermittelter postsynaptischer Ströme in neokortikalen Pyramidenzellen nach Applikation von 10 bis 1000 nM MK678. Die Wirkung wurde bei einem Membranpotenzial von -50 mV untersucht.

Die signifikante Reduktion der Maximalamplituden von durchschnittlich -55 ± 46 pA ($n=14$) um 27% (=16 pA) auf -39 ± 27 pA ($n=14$) war ein weiterer charakteristischer Effekt von MK678 in den getesteten Konzentrationen ($\alpha = 0,05$) (siehe Abb. 46 und 47). Mit der Reduktion der Spitzenamplitude ging in dieser Versuchsreihe eine unwesentliche Verkürzung der Zeitkonstante der abfallenden Flanke von $73,6 \pm 25,1$ ms ($n=14$) um 3% (=2,3 ms) auf $71,3 \pm 33,7$ ms ($n=14$) einher. Dadurch verringerte sich als Resultat der über die Zeit integrierte Stromfluss von $5,7 \pm 5,7$ pAs ($n=14$) um 14% (=0,8 pAs) auf $4,9 \pm 4,9$ pAs ($n=14$).

Die beiden letztgenannten Effekte waren in dem eingesetzten Zweistichproben T-Test nicht signifikant ($\alpha = 0,05$).

3.7.5 Der Effekt von MK678 auf evozierte AMPA-Rezeptor vermittelte Ströme

Die Wirkung von 10 bis 1000 nM MK678 auf AMPA-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme wurde entsprechend den vorher geschilderten Versuchen an Pyramidenzellen des juvenilen Rattenkortex untersucht. Der Badlösung wurde in diesen Versuchen kontinuierlich 10 μ M BMI und 30 μ M DL-APV hinzugefügt, um GABA-A- und NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme zu blockieren und damit AMPA/Kainat-Rezeptor vermittelte Ströme zu isolieren. Die Spuren wurden bei einem Membranpotenzial von -70 mV ausgewertet.

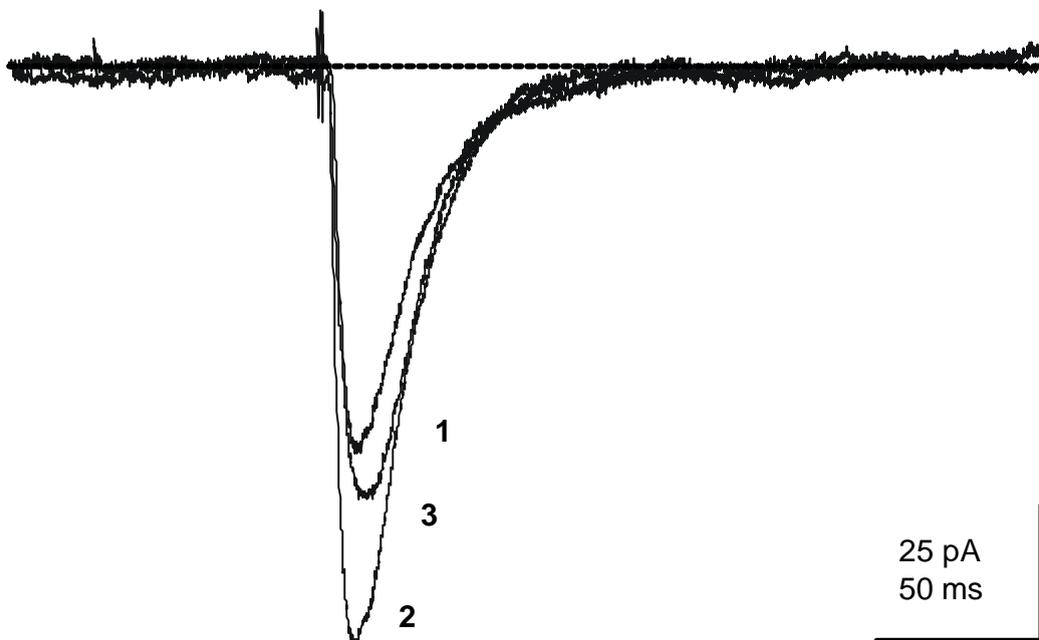


Abb. 48 Effekt von MK678 auf evozierte AMPA-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme in einer P13 Pyramidenzelle der Schicht II bei einem Membranpotenzial von -70 mV. Die postsynaptische Antwort wurde durch laterale Stimulation mit einer Spannung von 5V und 50 μ s Stimulationsdauer und einer Reizfrequenz von 0,2 Hz unter pharmakologischer Blockade von NMDA- und GABA-A-Rezeptor vermittelten Strömen durch DL-APV und BMI evoziert. Die mit 1 gekennzeichnete Spur zeigt die Ableitung unter Kontrollbedingungen, die mit 2 gekennzeichnete Spur die nach Badapplikation von 100 nM MK678 und die mit 3 gekennzeichnete Spur eine Ableitung 5 Minuten nach Start der Auswaschphase. Die Spitzenamplitude und die Fläche unter der Kurve nahmen durch MK678 deutlich zu.

MK678 verlängerte die Latenz zwischen Reiz und dem Beginn der postsynaptischen Antwort unwesentlich um 2% ($=0,2$ ms) von durchschnittlich $9,9 \pm 3,9$ ms ($n=5$) auf $10,1 \pm 3,5$ ms ($n=5$).

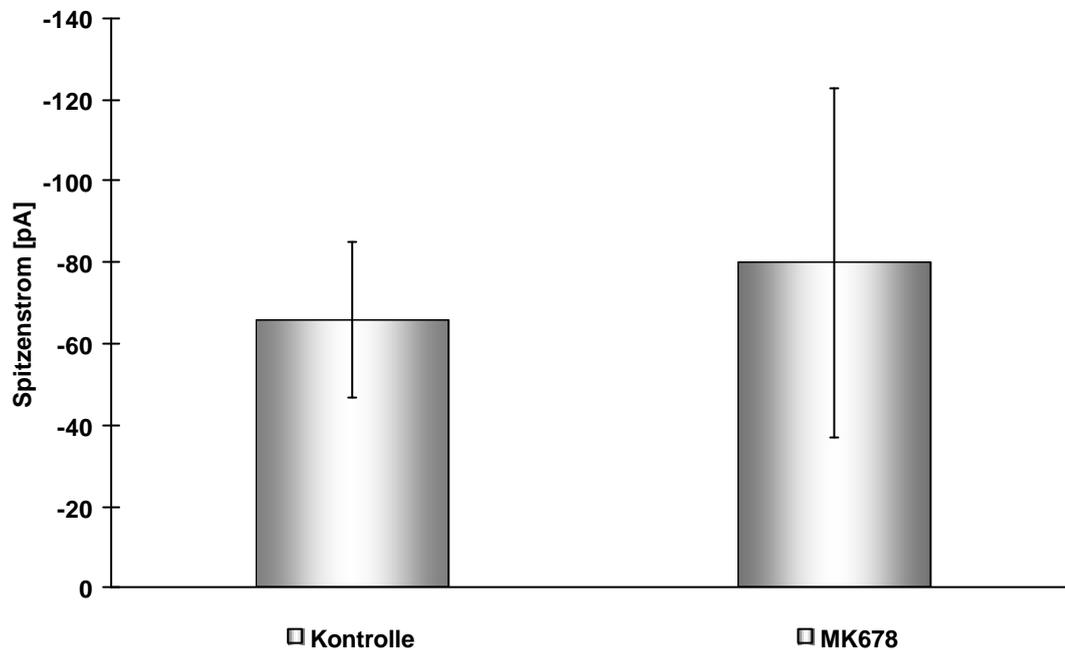


Abb. 49 Verstärkung isolierter AMPA-Rezeptor vermittelter postsynaptischer Ströme in neokortikalen Pyramidenzellen nach Applikation von 10 bis 1000 nM MK678. Die Wirkung wurde bei einem Membranpotenzial von -60 mV untersucht.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Effekten vergrößerte MK678 unabhängig von der eingesetzten Konzentration die Amplitude der AMPA/Kainat-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme von durchschnittlich -66 ± 19 pA ($n=5$) um 21% ($=14$ pA) auf -80 ± 43 pA ($n=5$) (Abb. 48 und 49). Die Zeitkonstante der abfallenden Flanke verlängerte sich dadurch in dieser Versuchsreihe im Mittel von $13,9 \pm 12,2$ ms ($n=5$) um 5,7% ($=0,8$ ms) auf $14,7 \pm 14,3$ ms ($n=5$). In der Folge erhöhte sich ebenfalls der über die Zeit integrierte Stromfluss von $1,5 \pm 1$ pAs ($n=5$) um 12,6% ($=0,19$ pAs) auf $1,69 \pm 1,1$ pAs ($n=5$) (siehe Abb. 47).

Die Irrtumswahrscheinlichkeit sank bei keinem dieser Resultate unter 0,05, d.h. die Amplitudenvergrößerungen waren statistisch nicht signifikant.

3.7.6 Der Effekt von MK678 auf GABA-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme

Die Wirkung von 10 bis 1000 nM MK678 auf GABA-Rezeptor vermittelte, postsynaptische Ströme wurde ebenfalls an Pyramidenzellen des juvenilen Neokortex untersucht. Dazu wurden die Neurone in der Nähe des natürlichen Ruhemembranpotenzials in der Spannungsklemme gehalten und durch Stimulation mit einer bipolaren Reizelektrode in der darunter liegenden weißen Substanz oder lateral durch sorgfältige Wahl der Reizintensität postsynaptische Ströme evoziert. Glutamaterge Komponenten wurden durch die Badapplikation von 30 μ M DL-APV und 5 μ M NBQX pharmakologisch blockiert. In der Auswertung wurden die Parameter Latenz (Zeit zwischen Reiz und postsynaptischer Antwort), Amplitude, Zeitkonstante der abfallenden Flanke und die Fläche unter der Kurve (Integral des gesamten Stromflusses) bei -70 mV Membranpotenzial bestimmt.

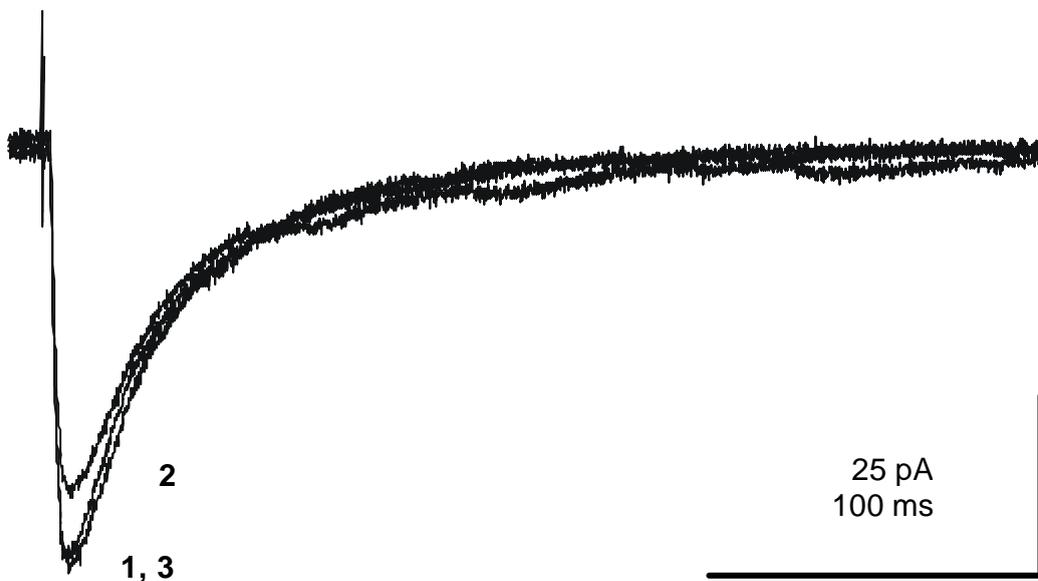


Abb. 50 Effekt von MK678 auf evozierte GABA-A-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme in einer P14 Pyramidenzelle der Schicht II bei einem Membranpotenzial von -70 mV. Die postsynaptische Antwort wurde durch laterale Stimulation mit einer Spannung von 7V und 200 μ s Stimulationsdauer und einer Reizfrequenz von 0,05 Hz unter pharmakologischer Blockade von AMPA/Kainat- und NMDA-Rezeptor vermittelten Strömen durch NBQX und DL-APV evoziert. Die mit 1 gekennzeichnete Spur zeigt die Ableitung unter Kontrollbedingungen, die mit 2 gekennzeichnete Spur die nach Badapplikation von 1000 nM MK678 und die mit 3 gekennzeichnete Spur eine Ableitung während der Auswaschphase. Deutlich sichtbar ist die reversible Reduktion der Spitzenstromamplitude und der Fläche unter der Kurve.

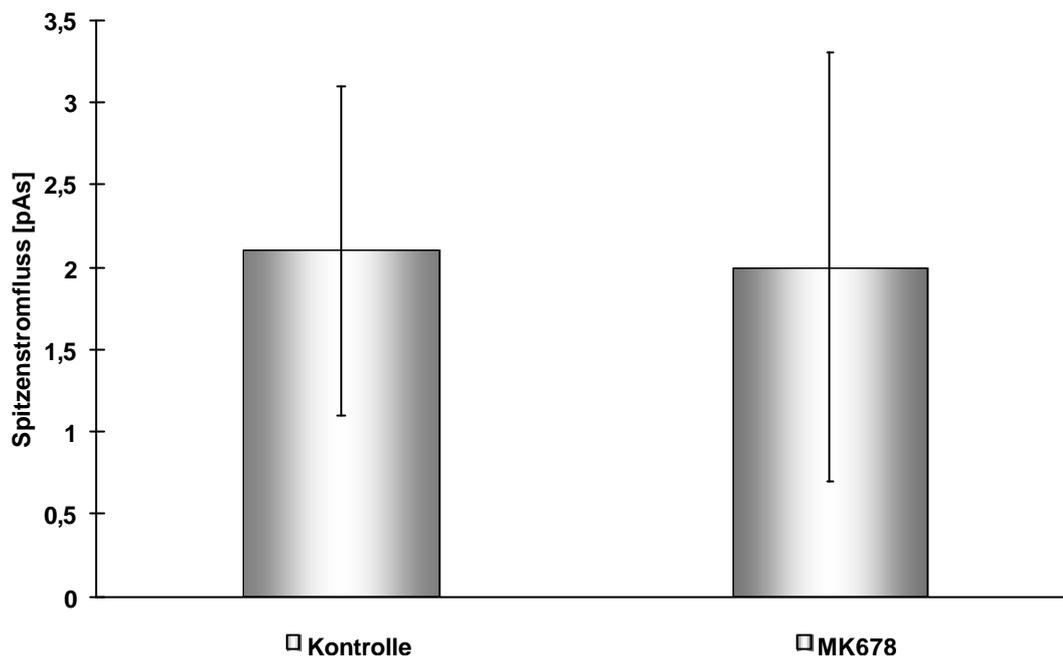


Abb. 51 Reduktion der Spitzenamplituden isolierter GABA-A-Rezeptor vermittelter postsynaptischer Ströme in neokortikalen Pyramidenzellen nach Applikation von 10 bis 1000 nM MK678. Die Wirkung wurde bei einem Membranpotenzial von -70 mV untersucht.

MK678 verlängerte die Latenz zwischen Reiz und dem Beginn der postsynaptischen Antwort um 9,3% (=1,4 ms) von durchschnittlich $15 \pm 7,1$ ms (n=6) auf $16,4 \pm 7,7$ ms (n=6). Die Maximalamplituden wurden von durchschnittlich $-33 \pm 19,5$ pA (n=6) um 12,7% (=4,2 pA) auf $-29 \pm 22,3$ pA (n=6) reduziert (Abb. 50 und 51). Als Resultat verringerte sich der über die Zeit integrierte Stromfluss minimal von $2,1 \pm 1$ pAs (n=6) um 4,8% (=0,1 pAs) auf $2 \pm 1,3$ pAs (n=6).

Ungewöhnlich war eine geringe Verlängerung der Zeitkonstante der abfallenden Flanke von $38 \pm 28,6$ ms (n=6) um 12% auf $42 \pm 30,2$ ms (n=6). Sämtliche hier besprochenen Effekte von MK678 auf GABAerge postsynaptische Ströme zeigten bei den eingesetzten statistischen Verfahren keine Signifikanzen ($\alpha = 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Morphologische Eigenschaften der Neurone

Mit Hilfe der DIC-Optik konnten die Somata und proximalen Neuriten der untersuchten Neuronenpopulationen routinemäßig hinsichtlich ihrer Größe und Orientierung im Neokortex identifiziert werden. Für feinere distale dendritische Bereiche und Axone reichte dieses Verfahren in der Regel nicht aus. Nur unter Verwendung einer Fluoreszenzmarkierung konnten auch diese Bereiche der Neurone in Grenzen sichtbar gemacht werden.

Cajal-Retzius Neurone waren durch längliche spindelförmige Somata charakterisiert, die an einem verjüngten Ende in einen recht langen, wenig verzweigten dendritischen Fortsatz übergingen. Diese Neurone waren in der oberen *Marginalzone*, dicht unter der pialen Oberfläche zu finden und stets tangential im Neokortex orientiert. Ihre Axone verliefen, soweit sichtbar, innerhalb der gleichen Schicht. Die Morphologie der beobachteten Zellen der *Marginalzone* stimmt damit gut mit früheren Beschreibungen dieser Zellen überein (Bradford et al., 1977; Marin-Padilla, 1990; Hestrin & Armstrong, 1996; Zhou & Hablitz, 1996c).

Die *unverzweigten Pyramidenzellen* der oberen *kortikalen Platte* waren in ihrer Morphologie durch ein kleines tropfenförmiges Soma mit einem apikalen, bisweilen im Fluoreszenzbild auch mit einem basalen Dendriten, charakterisiert. Diese unreifen Neurone waren stets radial orientiert.

Lediglich am Übergang von der *kortikalen Platte* in die *Marginalzone* konnten Neurone mit gleicher Morphologie mit eher tangentialer Ausrichtung gesehen werden. Axone waren bei diesen Neuronen nicht feststellbar. Vermutlich handelt es sich bei dieser Klasse von Neuronen um migrierende Neurone, die beim Erreichen der *Marginalzone* von dort vorhandenen axonalen Endigungen kontaktiert werden, um schließlich zu ramifizierten Pyramidenzellen zu differenzieren.

Verzweigte Pyramidenzellen konnten in der unteren *kortikalen Platte* bzw. Schicht V/VI gefunden werden, da diese Pyramidenzellen vor denen der äußeren Schicht

ten IV bis II migrieren. Diese Neurone hatten ein relativ großes Soma, sowie lange und verzweigte basale und apikale Dendriten. Sie waren stets radial orientiert. Im Fluoreszenzbild konnten verzweigte Axone gesehen werden, die sich in Richtung auf die weiße Substanz hin ausstreckten.

Die Neurone der *Subplatte* stellen eine Ansammlung sehr unterschiedlicher Neuronentypen dar. Wie erwartet, konnten daher sehr unterschiedliche Neurone erkannt werden. Es wurden Neurone mit pyramidaler Morphologie, aber sehr unterschiedlicher Ausrichtung gefunden, als auch solche mit bipolarer horizontaler Orientierung. Insgesamt zeigten diese Neurone die komplexesten Morphologien mit zahlreichen Ramifizierungen. Damit stehen diese Beobachtungen sehr gut im Einklang mit bisherigen Beschreibungen von *Subplattenneuronen* (Valverde & Facal-Valverde, 1987, Valverde et al., 1989; Chun & Shatz, 1989).

4.2 Passive Membraneigenschaften der Neurone

Die Untersuchung der passiven Membraneigenschaften der vier untersuchten Zelltypen stehen zum großen Teil im Einklang mit früheren Untersuchungen an Neuronen der *kortikalen Platte* (LoTurco et al., 1991; Kim et al., 1995) und der *Marginalzone* bzw. der später daraus hervorgehenden Schicht I (Zhou & Hablitz, 1996a, 1996d; Mienville & Pesold, 1999), sowie des somatosensorischen Kortex neugeborener Ratten (Kim et al., 1995; Luhmann et al., 1999). Die Ruhemembranpotenziale und Eingangswiderstände wurden in der Mehrzahl dieser Untersuchungen ebenfalls mit Ganzzelleitungen bestimmt, wodurch die Vergleichbarkeit der Resultate gewährleistet ist.

Neurone der *kortikalen Platte* embryonaler und neugeborener Tiere hatten in den genannten Untersuchungen Ruhemembranpotenziale zwischen -35 und -65 mV bzw. Eingangswiderstände zwischen 0,5 und 3 G Ω . Die hier ermittelten Werte von -44,1 mV und 1,8 G Ω (*unverzweigte Pyramidenzellen*) und -46,6 mV und 0,8 G Ω (*verzweigte Pyramidenzellen*) liegen gut im Rahmen der beschriebenen Werte.

Cajal-Retzius Neurone der *Marginalzone* von neugeborenen Tieren zeigten in dieser Arbeit Ruhemembranpotenziale zwischen -40 und -55 mV und Eingangswiderstände zwischen 1 und 5 G Ω .

Die Ursache der stark depolarisierten Ruhemembranpotenziale ist bislang unklar. Untersuchungen an *Cajal-Retzius* Neuronen über einen Kaliumstrom, der bei starker Hyperpolarisation aktiviert wird (I_h), haben gezeigt, dass dieser nicht für das sehr positive Membranpotenzial dieses Zelltyps verantwortlich ist (Kilb & Luhmann, 2000). Die Überlegung, dass die depolarisierten Membranpotenziale durch eine tonische Depolarisation durch erregende Neurotransmitter zu erklären sein könnten, konnte durch Inhibitoren der entsprechenden Rezeptoren und durch die Blockade der neuronalen Aktivität mit TTX widerlegt werden (Mienville & Pesold, 1999).

Die Eingangswiderstände korrelieren darüber hinaus sehr gut mit den gemessenen Zellgrößen. *Unverzweigte Pyramidenzellen* mit den höchsten Eingangswiderständen ($\sim 1,8$ G Ω) waren mit ~ 1600 μm^2 am kleinsten, *Subplattenneurone* und *verzweigte Pyramidenzellen* mit Eingangswiderständen zwischen 0,8 bis 1 G Ω am größten (4300-6200 μm^2). Der relative Membranwiderstand unverzweigter Pyramidenzellen ist damit um ein vielfaches höher als der von „reiferen“ Pyramidenzellen.

Die verzweigten Pyramidenzellen wiesen auch die kürzesten Membranzeitkonstanten von allen untersuchten Zelltypen auf. Das bedeutet, dass die Neurone mit zunehmender Ramifizierung nicht nur an Membranoberfläche zunehmen, sondern dass auch die Ruheleitfähigkeit überproportional zunimmt. Dieser Effekt könnte einerseits auf einen postnatal stark zunehmenden Einbau von Kanalproteinen, andererseits auf eine veränderte Kinetik der am Ruhestrom beteiligten Ionenkanäle zurückzuführen sein.

Der hohe Eingangswiderstand und die lange Membranzeitkonstante von 52,5 ms der *unverzweigten Pyramidenzellen* bedingen eine besonders leichte Erregbarkeit durch ankommende synaptische Afferenzen.

4.3 Aktive Membraneigenschaften der Neurone

Während die passiven Membraneigenschaften vor allem für die Geschwindigkeit und Reichweite eingehender synaptischer Aktivitäten, also die räumliche und zeitliche Summation von Bedeutung sind, definieren die aktiven Membraneigenschaften die Antworteigenschaften der Neurone.

Durch die Injektion überschwelliger depolarisierender Ströme konnten in allen vier Zelltypen TTX-sensitive Aktionspotenziale evoziert werden. Die Kinetik individueller Aktionspotenziale und das Feuerungsverhalten als Antwort auf langanhaltende Depolarisationen unterschied sich jedoch signifikant zwischen den vier Neuronenpopulationen.

In Übereinstimmung mit anderen Studien (Zhou & Hablitz, 1996a) zeigten *Cajal-Retzius* Neurone in dieser Untersuchung zum größten Teil tonisches Antwortverhalten nach langanhaltender Depolarisation. Diese Antwortmuster ähneln denen von Interneuronen des adulten Neokortex, wenn auch die Frequenz der Aktionspotenziale deutlich niedriger war. Einige Neurone der *Marginalzone* zeigten jedoch stark adaptierende Antwortmuster, die stark vom typischen Verhalten der CR Neurone abwich. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Neuronen nicht um CR Neurone, sondern um eine andere, morphologisch nicht unterscheidbare Population von Neuronen. Diese Befunde stimmen mit den Resultaten anderer Untersuchungen überein (Hestrin et al., 1996). *Cajal-Retzius* Neurone hatten mit 79,4 mV die höchsten Aktionspotenzialamplituden aller untersuchten Zelltypen.

Die *unverzweigten Pyramidenzellen* der *kortikalen Platte* waren auch bei starker Depolarisation nur zur Generierung einzelner Aktionspotenziale anzuregen. Diese Beobachtung stimmt mit anderen elektrophysiologischen Untersuchungen an Neuronen der *kortikalen Platte* neonataler Tiere überein (Kim et al., 1995).

Neben dieser sehr starken Adaptation ist bei diesen unreifen Pyramidenzellen die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotenziales mit -29,3 mV am höchsten, und die einzelnen Aktionspotenziale wiesen mit 31,1 ms Dauer die langsamste Kinetik von allen untersuchten Neuronen auf. Damit wird deutlich, dass eine funktionelle

Rolle dieser sehr "unreifen" Neurone in einem frühen kortikalen Netzwerk auszuschließen ist. Vielmehr sind diese Neurone vermutlich noch in einem Zustand morphogenetischer Differenzierung und synaptischer Konsolidierung, was durch die oben beschriebenen passiven Eigenschaften untermauert wird.

Etwas anders sah die Situation bei den verzweigten Pyramidenzellen der unteren *kortikalen Platte* aus. Diese Neurone besitzen bereits ein großes dendritisches Einzugsgebiet und ein Axon. Diese Morphologie korreliert bereits recht gut mit den "reiferen" aktiven Membraneigenschaften.

Knapp 40% dieser Neurone konnten bei entsprechend starker Depolarisation bereits mit hochfrequenter langsam-adaptierenden Aktionspotenzialserien antworten. Das "reifere" Feuerungsverhalten gegenüber *unverzweigten Pyramidenzellen* spiegelt sich auch in wesentlich kürzeren Aktionspotenzialen (18,2 ms) wieder, was vor allem durch eine starke Zunahme der Repolarisationsgeschwindigkeit (6,8 ms) verursacht wird.

Diese Befunde bedeuten, dass diese Zellen bereits ein großes Maß an afferenter Aktivität in einem Netzwerk verarbeiten und weiterleiten können. So ermöglichen die passiven Membraneigenschaften bereits eine Verrechnung eingehender Aktivität durch räumlich-zeitliche Summationsprozesse und die Feuerungseigenschaften die Generierung von spezifischen Antwortmustern.

Bei diesen Neuronen des unreifen Neokortex könnte damit der Übergang vom sich entwickelnden postmitotischen Neuron zum funktionellen, Informationen verarbeitenden Netzwerkbestandteil stattfinden. Dieser Prozess findet jedoch vermutlich nicht sprunghaft statt, sondern stellt vielmehr ein Kontinuum verschiedener Entwicklungszustände in Abhängigkeit des Alters und der Komplexität der Pyramidenzellen dar.

Die *Subplattenneurone* stellten sich in dieser Studie sowohl morphologisch, als auch im Antwortverhalten auf langanhaltende Depolarisationen als äußerst heterogene Zellpopulation dar. Weil dieser Zelltyp in bisherigen Studien elektrophysiologisch unzureichend untersucht wurde, sind diese Resultate für die Erstellung wei-

terführender kortikaler Entwicklungsmodelle von großer Bedeutung. Sowohl stark adaptierende, aber auch langanhaltende, tonische Entladungsmuster wurden gefunden. Dabei überwogen die Neurone mit hochfrequenten, langanhaltenden Aktionspotenzialserien. Da diese Zellpopulation neben den *Cajal-Retzius* Neuronen die ontogenetisch ältesten Neurone des Kortex sind, kann dieser "physiologische Phänotyp" auf einen höheren „Reifegrad“ schließen lassen, während stark adaptierende Zellen der *Subplatte* möglicherweise unreife, migrierende Zellen darstellen, die auf dem Weg in die *kortikale Platte* sind.

Die *Subplattenneurone* zeichneten sich durch ein sehr niedriges Schwellenpotenzial (-35 mV) und eine sehr schnelle Aktionspotenzialkinetik (8,6 ms) aus. Daher sind sie durch afferente synaptische Stimulation leicht erregbar und können diese Aktivität schnell weiterleiten. Wie die verzweigten Pyramidenzellen sind sie bereits im neonatalen Hirn in der Lage, inhibitorische und exitatorische Eingänge durch räumlich-zeitliche Summation zu verrechnen. Das bedeutet, dass sie bereits in der frühesten Entwicklung eine funktionelle Rolle übernehmen können.

Die beschriebenen aktiven Membraneigenschaften dieser ontogenetisch alten Neuronenpopulation stimmen gut mit anderen Resultaten zu diesem Zelltyp überein (McCormick & Prince, 1987).

Im Folgenden soll auf einige der grundlegenden Leitfähigkeiten eingegangen werden, die den bisher beschriebenen passiven und aktiven Eigenschaften zu Grunde liegen.

4.3.1 Kaliumleitfähigkeiten

Das elektrophysiologische Verhalten der hier untersuchten Neuronen zeigt, dass sie in der Lage sind, die für Aktionspotenziale verantwortlichen Natrium- und Kaliumströme zu generieren. So konnten Aktionspotenziale durch den Natriumkanalblocker Tetrodotoxin verhindert werden und die Repolarisationsphase durch intrazelluläre Perfusion mit Cäsiumionen verlängert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kaliumströme allerdings nicht im einzelnen untersucht, weil diese zum einen schon in vielen Studien des unreifen Kortex geschehen ist (z.B. Hamill et al., 1991; Zhou & Hablitz, 1996b; Kang et al., 1996) und zum anderen die Vielzahl der unterschiedlichen beteiligten Kaliumströme bei verschiedenen Zelltypen den Rahmen der Arbeit gesprengt hätten.

Ganzzelleableitungen unter Verwendung Cäsiumchlorid-gefüllter Pipetten zeigten im Vergleich zu Kalium-haltigen Pipettenlösungen jedoch deutlich höhere Eingangswiderstände und eine starke Verlängerung der abfallenden Flanke von Aktionspotentialen. Bei starker Depolarisation kam es nach der Blockade der Cäsiumsensitiven Kaliumkanäle vermutlich durch die Aktivierung von langsam inaktivierenden Kalziumströmen zur Ausbildung langer depolarisierender Plateaus. Da intrazellulär applizierte Cäsiumionen geeignet sind, I_K - und $I_{K(Ca)}$ - und teilweise I_A -Kaliumkanäle zu blockieren, sind also zumindest einige dieser Leitfähigkeiten in den Neuronen dieser Altersklasse funktionell aktiv. So sind zum Beispiel die depolarisierten Membranpotenziale bei Verwendung von Cäsiumchloridlösung möglicherweise auf die Blockade von I_K -Kanälen zurückzuführen.

Die Mehrzahl der *Cajal-Retzius* Neurone und der *Subplattenneurone* zeigten bei depolarisierenden überschwelligem Strominjektionen eine Verzögerung der Aktionspotentialgenerierung, die möglicherweise durch die Aktivierung eines transienten Kaliumauswärtsstroms (I_A) verursacht wird. Dieser Befund stimmt mit Resultaten anderer Untersuchungen überein. So wurde in einer Untersuchung an perinatalen Neuronen des Rattenkortex gezeigt, dass pyramidale und nicht-pyramidale Neurone in diesem Alter transiente und nicht-inaktivierende Kaliumleitfähigkeiten besitzen. Während bei Pyramidenzellen durch Depolarisation jedoch vorwiegend ein transienter Auswärtsstrom (I_A) aktiviert wurde, wurde in nicht-Pyramidenzellen vorwiegend ein nicht-inaktivierender Auswärtsstrom ($I_{K(V)}$) induziert. Beide Ströme konnten aber in beiden Zelltypen gefunden werden (Hamill et al., 1991). Auch in juvenilen Schicht I Neuronen (Zhou & Hablitz, 1996b) und *Cajal-Retzius* Neuronen (Mienville et al., 1999) konnte dieser Strom beschrieben werden.

In einer anderen Untersuchung über einen Kaliumstrom, der durch starke Hyperpolarisation aktiviert wird (I_h), konnte bei *Cajal-Retzius* Neuronen gezeigt werden, dass dieser zwar bereits vorhanden ist, aber nicht für das recht positive Ruhemembranpotenzial verantwortlich ist (Kilb & Luhmann, 2000).

Autoradiographischen Studien mit radioaktiv markiertem Apamin konnte zeigen darüber hinaus, dass bereits in der embryonalen und perinatalen Entwicklungsphase Apamin-sensitive Kaliumkanäle ($I_{K(Ca)}$) in allen Schichten des Neokortex exprimiert werden (Mourre et al., 1987; Hardingham et al., 1997). Diese werden als eines der ersten Ionenkanalproteine bereits in der *Ventrikulärzone* vor der Migration exprimiert (Mourre et al., 1987).

Eine andere Untersuchung an unreifen Pyramidenzellen der *kortikalen Platte* (Kang et al., 1996) zeigte, dass bei neugeborenen Ratten (P0 bis P5) zwei Typen von Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen ($I_{K(Ca)}$) mit hohen Leitfähigkeiten (B_K -Kanäle), aber unterschiedlichen Kinetiken zu finden und funktionell aktiv sind. Diese Kanäle werden meist sekundär über die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels aktiviert und modulieren durch die resultierende langsame Hyperpolarisation den Zeitverlauf von Aktionspotenzialen, sowie die Impulsauslösung bei niedriger Frequenz.

4.3.2 Transiente Natriumströme

Autoradiographische Untersuchungen zeigen, dass bei Ratten bereits prä- und perinatal TTX-sensitive Natriumkanäle exprimiert werden, die jedoch in der postnatalen Entwicklung innerhalb einiger Tage sehr schnell heraufreguliert werden und damit an Dichte zunehmen (Mourre et al., 1987).

Wie aus elektrophysiologischen Studien ebenfalls bekannt ist, ist in vielen Neuronen des embryonalen und perinatalen Kortex ein transienter Natriumstrom zu evozieren (Ahmed, 1988; Huguenard et al., 1988; Mienville et al., 1994).

Keine derartige Untersuchung des postnatalen Neokortex wurde jedoch an identifizierten Neuronen im Hirnschnitt durchgeführt, sondern entweder an akut dissoziierten postnatalen Neuronen, oder an kultivierten embryonalen Neuronen. Diese artifiziellen Eingriffe können aber nur unter der Annahme einer homogenen Ionenkanalverteilung auf vollständig erhaltene Neuronen im Gewebeverband übertragen werden. Daher kann diese Untersuchung von Natriumströmen identifizierter Neuronen im Hirnschnitt den bisherigen Wissensstand vertiefen.

In allen vier Neuronenpopulationen der vorliegenden Studie konnten Tetrodotoxin (TTX)-sensitive Natriumströme durch Depolarisationen aktiviert werden. Nach Applikation von 1 μM TTX zu der Badlösung konnte in der Stromklemme bei starker und langer Depolarisation kein Aktionspotenzial mehr ausgelöst werden. In der Spannungsklemme wurden isolierte Natriumströme durch diese Konzentration an TTX vollständig verhindert.

Dieser Befund stimmt mit bisher veröffentlichten Untersuchungen überein und legt die Annahme nahe, dass im Neokortex schon in der frühen Entwicklung Aktionspotenziale durch Natrium- und nicht durch andere Kationen initiiert werden. Die Dichte dieser Kanäle scheint allerdings in der pränatalen Ontogenese zunächst niedrig zu sein, um dann postnatal anzusteigen. So wurde in autoradiographischen Untersuchungen mit radioaktiv markiertem TTX eine schwache und diffuse Färbung in allen kortikalen Schichten zwischen P0 und P5 gefunden, die ab dem Tag P7 rapide an Intensität zunahm (Hardingham et al., 1997).

Elektrophysiologische Untersuchungen an akut dissoziierten Pyramidenzellen und nicht-Pyramidenzellen des perinatalen Kortex zeigten, dass bereits in der frühesten Entwicklung (E16-P5) Natriumströme in diesen Zellen zu aktivieren sind (Huguenard et al., 1988). Im Vergleich zu adulten Neuronen waren allerdings die Stromdichten mit 10 bis 13 $\text{pS}/\mu\text{m}^2$ sehr niedrig. Die Amplitude des Natriumstroms nahm in der weiteren postnatalen Entwicklung bei Pyramidenzellen um das 10fache zu, bei nicht-Pyramidenzellen immerhin um das 5fache. Diese Zunahme ist nach Ansicht der Autoren eher auf eine Zunahme der Ionenkanaldichte zurückzuführen, als auf eine veränderte Einzelkanalkinetik.

Zeitgleich mit dem Natriumstrom erhöhen sich auch die Amplitude und die Anstiegsgeschwindigkeit der Aktionspotenziale (McCormick, Prince, 1987). Rückschließend lassen sich also auch die gemessenen niedrigen Aktionspotenzialamplituden und die langsame Anstiegsgeschwindigkeit der Aktionspotenziale dieser Untersuchung mit einer geringen Dichte der Natriumkanäle im neugeborenen Rattenkortex erklären.

4.3.3 „HVA-Kalziumströme

Rezeptorautoradiographische Untersuchungen zeigen, dass bereits im perinatalen Neokortex Verapamil-sensitive Kalziumkanäle in geringer Dichte exprimiert werden, die langsame Kalziumströme vermitteln können (Mourre et al., 1987).

In situ Hybridisierungen zeigten darüber hinaus in neokortikalen Proliferationsschichten und in der *kortikalen Platte* das Vorliegen von mRNAs, die spannungsgesteuerte Kalziumkanalproteine kodieren (Tanaka et al., 1995).

Es ist bekannt, dass bereits embryonale postmitotische kortikale Neuronen neben spannungsabhängigen Kalziumkanälen auch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und intrazelluläre Kalziumspeicher besitzen, die für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase wichtig sind (Maric, 2000)

Dienen die Natrium- und Kaliumströme vor allem der Impulsbildung und der Regulation der repetitiven Entladungsmuster, initiieren Kalziumionen die synaptische Transmission, regulieren als sekundärer Botenstoff zahlreiche Haushalts- und Entwicklungsprozesse und können die Erregbarkeitsschwelle von Neuronen modulieren.

Es ist bekannt, dass intrazelluläre Kalziumionen in der Entwicklung eine wichtige Rolle bei der neuronalen Migration (Komuro & Rakic, 1992; Lawson & Maxfield, 1995), Zelldifferenzierung (Gu & Spitzer, 1995), axonalem (Kocsis et al., 1994; Cang et al., 1995) und dendritischem Wachstum (Schilling et al., 1991), Synaptogenese (Owens et al., 1996) und bei der Apoptose spielen (Franklin & Johnson, 1992, 1994).

Es stellt sich die Frage, ob Kalziumkanalproteine als Folge dieser Prozesse exprimiert werden, oder ob sie die Grundlage davon darstellen und die durch sie vermittelten Ströme die Entwicklung steuern. Eine nähere Untersuchung der Kalziumströme könnte Aufschluss über diese denkbaren Zusammenhänge geben.

Kalziumströme konnten nach Blockade der Natrium- und Kaliumströme in allen untersuchten Zelltypen durch Depolarisation evoziert werden. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen trat aber nur ein langsam inaktivierender Strom auf, der durch die Applikation von Kadmium zu blockieren war. Ein transients (T-Strom) Kalziumstrom, wie er von einigen Autoren teilweise an anderen Modellen und zu anderen Entwicklungsstufen beschrieben wurde (z.B. Friedmann & Gutnick, 1987; Sayer et al., 1990; Hamill et al., 1991; Thompson & Wong, 1991), trat nur sehr selten auf und wurde daher nicht systematisch untersucht.

Ebenso wurde in dieser Untersuchung keine Unterscheidung zwischen den fünf zur Zeit bekannten HVA-Kalziumströmen (L-, N-, P-, Q- und R-Typ) vorgenommen, da eine pharmakologische Isolation dieser fragilen Ströme im Hirnschnitt schwer durchzuführen und die Ableitbedingungen suboptimal waren. Daher wurde die Untersuchung auf elementare biophysikalische Parameter mit verlässlicher Aussagekraft unter den gegebenen Bedingungen eingeeengt.

Die Kalziumströme setzten sich aus einer transienten Komponente und einer langsam inaktivierenden Komponente zusammen, wie sie auch z.B. in hippocampalen Neuronen der CA1 Region gefunden werden konnten (Faas et al., 1996).

Die Spannungsabhängigkeit der Kalziumströme stimmt mit Untersuchungen perinataler (Hamill et al., 1991), postnataler (Lorenzon & Foehring, 1995) und juveniler (Brown et al., 1993) neokortikaler Neurone überein. Berichten Lorenzon und Foehring von ähnlichen Maximalamplituden (196 pA) bei P0-P6 Tieren, sind bei juvenilen Tieren (P10-P28) Amplituden (485 pA) und Stromdichten ($28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) der HVA-Kalziumströme doppelt so groß (Brown et al., 1993) wie in der vorliegenden Arbeit. Dieser Befund lässt auf eine Heraufregulation der Kalziumkanäle in der postnatalen Entwicklung kortikaler Neurone schließen, wie sie auch in anderen Studien des Kortex (Hamill et al., 1991) und des Kleinhirns (Gruol et al., 1992) gefunden wurde.

Die Inaktivierungs- und Deaktivierungskinetiken dieser Studie stimmen recht gut mit den Ergebnissen bei Ableitungen von neokortikalen Neuronen von P6-P10 Tieren überein (Lorenzon & Foehring, 1995).

Es stellt sich die Frage, ob die biophysikalischen Parameter der Kalziumströme für bestimmte Zelltypen oder Entwicklungsstadien funktionelle Konsequenzen haben. Geht man davon aus, dass die *unverzweigten Pyramidenzellen* dieser Studie migrierende Neurone darstellen, sollten sie während der Migration einem hohen Kalziumeinstrom unterliegen.

Aus Studien an migrierenden Neuronen des Kleinhirns ging hervor, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Komuro & Rakic, 1996) und der Einstrom dieser Ionen durch N-Typ Kalziumkanäle (Komuro & Rakic, 1992) elementar für die Geschwindigkeit der Migration sind.

In der vorliegenden Arbeit zeigten *unverzweigte Pyramidenzellen* die höchsten Stromdichten der transienten und der langsam inaktivierenden Komponente und zugleich ein sehr niedriges Ruhemembranpotenzial. Dadurch kann ein beständiger hoher Kalziumeinstrom in diese Neurone gewährleistet werden. Dieser Befund könnte als Untermauerung der oben genannten Studien dienen. Im Gegensatz zu diesen Neuronen zeigten nicht (mehr) migrierende *Cajal-Retzius* Neurone und *Subplattenneurone* die niedrigsten Kalziumstromdichten.

Neben dem eben diskutierten Vorgang der Migration stellt ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel auch einen möglichen Auslöser oder wenigstens eine Bedingung für den programmierten Zelltod (Apoptose) dar. Nach Franklin und Johnson's „Ca²⁺ set-point Hypothese“ ist ein bestimmter intrazellulärer Kalziumspiegel ([Ca²⁺]_i) und die Mitwirkung neurotropher Faktoren für das Überleben und das Neuritenwachstum neuronaler Zellen von entscheidender Bedeutung (Franklin & Johnson, 1994). Sie unterscheiden in diesem Modell vier Zustände, den [Ca²⁺]_i einnehmen kann.

„Ca²⁺ set-point Hypothese“ nach Franklin und Johnson:

1. [Ca²⁺]_i ist extrem niedrig, was zur Degeneration der Neuronen selbst in Anwesenheit neurotropher Faktoren führt.
2. [Ca²⁺]_i ist im „Ruhezustand“ (~100 nM) und ermöglicht das Überleben von Neuronen nur unter Mitwirkung neurotropher Faktoren.
3. [Ca²⁺]_i ist leicht erhöht (einige 100 nM), so dass Neurone auch in Abwesenheit von neurotrophen Faktoren überleben können.
4. [Ca²⁺]_i ist über längere Zeit extrem hoch (> 1 µM) und führt unweigerlich zur Apoptose.

In der Entwicklung des Neokortex der Ratte sind die *Cajal-Retzius* und *Subplattenneurone* nach den ersten beiden postnatalen Wochen nur noch selten nachzuweisen (Price et al., 1997; Ferrer et al., 1990; Al Ghouli & Miller, 1989).

Möglicherweise ist der programmierte Zelltod die Ursache für das scheinbare Verschwinden dieser Zellen. Da in diesen transienten Zellpopulationen die geringsten Stromdichten der HVA-Kalziumströme gemessen wurden, scheidet ein zu hoher Einstrom über diese Kanäle als alleinige Ursache für einen Tod durch Apoptose zunächst aus.

Allerdings ist neben der Stromdichte der HVA-Kalziumströme das Ruhemembranpotenzial, die Stärke und Dauer depolarisierender synaptischer Eingänge und die Ausstattung mit Kalziumregulatoren, wie Kalzium-bindenden Proteinen und Kalziumtransportern für die Homöostase von [Ca²⁺]_i wichtig.

Das niedrige Ruhemembranpotenzial der *Cajal-Retzius* Neurone könnte in Verbindung mit einer postnatalen Heraufregulation der NMDA-Rezeptordichte durch tonische Aktivierung unspezifisch und/oder synaptisch freigesetzten Glutamats zu einer andauerenden hohen intrazellulären Kalziumkonzentration führen, die nach der "Ca²⁺ set-point-Hypothese" die Apoptose zur Folge haben könnte (Mienville, 1999).

Die Eingangs gestellte Frage, ob die Regulation der Expression von Kalziumkanalproteinen Folge oder Ursache der verschiedenen Entwicklungsschritte der kortikalen Entwicklung ist, kann mit diesen Resultaten selbstverständlich nicht umfassend beantwortet werden. Jedoch zeigen die unterschiedlichen Stromdichten der untersuchten Neurone, dass in verschiedenen Entwicklungsstadien und verschiedenen Neuronentypen die Menge des in die Zelle eintretenden Kalziums sehr unterschiedlich ausfallen kann. Im Zusammenhang mit anderen Faktoren kann dieser Parameter, wie für die Migration und Apoptose beschrieben, für die weitere Entwicklung durchaus von elementarer Bedeutung sein.

Es ist jedoch zu vermuten, dass nicht allein die Höhe, sondern vielmehr die räumlich-zeitliche Verteilung der Kalziumionen eine nicht zu unterschätzende Rolle für Steuerung der Entwicklungsvorgänge spielt. Dieses wird sehr deutlich am Beispiel der Regulation des Transkriptionsfaktors CREB, der durch Kalziumionen aktiviert wird, die über L-Typ Kalziumkanäle in die Zellen gelangen (Ghosh & Greenberg, 1995, Rajadhyaksha et al., 1999).

Dabei dient in einer Kaskade von Ereignissen möglicherweise ein depolarisiertes Membranpotenzial der Lösung der Mg^{2+} -Blockade von NMDA-Rezeptoren, so dass durch diese Kanäle Kalzium in die Zelle gelangt. Die dadurch vermittelte Depolarisation kann dann spannungsgesteuerte Kalziumkanäle aktivieren, so dass schließlich über dass so in die Zelle gelangende Kalzium eine Regulation der Genexpression möglich wird.

Alle genannten Kalziumeintrittswege (mit Ausnahme des Fehlens synaptischer Eingänge der CR Neurone) konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die Steuerung der differentiellen Genexpression durch Kalziumionen ist also bereits in der frühen postnatalen Entwicklung denkbar.

4.4 Beteiligung der Leitfähigkeiten am Feuerungsverhalten

Die zwischen den Zelltypen beschriebenen Unterschiede hinsichtlich des Feuerungsverhaltens können auf der Basis unterschiedlicher Verhältnisse der Natrium-, Kalium- und Kalziumleitfähigkeiten erklärt werden. Während die Kinetik der Natriumkanäle für die ansteigende Flanke des Aktionspotenzials verantwortlich ist, bedingen hyperpolarisierende Kaliumleitfähigkeiten die Repolarisation des Membranpotenzials.

Die ontogenetisch älteren *Subplattenneurone* zeigten höhere Natriumstromdichten als unreife und *verzweigte Pyramidenzellen*. Damit einhergehend waren auch die "reifsten", d.h. hochfrequentesten Entladungsmuster bei den ontogenetisch älteren *Cajal-Retzius* Neuronen und *Subplattenneuronen* abzuleiten. Dagegen waren in den unreifen und verzweigten Pyramidenzellen niedrigere Natriumstromdichten, jedoch gleichzeitig die höchsten Kalziumstromdichten zu messen.

Ein durch Depolarisation verursachter hoher intrazellulärer Kalziumspiegel könnte die Aktivierung von Kalzium abhängigen Kaliumströmen fördern, die elementar an der Regulation des Feuerungsverhaltens beteiligt sind.

Diese Ströme sollten daher in weiterführenden Untersuchungen an den Zelltypen untersucht werden, um die genauen Ursachen für die sehr heterogenen Feuerungseigenschaften herauszufinden.

4.5 Die frühe kortikale Konnektivität

4.5.1 Thalamo-kortikales und kortiko-kortikales Netzwerk

Für die Funktionalität des reifenden Neokortex ist neben den bisher beschriebenen intrinsischen Parametern die interzelluläre Kommunikation durch Neurotransmitter von entscheidender Bedeutung.

Zur Untersuchung dieser Prozesse wurden thalamo-kortikale und kortiko-kortikale Afferenzen in der tiefen *Subplatte* durch elektrische Stimulation aktiviert und die postsynaptische Aktivität in der *Subplatte*, der *kortikalen Platte* und der *Marginalzone* mit Hilfe von Ganzzelleableitungen charakterisiert.

Es stellte sich heraus, dass *Cajal-Retzius* Neurone und die unreifen Pyramidenzellen der *kortikalen Platte* unter diesen Bedingungen keine synaptischen Eingänge erhalten. Dagegen zeigten *verzweigte Pyramidenzellen* der *kortikalen Platte* und *Subplattenneurone* nach afferenter Stimulation regelmäßig langanhaltende postsynaptische Aktivität.

Die Amplituden und die Dauer, sowie die Form dieser Aktivität war abhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration, der Stimulationsintensität und der Reizfrequenz.

Diese Parameter deuten darauf hin, dass ein weit verzweigtes polysynaptisches Netzwerk thalamo-kortikaler und kortiko-kortikaler Afferenzen, sowie intrakortikale Verbindungen zwischen *Subplattenneuronen* und Pyramidenzellen der unteren *kortikalen Platte* die beobachtete synaptische Aktivität vermittelt.

Die in dieser Arbeit beobachtete langanhaltende, polysynaptische Aktivität in *Subplattenneuronen* und verzweigten Pyramidenzellen steht im Einklang mit früheren Veröffentlichungen (Carmignoto & Vicini, 1992; Burgard & Hablitz, 1993; Kim et al., 1995), die ähnliche DL-APV-sensitive synaptische Antworten im Neokortex neugeborener Ratten beschreiben.

Damit wird gezeigt, dass die ontogenetisch früh gebildeten Neuronen der tieferen kortikalen bereits recht früh afferente synaptische Signale verarbeiten können.

Die Fähigkeit von *Subplattenneuronen* und "reifen" Pyramidenzellen, synaptische Netzwerkaktivität zu vermitteln, während jüngere *unverzweigte Pyramidenzellen* in höheren Schichten keinen Eingang erhalten, macht deutlich, dass hier eine Überlappung funktioneller und morphogenetischer Aktivität stattfindet. Diese ist *in vivo* auf stimulierende exogene Einflüsse angewiesen, fußt also nicht mehr auf rein intrinsischen Prozessen.

In der untersuchten Altersklasse können also überschwellige adäquate Reize aus der Umwelt einen Einfluss auf die Struktur und damit auf die Funktionalität des reifenden Neokortex ausüben.

Diese Beobachtung stimmt gut mit Arbeiten zur Rolle der *Subplatte* und der Entwicklung thalamo-kortikale und kortiko-kortikaler Afferenzen überein. An verschiedenen Säugetieren wurden thalamo-kortikale Verbindungen als erste subkortikale Afferenzen beschrieben (Ghosh & Shatz, 1990, 1992a, 1992b, 1993; Erzurumlu & Jhaveri, 1992; Miller et al., 1993; Kageyama & Robertson, 1993; Catalano et al., 1991; Allendoerfer et al., 1994). Die Axone thalamischer Projektionszellen wandern durch die Capsula interna, breiten sich tangential aus und nehmen in der *Subplatte* vor allem Kontakt mit dendritischen Dornfortsätzen der *Subplattenneurone* auf. Dort bilden sie funktionelle exzitatorische Synapsen aus (Friauf et al., 1990; Friauf & Shatz, 1991; Ghosh & Shatz, 1992b; Herrmann et al., 1994).

Ebenso stellen kortiko-kortikale Verbindungen erste Verbindungen afferenter und efferenter Natur zwischen den beiden Kortexhemisphären her (Norris & Kalil, 1992). Es wird davon ausgegangen, dass die einwachsenden Axone in der *Subplatte* eine „Warteperiode“ einlegen, bevor sie mit Axonkollateralen in die *kortikale Platte* einwachsen (Ghosh et al., 1990; Ghosh & Shatz, 1992b; Catalano et al., 1991).

Eine Zerstörung der *Subplattenneurone* des visuellen Kortex der Katze zu diesem Zeitpunkt lässt z.B. die thalamischen Axone ihr eigentliches Zielgebiet, die Neurone der späteren Schicht IV, nicht finden (Ghosh & Shatz, 1993). Eine Zerstörung zu späteren Zeitpunkten verhindert die Ausbildung der okulären Dominanzsäulen (Ghosh & Shatz, 1992a).

Die afferente Stimulierung des sich entwickelnden Neokortex ist daher von existenzieller Bedeutung für die Organisation des Kortex. Blockiert man diese Eingänge, kommt es zu Entwicklungsstörungen der afferenten Projektionen (Stryker & Harris, 1986; Reiter et al., 1986).

Neben den *Subplattenneuronen* werden gegen Ende der Warteperiode die Dendriten der Pyramidenzellen in den Schichten IV - VI von thalamo-kortikalen und kortiko-kortikalen Axonen innerviert (Norris & Kalil, 1992; Kageyama & Robertson, 1993), wo sie ebenfalls funktionelle Synapsen ausbilden (Agmon et al., 1996). Zeitgleich existieren aber auch weitreichende, horizontale Verbindungen innerhalb der *Subplatte* und der *kortikalen Platte* (Assal & Innocenti, 1993; Galuske & Singer, 1996). Damit wäre neben prägenden afferenten Einflüssen auch eine frühe intrakortikale Informationsverarbeitung möglich.

Inwieweit diese möglich und sinnvoll ist, hängt jedoch stark von der efferenten Konnektivität sowie der Kinetik der synaptisch evozierbaren Signale ab. Nur ein schnelles und differenziertes postsynaptisches Reaktionsvermögen und die Fähigkeit, schnelle und repetitive Aktionspotenziale zu generieren würde eine echte Informationsverarbeitung ermöglichen.

Neben thalamo-kortikalen Projektionen und glutamatergen *Subplattenneuronen* stellen die verzweigten Pyramidenzellen der unteren *kortikalen Platte* eine Quelle für glutamaterge Netzwerkaktivität dar. Es ist bekannt, dass diese Pyramidenzellen bereits weitreichende axonale Projektionen in horizontaler Orientierung aussenden (Luhmann et al., 1986; 1990) und dadurch ein weitmaschiges Netzwerk bilden. Dadurch tragen diese Neurone vermutlich einen großen Teil der durch AMPA- und NMDA-Rezeptoren vermittelten Aktivität (Kim et al., 1995). Die starke Adaptation der Pyramidenzellen nach überschwelliger Depolarisation wird jedoch die exzitatorische Netzwerkaktivität nur teilweise weitergeben. Dadurch stellen die intrinsischen Membraneigenschaften dieser Neurone einen inhibierenden, zumindest aber dämpfenden Faktor im postnatalen kortikalen Netzwerk dar, der eher gegen eine wirkliche Funktionalität dieser Netzwerke spricht.

In einer Untersuchung der Ontogenese kortikaler Glutamatrezeptoren konnten postnatal sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren im gesamten Kortex nachgewiesen werden (Blue & Johnston, 1995).

Sowohl die Glutamatergen Antagonisten NBQX und DL-APV, als auch der GABA_A-Antagonist BMI reduzierten in der vorliegenden Untersuchung Dauer und Amplitude der starken postsynaptischen Antworten in den tiefen kortikalen Schichten. Das bedeutet, dass NMDA- und AMPA-Rezeptoren, aber auch GABA_A-Rezeptoren bzw. die Transmitter Glutamat und GABA an der Verbreitung der Netzwerkaktivität wesentlich beteiligt sind.

Dieser Befund steht im Einklang mit der Tatsache, dass unter *Subplattenneuronen* neben Glutamatergen Neuronen auch GABAerge Neurone gefunden werden können und in der *Subplatte* eine starke Immunreaktivität für den GABA_A-Rezeptor (Cobas et al., 1991) zu finden ist.

Die Sensitivität der beobachteten Netzwerkaktivität für BMI stimmt mit ähnlichen Befunden im neonatalen Kortex der Maus überein (Agmon et al., 1996). Obwohl eine GABAerge Komponente in das Netzwerk integriert ist, wirkt GABA hier, wie auch Glutamat, exzitatorisch. Dieser Befund stimmt auch mit anderen Untersuchungen am neonatalen Kortex der Ratte überein (Owens et al., 1996).

Die depolarisierende Wirkungen von GABA in der frühen Ontogenese wurde auch bei Neuronen anderer Bereiche des Säugerhirns beschrieben (Cherubini et al., 1991; Ben-Ari et al., 1997). Interessanterweise werden neben GABA_A-Rezeptoren im unreifen Neokortex auch Glyzin-Rezeptoren exprimiert, die z.B. nach Bindung von Glyzin oder Taurin ebenfalls einen Chloridstrom vermitteln können, der in dieser Altersklasse exzitatorisch ist. Dabei wird aus vielen Neuronen des unreifen Kortex Taurin nach Stimulation freigesetzt (Flint et al., 1998).

Die exzitatorische Wirkung beruht bei GABA- und Glyzin/Taurinergen Strömen vermutlich auf einem veränderten Chloridgleichgewicht in diesen Neuronen, verglichen mit adulten Neuronen. Die intrazelluläre Chloridkonzentration verschiebt sich in der frühen kortikalen Entwicklung von etwa 20 mM bei der Geburt auf 11,7 mM

am Tag P16 bei Pyramidenzellen (Owens et al., 1996; Mienville, 1998). Dadurch ist das Chlorid-Umkehrpotenzial in diesem Alter positiver als das Ruhemembranpotenzial, was zu der depolarisierenden GABAergen Aktivität führt.

Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass die besonders lang andauernde NMDA-Komponente in neonatalen Neuronen verglichen mit adulten Neuronen auf eine besondere Untereinheitenkombination dieses Rezeptors in dieser Altersklasse zurückzuführen ist (Williams et al., 1993b; Sheng et al., 1994; Flint et al., 1997). Die NMDA-Komponente wurde durch die Applikation entweder von DL-APV oder Ifenprodil stark vermindert. Ifenprodil bindet stark an heteromere NMDA-Rezeptoren aus NR1/NR2B-Untereinheiten, aber schwach an NR1/NR2A-Heteromere (Williams, 1993a; Kew et al., 1998). Daher ist eine Beteiligung der NR2B-Untereinheit an der Mehrzahl der funktionellen NMDA-Rezeptoren neonataler Neurone des Kortex anzunehmen.

Diese Beobachtung stimmt mit dem Auftreten von NR2B-mRNA in kortikalen Neuronen zum Zeitpunkt der Geburt überein, während die NR2A-mRNA in den ersten drei Wochen postnatal heraufreguliert wird (Sheng et al., 1994). Gleichzeitig nimmt die Sensitivität der NMDA-Rezeptoren für Ifenprodil altersabhängig ab. Heteromere aus NR1/NR2B zeigten auch in anderen Untersuchungen eine langsamere Deaktivierungskinetik als NR1/NR2A-Heteromere (Monyer et al., 1994).

Neben den synaptischen NMDA-Rezeptoren vermitteln auch extrasynaptische NMDA Rezeptoren aus NR1/NR2B-Untereinheiten in dieser Altersklasse eine Glutamatantwort, deren Ifenprodil-Sensitivität mit zunehmendem Alter stetig abnimmt (LoTurco et al., 1991; Mohrmann et al., 2000). Neben der ohnehin langsameren Kinetik dieser Heteromere würde die Bindung unspezifisch freigesetzten Glutamats an extrasynaptische Rezeptoren eine nochmals starke Verlangsamung der Kinetik verursachen, da die Diffusionswege hier deutlich länger als bei der synaptischen Transmission sind. Es käme in vermutlich zu einer mehr oder weniger tonischen Depolarisation (LoTurco et al., 1991). Auch *unverzweigte Pyramidenzellen* der oberen Schichten könnten über diese extrasynaptischen Wege Glutamaterg depolarisiert werden. Möglicherweise ist das NR1/NR2B-Heteromer mit

der langsamen Kinetik und dem damit verbundenen starken Kalziumeinstrom nach synaptischer und extrasynaptischer Aktivierung somit für diverse Differenzierungsvorgängen von elementarer Bedeutung. Die Behandlung migrierender Neurone des Kleinhirns mit DL-APV führt zum Beispiel zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit (Komuro, Rakic, 1993; 1996).

Erstaunlich ist nun jedoch die Feststellung, dass Ifenprodil monosynaptische postsynaptische Ströme um 28% verringerte, während DL-APV nur eine Verringerung um 19% bewirkte. Diese Beobachtung könnte auf eine unspezifische Wirkung auf AMPA-Rezeptoren zurückzuführen sein (Kirson & Yaari, 1996).

Die Verwendung von BMI als GABA_A-Antagonist hatte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf monosynaptische postsynaptische Ströme. Es konnte sogar eine geringfügige Vergrößerung der Amplituden monosynaptischer Antworten beobachtet werden. Die Diskrepanz zwischen inhibitorischer Wirkung auf polysynaptische Ströme einerseits, aber keiner Reduktion monosynaptischer Ströme andererseits lässt darauf schließen, dass GABAerge Neurone in das perinatale Netzwerk integriert sein müssen, aber durch das gewählte Paradigma nicht demaskiert werden konnten.

Da in der *Subplatte* GABAerge Neurone nachgewiesen wurden (Lauder et al., 1986; Wahle et al., 1987; Van Eden et al., 1989; Cobas et al., 1991; Meinecke, Rakic, 1992; Yan et al., 1997; Del Rio et al., 1992), generieren vermutlich diese Neurone den GABAergen Anteil an der Netzwerkaktivität. Diese Neurone bilden weitreichende horizontale Axonnetzwerke innerhalb der *Subplatte* und der Schichten V/VI des neonatalen Kortex (Ghosh et al., 1990; De Carlos & O'Leary, 1992; Miller et al., 1993; Assal & Innocenti, 1993; Galuske & Singer, 1996). Postsynaptische Ziele der Axone sind Dendriten anderer *Subplattenneurone* (Meinecke & Rakic, 1992) und Schicht V/VI Neurone, aber auch Projektionsneurone der *Subplatte* (Ghosh et al., 1990).

Eine andere wichtige GABAerge Neuronenpopulation des Neokortex stellen vermutlich die nicht-CR Neurone der *Marginalzone* dar. Von diesen konnten aber in der vorliegenden Arbeit nach Aktivierung thalamischer Eingänge bzw. nach Erre-

gung von *Subplattenneuronen* in keinem Fall postsynaptische Aktivität abgeleitet werden. Damit wird deutlich, dass die Neurone der *Marginalzone* vermutlich nicht an den abgeleiteten postsynaptischen Antworten im Rahmen dieser Untersuchung beteiligt waren und damit nicht in ein frühes thalamo-kortikales, kortiko-kortikales oder intrakortikales Netzwerk eingebunden sind.

Das nicht-CR und CR Neurone trotzdem eine funktionelle Rolle in einem parallelen perinatalen oder dem reifen adulten Netzwerk spielen, wurde in jüngeren Publikationen mehrfach gezeigt (Kim et al., 1995; Hestrin & Armstrong, 1996; Zhou & Hablitz, 1996; Mienville & Barker, 1997; Schwartz et al. 1998; Mienville 1998). Dieses Netzwerk ist vermutlich unabhängig von den thalamo-kortikalen Verbindungen über die *Subplatte* und dient eher dem kortikalen Wachstum und der Laminierung, als der frühen kortikalen Informationsverarbeitung.

Es ist bekannt, dass perinatale CR Neurone durch Glutamat und wegen ihres Cl⁻-Gleichgewichtspotentials, das positiver als das Ruhemembranpotenzial ist, auch durch GABA depolarisiert und damit zu lang anhaltender neuronaler Aktivität ange regt werden können (Mienville, 1998). Dieses unterscheidet sie von den meisten anderen Neurone, bei denen in neonatalen Hirnen ein Wechsel von exzitatorischer GABAerger Wirkung hin zu inhibitorischer Wirkung festzustellen ist (z.B. Ben-Ari et al. 1997). Es ist weiterhin bekannt, dass neonatale CR Neurone spontane Aktionspotenzial generieren (Mienville 1998). Glutamaterge und GABAerge Netzwerkaktivität durch ein Netzwerk von tangential in der *Marginalzone* angeordneten Neuriten der CR und nicht-CR Neurone könnte damit zu einer starken Sezernierung von Reelin oder anderen trophischen Substanzen aus CR und nicht-CR Neuronen führen. Es wird vermutet, dass die Neurotransmitter GABA und Glutamat bei un spezifizierter Freisetzung in bestimmten Konzentrationsbereichen selber als trophische Faktoren dienen. Ausgehend von der *Marginalzone* würde eine recht starker Gradient dieser Substanzen im unreifen Kortex vorliegen, der in einer gewissen Entfernung von der *Marginalzone* als Attraktor dienen, bei überschreiten bestimmter Konzentrationen in der Nähe der *Marginalzone* aber auch als Stoppsignal für migrierende Neurone dienen könnte. Die dazu notwendige korrelierte Aktivität

konnte in Neuronen der *Marginalzone* nachgewiesen werden (Zhou & Hablitz, 1997; Schwartz et al., 1998; Aguilo et al., 1999). Reelin wurde in Verbindung experimentellen Untersuchungen als Vermittler eines Stoppsignals der Migration identifiziert und ist verantwortlich für die Loslösung der Neurone von den Radialgliazellen (Dulabon et al., 2000). Ein weitere Hinweis auf die wichtige Funktion der CR Neurone und des Reelins in der Entwicklung des Neokortex ist die Beobachtung, dass es in der Folge einer Zerstörung der CR Neurone zu einer gestörten Zytoarchitektur des adulten Kortex kommt (Supèr et al., 1997).

Neben der unspezifischen Ausschüttung neurotropher Wirkstoffe in der *Marginalzone* sind aber auch lokale Effekte denkbar. So projizieren beispielsweise Axonkolateralen von Neuronen der *Marginalzone* in die *kortikale Platte* und können die dortigen Neurone afferent stimulieren. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass selbst relativ hochfrequente Stimulation innerhalb der *Marginalzone* zu robusten monosynaptischen Antworten in *Cajal-Retzius* Neurone und Neuronen der *kortikalen Platte* führt. Diese Aktivität ist durch CNQX, DL-APV und BMI blockierbar (Dammerman & Kriegstein, 1998).

Die in dieser Arbeit gefundenen niedrigen Membranpotenziale würden durch das Fehlen einer Mg^{2+} -Blockade eine ständige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren bei präsynaptischer Aktivität zulassen. Es ist vorstellbar, dass die autonome Netzwerkaktivität innerhalb der *Marginalzone* und die damit verbundene mehr oder weniger tonisch-phasische Exzitation der *kortikalen Platte* für die Migration dieser Neurone von großer Bedeutung ist. So konnte gezeigt werden, dass migrierende Neurone des Zerebellums in Abhängigkeit von intrazellulären "Kalziumwellen" schnell bei einer Erhöhung des Kalziumspiegels und langsam bei einem niedrigen Kalziumspiegel wandern (Komuro & Rakic, 1996).

Die bisherigen Daten zur Funktion der *Subplattenneurone* und der *Marginalzone* lassen die Vermutung zu, dass die Neurone der *Marginalzone* durch den Ausstoß von neurotrophisch oder aber auch repulsiv wirkenden Faktoren der groben Orientierung und Schichtenbildung durch migrierende unreife Pyramidenzellen dienen. *Subplattenneurone* dagegen könnten durch ihre bereits recht differenzierte synap-

tische Konnektivität mit subkortikalen und anderen kortikalen Gebieten eher die Feinabstimmung und funktionelle Entwicklung des Kortex steuern.

4.5.2 Modell zur neonatalen kortikalen Konnektivität

Die mögliche Konnektivität der untersuchten Neuronenpopulationen soll abschließend in dem folgenden Modell zusammengefasst dargestellt werden:

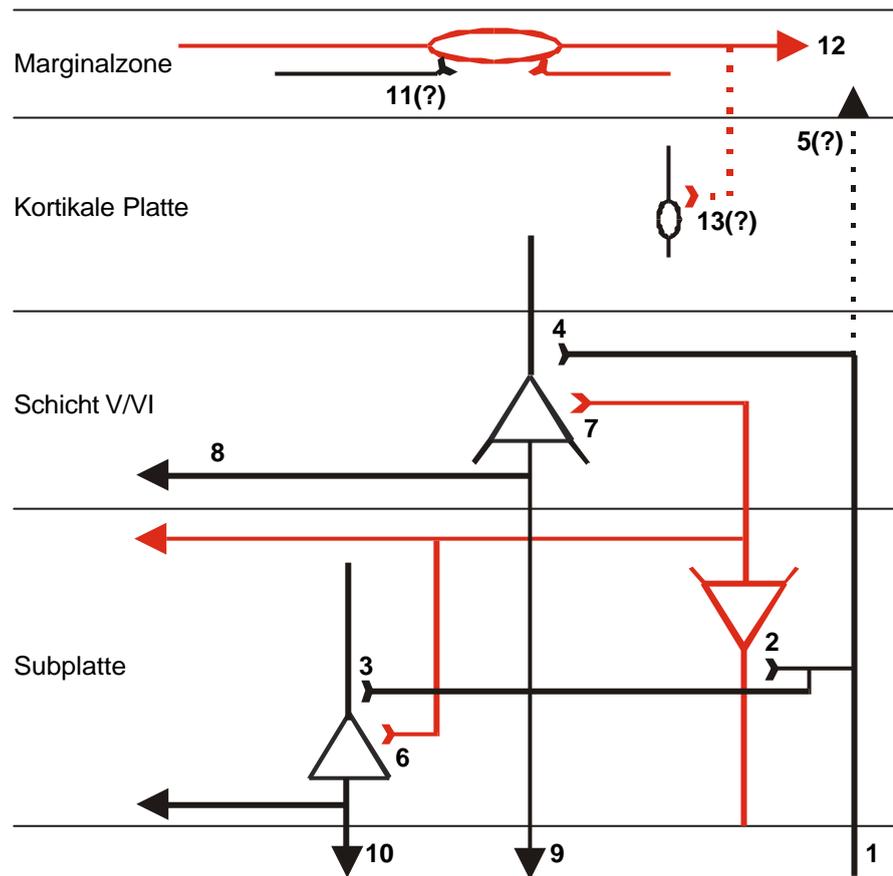


Abb. 52 Eingehende afferente Aktivität unterhalb der *Subplatte* aktiviert glutamaterge thalamokortikale Axone (1). Diese nehmen Kontakt mit GABAergen (2) und glutamatergen (3) SP Neuronen, sowie glutamatergen Prinzipalneuronen der Schicht V/VI auf (4). Unklar ist es bisher, ob auch die *Marginalzone* von diesen Axonen afferent stimuliert wird (5). Die Aktivität der GABAergen SP Neurone wird innerhalb der *Subplatte* durch weitreichende horizontale Axone zu anderen SP Neuronen (6) und durch Kollateralen in die Schicht V/VI (7) weitergegeben. Die Aktivität in der *Subplatte* ist sowohl GABAerg, als auch glutamaterg. Prinzipalneurone der zuerst gebildeten Schichten V und VI bilden mit ihren Axonen sehr weitreichende horizontale Netzwerke und sorgen damit für eine weite Ausbreitung thalamischer Aktivität (8). Diese Neurone, wie auch Projektionsneurone der *Subplatte* geben thalamische Efferenzen ab (9,10). CR und nicht-CR Neurone der *Marginalzone* erhalten keine oder, falls überhaupt, lediglich sehr geringe exzitatorische Innervation aus thalamokortikalen Axonen (5), möglicherweise aber von bisher unbekanntem Quellen (11). CR Neurone der *Marginalzone* bilden jedoch ein weitreichendes spontanaktives Netzwerk untereinander (12) und kontaktieren über Axonkollateralen möglicherweise migrierende Neurone der *kortikalen Platte* (13) (nach Luhmann, unveröffentlicht).

4.6 Neuromodulation durch Somatostatin im juvenilen Rattenkortex

Ob und warum neuromodulatorische Substanzen in der Ontogenese des Neokortex von Bedeutung sind, sollte in einer orientierenden Untersuchung am Beispiel diverser Neuropeptide geklärt werden. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass das Neuropeptid Somatostatin eine wichtige Funktion in der Physiologie des reifenden Neokortex spielen könnte. So wurde die Existenz von Somatostatinerger Neuronen vor allem in der *Subplatte* und Somatostatin-Rezeptoren in der *kortikalen Platte* des perinatalen Rattenkortex von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Shiosaka et al., 1982; Chun et al., 1987; Wulfsen et al., 1993). Sowohl die Zahl der Somatostatinerger Neurone, als auch die Dichte der Somatostatinrezeptoren erreicht zwischen P10 und P15 ein Maximum, weshalb ein funktioneller Hintergrund im Rahmen der Entwicklung des Großhirns vermutet werden kann.

Vor diesem Hintergrund wurde das Neuropeptid Somatostatin in einer orientierenden Untersuchung zu dessen Rolle im juvenilen Neokortex ausgewählt. Da sehr viele Angriffspunkte für einen Neuromodulator denkbar sind, wurden in der vorliegenden Arbeit essenzielle elektrophysiologische Faktoren unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss des Neuropeptides untersucht. Es wurde neben der Wirkung des Neuropeptides Somatostatin (SS14) auch die des sst2-Rezeptor spezifischen Agonisten MK678 auf verschiedene elektrophysiologische Parameter neokortikaler Pyramidenzellen untersucht, da diese die homogenste Gruppe der neokortikalen Neuronentypen darstellen.

Zwei wesentliche Effekte des Neuropeptides wurden im Laufe der Untersuchungen deutlich sichtbar. Zum einen bewirkte SS14 in allen daraufhin untersuchten Neuronen eine starke Reduktion der Feuerungsrate bei überschwelliger Depolarisation, zum anderen wurde evozierte postsynaptische Aktivität in der Nähe des Ruhemembranpotenzials stark reduziert. Neben diesen sehr folgenschweren Wirkungen zeigte sich in der weiteren Analyse der Daten ein depolarisierender und/oder hyperpolarisierender Effekt auf das Membranpotenzial, sowie häufig eine damit verbundenen Reduktion des Eingangswiderstandes bzw. eine Verkürzung der Membran-

zeitkonstante. Auch die Kinetik einzelner Aktionspotenziale wurde durch die Applikation des Neuropeptids moduliert, was möglicherweise eine Ursache der oben beschriebenen Reduktion der Feuerungsrate darstellt.

Diese Erkenntnisse stimmen gut mit bisher publizierten Daten zu den Wirkungen von Somatostatin auf verschiedene Neuronenpopulationen überein. Abhängig von methodischen Unterschieden, wie z.B. Ganzzelleableitungen versus Ableitungen mit der scharfen Mikroelektrode, Badapplikation versus lokaler Applikation, niedrige Konzentrationen versus hohen Konzentrationen, kurze Applikation versus langer Applikation etc. und den untersuchten Neuronenpopulationen zeigten sich unterschiedliche Wirkungen von Somatostatin an gleichen Neuronenpopulationen.

Der hier beschriebene Einfluss auf das Membranpotenzial stimmt z.B. mit Arbeiten am dorsolateralen septalen Nukleus der Ratte (Twery & Gallagher, 1989) und CA1 Pyramidenzellen des Hippokampus von Meerschweinchen und Kaninchen (Mueller et al., 1986) überein. In diesen Untersuchungen wurden insbesondere bei hohen Somatostatinkonzentrationen (100 - 1000 nM) bei Bad- oder lokaler Druckapplikation sowohl de- als auch hyperpolarisierende Effekte beobachtet. Andere Untersuchungen z.B. an hippokampalen CA1 Pyramidenzellen (Watson & Pittman, 1987) und neokortikalen Pyramidenzellen (Vidal & Zieglgänsberger, 1989) berichten jedoch vorwiegend von hyperpolarisierenden Effekten durch Somatostatin. Der Effekt scheint also neben der Rezeptorausstattung auch von der lokalen Konzentration und der Dauer der Applikation, abhängig zu sein.

Die hier gefundene Reduktion des Eingangswiderstandes belegt ebenfalls Daten anderer Studien an Neuronenpopulationen des Hippokampus und Septums (Mueller et al., 1986; Watson & Pittmann, 1987; Twery & Gallagher, 1989). Jedoch berichtet eine andere Untersuchung am Neokortex ebenfalls von keiner Veränderung des Eingangswiderstandes oder anderer passiver Membraneigenschaften durch Somatostatin (Vidal & Zieglgänsberger, 1989). Auch bei diesen Parametern mag die Applikationsart und die Konzentration des Neuropeptids eine wichtige Rolle bei der Wirkung spielen.

Die stark inhibierende Wirkung auf das Feuerungsverhalten der Pyramidenzellen stimmt mit Resultaten von in-vivo Ableitungen an neokortikalen Neuronen, in-vitro Arbeiten an CA1 Pyramidenzellen des Hippokampus und an Untersuchungen an septalen Neuronen überein (Renaud et al., 1975; Watson & Pittmann, 1987; Twery & Gallagher, 1989). Dort wurde jedoch auch von einem hyperpolarisierenden Effekt des Neuropeptids berichtet, wodurch notwendigerweise eine stärkere Depolarisation zur Auslösung von Aktionspotenzialen notwendig würde.

Neben dem Effekt auf das Membranpotenzial könnten aber auch andere Parameter zu der Inhibition des Feuerungsverhaltens beitragen. So ist die in dieser Arbeit gefundene Verminderung des Eingangswiderstandes bzw. die Verkürzung der Membranzeitkonstante, die Reduktion der Aktionspotenzialamplituden, sowie die Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und die gefundene Verstärkung der Nachhyperpolarisation im Anschluss an Aktionspotenziale ein Hinweis darauf, dass bestimmte Leitfähigkeiten, die einer Depolarisation des Membranpotenzials entgegenwirken, durch Somatostatin verstärkt werden. Da im wesentlichen Natrium- und Kaliumleitfähigkeiten an der Entstehung und Beendigung von Aktionspotenzialen und der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials beteiligt sind, könnte Somatostatin hier inhibierend oder auch verstärkend wirken. So ist es denkbar, dass die Kinetik schneller Natriumströme verlangsamt und die bestimmter Kaliumströme (z.B. k , I_{DR}) gefördert wird. Darüber hinaus könnte ein modulatorischer Einfluss auf Leitfähigkeiten, die in der Nähe des Ruhemembranpotenzials aktiv sind und das Potenzial damit stabilisieren, durch eine veränderte Ruheleitfähigkeit das Membranpotenzial in Richtung auf negativere oder positivere Werte verändern. Eine erhöhte Ruheleitfähigkeit für Kaliumionen würde die Reduktion des Eingangswiderstandes und die Verkürzung der Membranzeitkonstante erklären und in der Folge auch die Schwelle für die Auslösung von Aktionspotenzialen erhöhen. Auch hier stehen Kaliumleitfähigkeiten (z.B. k , I_M) als mögliche Effektoren im Vordergrund. Eine verstärkende Wirkung von Somatostatin auf den M-Strom wurde z.B. in hippokampalen Pyramidenzellen beschrieben (Moore et al., 1988; Schweitzer et al., 1993). Schließlich ist es denkbar, dass die auf Aktionspotenziale

folgende Refraktärperiode, die durch Kaliumleitfähigkeiten (z.B. I_K) bestimmt wird, durch modulatorische Einflüsse des Neuropeptids verlängert wird. Ebenso könnte ein Einfluss auf Kalzium- (z.B. I_{Ca} , L-Typ Kalziumkanal) und Kaliumleitfähigkeiten (z.B. $I_{K(Ca)}$), die den Zeitverlauf lang anhaltender Impulse modulieren, repetitive Entladungen hemmen. Alle genannten Möglichkeiten würden die beobachteten Effekte auf die Aktionspotenzialkinetik und das Feuerungsverhaltens erklären können. Ein großer Teil dieser möglicherweise durch Somatostatin beeinflusster Leitfähigkeiten (z.B. I_K , I_A , $I_{K(Ca)}$) wurde bei neokortikalen Neuronen in der untersuchten Altersklasse bereits beschrieben (z.B. Hamill et al., 1991; Zhou & Hablitz, 1996b; Kang et al., 1996; Mourre et al., 1987; Hardingham et al., 1997). Welche Leitfähigkeiten die in der vorliegenden Untersuchung durch Somatostatin verursachten Effekte tragen, sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Neben den gefundenen Effekten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Pyramidenzellen wurde eine Reduktion der Maximalamplituden und Gesamtströme gemischter und isolierter NMDA-Rezeptor vermittelter evozierter postsynaptischer Ströme gefunden. Auch diese Resultate stimmen gut mit bisher veröffentlichten Untersuchungen überein. In einer Untersuchung an neokortikalen Neuronen wurde eine Reduktion Glutamaterger und GABAerger postsynaptischer Ströme durch SS14 in ähnlicher Größenordnung beschrieben (Vidal & Zieglgänsberger, 1989). Andere Untersuchungen an hypothalamischen Neuronen berichten sowohl von inhibierenden, als auch von fördernden Effekten Glutamaterger Transmission durch Somatostatin (Lanneau et al., 1998; Lanneau et al., 2000) und von inhibierenden Einfluss auf GABAerge Transmission in thalamo-kortikalen Neuronen (Leresche et al., 2000).

Der inhibierende Einfluss von SS14 auf Glutamaterge NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme konnte mit dem sst2-Rezeptor spezifischen Agonisten MK678 reproduziert werden. Dagegen fand sich bei isolierten AMPA/Kainat-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Strömen eine Erhöhung der Amplituden nach Applikation von MK678. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu dem Befund in hypothalamischen Neuronen, in denen eine Erhöhung der Glutamatsensitivität von AMPA-

Rezeptoren durch den sst1-Rezeptor und eine Verminderung derselben mittels des sst2-Rezeptors berichtet wird (Lanneau et al., 1998). Dieser Unterschied könnte durch eine abweichende Rezeptorausstattung der neokortikalen Neurone oder durch eine in den relativ hohen Konzentrationen unspezifische Bindung des Agonisten auch an sst1-Rezeptoren erklärt werden. So wurde in verschiedenen Untersuchungen auch eine geringe Affinität von MK678 zu sst1-Rezeptoren beschrieben (Bell & Reisine, 1993; Hoyer et al., 1994).

Isolierte GABAerge postsynaptische Ströme wurden durch MK678 ähnlich wie NMDA-Rezeptor vermittelte Ströme in der Amplitude und Gesamtstromdichte reduziert. Dieser Befund stimmt mit Arbeiten an thalamo-kortikalen Neuronen überein (Leresche et al., 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Somatostatin in Konzentrationen von 1 bis 10 μM , evozierte GABA-A- und GABA-B-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme um 40 bis 55 % reduziert. Weiterhin wurde die Rate an spontaner GABAerger Aktivität reduziert. Diese Effekte werden von den Autoren auf präsynaptische Effekte des Neuropeptids zurückgeführt.

Ähnliche präsynaptische Effekte von Somatostatin über die Blockade von N-Typ Kalziumkanälen in Axonterminalien wurden auch in hippokampalen Neuronen beschrieben (Ishibashi et al., 1995). Durch den verminderten Kalziumstrom wird in der Folge die Ausschüttung von Neurotransmittern drastisch reduziert. Andere Autoren berichten ebenfalls von einer Verminderung der Transmitterausschüttung durch Somatostatin über die Bindung an präsynaptische Rezeptoren (Katayama & Hirai, 1989; Boehm & Betz, 1997).

Möglicherweise übt das Peptid in diesem Alter auch trophische Effekte auf die Neurone des unreifen Neokortex aus, wie dieses z.B. bei der Untersuchung des Neurofilamentwachstums von kultivierten Körnerzellen des Kleinhirns beobachtet wurde (Taniwaki & Schwartz, 1995). Durch einen solchen Effekt könnten postsynaptische Zellen von Somatostatinergen Neuronen z.B. zu einem verstärkten dendritischen Wachstum bzw. einer stärkeren Ramifikation angeregt werden.

5. Ausblick

Es zeigt sich bei der Lektüre der jüngeren Publikationen, dass die genetische Determination der Hirnentwicklung bis hin zu relativ weiten Differenzierungsstadien stärker als bisher vermutet ist. Das Wissen über entwicklungsphysiologisch relevante Gene nimmt mit der Aufschlüsselung des menschlichen und tierischen Genoms gleichzeitig mit enormer Geschwindigkeit zu.

Die Verlagerung des Interesses hin zu diesem Gebiet darf jedoch über die Bedeutung epigenetischer Einflüsse nicht hinwegtäuschen. Es fehlt häufig immer noch die Möglichkeit, in dem engmaschig verflochtenen Netz genetischer, biochemischer und elektrophysiologischer Interaktionen in der Entwicklung des Gehirns Anfang und Ende, Ursache und Wirkung zu erkennen.

Die Aufklärung der beteiligten komplexen intra- und interzellulären Signaltransduktionswege muss daher noch stärker in den Mittelpunkt der Untersuchung der Hirnentwicklung rücken. Dazu muss die Kombination elektrophysiologischer und molekularbiologischer Techniken stärker als bisher forciert werden. So kann z.B. die Einzelzell-PCR von morphologisch und elektrophysiologisch identifizierten Neuronen des Neokortex zumindest theoretisch Hinweise darüber liefern, welche Gene zu welchen Entwicklungsstadien in mRNA transkribiert werden. In Kombination z.B. mit immunhistologischen oder autoradiographischen Techniken lässt sich dann verifizieren, ob das entsprechende Genprodukt translatiert und funktionell aktiv wird.

Eine reine Beschreibung der elektrophysiologischen Charakteristika des postnatalen Neokortex könnte einen Zusammenhang zwischen der Physiologie und der Entwicklung naturgemäss nicht beweisen, da es sich lediglich um eine Momentaufnahme der Physiologie unter artifiziellen Bedingungen handelt. Will man einen kausalen Zusammenhang zwischen der Physiologie und bestimmten Differenzierungsvorgängen beweisen, so wird man *in vivo* oder *in vitro* bestimmte physiologische Parameter manipulieren und auftretende strukturelle Veränderungen beschreiben müssen. Dazu bieten sich pharmakologische oder gentechnische Expe-

rimente an, in denen bestimmte Ionenkanalproteine oder Rezeptoren gezielt chronisch blockiert, ausgeschaltet oder durch veränderte Untereinheitenzusammensetzung in ihrer Kinetik verändert werden.

So wäre es denkbar, lokal die Aktivität von Neuronen z.B. durch TTX zu blockieren, oder auch durch eine lokale Erhöhung der Kaliumionenkonzentration anzuregen. Weiterhin könnte man durch die chronische Applikation von neuroaktiven Substanzen, wie z.B. GABAergen und Glutamatergen Agonisten und Antagonisten, Dopamin, Serotonin etc. die Bedeutung dieser Transmitter in der Kortikogenese untersuchen.

Mithilfe der eingangs beschriebenen Kombination elektrophysiologischer und molekularbiologischer Techniken (z.B. Einzelzell-RT-PCR) könnte man weiterhin in diesen Modellen die unmittelbaren Ursachen der Entwicklungsstörungen untersuchen, indem man den unmittelbaren Einfluss der Manipulationen auf die differentielle Genaktivität beschreibt.

Aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit lassen sich einige Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen ableiten. Es hat sich gezeigt, dass die ersten entwickelten Neurone der pallialen Anlage bzw. deren Derivate funktionell sehr ausgereift sind, während migrierende Neurone eher eine unterentwickelte Physiologie demonstrieren. Es ist also zu vermuten, dass entweder bestimmte regulatorische Mechanismen die Ausbildung einer reifen Physiologie solange aktiv unterdrücken, wie ein Neuron funktionell unbedeutend ist und migriert, oder dass bestimmte Signale nach Erreichen des Zieles die Reifung erst ankurbeln. Einmal an seinem Platz angekommen, findet die morphologische und physiologische Differenzierung dann jedoch recht schnell statt.

Zu den Fragen, die sich durch diese Arbeit ergeben haben, gehört sicherlich die, ob das niedrige Membranpotenzial und die erhöhte Kalziumstromdichte in unreifen pyramidalen Neuronen eine Voraussetzung, eine Folge oder unabhängig von der Migration ist. Der Unterschied zu den anderen untersuchten Zelltypen legt hier einen unmittelbaren Zusammenhang nahe.

Experimentelle Arbeiten haben ergeben, dass spannungsgesteuerte Kalziumkanäle für die Geschwindigkeit der Migration wichtig sind (Komuro & Rakic, 1992, 1996). Die Tatsache, dass nur sehr selten monosynaptische Eingänge auf diese Neurone nachzuweisen waren, wirft die Frage auf, was die Funktion der NMDA-Rezeptoren auf diesen Neuronen sein könnte. Sie könnten unspezifisch freigesetztes Glutamat binden und so für eine langanhaltende Depolarisation sorgen. Eine exakte, mit bestimmten morphologischen Differenzierungsschritten korrelierte Untersuchung der Ausstattung mit Spannungs- und Liganden-gesteuerten Kalziumkanälen, Kalzium bindenden Proteinen, Kalziumpumpen und anderen in die Kalziumhomöostase eingebundenen Elementen von der postmitotischen Tochterzelle bis zum Ende der Migration könnte weitere Klarheit über die Rolle der Kalziumionen bei der Migration schaffen. Weiterhin könnte man die NMDA-Rezeptoren lokal manipulieren (chronische Blockade/ Aktivierung) und die Auswirkungen auf die kortikale Differenzierung untersuchen. Es böte sich an, die mRNA-Expression bestimmter an der Migration vermutlich beteiligter Gene unter diesen experimentellen Bedingungen zu untersuchen.

Ein weiteres Rätsel bleibt die Frage, ob die depolarisierende Wirkung von GABA und Glutamat im unreifen Kortex bzw. sekundär aus GABAergen Neuronen freigesetzte Neuromodulatoren trophische Funktionen ausüben können. Denkbar wäre es, GABA_A-Rezeptoren *in vivo* oder in Hirnschnittkulturen wie oben beschrieben zu manipulieren und eventuell auftretende zytoarchitektonische, elektrophysiologische oder molekularbiologische Veränderungen zu untersuchen.

Weiterhin bleibt die Frage zu klären, ob und zwischen welchen Neuronenpopulationen überhaupt funktionelle GABAerge Synapsen im neonatalen Kortex existieren. Die Charakterisierung der postnatalen neokortikalen Netzwerkaktivität nach gezielter Eliminierung spezifischer Neuronentypen könnte der Beantwortung dieser Fragen dienlich sein. Dabei sollte aber auch die Idee einer eher diffusen, nicht synaptischen Transmitterfreisetzung mit möglicherweise trophischer Wirkung im unreifen Neokortex stärker verfolgt werden. Dazu könnte man die Auswirkung einer lokalen chronischen Blockade von Neuronen auf die Transmitterfreisetzung und Verteilung

in das umgebende Gewebe und die damit einhergehenden Veränderungen der Differenzierung untersuchen.

Neben Untersuchungen über den Zusammenhang von funktionellen Aspekten und morphogenetischer Relevanz sollte aber auch die funktionelle Charakterisierung zahlreicher in dieser Arbeit nur angerissener Parameter stärker verfolgt werden. So wird gerade die Interaktion von *Subplattenneuronen* und den früh gebildeten Schicht V und VI Pyramidenzellen sehr früh etabliert. Handelt es sich bei diesen Schichten also um den ersten funktionellen Neokortex, während darüber liegende Schichten noch in der Entwicklung begriffen sind? Wie integrieren diese Neurone die afferente Aktivität, wie sehen die Antworten der ersten weit projizierenden Neurone aus?

Diese Fragestellungen stellen selbstverständlich nur einen Bruchteil der denkbaren weiteren Experimente dar. Angesichts der zunehmenden Zahl der erkannten, durch kortikale Dysgenesien (mit)verursachten Erkrankungen des Menschen wird die multidisziplinäre Erforschung der Kortikogenese in der Zukunft eher noch an Bedeutung gewinnen. Erst die komplette Aufklärung der Hirnentwicklung und der Physiologie während der Entwicklung wird es ermöglichen, eines Tages zentralnervöse Erkrankungen möglicherweise noch in der Entstehung zu diagnostizieren und gezielt zu therapieren.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Physiologie des früh postnatalen Neokortex der Ratte vom Tag der Geburt bis etwa drei Wochen postnatal mit Hilfe der Infrarot-Videomikroskopie und Ganzzellaufzeichnungen untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Beschreibung intrinsischer und synaptischer elektrophysiologischer Parameter der wichtigsten identifizierbaren Neuronentypen in den ersten vier Tagen nach der Geburt. In diesem Alter entwickelt sich der typische 6-schichtige Neokortex ausgehend von einer bis dahin 3-schichtigen Struktur. Nachdem es gelungen war, die *Cajal-Retzius* (CR) Neurone der *Marginalzone*, die unverzweigten (UP) und die verzweigten Pyramidenzellen (VP) der *kortikalen Platte* und die *Subplattenneurone* (SP) der *Subplatte* klar zu identifizieren, wurden deren passive und aktive Membraneigenschaften untersucht. Es stellte sich heraus, dass ein Zusammenhang zwischen dem ontogenetischen Alter der Neuronenpopulationen und dem "Reifegrad" gefunden werden konnte. Die älteren CR und SP zeigten deutlich "adultere" Eigenschaften als die später reifenden pyramidalen Neurone der *kortikalen Platte*. Auch isoliert untersuchte Natrium- und Kalziumströme zeigten eine Korrelation zu bestimmten funktionellen Entwicklungsstadien. Die synaptische Konnektivität dieser Neuronentypen war weiterhin von großem Interesse. Es stellte sich durch synaptische Stimulation und pharmakologische Isolation einzelner Komponenten heraus, dass SP Neurone und VP Zellen bereits eine recht starke synaptische Konnektivität besitzen, während die UP Zellen, die sich möglicherweise noch in der Migrationsphase befinden, nur schwache postsynaptische Aktivität zeigten. Die CR Neurone schienen in diesem Netzwerk keine Rolle zu spielen. Die synaptische Aktivität wurde durch GABAerge und NMDA-Rezeptor vermittelte, depolarisierende Aktivität gekennzeichnet. Inhibitorische Wirkungen von GABA wurden in diesem Entwicklungszustand nicht gefunden. Schließlich wurde untersucht, ob das zwischen P10 und P15 transient stark heraufregulierte Somatostatin und dessen Rezeptoren in diesem Alter eine funktionelle Relevanz im Neokortex haben. Es stellte sich heraus, dass Somatostatin eine wichtige inhibitorische neuromodulatorische Rolle im früh postnatalen Neokortex übernehmen kann.

7. Liste der verwendeten Literatur

- Agmon A, Hollrigel G, O'Dowd DK (1996) Functional GABAergic synaptic connection in neonatal mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience* 16:4684-4695.
- 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. *Journal of Neuroscience* 19(24):10856-10868.
- Ahmed Z (1988) Expression of membrane currents in rat neocortical neurons in serum-free culture. I. Inward currents. *Brain Research* 468:285-295.
- Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annual Reviews of Neuroscience* 17:185-218.
- Al Ghouli WM, Miller MW (1989) Transient expression of Alz-50 immunoreactivity in developing rat Neocortex: a marker for naturally occurring neuronal death? *Brain Research* 481:361-367.
- Anderson, SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR (1997) Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on DLx Genes. *Science* 278:474-476.
- Assal F, Innocenti GM (1993) Transient intra-areal axons in developing cat visual Cortex. *Cerebral Cortex* 3:290-303.
- Bauer R, Leferink J, Eckhorn R, Jordan W (1991) Complementary global maps for orientation coding in upper and lower layers of the cat striate Cortex and their possible functions. *The Journal of Comparative Neurology* 305:282-288.
- Bayer SA, Altmann J (1990) Development of layer I and subplate in the rat neocortex. *Experimental Neurology* 107:48-62.
- Bell GI, Reisine T (1993) Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends in Neuroscience* 16:34-38.
- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends in Neuroscience* 20:523-529.
- Berry M, Rogers AW (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral Cortex. *Journal of Anatomy* 99:691-709.

- Blanton MG, Kriegstein AR (1991a) Morphological differentiation of distinct neuronal classes in embryonic turtle cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 310:550-570.
- Blanton MG, Kriegstein AR (1991b) Appearance of putative amino acid neurotransmitters during differentiation of neurons in embryonic turtle cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 310:571-592.
- Blue ME, Johnston MV (1995) The ontogeny of glutamate receptors in rat barrel field Cortex. *Developmental Brain Research* 84:11-25.
- Boehm S, Betz H (1997) Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *Journal of Neuroscience* 17:4066-4075.
- Bradford R, Parnavelas JG, Liebermann AR (1977) Neurons in layer I of the developing occipital cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 176:121-132.
- Brown AM, Schwindt PC, Crill WE (1993) Voltage dependence and activation kinetics of pharmacologically defined components of the high-threshold calcium current in rat neocortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 70:1530-1543.
- Burgard EC, Hablitz JJ (1993) Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* 69:230-240.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA (2000) Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signalling pathways in cerebrocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6161-6166.
- Butler AB (1994) The evolution of the dorsal pallium in the telencephalon of amniotes: cladistic analysis and a new hypothesis. *Brain Research Review* 19:66-101.
- Carmignoto G, Vicini S (1992) Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual Cortex. *Science* 258:1007-1011.
- Catalano SM, Robertson RT, Killackey HP (1991) Early ingrowths of thalamocortical afferents to the neocortex of the prenatal rat. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 88:2999-3003.
- Chang HY, Takei K, Sydor AM, Born T, Rusnak F, Jay DG (1995) Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 376:686-690.

- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in Neuroscience* 14:515-519.
- Chun JJ, Nakamura MJ, Shatz CJ (1987) Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptid-immunoreactive neurons. *Nature* 325:617-620.
- Chun JJ, Shatz CJ (1989) Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early-generated subplate neuron population. *The Journal of Comparative Neurology* 282:555-569.
- Cobas A, Fairén A, Alvarez-Bolado G, Sánchez MP (1991) Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: A comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA_A receptor. *Neuroscience* 40:375-397.
- Creutzfeldt OD (1983) *Cortex Cerebri: Leistung, strukturelle und funktionelle Organisation der Hirnrinde*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Dammerman RS, Kriegstein AR (1998) Responses of *Cajal-Retzius* cells and immature cortical plate neurons to afferent stimulation in the perinatal neocortex. *Society for Neuroscience Abstracts* 24:57-57.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen S-C, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 374:719-723.
- Davies AA, Temple S (1995) Self-renewing multiple potential stem cells in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372:263-266.
- De Carlos JA, O'Leary DDM (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *Journal of Neuroscience* 12:1194-1211.
- De Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CLM, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242-245.
- Del Rio JA, Soriano E, Ferrer I (1992) Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *The Journal of Comparative Neurology* 326:501-526.
- Del Rio JA, Heimrich B, Super H, Borrell V, Frotscher V, Soriano E (1996) Differential survival of *Cajal-Retzius* cells in organotypic cultures of hippocampus and neocortex. *Journal of Neuroscience*. 16:6896-6907.
- Doherty P, Walsh FS (1992) Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Current Opinion in Neurobiology* 2:595-601.

- Dodt HU, Zieglgänsberger W (1994) Infrared videomicroscopy: A new look at neuronal structure and function. *Trends in Neuroscience* 17:453-458.
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES (2000) Reelin binds alpha 3 beta integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27:33-44.
- Epelbaum J (1986) Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Progress in Neurobiology* 27:63-100.
- Erzurumlu RS, Jhaveri S (1992) Emergence of connectivity in the embryonic rat parietal Cortex. *Cerebral Cortex* 2:336-352.
- Faas GC, Vreugdenhil M, Wadman WJ (1996) Calcium currents in pyramidal CA1 neurons *in vitro* after kindling epileptogenesis in the hippocampus of the rat. *Neuroscience* 75:57-67.
- 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.
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *Journal of Neuroscience* 17:2469-2476.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early cortical development. *Neuron* 20:43-53.
- Fonseca M, Del Río JA, Martínez A, Gómez S, Soriano E (1995) Development of calretinin immunoreactivity in the neocortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 361:177-192.
- Forssmann WG, Heym C (1985) *Neuroanatomie*, Heidelberg: Springer Verlag
- Franklin JL, Johnson EM, Jr. (1992) Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends in Neuroscience* 15:501-508.
- Franklin JL, Johnson EM Jr. (1994) Elevated intracellular calcium blocks programmed neuronal death. *Annals of the New York Academy of Science* 747:195-204.
- Frantz GD, McConell SK (1996) Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* 17:55-61.
- Friauf E, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Functional synaptic circuits in the subplate during fetal and early postnatal development of cat visual cortex. *Journal of Neuroscience* 10:2601-2613.

- Friauf E, Shatz CJ (1991) Changing patterns of synaptic input to subplate and cortical plate during development of visual cortex. *Journal of Neurophysiology* 66:2059-2071.
- Friedman A, Gutnick MJ (1987) Low-threshold calcium electrogenesis in neocortical neurons. *Neuroscience Letters* 81:117-122.
- Galuske RAW, Singer W (1996) The origin and topography of long-range intrinsic projections in cat visual Cortex: A developmental study. *Cerebral Cortex* 6:417-430.
- Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Requirements of subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347:179-181.
- Ghosh A, Shatz CJ (1992a) Involvement of subplate neurons in the formation of ocular dominance columns. *Science* 255:1441-1443.
- Ghosh A, Shatz CJ (1992b) Pathfinding and target selection by developing geniculocortical axons. *Journal of Neuroscience* 12:39-55.
- Ghosh A, Shatz CJ (1993) A role for subplate neurons in the patterning of connections from thalamus to neocortex. *Development* 117:1031-1047.
- Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signalling in neurons: Molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247.
- Gleeson JG, Walsh CA (2000) Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends in Neuroscience* 23:352-359.
- Gruol DL, Deal CR, Yool AJ (1992) Developmental changes in calcium conductances contribute to the physiological maturation of cerebellar Purkinje neurons in culture. *Journal of Neuroscience* 12:2838-2848.
- Gu X, Spitzer NC (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature* 375:784-787.
- Haeckel E (1866) *Generelle Morphologie der Organismen*. Berlin 1866
- Hamill OP, Huguenard JR, Prince DA (1991) Patch-clamp studies of voltage-gated currents in identified neurons of the rat cerebral Cortex. *Cerebral Cortex* 1:48-61.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260-265.

- Herrmann K, Antonini A, Shatz CJ (1994) Ultrastructural evidence for synaptic interactions between thalamocortical axons and subplate neurons. *European Journal of Neuroscience* 6:1729-1742.
- Hestrin S, Armstrong WE (1996) Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *Journal of Neuroscience* 16:5290-5300.
- Hoyer D, Lübbert H, Bruns C (1994) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 350:441-453.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PPA, O'Carroll A-M, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, Reisine T (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends in Pharmacological Science* 16:86-88.
- Huguenard JR, Hamill OP, Prince DA (1988) Developmental changes in Na⁺ conductances in rat neocortical neurons: appearance of a slowly inactivating component. *Journal of Neurophysiology* 59:778-795.
- Imamoto K, Karasawa N, Isomura G, Nagatsu I (1994) *Cajal-Retzius* neurons identified by GABA immunohistochemistry in layer I of the rat cerebral cortex. *Neuroscience Research* 20:101-105.
- Ishibashi H, Akaie N (1995) Somatostatin Modulates High-Voltage-Activated Ca²⁺ Channels in Freshly Dissociated Rat Hippocampal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 74:1028-1036.
- Jacobs K, Aktories K, and Schultz G (1983) A nucleotide regulatory site for somatostatin inhibition of adenylate cyclase in S49 lymphoma cells. *Nature* 303:177-178.
- Kageyama GH, Robertson RT (1993) Development of geniculocortical projections to visual Cortex in rat: Evidence for early ingrowths and synaptogenesis. *The Journal of Comparative Neurology* 335:123-148.
- Kang J, Huguenard JR, Prince DA (1996) Two types of BK channels in immature rat neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 76:4194-4197.
- Katayama Y, Hirai K (1989) Somatostatin presynaptically inhibits transmitter release in feline parasympathetic ganglion. *Brain Research* 487:62-68.
- Kater SB, Mills LR (1991) Regulation of growth cone behaviour by calcium. *Journal of Neuroscience* 11:891-899.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic Cell Subtypes and their Synaptic Connections in Rat Frontal Cortex. *Cerebral Cortex* 7:476-486.

- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 18:1935-1943.
- Kilb W, Luhmann HJ (2000) Characterisation of a hyperpolarization-activated inward current in *Cajal-Retzius* cells in rat neonatal neocortex. *Journal of Neurophysiology* 84:1681-1691.
- Kim HG, Fox K, Connors BW (1995) Properties of excitatory synaptic events in neurons of primary somatosensory Cortex of neonatal rats. *Cerebral Cortex* 5:148-157.
- Kirson ED, Yaari Y (1996) Synaptic NMDA receptors in developing mouse hippocampal neurones: Functional properties and sensitivity to ifenprodil. *Journal of Physiology* 497:437-455.
- Kocsis JD, Rand MN, Lankford KL, Waxman SG (1994) Intracellular calcium mobilisation and neurite outgrowth in mammalian neurons. *Journal of Neurobiology* 25:252-264.
- Komuro H, Rakic P (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257:806-809.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-97.
- Komuro H, Rakic P (1996) Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17:275-285.
- Kostovic I, Rakic (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *The Journal of Comparative Neurology* 297:441-470.
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in Neuroscience* 23:291-297.
- Lanneau C, Viollet C, Faivre-Baumann A, Loudes C, Kordon C, Epelbaum J, Gardette R (1998) Somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 elicit opposite effects on the response to glutamate of mouse hypothalamic neurones: an electrophysiological and single cell RT-PCR study. *European Journal of Neuroscience* 10:204-212.
- Lanneau C, Peineau S, Petit F, Epelbaum J, Gardette R (2000) Somatostatin Modulation of Excitatory Synaptic Transmission Between Periventricular and Arcuate Hypothalamic Nuclei *in vitro*. *Journal of Neurophysiology* 84:1464-1474.

- Lauder JM, Han VK, Henderson P, Verdoorn T, Towle AC (1986) Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 19:465-493.
- Lavdas AA, Mione MC, Parnavelas JG (1996) Neuronal clones in the cerebral cortex show morphological and neurotransmitter heterogeneity during development. *Cerebral Cortex* 6:490-4897.
- Lavdas AA, Grigoriou, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 19:7881-7888.
- Lawson MA, Maxfield FR (1995) Ca²⁺ and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377:75-79.
- Leresche N, Asproдини E, Emri Z, Cope DW, Crunelli V (2000) Somatostatin inhibits GABAergic transmission in the sensory via presynaptic receptors. *Neuroscience* 98:513-522.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
- Lorenzon NM, Foehring RC (1995) Characterisation of pharmacologically identified voltage-gated calcium channel currents in acutely isolated rat neocortical neurons. II. Postnatal development. *Journal of Neurophysiology* 73:1443-1451.
- LoTurco JJ, Blanton MG, Kriegstein AR (1991) Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *Journal of Neuroscience* 11:792-799.
- Luhmann HJ, Reiprich RA, Hanganu I, Kilb W (2000) Cellular Physiology of the Neonatal Rat Cerebral Cortex: Intrinsic Membrane Properties, Sodium and Calcium Currents. *Journal of Neuroscience Research* 62:574-584.
- Luhmann HJ, Schubert D, Kötter R, Staiger JF (1999) Cellular morphology and physiology of the perinatal rat cerebral cortex. *Developmental Neuroscience* 21:298-309.
- Luhmann HJ, Greuel JM, Singer W (1990) Horizontal interactions in cat striate Cortex: III. Ectopic receptive fields and transient exuberance of tangential interactions. *European Journal of Neuroscience* 2:369-377.
- Luhmann HJ, Martínez-Millán L, Singer W (1986) Development of horizontal intrinsic connections in cat striate Cortex. *Experimental Brain Research* 63:443-448.

- Luskin MB, Shatz CJ (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex. Cogeneration of subplate and marginal zones, *Journal of Neuroscience* 5:1062-1075.
- Maric D, Maric I, Barker JL (2000) Developmental changes in cell calcium homeostasis during neurogenesis of the embryonic rat cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 10:561-573.
- Marín-Padilla M (1970) Prenatal and early postnatal ontogenesis of the human motor Cortex: a golgi study. I. The sequential development of the cortical layers. *Brain Research* 23:167-183.
- Marín-Padilla M (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral Cortex (Neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organisation. *Z.Anat.Entwickl.-Gesch.* 134:117-145.
- Marín-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.Entwickl.-Gesch.* 136:125-142.
- Marín-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anatomical Embryology* 152:109-126.
- Marín-Padilla M (1988) Early ontogenesis of the human cerebral cortex. In: Peters A, Jones EG (Eds.), *Cerebral Cortex* Plenum, New York pp.447-478.
- Marín-Padilla M (1990) Three-dimensional structural organisation of layer I of the human cerebral cortex: a Golgi study. *The Journal of Comparative Neurology* 299:89-105.
- Marín-Padilla M (1992) Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: A unifying theory. *The Journal of Comparative Neurology* 321:223-240.
- Marín-Padilla M (1998) *Cajal-Retzius* cells and the development of the neocortex. *Trends in Neuroscience* 21:64-71.
- Mason A, Nicoll A, Stratford K (1991) Synaptic transmission between individual pyramidal neurons of the rat visual Cortex *in vitro*. *Journal of Neuroscience* 11:72-84.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science*:978-982.
- McConnell SK, Kaznowski CE (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing cerebral cortex. *Science* 254:282-285.

- McCormick DA, Prince DA (1987) Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *Journal of Physiology* 393:743-762.
- Meinecke DL, Rakic P (1992) Expression of GABA and GABA_A receptors by neurons of the subplate zone in developing primate occipital Cortex: Evidence for transient local circuits. *The Journal of Comparative Neurology* 317:91-101.
- Meyer G, Goffinet AM (1998) Prenatal Development of Reelin-Immunoreactive Neurons in the Human Neocortex. *The Journal of Comparative Neurology* 397:29-40.
- Meyer G, González-Hernández T (1993) Developmental changes in layer I of the human neocortex during prenatal life: A Dil-tracing and AChE and NADPH-d histochemistry study. *The Journal of Comparative Neurology* 338:317-336.
- Mienville JM, Lange GD, Barker JL (1994) Reciprocal expression of cell-cell coupling and voltage-dependent Na²⁺-current during embryogenesis of rat telencephalon. *Developmental Brain Research* 77:89-95.
- Mienville JM, Barker JL (1997) Potassium current expression during prenatal corticogenesis in the rat. *Neuroscience* 81:163-172.
- Mienville JM (1998) Persistent depolarising action of GABA in rat *Cajal-Retzius* cells. *Journal of Physiology* 512.3:809-817.
- Mienville JM, Pesold C (1999) Low resting potential and postnatal upregulation of NMDA receptors may cause *Cajal-Retzius* cell death. *Journal of Neuroscience* 19:1636-1646.
- Mienville JM, Maric I, Maric D, Clay JR (1999) Loss of I_A expression and increased excitability in postnatal *Cajal-Retzius* cells. *Journal of Neurophysiology* 82:1303-1310.
- Miller B, Chou L, Finlay BL (1993) The early development of thalamocortical and corticothalamic projections. *The Journal of Comparative Neurology* 335:16-41.
- Miller MW (1995) Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory Cortex: Barrel versus septal Cortex and projection versus local circuit neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 355:6-14.
- Mohrmann R, Hatt H, Gottmann K (2000) Developmental regulation of subunit composition of extrasynaptic NMDA receptors in neocortical neurones. *Neuroreport* 11:1203-1208.
- Molnar Z, Blakemore C (1995) How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends in Neuroscience* 18:389-397.

- 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.
- Mourre C, Cervera P, Lazdunski M (1987) Autoradiographic analysis in rat brain of the postnatal ontogeny of voltage-dependent Na⁺-channels, Ca²⁺-dependent K⁺ Channels and slow Ca²⁺ channels identified as receptors for tetrodotoxin, apamin and (-)-desmethoxyverapamil. *Brain Research* 417:21-32.
- Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1986) Electrophysiological Actions of Somatostatin (SRIF) in Hippocampus: An *in vitro* Study. *Cellular and Molecular Neurobiology* 6:363-380.
- Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB (2000) Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death & Differentiation* 7:102-111.
- Nieuwenhuys R (1994) The neocortex. *Anatomical Embryology* 190:307-339.
- Norris CR, Kalil K (1992) Development of callosal connections in the sensorimotor cortex of the hamster. *The Journal of Comparative Neurology* 326:121-132.
- 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 organisation of cortical neurons. *Neuron* 14:899-912.
- O'Leary DDM, Borngasser DJ (1992) Minimal dispersion of neuroepithelial cells and their progeny during generation of the cortical preplate. *Society for Neuroscience Abstracts* 18:925.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *Journal of Neuroscience* 16:6414-6423.
- Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurons: new vistas. *Trends in Neuroscience* 23:126-131.
- Patel YC (1995) Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoprotease. *Ciba Foundation Symposium* 190:26-40.
- Pesold C, Impagnatello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ (1998) Reelin is preferentially expressed in neurons synthesising γ -aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95:3221-3226.

- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1997) Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis- necrosis morphological continuum. *The Journal of Comparative Neurology* 378:70-87.
- Price DJ, Aslam S, Tasker L, Gillies K (1997) Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *The Journal of Comparative Neurology* 377:414-422.
- Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckmann JF, Schwartz ML, Vaccarino FM (2000) Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 20:5012-5023.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241(4862): 170-176.
- Rakic P, Cameron RS, Komuro H (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signalling and cell motility in guided neuronal migration. *Current Opinions in Neurobiology* 4:63-69.
- Rakic P, Komuro H (1995) The role of receptor/channel activity in neuronal cell migration. *Journal of Neurobiology* 26:299-315.
- Rakic P, Caviness VS Jr (1995) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14:1101-1104
- Ramon y Cajal S (1891) Sur la structure de l'écorce cerebrale de quelques mammiferes. *La Cellule* 7:125-176.
- Reichert H (1990) *Neurobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Reiter HO, Weitzmann DM, Stryker MP (1986) *Experimental Brain Research* 65:182.
- Retzius G (1893) Die Cajalschen Zellen der Großhirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biologische Untersuchungen* 5:1-9.
- Rickmann M, Chronwall BM, Wolff JR (1977) On the development of non-pyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as a pallial Anlage. *Anatomical Embryology* 151:285-307.
- Romer AS, Parsons TS (1983) *Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere*. Hamburg, Berlin: Parey.
- Sánchez MP, Frassoni C, Alvarez-Bolado G, Spreafico R, Fairén A (1992) Distribution of calbindin and parvalbumin in the developing somatosensory Cortex and its primordium in the rat: An immunocytochemical study. *Journal of Neurocytology* 21:717-736.

- Sayer RJ, Schwindt PC, Crill WE (1990) High- and low-threshold calcium currents in neurons acutely isolated from rat sensorimotor Cortex. *Neuroscience Letters* 120:175-178.
- Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM (1997) Reelin mRNA expression during mouse brain development. *European Journal of Neuroscience* 9:1055-1071.
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI (1991) Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 7:891-902.
- 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.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat Cortex. *Nature* 368:144-147.
- Shiosaka S, Takatsuki K, Sakanaka M, Inagaki S, Tagaki H, Senba E, Kawai Y, Iida H, Minagawa H, Hara Y, Matsuzaki T, Tohyama M (1982) Ontogeny of Somatostatin-Containing Neuron System of the Rat: Immunohistochemical Analysis. II. Forebrain and Diencephalon. *The Journal of Comparative Neurology* 204:211-224.
- Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research* 62:1-35.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY (1984) Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystinin-immunoreactive material. *Journal of Neuroscience* 4:2590-2603.
- Soriano E, Del Río JA, Martínez A, Supèr H (1994) Organisation of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterisation of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *The Journal of Comparative Neurology* 342:571-595.
- Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Río 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.
- Stryker MP, Harris WA (1986) Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *Journal of Neuroscience*. 6:2117.
- Supèr H, Martínez A, Soriano E (1997) Degeneration of *Cajal-Retzius* cells in the developing cerebral Cortex of the mouse after ablation of meningeal cells by 6-hydroxydopamine. *Developmental Brain Research* 98:15-20.

- Supèr H, Del Rio JA, Albert M, Pol PS, Soriano E (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of *Cajal-Retzius* cells. *Cerebral Cortex* 10:602-613.
- Tallent M, Liapakis G, O`Carroll AM, Lolait, SJ, Dichter M, Reisine T (1996) Somatostatin receptor subtypes sstr2 and sstr5 couple negatively to an L-type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience* 71: 1073-1081.
- Tan SS, Breen S (1993) Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* 362:638-640.
- Tanaka O, Sakagami H, Kondo H (1995) Localization of mRNAs of voltage-dependent Ca^{2+} channels: four subtypes of α 1- and β -subunits in developing and mature rat brain. *Molecular Brain Research* 30:1-16.
- Taniwaki T, Schwartz JP (1995) Somatostatin enhances neurofilament expression and neurite outgrowth in cultured rat cerebellar granule cells. *Developmental Brain Research* 88: 109-116.
- Thompson SM, Wong RKS (1991) Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology* 439:671-689.
- Tropepe V, Sibilica M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D (1999) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental Biology* 208:166-188.
- Twery MJ, Gallagher JP (1989) Somatostatin hyperpolarizes neurons and inhibits spontaneous activity in rat dorsolateral septal nucleus. *Brain Research* 497:315-324.
- 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 eds), 35-76. Cambridge: MIT Press.
- Uylings HBM, Delalle I (1997) Morphology of NPY-ir neurons and fibers in human prefrontal cortex during prenatal and postnatal development. *The Journal of Comparative Neurology* 397:523-540.
- Valverde F, Facal-Valverde MV (1987) Transitory population of cells in the temporal cortex of kittens. *Developmental Brain Research* 32:283-288.
- 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 autoradiographical study. *The Journal of Comparative Neurology* 290:118-140.

- Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HBM (1989) Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 289:213-227.
- Verney C, Derer P (1995) *Cajal-Retzius* neurons in human cerebral cortex at midgestation show immunoreactivity for neurofilament and calcium-binding proteins. *The Journal of Comparative Neurology* 359:144-153.
- Viana F, Hille B (1996) Modulation of High Voltage-Activated Calcium Channels by Somatostatin in Acutely Isolated Rat Amygdaloid Neurons. *Journal of Neuroscience* 16:6000-6011.
- Vidal C, Zieglgänsberger W (1989) Actions of Somatostatin on Rat Neocortical Neurons *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 1:489-493.
- Viollet, C., Lanneau, C., Faivre Bauman, A., Zhang, J., Djordjijevic, D, Loudes, C., Gardette, R., Kordon, C., and Epelbaum, J. (1997) Distinct patterns of expression and physiological effects of sst1 and sst2 receptor subtypes in mouse hypothalamic neurons and astrocytes in culture. *Journal of Neurochemistry* 68: 2273-2280.
- Voigt T, Baier H, De Lima AD (1997) Synchronisation of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *European Journal of Neuroscience* 9:990-999.
- Wahle P, Meyer G, Wu JY, Albus K (1987) Morphology and axon terminal pattern of glutamate decarboxylase-immunoreactive cell types in the white matter of the cat occipital Cortex during early postnatal development. *Brain Research* 433:53-61.
- Wahle P, Meyer G (1987) Morphology and quantitative changes of transient NPY-ir neuronal populations during early postnatal development of the cat visual Cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 261:165-192.
- Walsh C, Cepko CL (1988) Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241:1342-1345.
- Walsh C, Cepko CL (1992) Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255:434-440.
- Walsh C, Cepko CL (1993) Clonal dispersion in proliferative layers of developing cerebral cortex. *Nature* 362: 535-632.
- Watson TWJ, Pittman QJ (1988) Somatostatin(14) and -(28) but not somatostatin (1-12) hyperpolarize CA1 pyramidal neurons *in vitro*. *Brain Research* 448:40-45.
- Williams BP, Price J (1995) Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14:1181-1188.

- Williams K (1993a) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology* 44:851-859.
- Williams K, Russell SL, Shen YM, Molinoff PB (1993b) Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs *in vivo* and *in vitro*. *Neuron* 10:267-278.
- Wood JG, Martin S., Price DJ (1992) Evidence that the earliest generated cells of the murine cerebral cortex form a transient population in the subplate and marginal zone. *Developmental Brain Research* 66:137-141.
- Wulfsen I, Meyerhof W, Fehr S, Richter D (1993) Expression patterns of rat somatostatin receptor genes in pre- and postnatal brain and pituitary. *Journal of Neurochemistry* 61:1549-1552.
- Yamashita A, Hayashi M, Shimizu K, Oshima K (1989) Ontogeny of somatostatin in cerebral cortex of macaque monkey: an immuno-histochemical study. *Developmental Brain Research* 45:103-111.
- Yan XX, Cariaga WA, Ribak CE (1997) Immunoreactivity for GABA plasma membrane transporter, GAT-1, in the developing rat cerebral cortex: Transient presence in the somata of neocortical and hippocampal neurons. *Developmental Brain Research* 99:1-19.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996a) Layer I neurons of rat neocortex. I. Action potential and repetitive firing properties. *Journal of Neurophysiology* 76:651-667.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996b) Layer I neurons of the rat neocortex. II. Voltage-dependent outward currents. *Journal of Neurophysiology* 76:668-682.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996c) Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. *The Journal of Comparative Neurology* 376:198-213.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996d) Postnatal development of membrane properties of layer I neurons in rat neocortex. *Journal of Neuroscience* 16:1131-1139.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1997) Rapid kinetics and inward rectification of miniature EPSCs in layer I neurons of rat neocortex. *Journal of Neurophysiology* 77:2416-2426.