

**Synaptische Innervation als Richtungsgeber für migrierende Vorläufer
zentralnervöser Interneurone**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Annika Kristina Wefers

aus Düsseldorf

2016

Angefertigt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Karl Schilling
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Valentin Stein

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.04.2016

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Bonn
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Karl Schilling
sowie dem Institut für Zelluläre Neurowissenschaften
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Christian Steinhäuser

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1 Migration neuronaler Vorläuferzellen während der Entwicklung des Zentralnervensystems	11
1.2 Steuerung der Migration von Interneuron-Vorläuferzellen	11
1.3 Modellsystem: Das früh postnatale murine Cerebellum	13
1.3.1 Makroskopie	14
1.3.2 Histologie	14
1.3.3 Entwicklung	15
1.3.3.1 Entwicklung der inhibitorischen Interneurone des Cerebellums	17
1.4 Fragestellungen	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte und Zubehör	20
2.1.1.1 allgemein	20
2.1.1.2 Patch-clamp	20
2.1.1.3 Zeiss Axioskop-FS-System	21
2.1.1.4 Konfokales LSM5-Pascal-System	22
2.1.1.5 Leica LSM-TCS-SP5-System	23
2.1.2 Chemikalien	24
2.1.2.1 Farbstoffe und Antikörper	25
2.1.3 Lösungen	26
2.1.3.1 Allgemeine Lösungen	26
2.1.3.2 Außenlösungen für Patch-clamp-Ableitungen	27
2.1.3.3 Pipetten-Innenlösungen für Patch-clamp-Ableitungen	29
2.1.4 Pax2-GFP-Mäuse	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Präparation akuter parasagittaler Vermischnitte	31
2.2.2 Konfokale und Zwei-Photonen-Zeitraffer-Videomikroskopie	32
2.2.2.1 Schnittinkubation mit Tetanustoxin	34

2.2.2.2	Analyse der Zellmigration	35
2.2.3	Patch-clamp-Ableitungen von Pax2-Zellen	39
2.2.3.1	Identifizierung spannungsgesteuerter Kalium- und Natriumkanäle	45
2.2.3.2	Nachweis von Aktionspotentialen	47
2.2.3.3	Nachweis und Charakterisierung ionotroper GABA _A - und AMPA-Rezeptoren	47
2.2.3.4	Messung postsynaptischer Ströme	48
2.2.3.5	Auswaschen des zytosolischen GFPs während der Patch-clamp-Ableitungen	49
2.2.4	Immunhistochemie	49
2.2.5	Statistik	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Pax2-Zellen sind unreife neuronale Zellen	51
3.1.1	Pax2-Zellen migrieren	51
3.1.2	Pax2-Zellen sind elektrophysiologisch unreife neuronale Zellen, die spannungsgesteuerte Kaliumkanäle vom A- und DR-Typ sowie spannungsgesteuerte Natriumkanäle exprimieren	58
3.1.3	Pax2-Zellen können keine reifen Aktionspotentiale generieren	60
3.1.4	Pax2-Zellen exprimieren ionotrope GABA _A - und AMPA-Rezeptoren	61
3.2	Migrierende Pax2-Zellen sind synaptisch innerviert	64
3.2.1	Pax2-Zellen sind synaptisch GABAerg und glutamaterg innerviert	64
3.2.2	Pax2-Zellen sind während ihrer Migration synaptisch innerviert	68
3.2.3	Synaptische Innervation reguliert die Migration von Pax2-Zellen	70
4.	Diskussion	75
4.1	Methodische Aspekte	75
4.1.1	Untersuchter Zelltyp in Pax2-GFP-Mäusen	75
4.1.2	Patch-clamp-Ableitungen	78
4.1.3	Analyse der Zellmigration	79
4.2	Migrierende Pax2-Zellen erhalten direkte synaptische Innervation	81
4.2.1	Migration von Pax2-Zellen	82
4.2.2	Pax2-Zellen sind elektrophysiologisch unreife neuronale Zellen	86
4.2.3	Direkte synaptische Innervation migrierender Interneuron-Vorläuferzellen	88
4.3	Ausblick	102
5.	Zusammenfassung	104

6.	Abbildungsverzeichnis	106
7.	Literaturverzeichnis	107
8.	Danksagung	122

Abkürzungsverzeichnis

2P	Zwei-Photonen
Abb.	Abbildung, Abbildungen
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ApoER2	Apolipoproteinrezeptor 2
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BP	Bandpassfilter
C_m	Membrankapazität
C_{ms}	spezifische Membrankapazität
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion
CTZ	Cyclothiazid
Cxcl12	C-X-C-Motiv-Ligand 12
Cxcr4 und Cxcr7	C-X-C-Motiv-Rezeptoren 4 und 7
D-APV	D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DL-APV	DL-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
DR	verzögert gleichrichtender spannungsgesteuerter Kaliumkanal („delayed-rectifier“)
E	Embryonaltag
EGL	äußere Körnerzellschicht („external granule cell layer“)
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EphA4	Ephrin Typ-A-Rezeptor 4
Ex./Em.	Exzitation/Emission
FT	Farbteiler
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD-67	Glutamat-Decarboxylase-67
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

IGL	innere Körnerzellschicht („internal granule cell layer“)
KA	Kainat
KI	Konfidenzintervall
kWDF	kumulative Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
L IV/V	Lobulus IV/V
LP	Langpassfilter
M&M	Material und Methoden
MGE	mediale ganglionische Eminenz
ML	Molekularschicht („molecular layer“)
mPSC	postsynaptischer Miniaturstrom („minature postsynaptic current“)
n	Anzahl
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[<i>f</i>]chinoxalin-2,3-dion
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Postnataltag
Pax2-Zellen	in der Pax2-GFP-Maus (Pfeffer et al., 2002) Pax2-exprimierende, GFP-markierte kleine migrierende Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone des Cerebellums; die großen stationären, ebenfalls Pax2-GFP-positiven Golgi-Zellen gehören nicht dazu
PCL	Purkinjezellschicht („Purkinje cell layer“)
PFA	Paraformaldehyd
R_m	Membranwiderstand
RMS	rostraler migratorischer Strom
ROI	Bereich von Interesse („region of interest“)
R_s	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels („standard error of the mean“)
sPSC	spontaner postsynaptischer Strom („spontaneous postsynaptic current“)
t	Zeitpunkt
TeNT	Tetanus(neuro)toxin

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TTX	Tetrodotoxin
U_h	Haltepotential
U_m	Membranpotential
U_r	Ruhemembranpotential
U_{rev}	Umkehrpotential
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VLDL-R	Rezeptor des Very-low-density-Lipoproteins
v-SNARE	Vesikel-SNAP („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein“) -Rezeptor
VZ	Ventrikulärzone
WDF	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
WM	weiße Substanz („white matter“)
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Migration neuronaler Vorläuferzellen während der Entwicklung des Zentralnervensystems

Im Zentralnervensystem (ZNS) unterscheidet man nach ihrer Verschaltung zwei grundlegende Arten von Neuronen: Projektionsneurone übermitteln Signale über längere Distanzen. Interneurone dienen hingegen der lokalen Signalweitergabe. Die neuronalen Vorläuferzellen beider Zelltypen werden während der Entwicklung des ZNS meist von Stammzellen der Ventrikulärzonen generiert (Marín et al., 2010; Evsyukova et al., 2013). Nach der letzten Mitose der Stammzellen, der „Geburt“ der neuronalen Vorläuferzellen, wandern die neuronalen Vorläuferzellen über mehr oder weniger weite Distanzen, bevor sie sich differenzieren und funktionell in neuronale Netzwerke integriert werden. Man bezeichnet diese Wanderung als neuronale Migration (Marín et al., 2010; Evsyukova et al., 2013). Im Gegensatz zu der überwiegend radialen Migration der Projektionsneuron-Vorläuferzellen migrieren Interneuron-Vorläuferzellen oft tangential (Goldowitz und Hamre, 1998; Letinic et al., 2002; Tan et al., 1998; Valiente und Marín, 2010; Evsyukova et al., 2013). Interneuron-Vorläuferzellen legen dabei in vielen Regionen des ZNS deutlich weitere Distanzen als die Projektionsneuron-Vorläuferzellen zurück. Da sie oft auch erst nach den Projektionsneuronen ihre Zielgebiete erreichen, wandern sie typischerweise in Gebiete ein, die bereits von in ihrer Differenzierung weiter fortgeschrittenen Projektionsneuronen besiedelt sind (Miale und Sidman, 1961; Pla et al., 2006; Rymar und Sadikot, 2007; Lodato et al., 2011).

1.2 Steuerung der Migration von Interneuron-Vorläuferzellen

Die Migration von Interneuron-Vorläuferzellen, ihre nachfolgende Verteilung im Zielgebiet sowie ihre Zuordnung zu den zugehörigen, bereits ausdifferenzierten Projektionsneuronen im Rahmen der Netzwerkintegration müssen präzise gesteuert werden, um die korrekte Funktion des ZNS zu gewährleisten (Marín et al., 2010). Migrationsstörungen können neurologische oder psychiatrische Defizite hervorrufen (Barkovich et al., 2005; Penagarikano et al., 2011; Riviere et al., 2012).

Im Folgenden möchte ich kurz ein paar bekannte Mechanismen der Migrationssteuerung von Interneuron-Vorläuferzellen im Vergleich zu Projektionsneuron-Vorläuferzellen darstellen.

Die Steuerung neuronaler Migration durch Interaktion löslicher diffusibler oder zellmembrangebundener Liganden mit Rezeptoren auf migrierenden Vorläuferzellen ist im Vorderhirn relativ gut untersucht (Marín, 2013; Evsyukova et al., 2013).

Verschiedene Aspekte der radialen Migration von Projektionsneuron-Vorläuferzellen wie die Anordnung der Projektionsneurone nach einem „Inside-out pattern“ werden z. B. durch Reelin gesteuert, das von Cajal-Retzius-Zellen sezerniert wird. Es bindet an den Rezeptor des Very-low-density-Lipoproteins (VLDL-R) und den Apolipoproteinrezeptor 2 (ApoER2) und induziert über die Phosphorylierung des Proteins Disabled 1 (Dab1) verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, die u. a. auch die Expression von N-Cadherinen steuern (Rice und Curran, 2001; Jossin und Cooper, 2011; Evsyukova et al., 2013; Gao und Godbout, 2013).

Auch die Migration von Interneuron-Vorläuferzellen wird durch zahlreiche Liganden beeinflusst. Beispielsweise wirken Klasse-III-Semaphorine, die von Projektionsneuronen des Striatums freigesetzt werden, über Neuropilin-Rezeptoren auf Interneuron-Vorläuferzellen aus der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) repulsiv (Marín et al., 2001). Die Interaktion von EphrinB3, das von Interneuron-Vorläuferzellen der präoptischen Region exprimiert wird, mit dem Ephrin-Typ-A-Rezeptor 4 (EphA4), der von Interneuron-Vorläuferzellen der MGE exprimiert wird, führt über eine bilaterale Repulsion zu getrennten Migrationswegen dieser Zellen (Zimmer et al., 2011). Membrangebundenes oder diffusibles Neuregulin 1 wirkt hingegen auf migrierende Interneuron-Vorläuferzellen der MGE chemoattraktiv (Flames et al., 2004). Im Cortex ist die Bindung des C-X-C-Motiv-Liganden 12 (Cxcl12) an die Rezeptoren Cxcr7 und Cxcr4 für die Migration in der Marginalzone sowie der Subventrikulärzone notwendig (Sanchez-Alcaniz et al., 2011).

Im Kontext der vorliegenden Arbeit sei vor allem auf Untersuchungen hingewiesen, die die Bedeutung klassischer Neurotransmitter für die Entstehung, Migration und Differenzierung von Nervenzellen belegen. Für Projektionsneuron-Vorläuferzellen wurde gezeigt, dass Neurotransmitter sowohl ihre Proliferation (LoTurco et al., 1995) als auch

ihre Mobilität beeinflussen (Bouzigues et al., 2007; Manent und Represa, 2007). Manent und Kollegen wiesen beispielsweise nach, dass parakrin, d. h. nicht-synaptisch freigesetztes GABA sowie Glutamat in organotypischen hippocampalen Kulturen für die Einwanderung von Projektionsneuron-Vorläuferzellen in das Stratum pyramidale notwendig sind (Manent et al., 2005).

Auch die Proliferation (Liu et al., 2005) und die Mobilität von Interneuron-Vorläuferzellen werden durch elektrische Aktivität bzw. die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflusst (De Marco Garcia et al., 2011; Spitzer, 2006). Seit längerem ist beispielsweise bekannt, dass die Stimulation von Neurotransmitterrezeptoren bei der Migration cerebellärer Körnerzellvorläufer eine wichtige Rolle spielt (Komuro und Rakic, 1993) und Transmittergradienten die Migration von Interneuron-Vorläuferzellen beeinflussen können (Behar et al., 1996). Auch bei der Beendigung der Migration (Bortone und Polleux, 2009; de Lima et al., 2009) sowie bei der Netzwerkintegration scheinen Neurotransmitter eine wichtige Rolle zu spielen (Ge et al., 2006).

Die Details der Wirkweise von Neurotransmittern auf migrierende neuronale Vorläuferzellen sind aber noch weitgehend unbekannt. Um dem weiter nachzugehen, haben wir das murine Cerebellum (Kleinhirn) als Modell gewählt. Dieses Modell werde ich in den folgenden Abschnitten kurz vorstellen.

1.3 Modellsystem: Das früh postnatale murine Cerebellum

Das früh postnatale murine Cerebellum eignet sich aus mehreren Gründen gut zur Untersuchung der Migration von Interneuron-Vorläuferzellen: Erstens weist das Cerebellum eine klare und evolutionär weitgehend unveränderte Struktur auf (Bell et al., 2008) und besteht aus wenigen gut charakterisierten Haupt-Neuronenarten (Goldowitz und Hamre, 1998; Schilling et al., 2008; Schilling, 2013). Dies erlaubt eine einfache histologische Orientierung.

Zweitens findet die cerebelläre Entwicklung zu beträchtlichen Teilen postnatal statt. Bei der Maus dauert dieser Prozess bis etwa Postnataltag 18 (P18) an (Goldowitz und Hamre, 1998; Martinez et al., 2013) und ist Studien deshalb gut zugänglich. Wir verfügen zudem über molekulare Marker, um einzelne cerebelläre Neuronenarten zu

unterscheiden und ihre Reifung zu verfolgen. Postmitotische Vorläuferzellen cerebellärer inhibitorischer Interneurone exprimieren Pax2 und migrieren während einer protrahierten Periode über weite Strecken (Maricich und Herrup, 1999; Weisheit et al., 2006). Deshalb eignen sie sich besonders gut zur Untersuchung von Migrationsmechanismen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die elektrophysiologischen Eigenschaften sowie die Migration dieser Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone des Cerebellums untersucht werden. Ich werde daher nachfolgend kurz die Anatomie und Entwicklung des Cerebellums darstellen.

1.3.1 Makroskopie

Das murine Cerebellum liegt in der hinteren Schädelgrube dorsal dem Pons auf und bildet das Dach des vierten Ventrikels. Es besteht aus drei Teilen: dem unpaaren Wurm, dem sogenannten Vermis, in der Mitte, an den beidseits eine Hemisphäre angrenzt (Abbildung 1A; Voogd und Glickstein, 1998). Durch Einstülpung der Oberfläche wird das Cerebellum in zehn Läppchen, sogenannte Lobuli, unterteilt. Abbildung 1B zeigt ein Schema eines parasagittalen Vermischnitts einer P7 Maus. Die anatomische Gliederung in die Lobuli I–X (Larsell, 1951) ist im Vermis deutlich konservierter und besser erkennbar als in den Hemisphären (Larsell, 1952), so dass sich der Vermis für experimentelle Studien besser eignet.

Die einzelnen Lobuli entwickeln sich zudem zu etwas unterschiedlichen Zeitpunkten (Altman und Bayer, 1985), so dass wir unsere Untersuchungen mit Ausnahme von Antikörperfärbungen ausschließlich in den Lobuli IV und V (L IV und V) durchführten.

1.3.2 Histologie

Früh postnatal befindet sich im Inneren des Cerebellums die weiße Substanz (WM), durch die Nervenfasern in das Cerebellum ein- und aus diesem austreten (Abb. 1B). Umschlossen wird die WM an der Cerebellum-Oberfläche von der in diesem Entwicklungsstadium noch vierschichtigen Rinde, dem Cortex (Schilling et al., 2008). Die Haupt-Neuronenarten der an die WM angrenzenden inneren Körnerzellschicht (IGL) sind die Körnerzellen, exzitatorische Interneurone, sowie die Golgi-Zellen, inhibitorische

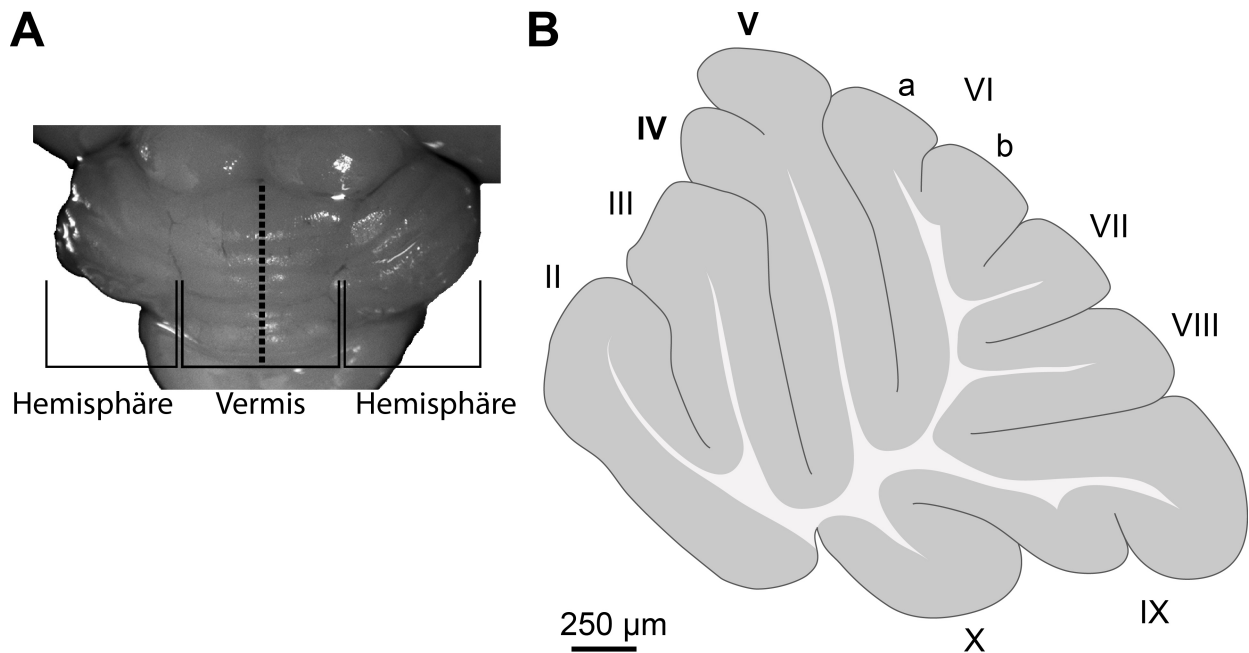


Abbildung 1: Anatomie des cerebellären Vermis. (A) Blick von dorsocranial auf das Cerebellum einer sieben Tage alten Maus. Rostral des Cerebellums ist die Vierhügelplatte sichtbar, caudal die Medulla oblongata. (B) Schema eines parasagittalen Vermischnitts (Postnataltag P7; die gestrichelte Linie in (A) markiert die Schnittebene). Zentral befindet sich die weiße Substanz (hellgrau), daran angrenzend der cerebelläre Cortex (dunkelgrau). Die römischen Ziffern markieren die Lobuli II–X nach Larsell.

Interneurone (Abb. 3). An die IGL schließt sich die Purkinjzellschicht (PCL) mit den Somata der GABAergen Purkinjzellen, der cerebellären Projektionsneurone, an. Die Haupt-Neurone der Molekularschicht (ML) sind die Korb-/Sternzellen, ebenfalls inhibitorische Interneurone. In der äußeren Körnerzellschicht (EGL) liegen Vorläuferzellen der Körnerzellen. Nachfolgend soll die Entwicklung dieser Neuronenarten im reifenden Cerebellum beschrieben werden.

1.3.3 Entwicklung

Die Vorläuferzellen cerebellärer Neurone werden vom Neuroepithel des vierten Ventrikels bzw. der Rautenlippe generiert (Abbildung 2):

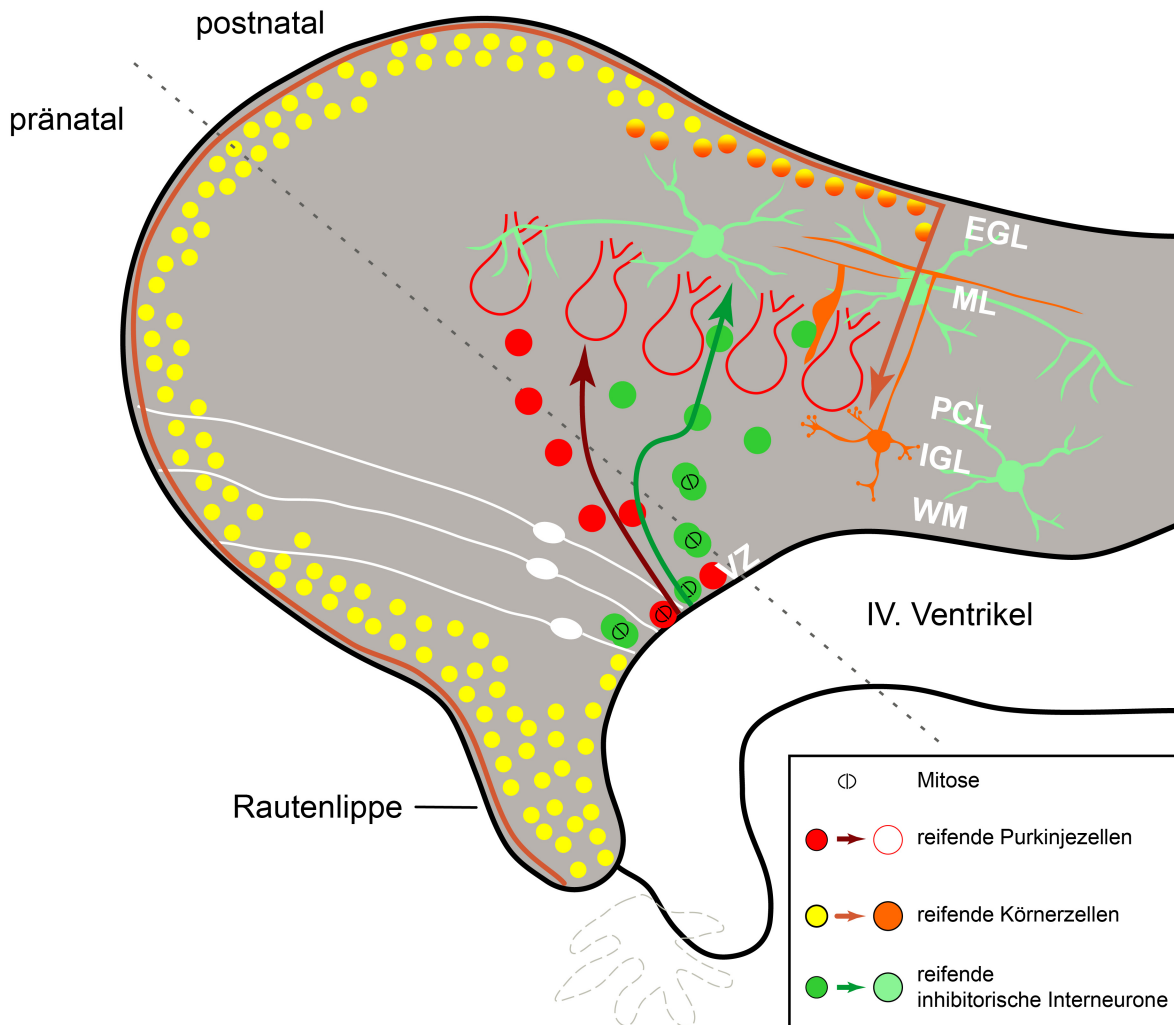


Abbildung 2: Pränatale (links) und postnatale (rechts) Entwicklung des Cerebellums. Vorläuferzellen von Purkinjezellen (rot) entstehen aus dem Neuroepithel der an den vierten Ventrikel angrenzenden Ventrikulärzone (VZ). Sie wandern von E11 bis E13 in das entstehende Cerebellum ein und bilden dort die Purkinjezellschicht (PCL). Vorläuferzellen von Körnerzellen (gelb) gehen von E13 bis P15 aus dem Bereich der Rautenlippe hervor. Sie migrieren zunächst tangential durch die von ihnen gebildete äußere Körnerzellschicht (EGL) an der Cerebellumoberfläche. Danach wandern sie radial durch die Molekularschicht (ML) und die PCL in die innere Körnerzellschicht (IGL) des Cortex und differenzieren dort in reife Körnerzellen (orange). Vorläuferzellen der inhibitorischen Interneurone (grün) werden zwischen E13,5 und P18 vom Ventrikelepithel generiert. Sie wandern zunächst weitgehend tangential durch die weiße Substanz (WM), in der sie sich initial noch teilen, in das entstehende Cerebellum ein. Im cerebellären Cortex migrieren sie nachfolgend in radialer Orientierung und differenzieren sich dort in inhibitorische Interneurone (hellgrün; vgl. Abb. 3). Weiß: radiale Glia. Für Details s. Text. Nach einer Skizze von Karl Schilling.

Zwischen Embryonaltag 11 und 13 (E11–13) gehen zunächst die Purkinjezellen aus dem Neuroepithel des vierten Ventrikels hervor (Miale und Sidman, 1961). Sie wandern weitgehend radial in das entstehende Cerebellum ein, wo sie die PCL bilden. Von E13 bis P15 (Carletti und Rossi, 2008) werden nachfolgend in der Rautenlippe die Vorläuferzellen der Körnerzellen gebildet. Sie wandern zunächst tangential über die Oberfläche des cerebellären Cortex, wo sie die EGL bilden. Im äußeren Bereich der EGL teilen sie sich letztmalig (Carletti und Rossi, 2008). Danach durchwandern sie den cerebellären Cortex radial von außen nach innen, um nach Durchqueren der ML und PCL die IGL zu bilden und sich dort zu differenzieren. Ihre Migration ist deutlich ausführlicher untersucht als die der Vorläuferzellen der inhibitorischen Interneurone (Komuro und Rakic, 1998).

1.3.3.1 Entwicklung der inhibitorischen Interneurone des Cerebellums

Die Vorläuferzellen der inhibitorischen Interneurone entstehen zwischen E13,5 und P18 aus Stammzellen des Ventrikelepithels (Abb. 2; Weisheit et al., 2006; Carletti und Rossi, 2008). Sie wandern zunächst weitgehend tangential durch die WM in Richtung des sich entwickelnden cerebellären Cortex, während sie sich weiter teilen (Zhang und Goldman, 1996). Etwa ab der letzten Mitose exprimieren sie das Paired-box-Protein Pax2, das daher als Marker für die Vorläuferzellen cerebellärer inhibitorischer Interneurone genutzt werden kann (Maricich und Herrup, 1999; Weisheit et al., 2006). Anschließend wandern sie weitgehend radial in den sich entwickelnden cerebellären Cortex ein (Abbildung 3). Embryonal entstehende Pax2-positive Vorläuferzellen differenzieren sich fast ausschließlich in die großen inhibitorischen Interneurone der IGL, die gemeinhin als Golgi-Zellen zusammengefasst werden. Die postnatal entstehenden Pax2-positiven Vorläuferzellen durchqueren zum überwiegenden Teil die IGL und die PCL, um sich in der ML niederzulassen und in Korb-/Sternzellen zu differenzieren (Miale und Sidman, 1961; Zhang und Goldman, 1996; Weisheit et al., 2006; Leto et al., 2009).

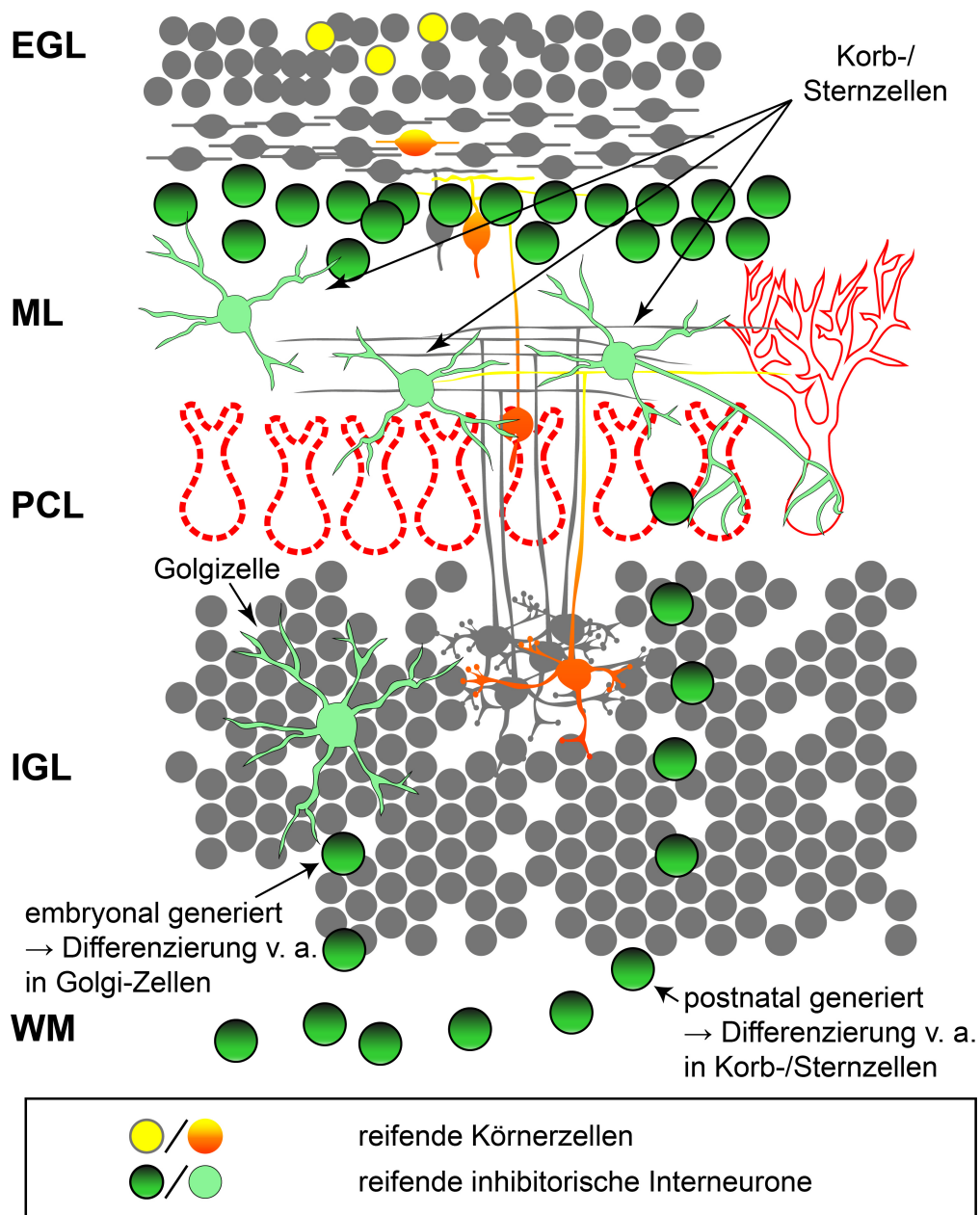


Abbildung 3: Corticale Migration der Interneuron-Vorläuferzellen. Früh postnatal ist der cerebelläre Cortex vierschichtig: Von innen nach außen besteht er aus der IGL, der PCL, der ML und der EGL. Postmitotische Körnerzell-Vorläufer (gelb-orange) migrieren radial von außen aus der EGL durch die ML und PCL in die IGL, um sich dort zu differenzieren. Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone (dunkelgrün) wandern hingegen aus der WM weitgehend radial in den cerebellären Cortex ein. Während sie embryonal vorwiegend die Golgi-Zellen der IGL bilden, wandern sie postnatal bis in die äußere ML. Sie differenzieren sich nachfolgend in Korb-/Sternzellen. Rot: Purkinjezellen. Nach einer Skizze von Karl Schilling.

1.4 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wollten wir zunächst grundlegende elektrophysiologische Eigenschaften migrierender Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone des murinen Cerebellums untersuchen und mit der Position dieser Zellen in der Cerebellum-Anlage korrelieren. Parallel dazu sollte die Migration dieser Zellen quantifiziert werden. Letztlich wollten wir wissen, ob die (direkte) synaptische Innervation das Migrationsverhalten dieser Zellen beeinflusst.

Zur Bearbeitung dieses Themenkomplexes war die Beantwortung folgender Fragen von primärem Interesse:

- Kann die Migration von Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone in akuten cerebellären Schnitten beobachtet werden (Abschnitt 3.1.1, S. 51)?
- Welche grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften weisen die Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone auf?
 - Haben sie spannungsgesteuerte Ionenkanäle, und wenn ja, welche (Abschnitt 3.1.2, S. 58)?
 - Können sie Aktionspotentiale generieren (Abschnitt 3.1.3, S. 60)? Diese Eigenschaft wäre notwendig für die Weiterleitung synaptisch empfangener Signale.
 - Haben sie ionotrope Neurotransmitter-Rezeptoren für die cerebellären Haupt-Neurotransmitter GABA und Glutamat (Abschnitt 3.1.4, S. 61)? Dies (oder die Anwesenheit anderer Neurotransmitter-Rezeptoren) wäre notwendig für das Empfangen nicht-synaptischer und/oder synaptischer Signale in Form freigesetzter Neurotransmitter.

Die zu den oben genannten Fragen erhobenen Befunde führten dann zu den letztlich zentralen Fragen:

- Werden die migrierenden Vorläuferzellen cerebellärer corticaler Interneurone vor ihrer Ankunft an ihrer adulten Position synaptisch innerviert (Abschnitt 3.2, S. 64)?
- Ist synaptische Kommunikation für die Migration und/oder Zielfindung dieser Zellen von Bedeutung (Abschnitt 3.2.3, S. 70)?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

2.1.1.1 allgemein

Kaltlichtleuchten	KL200	Schott AG, Mainz, Deutschland
	KL1500 LCD	
Magnetrührer	IKAMAG RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
	IKAMAG RH basic	
Osmometer	Vapro Vapor Pressure Osmometer	Wescor, Logan, Utah, USA
pH-Meter	pH M761	Knick GmbH & Co, Berlin, Deutschland
Ultraschallbäder	Transsonic T310	Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland
	Elmasonic S10H	
Vibratome	VT1000S und 1200S	Leica, Wetzlar, Deutschland
Wasserbad	GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Waagen	BP121S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	Sartorius Portable	

2.1.1.2 Patch-clamp

DA/AD-Wandler	ITC 16	Instrutec Corporation, Port Washington, New York, USA
	LIH 1600	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland

Glaskapillaren	Borosilikatglas mit Filament; Außen-Durchmesser 2,00 mm, Innen-Durchmesser 1,50 mm	Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland
	Borosilikatglas mit Filament GB150F-10; Außen-Durchmesser 1,50 mm, Innen-Durchmesser 0,86 mm	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Nachverstärker	DPA 2F in EPMS-07-System	NPI Elektronik GmbH, Tamm, Deutschland
Oszilloskope	HM501 und HM507	HAMEG Instruments GmbH, Mainhausen, Deutschland
Patch-clamp-Verstärker	EPC8, EPC9 und EPC800	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Pipettenziehgeräte	PP-830	Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan
	P-87 und P-2000	Sutter Instrument, Novato, USA
schwingungsgedämpfte Tische		Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.1.3 Zeiss Axioskop-FS-System

Mikroskop	Axioskop FS	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektive	5×/0,15 Zeiss Plan Neofluar	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	60×/0,90W Lumiplan FI/I-Objektiv	
UV-Lampe	HBO 50W	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Filter	Zeiss Filterset 10 (Exzitation (Ex.) Bandpassfilter (BP) 450-490; Farbteiler (FT) 510; Emission (Em.) BP 515-565)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	Zeiss Filterset 5 (Ex. BP 395-440; FT 460; Em. Langpassfilter (LP) 470)	
	Zeiss Filterset 0 (Ex. BP 530-585; FT 600; Em. LP 615)	
Kamera	Charge-coupled device (CCD) Kamera C5405	Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Kamera Controller	C2400	Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Mikro-/Manipulatoren	MHW-3	Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan

2.1.1.4 Konfokales LSM5-Pascal-System

Mikroskop	Axioskop FS2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektive	CP-Achromat 5×/0,12	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	LUMPlan FI/IR Objektiv 60×/0,09 W	Olympus Optical Co., Hamburg, Deutschland
UV-Lampe	448066, HBO 50W	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Filter	Zeiss Filterset 10 (Ex. BP 450-490; FT 510; Em. BP 515-565)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Lasert	Argon-Lasert	LASOS Lasertchnik GmbH, Jena, Deutschland
Kamera	analoge Tubus-Kamera	Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Kamera-Controller	C2400-07	Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Manipulatoren	SM-1 und SM-4	Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland
Badheizung	Temperaturcontroller III	Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland

2.1.1.5 Leica LSM-TCS-SP5-System

Mikroskop	DM 6000 CES	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektiv	20×/1,00 W HCX APO- Objektiv	Leica, Wetzlar, Deutschland
UV-Lampe	EL 6000	Leica, Wetzlar, Deutschland
IR-Lasert	Ti:Sapphir-Oszillator	MaiTai BB, Newport/Spectra Physics
Kamera	DFC 350 FX	Leica, Wetzlar, Deutschland
Badheizung	Badcontroller V	Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland
Manipulatoren	SM-1 und SM-5	Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland
Pumpe	Ismatec IPC ISM930	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Bicucullin-Methbromid	Abcam Biochemicals (Ascent Scientific), Cambridge, UK
6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion (CNQX)-Dinatriumsalz	Abcam Biochemicals (Ascent Scientific), Cambridge, UK
Cyclothiazid (CTZ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (D-APV)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
DL-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (DL-APV)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
γ -Aminobuttersäure (GABA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ionomycin-Calciumsalz	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Kainat (KA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Muscimol	Abcam Biochemicals (Ascent Scientific), Cambridge, UK
2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl- benzo[<i>f</i>]chinoxalin-2,3-dion (NBQX)- Dinatriumsalz	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Picrotoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tetanusneurotoxin (TeNT)	Merck KGaA (Calbiochem), Darmstadt, Deutschland
Tetrodotoxin-Citrat (TTX-Citrat)	Alomone Labs, Jerusalem, Israel oder Abcam Biochemicals (Ascent Scientific), Cambridge, UK oder Tocris Bioscience, Bristol, UK

Alle anderen Chemikalien	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland)
--------------------------	--

2.1.2.1 Farbstoffe und Antikörper

Texas Red Dextran, MW 3000, Lysin- fixierbar	Life Technologies GmbH , Darmstadt, Deutschland
Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-Dextran, MW 3000, Lysin- fixierbar	Life Technologies GmbH , Darmstadt, Deutschland
Kaninchen-anti-Synaptophysin- Primärantikörper G95 (monoklonal)	Ikin et al., 1996
Maus-anti-Calbindin-D28K- Primärantikörper (monoklonal), #300	SWANT, Bellinzona, Schweiz
Alexa-546-gekoppelter Ziege-anti- Kaninchen-Sekundärantikörper	Life Technologies GmbH , Darmstadt, Deutschland
Biotin-gekoppelter Ziege-anti-Maus- Sekundärantikörper	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Streptavidin-Cy3	Life Technologies GmbH , Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Allgemeine Lösungen

10× Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	1,5	M
Na ₂ HPO ₄	83	mM
NaH ₂ PO ₄	17	mM

- pH mit NaOH auf 6,9 einstellen
- nach Verdünnung mit ddH₂O auf 1× PBS den pH ggf. mit HCl nachstellen

10× TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-gepufferte Salzlösung (TBS)

NaCl	1,5	M
TRIS	0,5	M

- pH mit HCl auf 7,4 einstellen
- nach Verdünnung mit ddH₂O auf 1× TBS den pH ggf. mit NaOH oder HCl nachstellen

Phosphat-gepufferte Lösung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)

- 800 ml ddH₂O auf 60 °C erwärmen
- 40 g PFA darin lösen
- 5 M NaOH in ddH₂O tropfenweise zugeben, bis die Lösung klar ist
- abkühlen und 100 ml 10× PBS zugeben, auf 1000 ml auffüllen
- bei RT pH mit NaOH und HCl auf 7,4 einstellen
- ggf. filtrieren
- Lagerung bei -20 °C für bis zu 12 Monate

2.1.3.2 Außenlösungen für Patch-clamp-Ableitungen

Der pH der Außenlösungen wurde auf 7,38–7,4 eingestellt.

Präparationslösung

NaCl	87	mM
KCl	2,5	mM
NaH ₂ PO ₄	1,25	mM
MgCl ₂	7	mM
CaCl ₂	0,5	mM
NaHCO ₃	25	mM
Glucose	25	mM
Sucrose	75	mM

- 354 mosm
- Einstellung des pHs und Oxygenierung der Schnitte bei 4 °C durch Begasung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂)

Künstliche cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) für Raumtemperatur (RT, ≈ 24 °C)

NaCl	126	mM
KCl	3	mM
NaH ₂ PO ₄	1,25	mM
MgSO ₄	2	mM
CaCl ₂	2	mM
NaHCO ₃	26	mM
Glucose	10	mM

- 334,5 mosm
- Einstellung des pHs und Oxygenierung der Schnitte bei RT durch Begasung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂)

ACSF für 35 °C

NaCl	132 mM
KCl	3 mM
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	2 mM
NaHCO ₃	20 mM
Glucose	10 mM

- 334,5 mosm
- Einstellung des pHs und Oxygenierung der Schnitte bei 35 °C durch Begasung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-gepufferte Lösung

NaCl	135 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	2 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
BaCl ₂	10 mM
4-Aminopyridin	4 mM
CdCl ₂	30 µM
TTX	1 µM
DL-APV oder D-APV	50 µM bzw. 20–25 µM

- ≈ 326 mosm
- Einstellung des pHs mit NaOH; Oxygenierung der Schnitte bei RT durch Begasung mit Sauerstoff

2.1.3.3 Pipetten-Innenlösungen für Patch-clamp-Ableitungen

Alle Innenlösungen enthielten 0,05 % TRITC-Dextran oder 0,1 % Texas Red-Dextran. Der pH der Innenlösungen wurde auf 7,25–7,3 eingestellt. Das Liquid-Junction-Potential der gluconathaltigen Innenlösungen von 6 mV wurde vor den Messungen korrigiert.

Innenlösung 1:

KCl	130	mM
MgCl ₂	2	mM
CaCl ₂	0,5	mM
Na ₂ -ATP	3	mM
BAPTA	5	mM
HEPES	10	mM

- ≈ 282,5 mosm
- Einstellung des pHs mit KOH

Innenlösung 2:

CsCl	130	mM
MgCl ₂	2	mM
CaCl ₂	0,5	mM
Na ₂ -ATP	3	mM
BAPTA	5	mM
HEPES	10	mM

- ≈ 282,5 mosm
- Einstellung des pHs mit CsOH

Innenlösung 3:

K-Gluconat	125	mM
KCl	20	mM
NaCl	3	mM
MgCl ₂	2	mM
Na ₂ -ATP	2	mM
EGTA	0,5	mM
HEPES	10	mM

- $\approx 318,5$ mosm
- Einstellung des pHs mit KOH

Innenlösung 4:

CsOH	125	mM
CsCl	20	mM
NaCl	3	mM
MgCl ₂	2	mM
Na ₂ -ATP	2	mM
EGTA	0,5	mM
HEPES	10	mM

- ≈ 300 mosm
- Titration des pHs mit Gluconat auf 7,25

2.1.4 Pax2-GFP-Mäuse

Für alle Experimente wurde die Mauslinie „bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) #30“, die das grün fluoreszierende Protein GFP vom Pax2-Genort exprimiert (Marshall et al., 1995; Pfeffer et al., 2002; Weisheit et al., 2006), verwendet (Abbildung 4). In Schnitten von Cerebella dieser Tiere können unreife, migrierende Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone anhand ihrer Expression von GFP erkannt werden. Ich werde diese neuronalen Vorläuferzellen deshalb nachfolgend als „Pax2-Zellen“ bezeichnen.

Die Pax2-GFP-Mäuse wurden heterozygot auf einem C57BL/6-Hintergrund gezüchtet. Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum und hatten einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 h. Die Tiere wurden über Nacht verpaart. Der Tag nach der Verpaarung wurde als Gestationstag 0 (E0) gewertet. Tierhaltung und -experimente wurden in Übereinstimmung mit dem geltenden Tierschutzgesetz durchgeführt und alle erforderlichen Maßnahmen ergriffen, um die Zahl der benötigten Tiere zu minimieren.

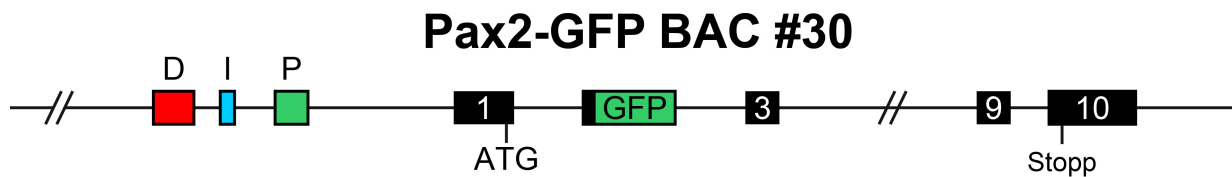


Abbildung 4: Pax2-BAC-Konstrukt #30. Es enthält eine im Leseraster eingebrachte GFP-Insertion in Exon 2. Zudem beinhaltet es mindestens 30 kb, die dem Promotor vorgelagert sind. Dort liegen Regionen mit weitgehend homologen Sequenzen der humanen und murinen Pax2-Gene (D distal, I intermediär, P proximal). Nach Pfeffer et al., 2002.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation akuter parasagittaler Vermischnitte

Die meisten Experimente wurden an akuten parasagittalen Vermischnitten von Pax2-GFP-Mäusen durchgeführt. Sieben bis neun Tage alte Mäuse wurden anästhesiert, dekapitiert und das Cerebellum entnommen. Mit einem Vibratom wurden nachfolgend 200 µm (für Patch-clamp-Messungen und xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie) oder 300 µm dicke (für xyzt-Zeitraffer-Videomikroskopie) parasagittale Schnitte des cerebellären Vermis in eiskalter Präparationslösung angefertigt. Die Schnitte wurden in derselben Lösung für 30 min bei 32 °C gelagert und dann über weitere 30 min auf RT heruntergekühlt. Danach wurden sie in ACSF bei RT aufbewahrt.

2.2.2 Konfokale und Zwei-Photonen-Zeitraffer-Videomikroskopie

Die Histogenese der einzelnen cerebellären Lobuli erfolgt zeitlich leicht versetzt (s. z. B. Altman und Bayer, 1985). Um diese mögliche Variationsquelle auszuschließen, untersuchten wir durchgehend Pax2-Zellen der L IV und V des Vermis.

Die Zeitraffer-Videomikroskopie wurde entweder konfokal in xyt an P7–9 Pax2-GFP-Mäusen oder mittels Zwei-Photonen-Anregung (Denk et al., 1990; Svoboda und Yasuda, 2006; Haberlandt et al., 2011) in xyt an P8 Pax2-GFP-Mäusen durchgeführt. Die Messungen erfolgten immer in ACSF bei nahezu physiologischer Temperatur von 35 °C.

Die konfokale xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie diente primär der Identifizierung migrierender Pax2-Zellen für Patch-clamp-Ableitungen (vgl. Ergebnisse Abschnitte 3.1.1., S. 51, und 3.2.2, S. 68). Sie wurde mit einem konfokalen LSM5-Pascal-System (Zeiss), ausgestattet mit einem Axioskop-FS2-Mikroskop, einem 60× LUMPlan-FI/IR-Objektiv und einer analogen Tubus-Kamera, durchgeführt. Die Anregung der GFP-positiven Pax2-Zellen erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm unter Nutzung des Zeiss-Filtersets 10.

Jede Aufnahme fokussierte auf eine einzelne migrierende Pax2-Zelle, von der alle 10 Sekunden ein Bild aufgenommen wurde (1024 × 1024 Pixel, 217 × 217 μm², 8-Bit; optische Schnittdicke $d \approx 4,5$ μm). Dabei wurde die untersuchte Zelle manuell im Fokus gehalten. Am Ende der Aufnahme wurde die migrierende Pax2-Zelle im Gesichtsfeld zentriert und ihre Morphologie und die Position/Schichtzugehörigkeit wurden mittels Fluoreszenzlampenaufnahmen und Aufnahmen mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) dokumentiert.

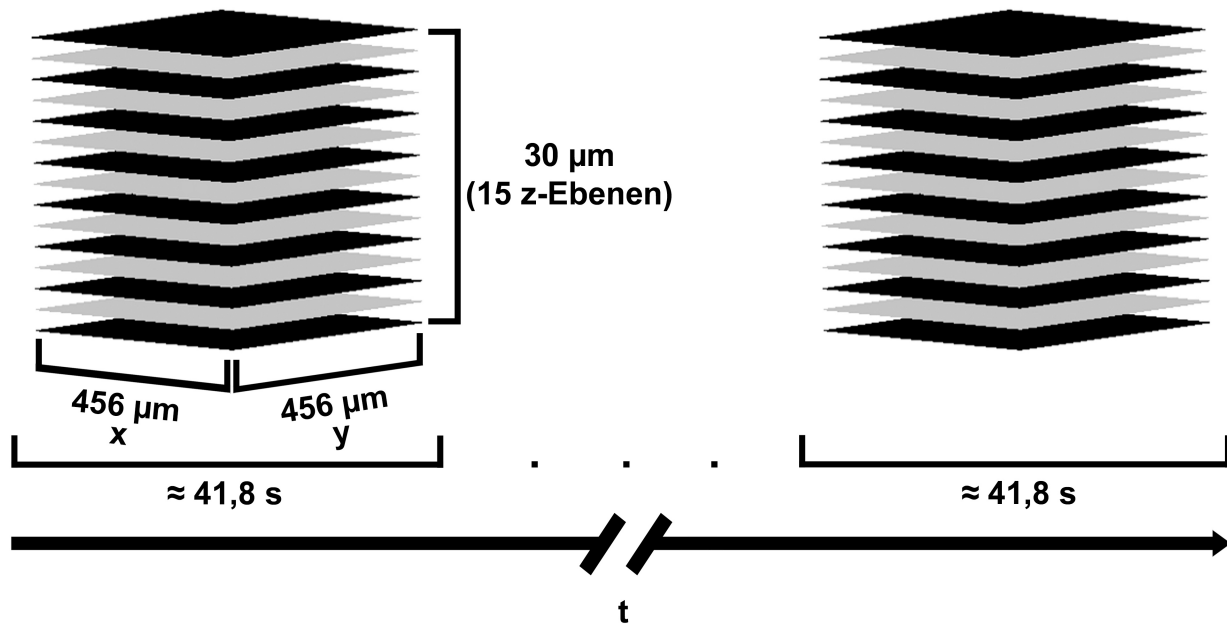


Abbildung 5: xyzt-Zwei-Photonen-Zeitraffer-Videomikroskopie. Über einen Zeitraum von 30 min bis 4 h wurde alle $\approx 41,8$ s ein xyz-Bildstapel von $456 \times 456 \times 30 \mu\text{m}^3$ ($\Delta z = 2 \mu\text{m}$) aufgenommen.

Die xyzt-Zwei-Photonen (2P)-Zeitraffer-Videomikroskopie wurde eingesetzt, um zahlreiche Pax2-Zellen zeitgleich in 3D aufzunehmen und ihre Migration detailliert quantitativ zu analysieren (vgl. Abschnitte 3.1.1, S. 51, und 3.2.3, S. 70). Im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie hat die 2P-Anregung den Vorteil, dass die Anregung nur sehr fokal erfolgt. Im Gegensatz zur „Sanduhr-förmigen“ Anregung durch einen konfokalen Laser, die die gesamte Schnittdicke durchdringt, ist die 2P-Anregung kugelförmig. Der Durchmesser des Anregungsbereichs beträgt etwa 250 nm. Dies hat zur Folge, dass beim Scannen ausschließlich Fluorophore der aktuellen z-Ebene angeregt werden. Bei der konfokalen Anregung werden hingegen prinzipiell immer alle z-Ebenen angeregt. Zwar nimmt die Lichtintensität mit dem Abstand zur Fokusebene ab, gleichzeitig vergrößert sich jedoch die beleuchtete Fläche. Insgesamt bleichen bei der 2P-Anregung die Fluorophore deutlich weniger, die Anregung ist weniger fototoxisch, und es ergeben sich weniger Probleme mit Streulicht (Dunn und Young, 2006). Mit einem Leica LSM-TCS-SP5-System wurde etwa alle $\approx 41,8$ s ein Bildstapel mit einem

Volumen von $456 \times 456 \times 30 \mu\text{m}^3$ aufgenommen (1024×1024 Pixel, 400 Hz; 15 z-Ebenen, $\Delta z = 2 \mu\text{m}$; Abbildung 5). Dies entspricht einem Ausschnitt der L IV und V mit dazwischenliegender weißer Substanz. Die Beobachtungsdauer betrug bis zu 4 h. Die Anregung des GFPs erfolgte bei 980 nm. Hierzu wurde ein gepulster Ti:Saphir-IR-Laser genutzt, der an ein Leica DM 6000 CES mit einem Leica 20 \times /1.00 W HCX-APO-Objektiv gekoppelt war. Wenn eine z-Drift von mehr als 4 μm auftrat, erkennbar als Verschiebung von beobachteten charakteristischen Objekten um zwei Ebenen in z, wurden die Einstellungen für die z-Ebenen manuell korrigiert.

2.2.2.1 Schnittinkubation mit Tetanustoxin

Um den Effekt der synaptischen Neurotransmitterfreisetzung auf die Migration von Pax2-Zellen zu erfassen, wurde die vesikuläre Transmitterfreisetzung mit Tetanus(neuro)toxin (TeNT) blockiert (Schiavo et al., 1992; vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.2.3, S. 70).

Zunächst wurde die Migration unbehandelter Pax2-Zellen mittels xyz-t-2P-Zeitraffer-Videomikroskopie für 1 h beobachtet.

Danach wurde der Schnitt auf einem Gitter in einer kleinen selbstgebauten Inkubationskammer in 1 ml modifiziertem ACSF mit 100 $\mu\text{g/ml}$ TeNT für 2 h bei 35 °C inkubiert. Der pH wurde mit Carbogen durch Begasung über der Lösung auf 7,35–7,40 eingestellt und am Ende der Inkubation nochmals überprüft. Die Osmolarität der Inkubationslösung wurde vor der Inkubation auf etwa 330 mosm eingestellt und am Ende der Inkubationsperiode ebenfalls überprüft.

Nach der Inkubation wurde der Schnitt zurück in die Messkammer des SP5-Systems gebracht und so orientiert, dass wir dieselbe Region wie vor der Inkubation beobachten konnten. Dabei orientierten wir uns an den Positionen einzelner leicht identifizierbarer Golgi-Zellen. Anschließend wurde die Migration der Pax2-GFP-positiven Zellen wie oben beschrieben für weitere 2 h beobachtet.

Insgesamt wurde von drei verschiedenen Spendertieren je ein Schnitt auf die geschilderte Art aufgenommen. So wurden Daten von 917 Pax2-Zellen vor Inkubation mit TeNT sowie 651 Pax2-Zellen nach Inkubation mit TeNT gewonnen. Parallel wurde an gleich behandelten Schnitten der Effekt von TeNT anhand elektrophysiologischer Ableitungen von Purkinje-, Golgi- und Körnerzellen gesichert.

Ein Kontrollschnitt wurde nicht mit TeNT, sondern mit reinem ACSF inkubiert („Sham-Inkubation“). Dies erlaubte uns, starke toxische Effekte der Laserbeleuchtung und/oder der zweistündigen Inkubation auf die Pax2-Zellmigration auszuschließen.

2.2.2.2 Analyse der Zellmigration

Die Distanzen, die migrierende Pax2-Zellen in xyt-Zeitraffer-videomikroskopischen Aufnahmen zurückgelegt hatten, wurden wie folgt abgeschätzt: Aufnahmen individueller Pax2-Zellen vom ersten sowie letzten beobachteten Zeitpunkt wurden anhand stationärer (Golgi-) Zellen, die in beiden Aufnahmen sichtbar waren, in Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA) übereinandergelegt. Wenn sich die sichtbaren stationären Golgi-Zellen zum Anfangs- und Endzeitpunkt unterschieden, da sie in einer anderen z-Ebene lagen, wurden weitere Aufnahmen dazwischenliegender Zeitpunkte zur Ermittlung der Lage der beiden Bilder zueinander herangezogen. Anschließend wurde die zurückgelegte Distanz der beobachteten migrierenden Pax2-Zelle zwischen Anfangs- und Endaufnahmezeitpunkt vermessen. Pax2-Zellen, die mindestens 2,5 μm migriert waren, wurden anschließend gepatcht.

Exemplarisch erfolgte eine ausführlichere Analyse der xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie für eine Pax2-Zelle, die über 4:20 h beobachtet worden war. Ziel war es, weitgehend auszuschließen, dass länger dauernde konfokale Aufnahmen über einen fototoxischen Effekt die Migration inhibieren. In einer mit Igor Pro 6 (Wavemetrics Inc., Portland, Oregon, USA) durchgeführten Fluoreszenzintensitäts-basierten Partikelanalyse wurde für jeden Zeitpunkt an die Zelle ein Ellipsoid angepasst. Daraus wurde der Zellschwerpunkt zur Beschreibung der Zellposition berechnet. Das örtliche Hintergrundrauschen wurde durch Mittelung der Schwerpunkte von je sechs aufeinanderfolgenden Zeitpunkten minimiert. Effektiv wurde der Schwerpunkt somit einmal pro Minute ermittelt. Eine Drift-Korrektur wurde nicht durchgeführt, da sich die neben der beobachteten Pax2-Zelle sichtbaren Zellen durch Fokussierung auf die auch in z-Richtung migrierende Pax2-Zelle veränderten.

Die quantitative Analyse der mittels xyzt-2P-Zeitraffer-Videomikroskopie erhobenen Daten erfolgte mit dem Tracking-Modul der Software Imaris 7.5.1 (Bitplane, Zürich, Schweiz). Dabei wurden die Bilder zunächst mit einem Gauß-Filter geglättet. Dann

wurden für jeden Bildstapel die Iso-Oberflächen, definiert als stetige Flächen gleicher Intensität, der darin abgebildeten corticalen Pax2-Zellen sowie der Golgi-Zellen ermittelt. Hierfür wurden die Iso-Oberflächen durch Setzen eines Schwellenwertes für die GFP-Fluoreszenzintensität so segmentiert, dass einerseits möglichst viele Pax2-Zellen gut erfasst wurden, andererseits aber die Iso-Oberflächen der einzelnen Pax2-Zellen möglichst separiert blieben. Wenn für sich berührende Pax2-Zellen durch das skizzierte Verfahren nur eine Iso-Oberfläche generiert wurde, so wurde diese nachträglich auf der Grundlage der unbearbeiteten Bilddaten geteilt. Manche Pax2-Zellen, die in den unbearbeiteten Bildern eindeutig erkennbar waren, wurden bei der ersten Segmentierung nicht erfasst, da ihre Fluoreszenzintensität unterhalb des zunächst gewählten Schwellenwertes lag. In diesen Fällen wurde die Analyse in einem kleinen Bereich (ROI) mit niedrigerem Schwellenwert wiederholt. Aus den Iso-Oberflächen wurden letztendlich die Schwerpunkte der Pax2-Zellen berechnet.

Imaris gibt zwei verschiedene Schwerpunkte für jede Zelle aus: den Schwerpunkt bei konstanter Dichte und den intensitätsgewichteten Schwerpunkt.

Der Schwerpunkt i. S. des Massenmittelpunkts \vec{r}_s eines Körpers ist definiert als der Ortsvektor, an dem die Summe aller Drehmomente Null ist. Es gilt

$$\vec{r}_s = \frac{1}{M} \int_{(m)} \vec{r} dm(\vec{r}) = \frac{1}{M} \int_{(m)} \vec{r} \rho(\vec{r}) dV(\vec{r}) \quad (1)$$

mit M Gesamtmasse, \vec{r} Ortsvektor, $dm(\vec{r})$ Masse eines infinitesimalen Volumensegments am Ort \vec{r} , $\rho(\vec{r})$ Dichte am Ort \vec{r} , $dV(\vec{r})$ Volumenelement.

Bei der Berechnung des Schwerpunkts bei konstanter Dichte wird angenommen, dass alle Voxel einer durch eine Iso-Oberfläche definierten Zelle dieselbe Intensität haben (Imaris-Handbuch, Bitplane, Zürich, Schweiz). Der Massenmittelpunkt und der Volumenschwerpunkt sind in diesem Fall gleich und die Dichte ρ kann als Faktor vor das Integral gezogen werden. Da es sich in unserem Fall um ein diskretes System handelt,

wird das Volumenintegral durch eine Summe über die Ortsvektoren \vec{r}_i aller Massenelemente ersetzt:

$$\vec{r}_s = \frac{1}{n} \sum_{i \in \text{Zelle}} \vec{r}_i \quad (2)$$

mit \vec{r}_s Schwerpunkt bei konstanter Dichte, \vec{r}_i Ortsvektor eines Voxels, n Anzahl der Voxel einer Zelle.

Bei der Berechnung des intensitätsgewichteten Schwerpunkts gehen in die Schwerpunktberechnung die Voxel-Intensitäten ein, d. h. die Voxel werden intensitätsgewichtet:

$$\vec{r}_s = \frac{1}{M} \sum_{i \in \text{Zelle}} m_i \vec{r}_i \quad (3)$$

mit \vec{r}_s intensitätsgewichteter Schwerpunkt, m_i Voxel-Intensität, \vec{r}_i Ortsvektor eines Voxels, M Summe der Voxel-Intensitäten.

Die Distanz, die Trajektorienlänge und die Durchschnittsgeschwindigkeit werden von Imaris nur für den Schwerpunkt bei konstanter Dichte ausgegeben. Wir werteten deshalb die Daten anhand der intensitätsgewichteten Schwerpunkte mit einem selbstgeschriebenen Makro in Igor Pro zusätzlich aus. Da sich die Ergebnisse nicht wesentlich unterscheiden und der Schwerpunkt bei konstanter Dichte weniger stör anfällig ist, beruhen die hier gezeigten Daten auf der Analyse des Schwerpunkts bei konstanter Dichte.

Die so ermittelten Schwerpunkte der einzelnen Pax2-Zellen ermöglichen die quantitative Beschreibung der Positionsveränderungen dieser Pax2-Zellen während der Beobachtungszeit. Bevor diese Werte für weitere Analysen benutzt werden konnten, mussten sie allerdings von Drift-Artefakten, v. a. durch minimale, oftmals anisotrope Schnittpassung während der Beobachtung, bereinigt werden. Als quasi-stationäre Bezugspunkte dienten dabei Golgi-Zellen. Eine anisotrope Drift wurde durch

Verkleinerung der ROIs kompensiert, so dass innerhalb der kleineren ROIs annähernd von einer isotropen Drift ausgegangen werden konnte. Diese wurde durch eine Linearkombination von Translation und Rotation approximiert.

Ausgeschlossen von der weiteren Analyse wurden Golgi-Zellen sowie diejenigen Pax2-Zellen, die weniger als 80 % aller Zeitpunkte sichtbar waren. Ebenso wurden Pax2-Zellen ausgeschlossen, die randständig waren und nicht nahezu vollständig in dem untersuchten Volumen lagen. Die Zahl der ausgeschlossenen Pax2-Zellen dürfte deutlich unter 1 % aller aufgenommenen corticalen Pax2-Zellen liegen.

Aus den rekonstruierten Schwerpunkten wurden für alle Pax2-Zellen mittels eines selbstgeschriebenen Makros folgende Parameter in Igor Pro ermittelt und mit den von Imaris ausgegebenen Werten verglichen (Abbildung 10A, S. 57):

- 1) Die Trajektorienlänge: Dies ist die Summe der Wegstrecken zwischen den Zellschwerpunkten zu konsekutiven Zeitpunkten (gelb in Abb. 10A).
- 2) Die Distanz: Sie ist die Länge der direkten Verbindung des Schwerpunkts einer Pax2-Zelle zu den Zeitpunkten t_0 (Startzeitpunkt) und t_n (Endzeitpunkt; grüner Pfeil in Abb. 10A).
- 3) Die Geradlinigkeit: Sie ist der Quotient der Distanz zu der Trajektorienlänge (maximal 1).
- 4) Die Geschwindigkeit: Diesen Begriff werde ich für die genaueste von uns ermittelte Geschwindigkeit verwenden. Sie wurde für alle Pax2-Zellen und alle Distanzen, die Pax2-Zellen in dem kleinsten von uns aufgenommenen Zeitraum von $\approx 41,8$ s zwischen zwei Messzeitpunkten zurückgelegten, berechnet.
- 5) Die Durchschnittsgeschwindigkeit: Dies ist der Quotient der Trajektorienlänge und der Gesamtzeit.

Für die TeNT-Experimente wurde die Pax2-Zellmigration der letzten 30 min der Kontrollaufnahme mit den ersten 30 min nach Inkubation mit TeNT verglichen. Zudem wurde ein Sham-inkubierter Schnitt auf dieselbe Art ausgewertet.

Kumulative Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für die Geschwindigkeiten, die Distanz und die Geradlinigkeit wurden für die Ergebnisse der drei unabhängigen TeNT-Experimente sowohl separat als auch zusammengefasst erstellt. Die in Abschnitt 3.2.3,

S. 70, beschriebenen Effekte einer TeNT-Inkubation auf die Migration von Pax2-Zellen waren in allen drei Experimenten nachweisbar. Der Übersichtlichkeit halber sind in dieser Arbeit die Ergebnisse der zusammengefassten Experimente dargestellt.

Geschwindigkeit, Distanz und Geradlinigkeit der Pax2-Zellmigration wurden aufgrund der nicht normalverteilten Werte anhand ihrer Mediane verglichen. Die 95 %-Konfidenzintervalle (KI) der Mediane wurden mittels Bootstrapping in R (R Development Core Team, 2011) ermittelt (www.statmethods.net/advstats/bootstrapping.html; für Details siehe Hilfefunktion von R unter „boot“). Hierbei wurden 1000 Proben durch Replikation gezogen. Die Teststatistik war die Differenz des Medians für die einzelnen Parameter zwischen der initialen Migration und der Migration nach Inkubation.

Zudem wollten wir die Richtungspersistenz migrierender Pax2-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit TeNT erfassen. Hierzu berechneten wir für die Trajektorien alle Winkeländerungen $\Delta\phi$ zwischen allen Wegstrecken, die zwischen je zwei aufeinanderfolgenden Beobachtungszeitpunkten zurückgelegt wurden (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.2.3, S. 70). Die Winkeländerungen $\Delta\phi$ ergaben sich als Winkel bei Zeitpunkt $t+1$ aus den Vektoren zwischen den Zellschwerpunkten zu den Zeitpunkten t und $t+1$ sowie $t+1$ und $t+2$. Sie beschreiben somit die Änderung der Migrationsrichtung. Die Winkeländerungen vor und nach Inkubation mit TeNT oder einer Sham-Inkubation wurden mit dem Kuiper-Test für zwei Proben verglichen.

Analog wurden die Winkeländerungen $\Delta\phi$ nach Projektion der Trajektorien auf die xy -Ebene bzw. die xz -Ebene, die im Wesentlichen der Sagittalebene bzw. der Horizontalebene entsprechen, berechnet. Dadurch wurde die Richtungspersistenz in diesen beiden Ebenen getrennt beschrieben.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe von Herrn Professor Dr. Karl Schilling in R implementiert.

2.2.3 Patch-clamp-Ableitungen von Pax2-Zellen

Zu methodischen Details der Patch-clamp-Technik sei auf die weiterführende Literatur verwiesen (z. B. Sakmann und Neher, 1995; Numberger und Draguhn, 1996).

Für Patch-clamp-Ableitungen nutzten wir Messplätze, bei denen das Mikroskop mit Messkammer und Kamera sowie der Mikromanipulator mit Vorverstärker und der Patch-Pipette auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert waren. Der Tisch wurde durch einen umgebenden Faradaykäfig elektrisch abgeschirmt.

Für Patch-clamp-Ableitungen von Pax2-Zellen wurden parasagittale Pax2-GFP-Vermischnitte in einer Messkammer mit Nylonfäden, die zwischen einem U-förmigen Platindraht gespannt waren, fixiert. Die Schnitte wurden kontinuierlich mit oxygenierter Außenlösung umspült (Durchfluss je nach Experiment 1,2–3 ml/min). Der Zu- und Abfluss wurde entweder hydrostatisch mit Regulation über Klemmen oder über eine Peristaltikpumpe getrieben. In der Außenlösung befand sich eine Referenzelektrode. Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilikatglas mit einem Ziehgerät hergestellt. Für jede Messung wurde eine Patch-Pipette mit Innenlösung gefüllt, in die eine Messelektrode eingetaucht wurde. Alle Elektroden bestanden aus Silber/Silberchlorid und waren somit nicht polarisierend, sogenannte Elektroden zweiter Art. Um die Ablagerung von Gewebefragmenten an der Spitze der Patch-Pipette zu vermeiden, wurde vor Eintauchen der Patch-Pipette in die Außenlösung ein leichter Überdruck an die Patch-Pipette angelegt. Über Mikromanipulatoren gesteuert wurde die Patch-Pipette dann in die Außenlösung eingetaucht und unter mikroskopischer Orientierung einer ausgewählten Pax2-Zelle angenähert. Alle Patch-clamp-Ableitungen wurden an Pax2-Zellen des L IV durchgeführt. Zur Berechnung des aktuellen Widerstandes über das ohmsche Gesetz $R = U/I$ wurde ein 10 mV-Spannungssprung angelegt und die Stromamplitude abgelesen. Initial entsprach der Widerstand dem Pipettenwiderstand und betrug bei Nutzung der aufgeführten Innenlösungen 3–4,5 M Ω .

Als Patch-clamp-Verstärker diente, je nach Messplatz, ein EPC8, ein EPC9 oder ein EPC800. Die gemessenen Signale wurden mit 0,1–30 kHz abgetastet, mit 1–10 kHz gefiltert, mit einem ITC 16 oder LIH 1600 digitalisiert und mit der Software Tida (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Oszilloskop zur Beobachtung der Messkurven während der Aufnahmen verwendet. Sobald die Pipettenspitze dicht an der Zellmembran war, d. h. sobald eine leichte Eindellung der Zellmembran sichtbar war, wurde der Überdruck abgelassen und ein leichter Unterdruck angelegt. Zwischen Zellmembran und Pipettenspitze bildete sich daraufhin eine sehr

enge Verbindung mit einem Übergangswiderstand von mehreren Gigaohm aus. Man bezeichnet diese Konfiguration als „Cell-attached“-Konfiguration. Die Zellmembran wurde dann auf -70 mV geklemmt (zur Methode s. S. 44) und die Pipettenkapazität über den Verstärker kompensiert. Danach wurden zehn 10 mV-Spannungssprünge von -70 auf -60 mV (Dauer 50 ms) angelegt und die resultierenden Stromkurven gemittelt. Durch Anlegen eines kurzen Pulses stärkeren Unterdrucks wurde danach die Zellmembran unter der Pipettenspitze durchbrochen und damit elektrisch der Zugang zu der ganzen Zellmembran geschaffen. Man bezeichnet diese Konfiguration deshalb als „Ganzzellkonfiguration“ (Abbildung 6).

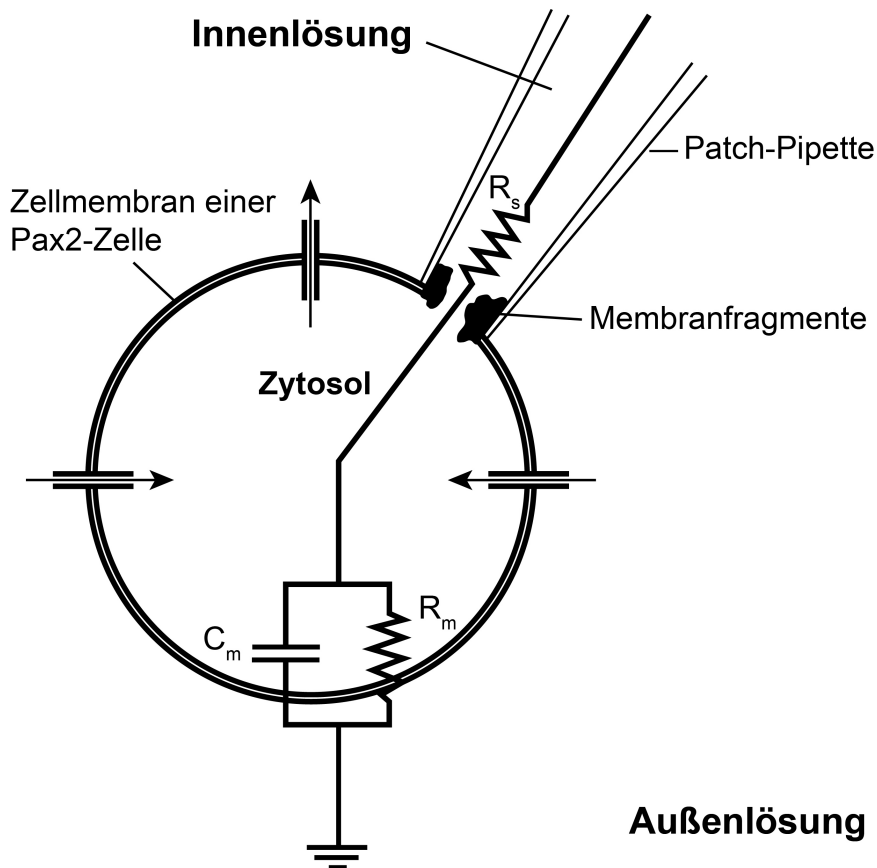


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Patch-clamp-Ableitung in der Ganzzellkonfiguration. Die Pfeile symbolisieren den Ionenfluss durch Ionenkanäle und Rezeptoren in der Zellmembran, das Schaltbild gibt vereinfacht Widerstände und Kapazitäten im Messkreis an. R_s : Serienwiderstand, R_m : Membranwiderstand der Zelle, C_m : Membrankapazität. Modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996.

Erneut wurden zehn 10 mV-Spannungssprünge von -70 auf -60 mV aufgenommen und die Stromkurven gemittelt. Die Depolarisation auf maximal -60 mV sollte eine Öffnung spannungsgesteuerter Ionenkanäle vermeiden. Die gemittelte Stromkurve vor Durchbrechen der Zellmembran wurde zur Eliminierung kapazitiver Pipettenströme von der danach subtrahiert. Aus der resultierenden Stromkurve konnten wir folgende passive Membranparameter mittels von Herrn PD Dr. Ronald Jabs geschriebener Makros in Igor Pro berechnen (Abb. 6 und 7):

1. Den Serienwiderstand R_s : Dieser ist ein Maß für die Güte des Zugangs zur Zelle. Er wird durch den Widerstand der Pipette sowie zusätzliche Widerstände durch Membranfragmente an der Pipettenöffnung und unterschiedliche Ionenbeweglichkeiten im Zytosol und der Innenlösung bestimmt. Im Idealfall ist R_s in etwa doppelt so groß wie der Widerstand der offenen Patchpipette (Pusch und Neher, 1988).
2. Den Membranwiderstand R_m der Zelle: Dieser nimmt während der Zellreifung häufig ab, da er von der Art und Dichte der geöffneten Ionenkanäle in Ruhe abhängt.
3. Die Membrankapazität C_m : Da die Zellmembran auch die Eigenschaften eines Kondensators hat, ist C_m proportional zur Fläche der Zellmembran und daher ein indirektes Maß für die Zellgröße.

Zunächst berechneten wir R_s (Abbildung 7). $I_{(t_0)}$ ist die maximale Stromamplitude zu Beginn des Testpulses (Zeitpunkt t_0). Der Widerstand von C_m ist zu diesem Zeitpunkt 0, da C_m noch nicht umgeladen wurde. Der gesamte Strom fließt daher über C_m , d. h. R_m wird kurzgeschlossen (vgl. Abb. 6). R_s ist der einzig wirksame ohmsche Widerstand im Schaltkreis. Daher kann R_s nach dem ohmschen Gesetz aus dem angelegten Spannungssprung $\Delta U = 10$ mV und dem Strom $I_{(t_0)}$ berechnet werden (Gleichung 4):

$$R_s \approx \Delta U / I_{(t_0)}. \quad (4)$$

Nach abgeschlossener Aufladung von C_m zum Zeitpunkt t_1 ist der Widerstand von C_m unendlich groß. Daher fließt der Strom $I_{(t_1)}$ nun ausschließlich über R_m . R_s und R_m sind in Serie geschaltet und der Gesamtwiderstand R beträgt nun $R = R_s + R_m$.

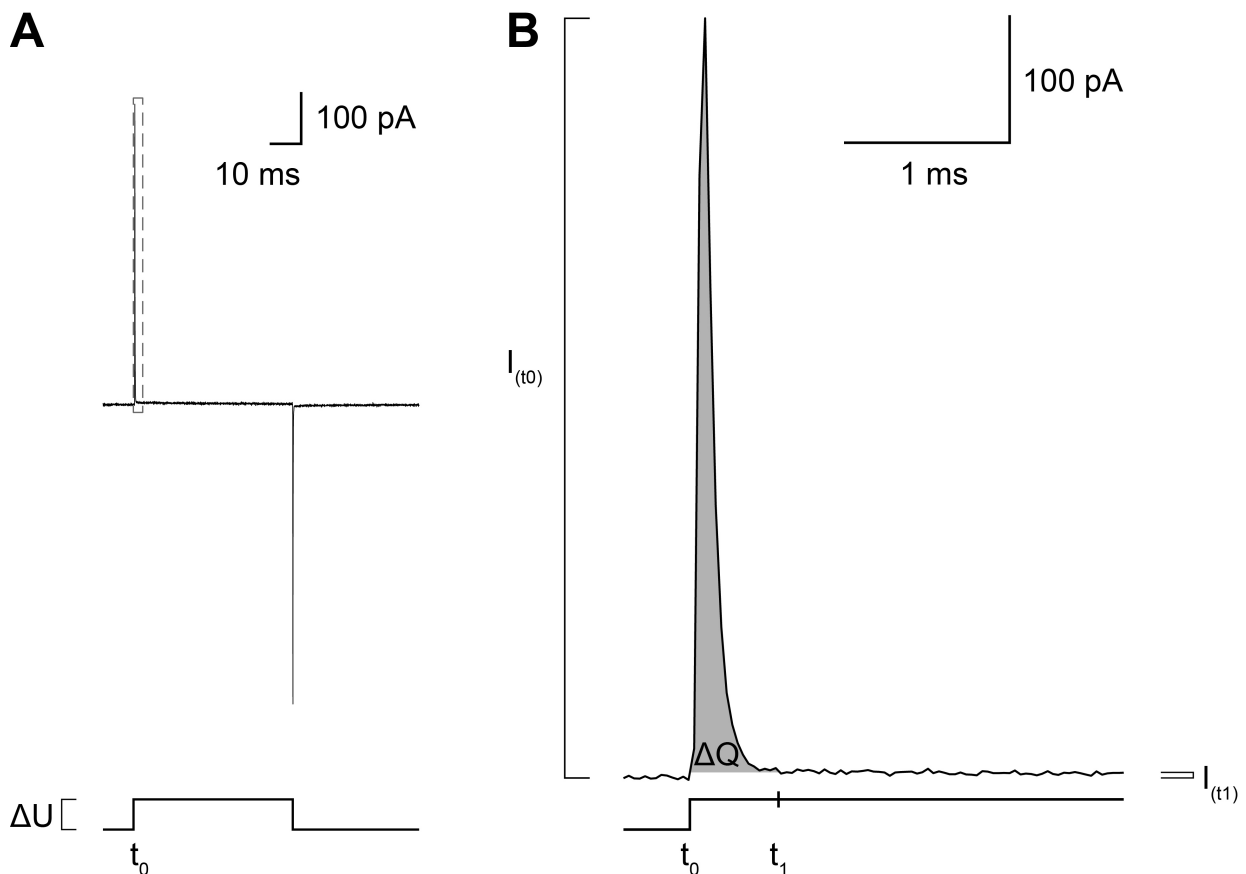


Abbildung 7: Bestimmung des R_s sowie der passiven Membranparameter R_m und C_m . (A) Unten: Voltage-clamp Protokoll zur Bestimmung von R_s , R_m und C_m mit $\Delta U = +10$ mV. Oben: Resultierender, aus zehn Aufnahmen gemittelter Strom einer Pax2-Zelle in der Ganzzellkonfiguration bei einem Haltepotential $U_h = -70$ mV. Die kapazitiven Pipettenströme wurden bereits subtrahiert. (B) Oben: Vergrößerte Darstellung des Stroms (Ausschnitt in (A) mit einem Kasten markiert) direkt nach Depolarisation (unten: Protokoll). Zum Zeitpunkt t_0 beginnt die Umladung der Zellmembran, die zu t_1 abgeschlossen ist (konstanter Haltestrom). Der R_s wird aus dem Strom zu t_0 berechnet (Gleichung 4), der R_m aus dem R_s sowie dem Strom zu t_1 (Gleichung 5), die C_m aus der Ladungsänderung ΔQ pro Spannungsänderung ΔU (Gleichung 8). Die Berechnung von C_m erfolgte aus dem Integral des kapazitiven Membranstroms bei der Repolarisation. Hier ist die Ladungsänderung (grau) am kapazitiven Membranstrom bei der Depolarisation illustriert (für Details s. Text). Für diese Pax2-Zelle betrug der R_s 17 M Ω , der $R_m > 1$ G Ω und die C_m 10 pF.

Wiederum nach dem ohmschen Gesetz berechneten wir R_m (Gleichung 5):

$$R_m + R_s = \Delta U / I_{(t_1)} \Leftrightarrow R_m = \Delta U / I_{(t_1)} - R_s . \quad (5)$$

Da die Ladungsänderung von C_m nach Anlegen eines definierten Spannungssprungs proportional zu letzterem ist, kann C_m wie folgt bestimmt werden:

$$C_m = \frac{\Delta Q}{\Delta U} . \quad (6)$$

Der Stromfluss zwischen t_0 und t_1 bei Anlegen von ΔU wird im einfachsten Fall durch eine Monoexponentialfunktion beschrieben (Gleichung 7):

$$I(t) = I e^{-\frac{t}{\tau}} + I_{(t_1)} . \quad (7)$$

Diese Gleichung gilt streng genommen jedoch nur für eine Kugel, bei der der Krümmungsradius gegenüber dem Durchmesser vernachlässigt werden kann. Die Ladungsänderung ΔQ des Kondensators C_m kann jedoch exakt für jede Geometrie durch numerische Integration des kapazitiven Artefakts berechnet werden (graue Fläche in Abb. 7B). C_m ergibt sich daher allgemein aus Gleichung 8:

$$C_m = \frac{\Delta Q}{\Delta U} = \frac{1}{\Delta U} \left(\int_{t_0}^{t_1} I(t) dt - \int_{t_0}^{t_1} I_{(t_1)} dt \right) . \quad (8)$$

Zur Berechnung von C_m wurde das zweite „Umladeartefakt“ bei der Repolarisation benutzt. Dieses hat den Vorteil, dass hierbei die Aktivierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle noch unwahrscheinlicher als bei dem depolarisierenden Spannungssprung ist.

In der Ganzzellkonfiguration waren zwei Arten von Messungen möglich: die Messung des Stromflusses über die Zellmembran im Voltage-clamp-Modus oder die Messung von an der Zellmembran anliegenden Spannungen im Current-clamp-Modus.

Im Voltage-clamp-Modus (Spannungsklemme) wurde ein gewünschtes Haltepotential U_h an die Zellmembran angelegt. Bei Abweichen des tatsächlichen Membranpotentials U_m von U_h wurde U_h durch Strominjektion in die Zelle erzwungen. Die hierfür notwendigen Kompensationsströme entsprechen dem invertierten Stromfluss über die Zellmembran

bei U_h . Per Definition werden in den Graphen Auswärtsströme ausgehend von der Grundlinie in positiver Richtung dargestellt, Einwärtsströme in negativer Richtung.

Im Current-clamp-Modus (Stromklemme) wurde hingegen die an der Zellmembran anliegende Spannung bei konstantem Stromfluss durch die Pipette gemessen. In einigen Fällen wurden Messungen in Kombination beider Konfigurationen durchgeführt. Dabei handelte es sich um den sogenannten „low-frequency-voltage-clamp“-Modus“. Hierbei wird die Zelle mit einer sehr niedrigen Frequenz von maximal 1 Hz kurzfristig im Voltage-clamp auf ein gewünschtes Membranpotential gebracht. Danach wird das Membranpotential U_m der Zelle im Current-clamp gemessen. Diese Technik ist sinnvoll, wenn das Ruhemembranpotential der Zelle zu depolarisiert ist, um z. B. diverse spannungsgesteuerte Ionenkanäle zu öffnen. In dieser Arbeit wurde diese Ableittechnik für die Analyse von Aktionspotentialen benutzt. Alle Current-clamp-Aufnahmen wurden mit einem DPA 2F-Verstärker nachverstärkt. Das Ruhemembranpotential U_r wurde direkt nach Durchbrechen der Zellmembran im Current-clamp-Modus ausgelesen.

2.2.3.1 Identifizierung spannungsgesteuerter Kalium- und Natriumkanäle

Alle Messungen zur Identifizierung spannungsgesteuerter Kalium- und Natriumkanäle wurden in ACSF für RT mit Innenlösung 1 durchgeführt (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.1.2, S. 58). Zur Ermittlung des Ganzzell-Strommusters wurden die Pax2-Zellen, ausgehend jeweils von -70 mV, in 10 mV-Schritten für je 50 ms auf Werte zwischen -160 und $+20$ mV hyper- bzw. depolarisiert (Abbildung 11A, S. 59). Zur Unterscheidung zwischen Subtypen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle sowie spannungsgesteuerten Natriumkanälen wurden Protokolle mit konditionierenden Vorpulsen verwendet. Diese wurden mit und ohne Tetrodotoxin (TTX), einem Antagonisten spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Chen und Chung, 2014), aufgenommen. Hierzu wurden Pax2-Zellen jeweils vor den eigentlichen Testpulsen für 287 ms auf -110 mV oder -10 mV geklemmt. Von diesen konditionierenden Vorpulsen aus erfolgten, ähnlich dem vorher beschriebenen Protokoll, Spannungssprünge in 10 mV-Intervallen auf Werte zwischen -160 und $+70$ mV. Die Auswertung wurde wie folgt durchgeführt: Signale in der Gegenwart von TTX nach konditionierenden Vorpulsen auf -10 mV entstammen vorwiegend verzögert gleichrichtenden Kaliumkanälen:

Verzögert gleichrichtender Kaliumstrom \approx Strom_{Vorpulsprotokoll -10 mV mit TTX}.

A-Typ-Kaliumkanäle sind hingegen bei diesem Potential inaktiviert. Somit erhält man durch A-Typ-Kaliumkanäle vermittelte Ströme durch Subtraktion eines Protokolls mit einem konditionierenden Vorpuls auf -10 mV (A-Typ-Kaliumkanäle inaktiviert, Vorpuls-unabhängige spannungsgesteuerte Kanäle aktiv) von einem Protokoll mit einem konditionierenden Vorpuls auf -110 mV (A-Typ-Kaliumkanäle aktivierbar; Stromfluss durch A-Typ- und Vorpuls-unabhängige spannungsgesteuerte Kanäle; Hille, 2001):

$$\text{A-Typ-Kaliumstrom} = (\text{Strom}_{\text{Vorpulsprotokoll -110 mV mit TTX}}) - (\text{Strom}_{\text{Vorpulsprotokoll -10 mV mit TTX}}).$$

Durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle vermittelte Ströme ergeben sich durch Subtraktion eines Protokolls mit konditionierenden Vorpulsen auf -110 mV mit TTX von demselben Protokoll ohne TTX (alle spannungsgesteuerten Natriumkanäle aktivierbar; Ulbricht, 2005):

$$\text{Spannungsgesteuerter Natriumstrom} = (\text{Strom}_{\text{Vorpulsprotokoll -110 mV}}) - (\text{Strom}_{\text{Vorpulsprotokoll -110 mV mit TTX}}).$$

Die Strom-Spannungs-Kennlinien wurden zum Zeitpunkt der maximalen Stromamplitude erstellt. Für die A-Typ-Kaliumkanäle sowie die spannungsgesteuerten Natriumkanäle wurden hierfür die maximalen Stromamplituden ermittelt. Für den verzögert gleichrichtenden Kaliumkanal erfolgte die Messung der Stromamplituden während des konstanten Stromflusses 45 ms nach Anlegen der Spannungssprünge.

Zellmembranen haben eine spezifische Kapazität C_{ms} von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, entsprechend $0,01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ (Sakmann und Neher, 1995). Die Dichte des spannungsgesteuerten Natriumstroms \vec{J}_{Na} wurde daher berechnet als

$$\vec{J}_{\text{Na}} = \frac{I_{\text{maxNa}}}{\frac{C_m}{C_{ms}}}. \quad (9)$$

2.2.3.2 Nachweis von Aktionspotentialen

Um zu untersuchen, ob Pax2-Zellen spontan Aktionspotentiale generieren, wurden Pax2-Zellen im Current-clamp-Modus beobachtet (ACSF für RT, Innenlösungen 1 und 3; vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.1.3, S. 60).

Weiterhin wurde untersucht, ob Pax2-Zellen bei Depolarisation durch Strominjektion Aktionspotentiale generieren können. Hierzu wurden die Pax2-Zellen initial auf -70 mV hyperpolarisiert, um eine definierte Ausgangssituation zu schaffen. Dies geschah entweder im low-frequency-voltage-clamp-Modus (EPC 800, 1 Hz) oder manuell durch Nutzung des Offsetstroms (EPC 7 und 8). Daraufhin wurde zehnmal für je 50 ms Strom von $0-72$ pA in Schritten von 8 pA injiziert. Die resultierenden Spannungskurven wurden im Current-clamp-Modus gemessen.

2.2.3.3 Nachweis und Charakterisierung ionotroper GABA_A- und AMPA-Rezeptoren

Die Expression von GABA_A- sowie α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) wurde in der HEPES-gepufferten Lösung untersucht (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.1.4, S. 61). Diese enthielt BaCl₂ zur Blockierung von Kaliumkanälen, 4-Aminopyridin zur Blockierung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle, CdCl₂ zur Blockierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle, TTX zur Blockierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle und DL-APV oder D-APV zur Blockierung von NMDA-Rezeptoren. Es wurden die Innenlösungen 2 und 4 verwendet. Zur Untersuchung von GABA_A-Rezeptoren enthielt die Außenlösung zudem NBQX oder CNQX, um AMPA-Rezeptoren zu blockieren. Während NBQX relativ spezifisch AMPA-Rezeptoren blockiert, ist CNQX zudem ein Kainat (KA)-Rezeptorantagonist (Traynelis et al., 2010). Zur Untersuchung von AMPA-Rezeptoren wurden der Außenlösung Bicucullin oder Picrotoxin, d. h. ein kompetitiver GABA_A- bzw. ein nicht-kompetitiver GABA_{A/C}-Rezeptorantagonist (Bormann, 2000), hinzugegeben.

Die Rezeptoren wurden durch Einwaschen spezifischer Rezeptoragonisten in 5 ml der HEPES-gepufferten Lösung über das Bad stimuliert. Als Rezeptoragonisten zur Stimulation von GABA_A-Rezeptoren wurden GABA oder Muscimol verwendet (Bormann, 2000). Für AMPA-Rezeptoren diente KA als Rezeptoragonist (Traynelis et al., 2010).

Das Haltepotential wurde in 20 mV-Schritten zwischen -100 und +40 mV variiert (je 100 ms Dauer). Zwischen diesen Schritten kehrt das Haltepotential jeweils für 100 ms auf -70 mV zurück (Abbildung 13A, S. 63, eingefügtes Quadrat). Dieses Protokoll wurde alle 4,5 s wiederholt. Dazwischen blieb das Membranpotential bei -70 mV.

Im Anschluss wurden die Liganden-aktivierten Ströme durch spezifische Rezeptorantagonisten blockiert. Die Rezeptorantagonisten wurden hierbei erst in 7 ml Lösung alleine und dann in 5 ml Lösung mit Rezeptoragonisten eingewaschen. Hierdurch wurde eine Sättigung der Rezeptorbindungsstellen mit Rezeptorantagonisten vor Einwaschen der Agonisten erreicht. Als Rezeptorantagonisten wurden Bicucullin oder Picrotoxin bzw. NBQX oder CNQX eingesetzt.

Zur Berechnung der Leitfähigkeit („slope conductance“) wurde die Strom-Spannungskennlinie linear gefittet. Das Umkehrpotential wurde aus dieser Kurvenanpassung interpoliert.

2.2.3.4 Messung postsynaptischer Ströme

Postsynaptische Ströme (PSCs) wurden in ACSF für RT aufgenommen (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.2, S. 64). Je nach Messung wurde die Innenlösung 1, 3 oder 4 verwendet (letztere v. a. für Messungen bei depolarisiertem Haltepotential). Die Daten wurden mit MiniAnalysis 6 (Synaptosoft Inc., Fort Lee, New Jersey, USA) oder PClamp 10 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA) und Igor Pro 6 (Wavemetrics Inc., Portland, Oregon, USA) mit von Herrn PD Dr. Ronald Jabs und mir geschriebenen Makros analysiert. PSCs mit Amplituden kleiner als die zweifache Amplitude des Hintergrundrauschens wurden verworfen. Die Anstiegszeiten der PSCs wurden zwischen den Zeitpunkten bei Erreichen von 20 % und 80 % der Amplitude berechnet (20 %-80 %-Anstiegskonstante). Die Abfallzeiten wurden als Zerfallszeiten einer mono-exponentiell gefitteten Exponentialfunktion bestimmt. Eine gute Möglichkeit, PSC-Frequenzen in schwach innervierten Zellen zu vergleichen, ist die Berechnung der Momentanfrequenzen. Diese Frequenzen wurden aus den Zeitintervallen zwischen je zwei aufeinanderfolgenden PSCs berechnet.

2.2.3.5 Auswaschen des zytosolischen GFPs während der Patch-clamp-Ableitungen

Wir wollten sicherstellen, dass die erhobenen elektrophysiologischen Daten tatsächlich von Pax2-Zellen stammten, und nicht von fälschlicherweise gepatchten benachbarten GFP-negativen Zellen. Hierzu nutzten wir die Tatsache, dass in der Ganzzellkonfiguration das Zytosol durch die Innenlösung ausgetauscht wird. Bei Pax2-Zellen kommt es dabei auch zu einem Verlust des zytosolischen GFPs. Um dies zu dokumentieren, wurden die Morphologie und der GFP-Gehalt der Pax2-Zellen i) direkt vor der Patch-clamp-Ableitung, ii) in der cell-attached-Konfiguration und iii) am Ende der elektrophysiologischen Ableitung verifiziert und je nach Messplatz ggf. fotografisch dokumentiert. Das Auswaschen des GFPs während der Patch-clamp-Messungen belegte dabei eindeutig, dass wir tatsächlich die ausgewählten Pax2-Zellen abgeleitet hatten.

2.2.4 Immunhistochemie

Alle Inkubationen für die Immunhistochemie wurden in PBS- bzw. TBS (für Antikörperfärbungen gegen Calbindin bzw. Synaptophysin) vorgenommen. Die Darstellung von Purkinjezellen erfolgte mit einem Primärantikörper gegen Calbindin (1:4000). Zum lichtmikroskopischen Nachweis von Synapsen färbten wir cerebelläre Schnitte mit einem Antikörper gegen Synaptophysin, ein für synaptische Vesikel spezifisches Protein (Jahn et al., 1985; Verdünnung 1:500, Ikin et al., 1996; vgl. Ergebnisse Abschnitte 3.1.1, S. 51, und 3.2.1, S. 64).

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 50 µm dicke parasagittale Pax2-GFP-Schnitte aus dem Vermis des Cerebellums mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Schnitte mit 0,5 % Triton X-100 in gepufferter Salzlösung für 30 min permeabilisiert. Anschließend wurden sie für 1 h mit 2 % Ziegenerum in gepufferter Salzlösung inkubiert. Danach wurden sie über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper in gepufferter Salzlösung mit 0,5 % Triton X-100 inkubiert. Die Schnitte wurden dann bei der Calbindin-Färbung erneut über Nacht bei 4°C mit einem Biotin-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (1:200) inkubiert. Anschließend erfolgte eine dreistündige Inkubation mit Streptavidin-Cy3 (1:300) bei RT. Für die

Synaptophysin-Färbung folgte hingegen eine Inkubation mit einem Alexa-546-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:500) für 2 h bei RT.

Konfokale Bilder wurden mit einem Leica TCS SP2-System (Anregung 488/543 nm; Pinhole 1 airy) angefertigt.

2.2.5 Statistik

Die durchgeführten statistischen Tests sind im Ergebnisteil genannt. Werte sind als Mittelwert plus Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben, falls nicht anders vermerkt. Mit Ausnahme einzelner mit MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) durchgeführter Tests wurden die Tests mit Igor Pro 6 (Wavemetrics Inc., Portland, Oregon, USA) oder R (R Development Core Team, 2011) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Pax2-Zellen sind unreife neuronale Zellen

3.1.1 Pax2-Zellen migrieren

Zunächst wollten wir die Beobachtung der Migration von Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone des Cerebellums in akuten Schnitten etablieren. Wie einführend bereits beschrieben (Abschnitte 1.3.3.1 und 2.1.4), exprimieren diese Vorläuferzellen nach ihrer letzten Mitose in der WM das Paired-box-Protein Pax2 (Maricich und Herrup, 1999; Weisheit et al., 2006). Wir verwendeten deshalb für unsere funktionellen Untersuchungen akute Schnitte aus dem Vermis von P7–9 Pax2-GFP-Mäusen. Diese Mäuse exprimieren GFP vom Pax2-Locus (Pfeffer et al., 2002), so dass Pax2-positive Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz intravital identifiziert werden können (Weisheit et al., 2006). Die Schnitte wurden in sagittaler Richtung angefertigt, da die Interneuron-Vorläuferzellen im cerebellären Cortex weitgehend in dieser Ebene migrieren.

Zwischen P7–9 differenzieren sich die Pax2-positiven Interneuron-Vorläuferzellen fast ausschließlich in Korb-/Sternzellen (Zhang und Goldman, 1996; Leto et al., 2006; Leto et al., 2009). Abbildung 8A zeigt einen Vermischnitt einer acht Tage alten Pax2-GFP-Maus. Zur Abgrenzung der corticalen Schichten wurden die Purkinjezellen mit einem Antikörper gegen das Calcium-bindende Protein Calbindin (Barski et al., 2003) rot gegengefärbt. Bei höherer Vergrößerung sieht man zahlreiche kleine GFP-positive Interneuron-Vorläuferzellen (Abb. 8B). Sie sind meist bipolar mit einem führenden Filopodien-tragenden und einem nachfolgenden Fortsatz, die vom Soma abgehen (Abbildung 9A). Diese Zellen, deren Entwicklung wir in unserer Studie näher untersucht haben, werde ich nachfolgend als „Pax2-Zellen“ bezeichnen. Ihre Morphologie unterscheidet sie eindeutig von den großen stationären Golgi-Zellen der IGL, die stark verzweigte Neuriten haben und ebenfalls Pax2 exprimieren (Weisheit et al., 2006; Abb. 8B).

Wir beobachteten die Migration von Pax2-Zellen zunächst mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops mit einer xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie (s. Material und Methoden (M&M)-S. 32). Ziel war die Etablierung dieser Methode für eine spätere Kombination mit Patch-clamp-Experimenten (s. S. 68). Wir selektierten einzelne Pax2-Zellen, die sich

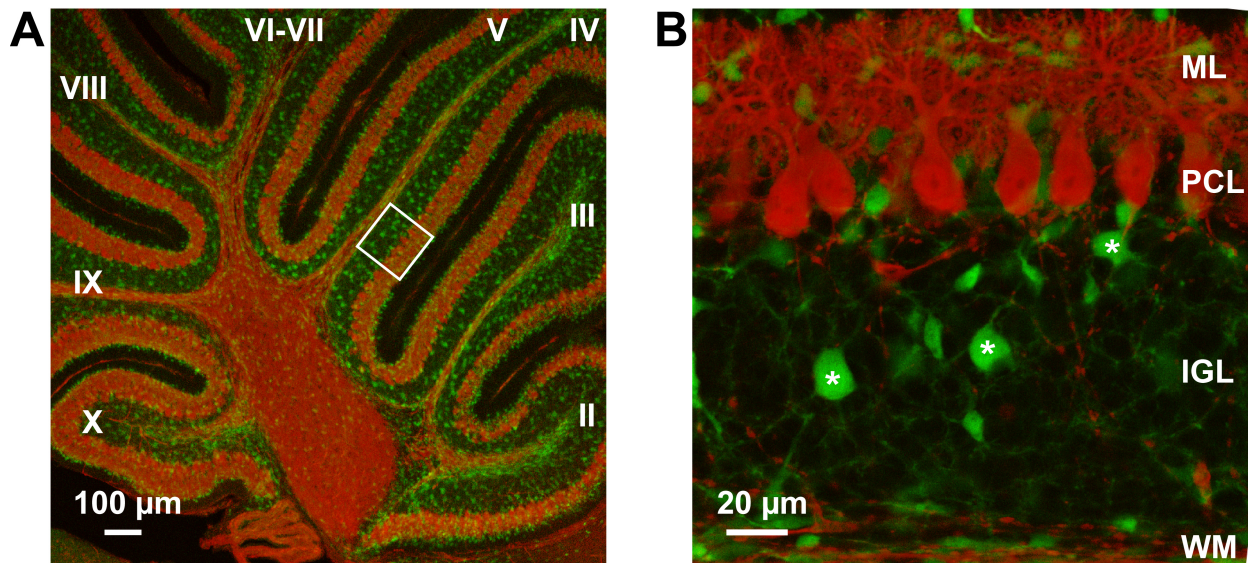


Abbildung 8: Pax2-Zellen in einem parasagittalen Vermischnitt einer P8 Pax2-GFP-Maus. Das grün fluoreszierende Protein GFP markiert Pax2-exprimierende Zellen, die rote Calbindin-Antikörperfärbung Purkinjezellen. **(A)** Sagittalschnitt aus dem cerebellären Vermis. Die römischen Ziffern numerieren die Lobuli. Das Quadrat symbolisiert die Vergrößerung (**(B)**, anderer Schnitt). **(B)** Die Vergrößerung aus L IV zeigt kleine GFP-positive, meist bipolare Pax2-Zellen, die aus der WM (unten) in den cerebellären Cortex (oben) einwandern. Die großen GFP-positiven Zellen in der IGL sind stationäre Golgi-Zellen (*).

bewegten, und hielten sie manuell in der Fokusebene. Wie für andere neuronale Vorläuferzellen beschrieben (Marín et al., 2006), verformte sich das Soma während der Migration entlang des führenden Fortsatzes typischerweise von einer eher runden Form über ein Ellipsoid zurück zu einer eher runden Form (Abb. 9B). Die letzte Verformung fiel mit einer schnellen Vorwärtsbewegung zusammen.

Auch eine Migrationsbeobachtung über mehrere Stunden ist mit dieser Methode möglich, wie Abbildung 9C exemplarisch für eine Zelle illustriert. In rot ist die Trajektorie einer typischen migrierenden Pax2-Zelle eingezeichnet. Diese Pax2-Zelle migrierte in ≈ 3 h von der Mitte der IGL (gezeigtes Standbild) bis zur Grenze der ML zur EGL und weiter entlang dieser Grenze (gesamte Beobachtungsdauer 4:20 h). Der Schwerpunkt dieser Zelle bewegte sich phasenweise kaum vorwärts, sondern oszillierte auf der Stelle (Abb. 9D).

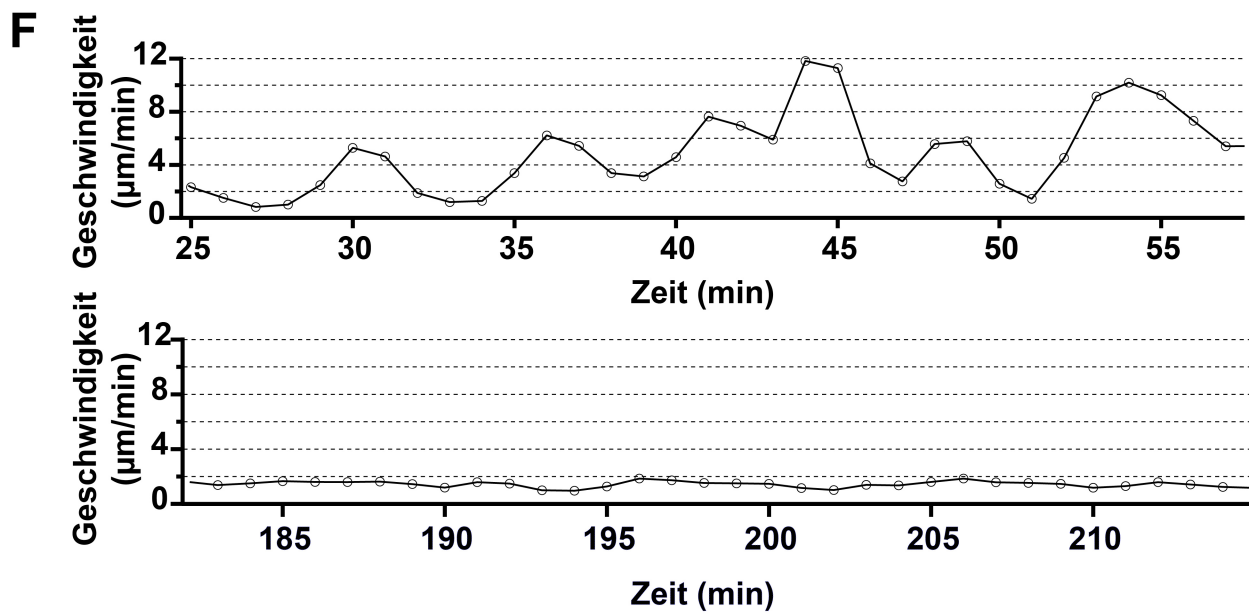
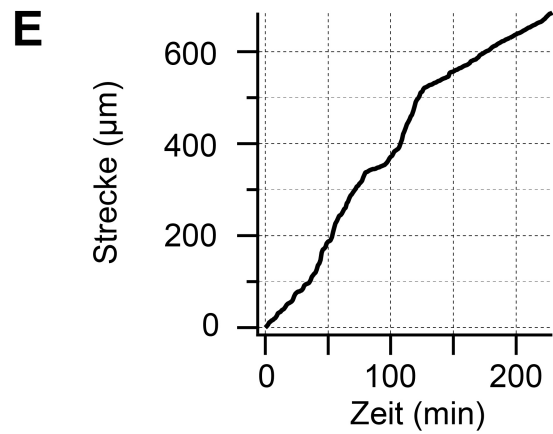
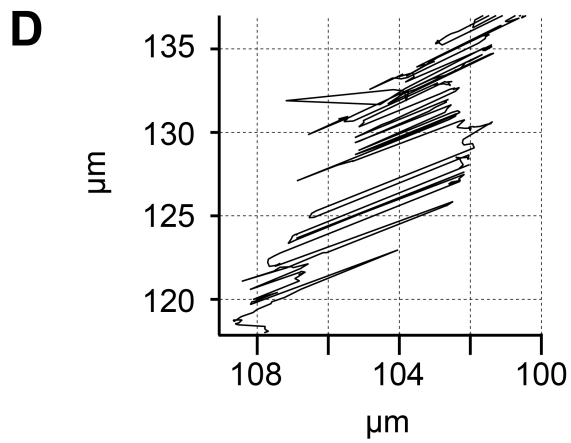
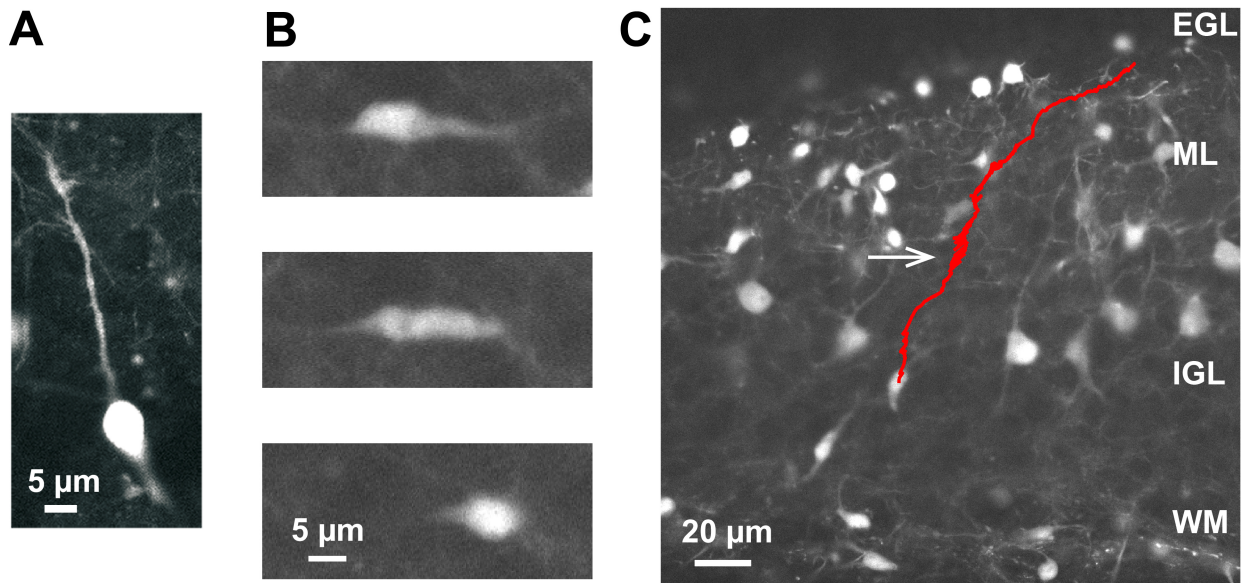


Abbildung 9 (vorherige Seite): Pax2-Zellen migrieren in akuten Schnitten weite Distanzen. Konfokale xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie. **(A)** Migrierende Pax2-Zelle (konfokale Ebene, $d \approx 4,5 \mu\text{m}$). Von dem runden Soma geht nach oben der führende Fortsatz mit endständigen Filopodien ab. Nach unten ist der dem Soma nachfolgende Fortsatz angeschnitten. **(B)** Typische Formveränderungen des Somas einer Pax2-Zelle während der Migration. **(C)** Trajektorie einer Pax2-Zelle (rot; dargestellte Beobachtungsdauer 4 h). **(D)** Vergrößerter Abschnitt der Trajektorie (Pfeil in **(C)**). **(E)** Zurückgelegte Strecke über die Zeit. **(F)** Geschwindigkeitsprofile der Pax2-Zelle in der IGL (oben) und der äußeren ML (unten).

Durch diese Oszillationen und die nicht ganz geradlinige Migration war die Trajektorie deutlich länger als die effektiv gewanderte Distanz (Abb. 9E; Trajektorie ca. $600 \mu\text{m}$ versus Distanz $160 \mu\text{m}$; für die Definition der Distanz s. S. 38). Abbildung 9F dokumentiert die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten in verschiedenen Regionen des Cortex und deren zeitliche Änderung. Die Geschwindigkeit variierte sowohl bei der Wanderung durch die IGL als auch durch die äußere ML ausgeprägt phasisch. Während der Migration in der äußeren ML war sie allerdings deutlich niedriger als in der IGL.

Diese orientierenden Untersuchungen zeigen, dass Pax2-Zellen in akuten Schnitten des früh postnatalen Cerebellums über weite Strecken migrieren, und dass sich die xyt-Zeitraffer-Aufnahmen zur Selektion migrierender Pax2-Zellen für Patch-clamp-Experimente gut eignen. Da sich in unseren Aufnahmen gegen Ende der Beobachtungszeit immer noch Pax2-Zellen schnell bewegten, kann eine ausgeprägt cytotoxische Wirkung des Laserlichtes weitgehend ausgeschlossen werden. Unser Modellsystem kann daher Daten zur Dynamik dieser Migration liefern.

Für eine quantitative Analyse der Migration vieler Pax2-Zellen, die für eine andere Experimentreihe benötigt wurde, sind die so erhobenen Daten hingegen nicht geeignet. Da Zellen grundsätzlich auch in der z-Ebene wandern und diese bei dem oben beschriebenen Vorgehen nur für je eine Zelle manuell angepasst werden kann, erlaubt die xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie nur die Beobachtung einer Zelle pro Schnitt. Die Untersuchung einer ausreichenden Zahl von Pax2-Zellen wäre mit dieser Methode daher extrem zeitaufwendig gewesen und hätte u. a. sehr vieler Versuchstiere bedurft.

Die xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie ist weiterhin sehr stark von der kontinuierlichen Aufmerksamkeit des Experimentators abhängig, da exakt manuell nachfokussiert werden muss. Das ist für eine größere Zellzahl und Beobachtungszeiträume von mindestens 30 min weder sinnvoll noch praktikabel.

Zur exakteren Quantifizierung der Pax2-Zellmigration für andere Fragestellungen (s. S. 70) etablierten wir deshalb ein Protokoll für eine xyzt-Zeitraffer-Videomikroskopie mit 2P-Anregung an akuten Vermischnitten. Hierbei konnten wir die Migration vieler Pax2-Zellen gleichzeitig quantifizieren (s. M&M S. 35).

Zudem war die räumliche Auflösung dieser Messmethode genauer als die der xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie, da nun zusätzlich auch Bewegungen entlang der z-Achse in die Tiefe des Schnitts erfasst wurden. Abbildung 10A zeigt exemplarisch die Migration einer Pax2-Zelle über 30 min in z-Maximum-Intensitäts-Projektionen von xyz-Bildstapeln. Diese waren in fünfminütigen Abständen aufgenommen worden. Das Soma verformte sich auch hier während der Migration entlang des führenden Fortsatzes von rund zu oval (t_0-t_5). In der z-Projektion ist dies aufgrund der gegenüber dem Soma geringeren Fluoreszenzintensität des führenden Fortsatzes nur zu erahnen. Der führende Fortsatz teilte sich nachfolgend in zwei Fortsätze auf. Nach 25 min hatte das Soma diesen Teilungspunkt erreicht und nahm nachfolgend wieder eine rundliche Form an. Die Zelle bewegte sich, wie mit dem blauen Quadrat indiziert, über die 30 min kontinuierlich vorwärts. Der Index für die Geradlinigkeit (s. S. 38) von 0,82 bestätigt den visuellen Eindruck, dass die Zelle sich relativ geradlinig fortbewegte.

Die Abbildungen 10B und 10C illustrieren, dass die Beobachtung von Pax2-Zellen mittels xyzt-2P-Zeitraffer-Videomikroskopie auch über längere Zeiträume möglich ist. Sie zeigen exemplarisch die Trajektorien von zwei Pax2-Zellen, die über 4 h verfolgt wurden (insgesamt 154 über 4 h beobachtete corticale Pax2-Zellen). Die in Abbildung 10B dargestellte Pax2-Zelle legte in dieser Zeit eine Distanz von 19,3 μm bei einer Geradlinigkeit von 0,33 zurück. Sie änderte zwischenzeitlich die Migrationsrichtung, indem sie den ursprünglichen führenden Fortsatz zurückzog und einen neuen führenden Fortsatz an anderer Position ausstreckte (Trajektorienabschnitt in Abb. 10B durch Pfeil

markiert). Sie migrierte vorwiegend in der yz-Ebene, was *in situ* recht genau der Frontalebene entspricht.

Abbildung 10C zeigt die Positionen und Trajektorie der Pax2-Zelle mit der längsten in 4 h zurückgelegten Distanz (63 μm bei einer Geradlinigkeit von 0,45). Diese Pax2-Zelle migrierte vorwiegend in der xy-Ebene, was *in situ* recht genau der Sagittalebene entspricht. Die variierenden Abstände der roten Kreise in den linken Darstellungen lassen erahnen, dass die Geschwindigkeit der Pax2-Zellen teils stark variierte.

Abbildung 10D stellt die Geschwindigkeiten von 294 Pax2-Zellen über je 30 min dar. Auch hier ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit für einzelne Pax2-Zellen sehr stark über die Zeit variierte. Zudem bewegten sich manche Pax2-Zellen über die gesamten 30 min eher langsam (rot-orange Quadrate), andere hingegen schnell (grün-blaue Quadrate).

Zusammen dokumentieren diese Befunde, dass sich die xyz-2P-Zeittraffer-Videomikroskopie zur Quantifizierung der Migration von Pax2-Zellen eignet. Sie ermöglicht die simultane Verfolgung zahlreicher Pax2-Zellen und die Quantifizierung der Zellbewegung in allen drei Raumrichtungen. Die Daten ermöglichen zudem die Korrektur systemischer Driftbewegungen auf reproduzierbare und konsistente Weise. Darüber hinaus sollte die im Vergleich zur konventionellen konfokalen Mikroskopie deutlich fokussiertere Anregung der Fluorophore, gerade bei den langen Beobachtungszeiten, eventuelle licht-toxische Schädigungen der Pax2-Zellen nochmals deutlich reduzieren. Auch die xyz-2P-Zeittraffer-Videomikroskopie werde ich später wieder aufgreifen und die Ergebnisse von Quantifizierungen darstellen (s. S. 70).

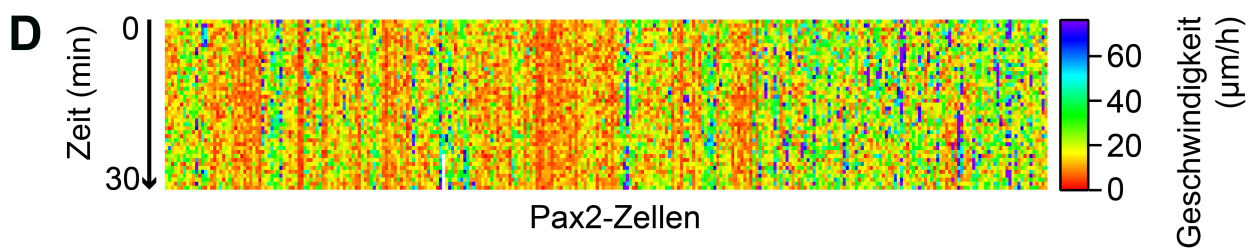
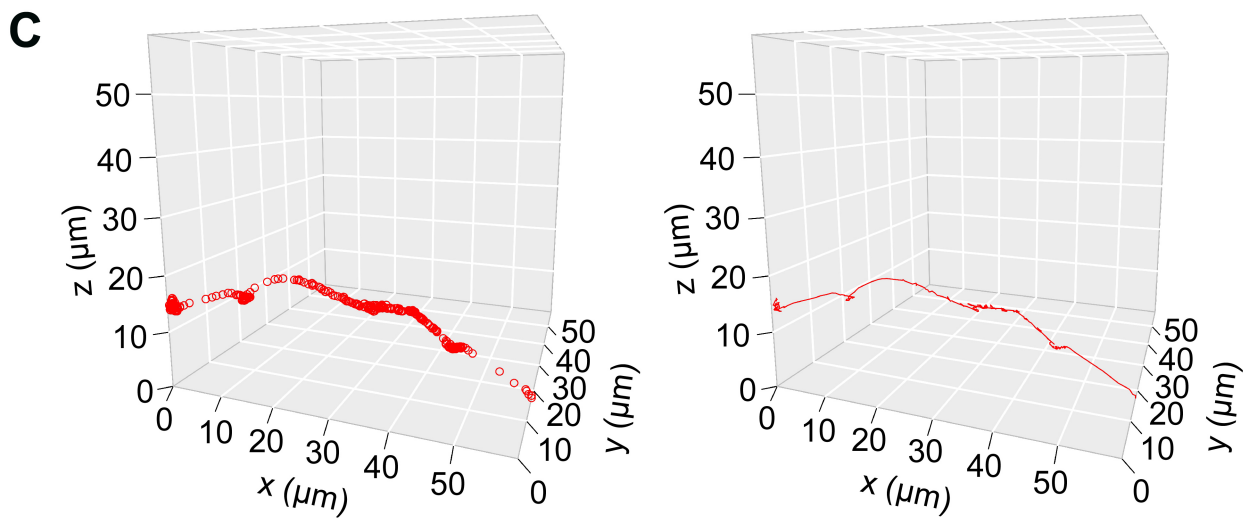
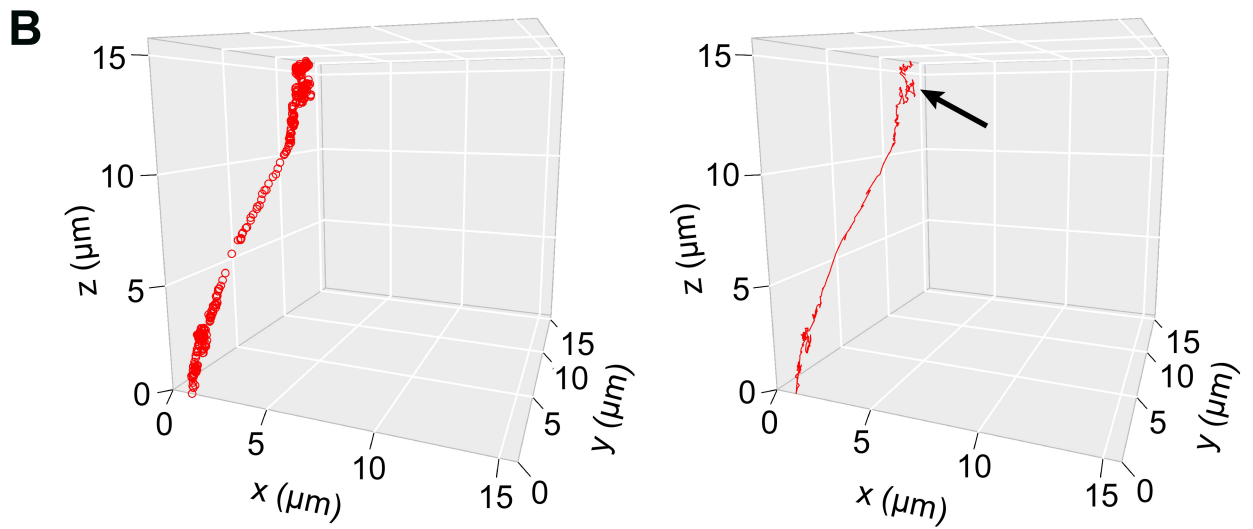
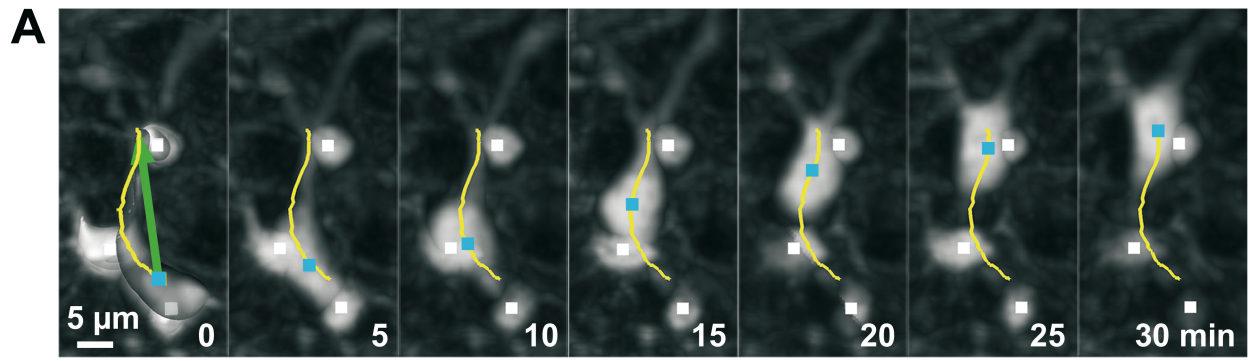


Abbildung 10 (vorherige Seite): Quantifizierung der Migration von Pax2-Zellen. xyz-2P-Zeitraffer- Videomikroskopie. **(A)** z-Maximum-Intensitäts-Projektionen sieben ausgewählter Bildstapel, die im Abstand von 5 min aufgenommen worden waren. Die Projektionen zeigen eine Pax2-Zelle, die über 30 min durch die IGL einer acht Tage alten Maus migriert. Die gelbe Trajektorie dieser Pax2-Zelle misst $22,6 \mu\text{m}$ (blaue Quadrate: Zellschwerpunkt). Der grüne Pfeil zu t_0 illustriert die von der Zelle zurückgelegte Distanz ($18,5 \mu\text{m}$). Die Zelle wird von drei stationären Pax2-Zellen umgeben (weiße Quadrate: Zell-Schwerpunkte). Die für die Quantifizierung erstellten Iso-Oberflächen sind exemplarisch zu Zeitpunkt t_0 grau dargestellt. **(B, C)** Pseudo-3D-Darstellung von Trajektorien von zwei Pax2-Zellen, die über 4 h beobachtet wurden. Die roten Kreise in der linken Darstellung zeigen die Zellschwerpunkte zu den Beobachtungszeitpunkten, rechts sind die Trajektorien dargestellt. Die Skalierung wurde jeweils der Migrationsdistanz angepasst. Der Pfeil in **(B)** weist auf eine Richtungsänderung hin. **(D)** Geschwindigkeiten von 294 Pax2-Zellen. Jede Spalte zeigt die Geschwindigkeiten einer Pax2-Zelle über die Zeit, jede Zeile entspricht dabei einem Aufnahmeintervall von $\approx 41,8 \text{ s}$ (Gesamtdauer 30 min). Rechts: Farbkodierung der Geschwindigkeiten. Geschwindigkeitswerte oberhalb der 99,7-Perzentile wurden dargestellt, aber für die Generierung der Farbskala nicht berücksichtigt.

3.1.2 Pax2-Zellen sind elektrophysiologisch unreife neuronale Zellen, die spannungsgesteuerte Kaliumkanäle vom A- und DR-Typ sowie spannungsgesteuerte Natriumkanäle exprimieren

Als nächstes charakterisierten wir die Pax2-Zellen mittels der Patch-clamp-Technik. Zunächst ermittelten wir die passiven Membranparameter. Pax2-Zellen hatten einen hohen Eingangswiderstand ($R_m > 1 \text{ G}\Omega$ bei 170 von 176 Pax2-Zellen). Zudem wies die geringe Membrankapazität C_m von $9,4 \pm 0,4 \text{ pF}$ auf eine vergleichsweise geringe Zellgröße hin. Dies ist konsistent mit dem visuellen Eindruck.

Wir ermittelten für jede elektrophysiologisch gemessene Pax2-Zelle im Voltage-clamp-Modus das Gesamtstrommuster, das eine Art „elektrophysiologischer Fingerabdruck“ der spannungsgesteuerten Kanäle ist. Dabei interessierte uns primär, ob Pax2-Zellen spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumkanäle exprimieren. Abbildung 11B zeigt exemplarisch das Gesamtstrommuster einer Pax2-Zelle. Sichtbar sind initiale Einwärtsströme mit schneller Kinetik, denen Auswärtsströme folgen. Um herauszufinden, welche spannungsgesteuerten Ionenkanäle zu diesem Gesamtstrommuster beitragen, nutzten wir konditionierende Vorpulse (s. M&M S. 45; $n = 3$ Pax2-Zellen). Hierdurch konnten wir die Auswärtsströme Kaliumkanälen vom A-Typ (Abb. 11C) sowie vom verzögert gleichrichtenden Typ („delayed-rectifier“ (DR); Abb.

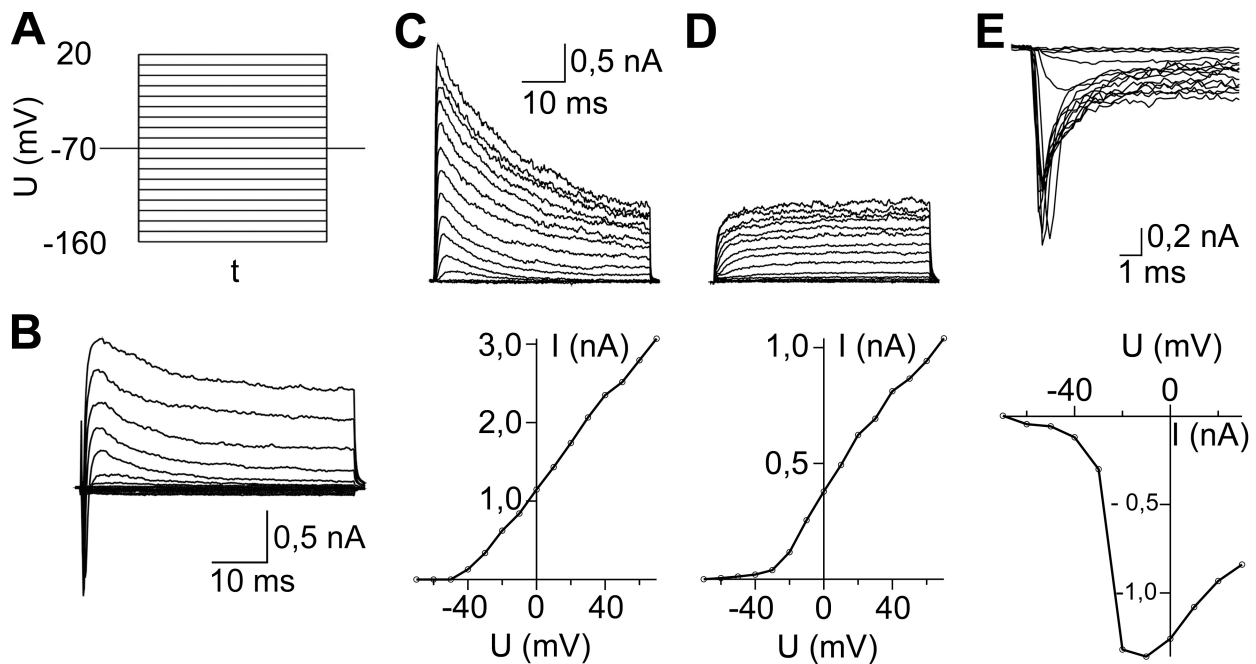


Abbildung 11: Pax2-Zellen exprimieren spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumkanäle. (A) Stimulationsprotokoll zu B. Die Zellen wurden in 10 mV-Schritten für je 50 ms auf Werte zwischen -160 und $+20$ mV hyper- bzw. depolarisiert. (B) Repräsentatives Gesamtstrommuster einer Pax2-Zelle einer P8 Maus ($R_m > 1$ G Ω , $C_m = 10$ pF). (C–E) Oben: Ströme durch spannungsgesteuerte A-Typ (C) und verzögert gleichrichtende Kaliumkanäle (D) sowie spannungsgesteuerte Natriumkanäle (E). Unten: Zugehörige charakteristische Strom-Spannungs-Kennlinien.

11D) zuordnen (Gutman et al., 2005). Die unter den Stromkurven dargestellten Strom-Spannungs-Kennlinien sind typisch für diese spannungsgesteuerten Ionenkanäle (Hille, 2001). Durch Subtraktion von Messungen ohne und mit TTX ($1 \mu\text{M}$), einem Antagonisten spannungsgesteuerter Natriumkanäle, zeigte sich, dass die schnellen Einwärtsströme durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle vermittelt wurden (Abb. 11E). Die Dichte des Natriumstroms lag mit $0,7 \pm 0,1 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ deutlich unter dem für reife Korb-/Sternzellen ermittelten Wert von $30 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ (Southan und Robertson, 1998).

Dieses Gesamtstrommuster aus spannungsgesteuerten Kalium- und Natriumströmen ist somit typisch für unreife neuronale Zellen.

3.1.3 Pax2-Zellen können keine reifen Aktionspotentiale generieren

Die Fähigkeit zur Generierung von Aktionspotentialen ist ein Charakteristikum reifer Neurone (Carleton et al., 2003; Doischer et al., 2008). Zudem ist sie für die Weitergabe eingehender Signale an nachgeschaltete Neurone essentiell. Daher interessierte uns, ob Pax2-Zellen Aktionspotentiale generieren können. Zunächst untersuchten wir im Current-clamp-Modus, ob Pax2-Zellen bei ihrem intrinsischen Membranpotential spontan Aktionspotentiale generieren. Dies geschah nie ($n = 11$; WM: $n = 3$, IGL: $n = 3$, ML: $n = 5$). Daraufhin untersuchten wir, ob Pax2-Zellen bei Injektion depolarisierender Ströme, ausgehend von einem Membranpotential von -70 mV, Aktionspotentiale generieren (s. M&M S. 47). Unter diesen für Aktionspotentiale optimalen Messbedingungen zeigte keine Pax2-Zelle Aktionspotentiale ($n = 25$; WM: $n = 7$, IGL: $n = 8$, ML: $n = 10$).

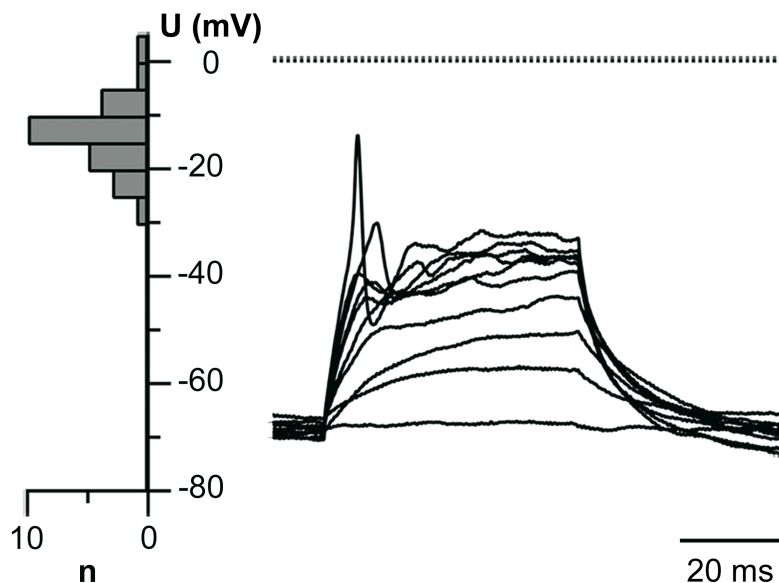


Abbildung 12: Pax2-Zellen generieren nach Injektion depolarisierender Ströme "Spikelets", aber keine reifen Aktionspotentiale. Rechts sind exemplarisch die Spannungs-Kurven einer Pax2-Zelle gezeigt. Das Histogramm links dokumentiert die Verteilung der Spannungs-Maxima der Spikelets von 25 Pax2-Zellen (gestrichelte Linie: 0 mV).

Bei starker Depolarisation generierten Pax2-Zellen lediglich sogenannte Spikelets, unreife Aktionspotentiale mit geringer Amplitude. Das absolute Spannungsmaximum der Spikelets lag bei +1 mV, der Mittelwert bei $-13,8 \pm 1,2$ mV (Abbildung 12). Im Gegensatz zu diesen Spikelets hätte ein reifes Aktionspotential zu einer Depolarisation deutlich über 0 mV geführt.

Zusammenfassend ist auch die Generierung von Spikelets anstelle reifer Aktionspotentiale konsistent damit, dass Pax2-Zellen neuronale Vorläuferzellen sind.

3.1.4 Pax2-Zellen exprimieren ionotrope GABA_A- und AMPA-Rezeptoren

Als nächstes fragten wir, ob Pax2-Zellen ionotrope Liganden-aktivierte Ionenkanäle exprimieren. Es ist bekannt, dass Liganden-aktivierte Ionenkanäle die Motilität migrierender neuronaler Vorläuferzellen beeinflussen können (Übersichten bei Spitzer, 2006; Evsyukova et al., 2013). Zudem ist diese Frage besonders relevant, weil die Expression Liganden-aktivierter Ionenkanäle bzw. metabotroper Rezeptoren eine Grundvoraussetzung für das Empfangen synaptischer Signale ist.

Im adulten Cerebellum sind GABA und Glutamat in Summe der exprimierten Rezeptoren funktionell die vorherrschenden hemmenden bzw. erregenden Neurotransmitter. Zudem werden reife Korb-/Sternzellen sowohl GABAerg durch andere Korb-/Sternzellen als auch glutamaterg durch Parallelfasern der Körnerzellen innerviert (Liu, 2013; Schilling, 2013). Wir fokussierten uns deshalb auf die Frage, ob Pax2-Zellen ionotrope GABA_A- und AMPA-Rezeptoren exprimieren. AMPA-Rezeptoren sind eine Subgruppe ionotroper Glutamat-Rezeptoren (Traynelis et al., 2010).

Zur Identifizierung von GABA_A-Rezeptoren auf Pax2-Zellen wurden GABA (100 µM) oder der GABA_A-Rezeptoragonist Muscimol (300 µM) über das Bad eingewaschen (s. M&M S. 47). Wie bei der in Abbildung 13A–D exemplarisch gezeigten Pax2-Zelle induzierten GABA bzw. Muscimol bei einem Haltepotential von -70 mV in allen getesteten Pax2-Zellen Einwärtsströme (Stromdichten $0,03 \pm 0,01$ pA/µm², $n = 14$ bzw. $0,1 \pm 0,01$ pA/µm², $n = 13$ für GABA bzw. Muscimol). Die Einwärtsströme wurden durch den GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (100 µM) im Mittel um 85 % blockiert (auf $0,001 \pm 0,001$ pA/µm², $n = 4$ bzw. $0,02 \pm 0,01$ pA/µm², $n = 4$). Dies erlaubt ihre eindeutige Klassifikation als GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme. Das aus der Strom-

Spannungs-Kennlinie interpolierte Umkehrpotential lag zum Zeitpunkt der maximalen Rezeptoraktivierung für Muscimol-induzierte-Ströme bei -40 ± 2 mV ($n = 12$). Angesichts der Ionenzusammensetzung der bei diesen Messungen verwendeten Lösungen handelt es sich daher konsistenterweise um einen Cl^- -vermittelten Strom.

Die Identifizierung und Charakterisierung von AMPA-Rezeptoren auf Pax2-Zellen ist in Abbildung 13E–H dargestellt. Der AMPA/KA-Rezeptoragonist KA ($300 \mu\text{M}$) induzierte in allen getesteten Pax2-Zellen einen Stromfluss. KA-induzierte Einwärtsströme waren in Pax2-Zellen der ML signifikant größer als in der WM ($U_h = -70$ mV; Stromdichte ML: $0,95 \pm 0,13$ pA/ μm^2 , $n = 14$; WM: $0,3 \pm 0,06$ pA/ μm^2 , $n = 14$; $p < 0,001$ für WM vs. ML, Mann-Whitney-Test). NBQX ($10\text{--}20 \mu\text{M}$), ein AMPA-Rezeptorantagonist, blockierte die Ströme vollständig ($n = 8$). Demnach handelt es sich um AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme. Das Umkehrpotential von $3,4 \pm 1,2$ mV ($n = 27$) identifiziert diese Ströme als unspezifische Kationenströme und spricht ebenfalls für diese Schlussfolgerung.

AMPA-Rezeptoren sind Tetramere, die aus den Subeinheiten GluA1–GluA4 zusammengesetzt werden. Die Untereinheiten existieren in zwei Splice-Varianten, die als Flip- und Flop-Variante bezeichnet werden (Traynelis et al., 2010). CTZ potenziert die Flip-Varianten von GluA1, 3 und 4 stärker als die entsprechenden Flop-Varianten (Partin et al., 1993). Bei AMPA-Rezeptorheteromeren potenziert CTZ die Ströme je nach Rezeptorzusammensetzung unterschiedlich stark (Traynelis et al., 2010; Cotton und Partin, 2000). Cyclothiazid ($100 \mu\text{M}$) potenzierte die KA-induzierten Ströme in Pax2-Zellen der WM signifikant (um 86 ± 13 % bei -70 mV, $n = 12$, $p < 0,01$, Wilcoxon-Test), nicht hingegen in Pax2-Zellen der ML (15 ± 6 %, $n = 9$, $p = 0,25$).

Zusammenfassend belegen diese Befunde, dass Pax2-Zellen ionotrope GABA_A - und AMPA-Rezeptoren besitzen. Die AMPA-Rezeptoren ändern ihre Charakteristika, nachdem Pax2-Zellen die WM verlassen haben.

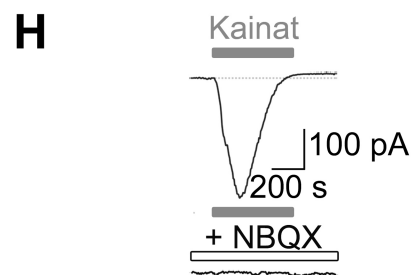
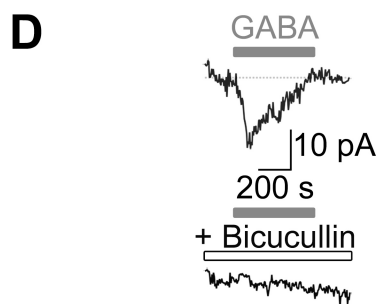
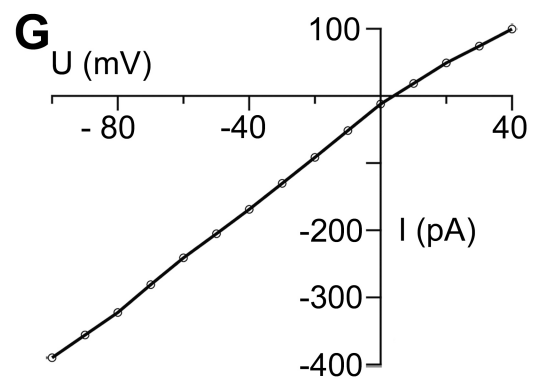
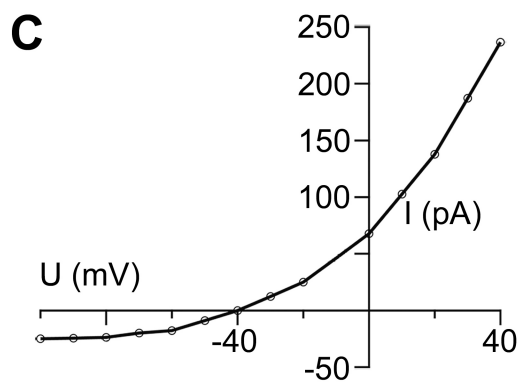
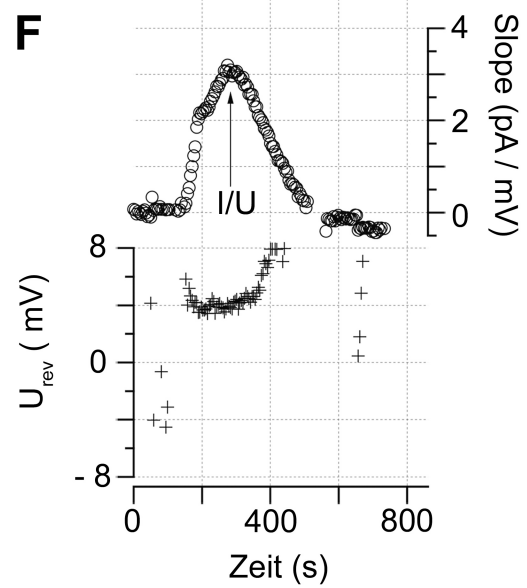
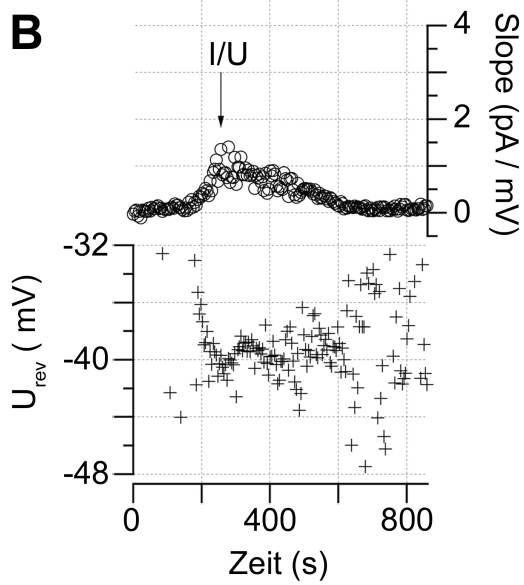
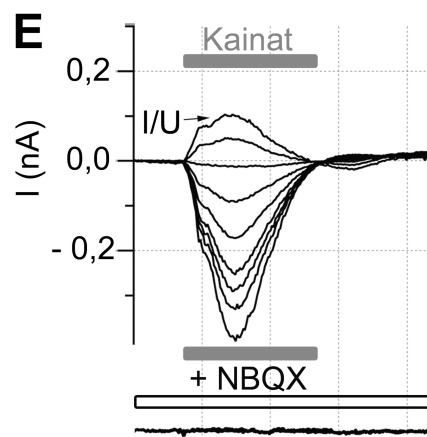
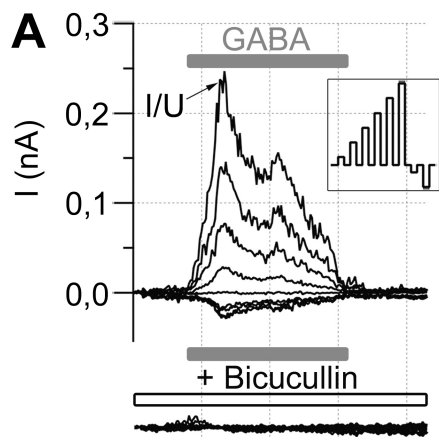


Abbildung 13 (vorherige Seite): Pax2-Zellen exprimieren GABA_A-Rezeptoren und AMPA-Rezeptoren.

(**A**) oben: Zeitverlauf GABA- (100 μ M) induzierter Ströme. Das eingefügte Quadrat zeigt das Stimulationsprotokoll (De- bzw. Hyperpolarisation in 20 mV-Schritten zwischen -100 und $+40$ mV für je 100 ms, dazwischen jeweils Rückkehr des Haltepotentials für 100 ms auf -70 mV). Unten: Ko-Applikation von Bicucullin (100 μ M) blockierte die GABA-induzierten Ströme vollständig. (**E**) oben: Zeitverlauf KA- (300 μ M) induzierter Ströme (Stimulationsprotokoll wie in (**A**)). Unten: Die Ströme wurden durch NBQX (10 μ M) vollständig blockiert.

(**B** und **F**) Zeitverlauf der Leitfähigkeiten (oben, Kreise) und Umkehrpotentiale U_{rev} (unten, Kreuze) für GABA- (**B**) und KA- (**F**) induzierte Ströme.

(**C** und **G**) Strom-Spannungs-Kennlinien für GABA-induzierte Ströme (Umkehrpotential -40 mV) und KA-induzierte Ströme (Umkehrpotential 4 mV) zum Zeitpunkt der maximalen Rezeptoraktivierung (aus (**A**) bzw. (**E**); s. Pfeile).

(**D**) Zeitverlauf des GABA-induzierten Stroms bei -70 mV (oben) mit Bicucullin-Block (unten).

(**H**) Zeitverlauf des KA-induzierten Stroms bei -70 mV (oben) mit NBQX-Block (unten).

3.2 Migrierende Pax2-Zellen sind synaptisch innerviert

3.2.1 Pax2-Zellen sind synaptisch GABAerg und glutamaterg innerviert

Die Expression von GABA_A- und AMPA-Rezeptoren durch Pax2-Zellen führt zu der Frage, welche entwicklungsbiologische Funktion(en) diese Rezeptoren haben: Werden Pax2-Zellen während ihrer Migration GABAerg und glutamaterg stimuliert, sei es durch Diffusion von Neurotransmittern benachbarter Synapsen oder sogar direkte synaptische Innervation?

Zunächst fragten wir, ob sich morphologische Hinweise für eine synaptische Innervation von Pax2-Zellen finden lassen. Orientierende immunhistochemische Färbungen von cerebellären Schnitten acht Tage alter Pax2-GFP-Mäuse gegen das vesikuläre Glykoprotein Synaptophysin (Kwon und Chapman, 2011) zeigten im gesamten Cortex zahlreiche stark Synaptophysin-positive, granuläre Signale (Abbildung 14). Diese stellen vermutlich präsynaptische Terminale dar. Die Dichte dieser Synaptophysin-positiven Strukturen nahm zur ML hin zu. Pax2-Zellen schienen oft in engen Kontakt mit Synaptophysin-positiven präsynaptischen Terminalen zu kommen.

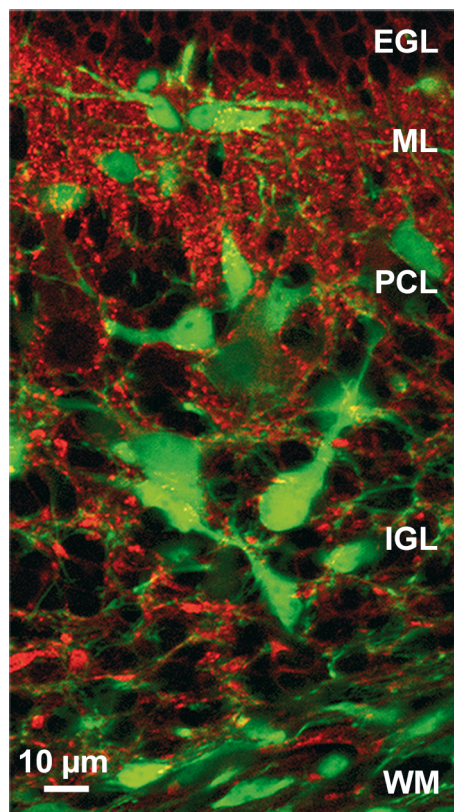


Abbildung 14: Pax2-Zellen kommen während der Migration durch den cerebellären Cortex in engen Kontakt zu präsynaptischen Terminalen. Synaptophysin-positive Strukturen (rot) liegen im ganzen cerebellären Cortex nah an Pax2-Zellen (grün; L IX, P8).

Da Pax2-Zellen unreife migrierende neuronale Vorläuferzellen sind, erschien uns eine direkte synaptische Innervation trotz ihres engen Kontakts zu präsynaptischen Terminalen unwahrscheinlich. Um experimentell zu klären, ob Pax2-Zellen synaptisch innerviert sind, untersuchten wir sie auf die Ableitbarkeit postsynaptischer Ströme (PSCs). Diese gelten als elektrophysiologische Korrelate synaptischer Innervation. Zum Nachweis spontaner postsynaptischer Ströme (sPSCs) in Pax2-Zellen selektierten wir randomisiert kleine, stark GFP-positive Pax2-Zellen der WM, der IGL und der ML für Patch-clamp-Ableitungen. Unerwarteterweise waren in der ML 15 von 17 und in der IGL 5 von 6 Pax2-Zellen nachweislich innerviert, hingegen 0 von 11 untersuchten Pax2-Zellen in der WM (Abbildung 15). Bei den innervierten corticalen Pax2-Zellen ließen sich zwei Arten von sPSCs unterscheiden (Abb. 15A–G). Die einen hatten eine schnelle

Abfallkonstante $\tau \approx 1$ ms (Abb. 15B und 15G oben). Die anderen hatten eine langsamere Abfallkonstante $\tau \approx 12$ ms (Abb. 15C und 15G unten). Um zu klären, welche Transmitter die gemessenen sPSCs hervorrufen, applizierten wir nacheinander Antagonisten ionotroper GABA_A- und Glutamat-Rezeptoren. Bicucullin (10 μ M) blockierte die langsam abfallenden sPSCs. Diese wurden demzufolge über GABA_A-Rezeptoren vermittelt (Abb. 15D; IGL: $n = 5$ Pax2-Zellen, ML: $n = 10$). Die Kinetik der verbleibenden, schnell abfallenden sPSCs (Abb. 15E) ähnelte der der zuvor gemessenen sPSCs mit schneller Abfallkonstante. Die schnell abfallenden sPSCs wurden durch NBQX und D(L)-APV blockiert (Abb. 15F; IGL: $n = 5$ Pax2-Zellen, ML: $n = 9$). Sie wurden daher über ionotrope Glutamat-Rezeptoren vermittelt. Beide Arten von sPSCs waren nach Auswaschen der Antagonisten erneut zu beobachten (Daten nicht gezeigt, $n = 4$).

Um die gemessenen sPSCs noch mit einer anderen Methode zu klassifizieren, identifizierten wir anhand der Umkehrpotentiale die ihnen zu Grunde liegenden Ionenströme. Dazu wurden die Ionenkonzentrationen der Innen- und Außenlösung so gewählt, dass das Umkehrpotential für Cl⁻-vermittelte Ströme -40 mV und das Umkehrpotential für unspezifische Kationenströme 0 mV betrug. Wir analysierten dann von Pax2-Zellen abgeleitete sPSCs bei Haltepotentialen von -80 mV, -40 mV, 0 mV und $+40$ mV (Abb. 15H).

sPSCs mit langsamem Abfall manifestierten sich bei -80 mV als Einwärtsströme, fehlten bei dem Chlorid-Umkehrpotential von -40 mV und waren bei positiveren Spannungen als Auswärtsströme messbar. Folglich werden die langsam abfallenden sPSCs durch Chlorid-Ionen vermittelt. Dies passt gut mit der pharmakologischen Identifizierung als GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme zusammen.

Die Amplituden der einwärts gerichteten sPSCs mit schnellem Abfall waren bei -40 mV kleiner als bei -80 mV. Sie waren bei 0 mV nicht messbar, und kehrten bei positiven Haltepotentialen in Auswärtsströme um. Demzufolge sind diese Ströme unspezifische Kationenströme. Dies ist mit der pharmakologischen Charakterisierung als AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme kongruent ($n = 2$, beide ML).

Die Zeitkonstanten der Anstiegs- und Abfallzeiten langsam und schnell abfallender sPSCs ähnelten den zuvor gemessenen Werten.

Zusammenfassend zeigen die elektrophysiologischen Befunde, dass corticale Pax2-Zellen direkte GABAerge und glutamaterge synaptische Signale über GABA_A- und AMPA-Rezeptoren erhalten.

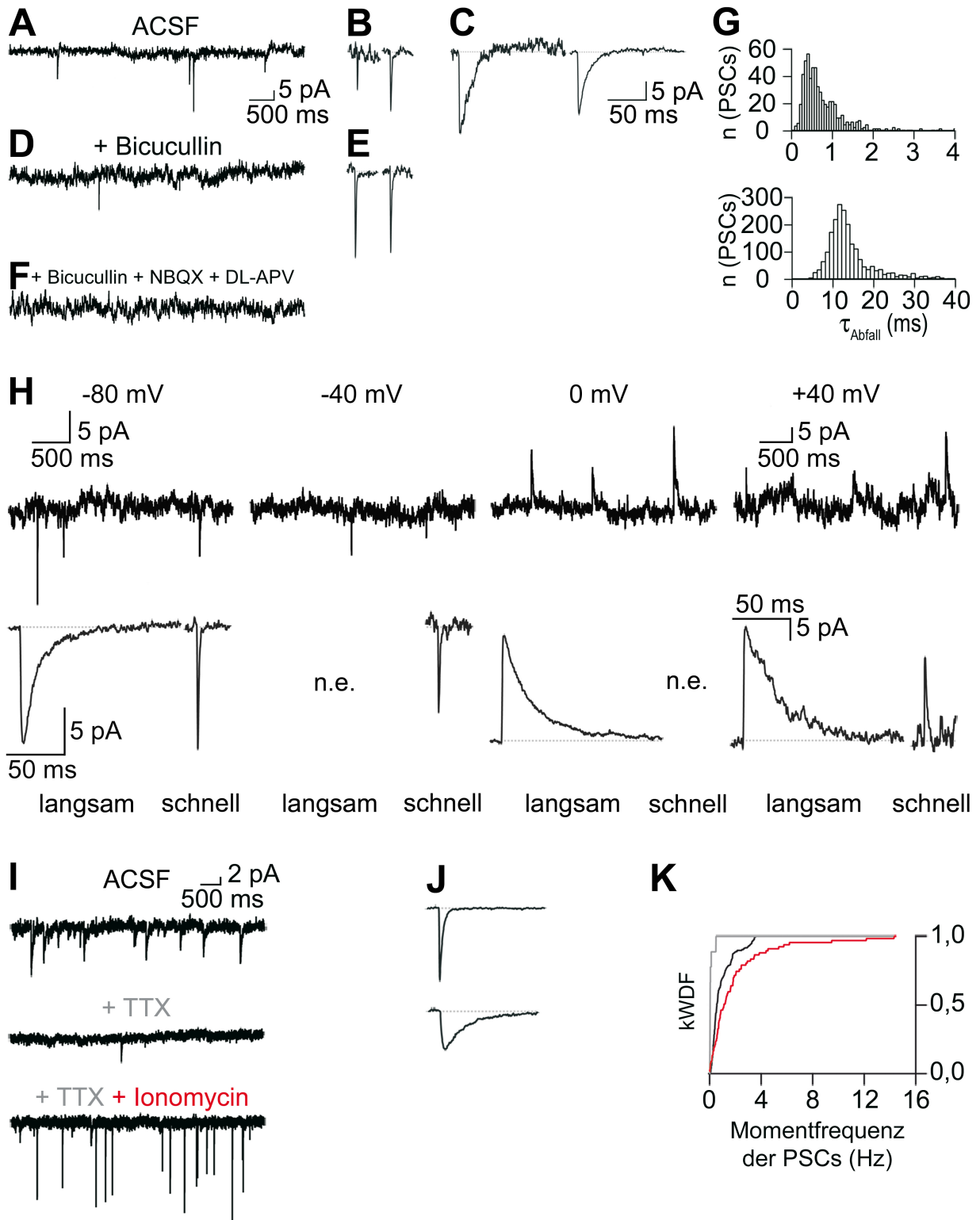


Abbildung 15 (vorherige Seite): Migrierende Pax2-Zellen sind synaptisch GABAerg und glutamaterg innerviert. (A) Voltage-clamp Ableitung einer Pax2-Zelle in der mittleren ML ($U_h = -80$ mV). Die schnellen Einwärtsströme entsprechen sPSCs. Manche weisen einen schnellen Strom-Abfall auf ($\tau \approx 1$ ms; (B)), andere einen langsamen Strom-Abfall ($\tau \approx 12$ ms; (C)). (B) Links repräsentatives schnell abfallendes sPSC aus (A): 0,3 ms Anstieg, 0,6 ms Abfall, Amplitude 11 pA; rechts gemittelte sPSCs: 0,7 ms Anstieg, 1,5 ms Abfall, 17 pA, $n = 4$. (C) Links repräsentatives langsam abfallendes sPSC aus (A): 0,7 ms Anstieg, 19,4 ms Abfall, 23 pA; rechts gemittelte sPSCs: 0,9 ms Anstieg, 12,1 ms Abfall, Amplitude 23 pA, $n = 20$. (D) Bicucullin (10 μ M) blockierte die langsam abfallenden sPSCs, nicht hingegen die sPSCs mit schnellem Strom-Abfall. (E) Links repräsentatives schnell abfallendes sPSC aus (D): 0,6 ms Anstieg, 0,7 ms Abfall, 26 pA; rechts gemittelte sPSCs: 0,6 ms Anstieg, 1,4 ms Abfall, 23 pA, $n = 9$. (F) DL-APV (50 μ M) plus NBQX (10 μ M) blockierten die schnell abfallenden sPSCs. (G) Histogramm der Abfall-Zeiten für schnelle (oben, $n = 490$ sPSCs von 43 Pax2-Zellen) und langsame (unten, $n = 1915$ von 31 Pax2-Zellen) sPSCs. (H) Oben: Ströme gemessen bei -80 mV, -40 mV, 0 mV und $+40$ mV. Unten: Zugehörige gemittelte sPSCs mit langsamem (links) bzw. schnellem (rechts) Strom-Abfall (n. e.: nicht existierend). Charakteristika der sPSCs: -80 mV: langsame sPSCs Anstieg 1,0 ms, Abfall 11,1 ms, Amplitude 12 pA, $n = 21$, schnelle sPSCs Anstieg 0,6 ms, Abfall 1,0 ms, Amplitude 13 pA, $n = 13$; -40 mV: schnelle sPSCs Anstieg 0,3 ms, Abfall 1,5 ms, Amplitude 9 pA, $n = 3$; 0 mV: langsame sPSCs Anstieg 0,6 ms, Abfall 22,0 ms, Amplitude 11 pA, $n = 46$; $+40$ mV: langsame sPSCs Anstieg 0,6 ms, Abfall 31 ms, Amplitude 26 pA, $n = 5$, schnelles sPSC Anstieg 0,3 ms, Abfall 2,2 ms, Amplitude 19 pA. (I) Oben: Voltage-clamp-Ableitung ($U_h = -80$ mV) einer Pax2-Zelle, die unmittelbar vorher migriert war. Mitte: Strom in Anwesenheit von TTX (1 μ M). Unten: Strom in Anwesenheit von TTX und Ionomycin (3 μ M). (J) Gemittelte schnelle (oben) und langsame (unten) mPSCs in Anwesenheit von TTX plus Ionomycin (schnelle mPSCs: 0,5 ms Anstieg, 2,6 ms Abfall, Amplitude 13 pA, $n = 72$; langsame mPSCs: 1,6 ms Anstieg, 17 ms Abfall, 6 pA, $n = 22$). (K) Kumulative Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (kWDF) der Momentanfrequenzen der PSCs. Schwarz: Momentanfrequenzen in ACSF, grau: mit TTX, rot: mit TTX + Ionomycin (aus (I)). Werte oberhalb der 95. Perzentile sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Skalierungsbalken in (A) auch für (D) und (F); in (C) auch für (B), (E) und (J).

3.2.2 Pax2-Zellen sind während ihrer Migration synaptisch innerviert

Die zuletzt erläuterten Befunde belegen, dass zufällig ausgewählte, in der IGL oder der entstehenden ML des Cerebellums liegende Pax2-Zellen synaptisch innerviert sind. Diese Zellen haben ihre endgültigen Positionen in der ML noch nicht erreicht (siehe z. B. Weisheit et al., 2006). Dies legt den Schluss nahe, dass die Vorläuferzellen von

Korb-/Sternzellen des Cerebellums schon während ihrer Migration synaptisch innerviert werden.

Um dies experimentell zu überprüfen, führten wir eine weitere Serie von Experimenten durch. Wir wollten konkret zeigen, dass migrierende Pax2-Zellen während der Bewegung synaptisch innerviert sind. Mit Hilfe der konfokalen xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie (vgl. Ergebnisse S. 51 sowie M&M S. 32) dokumentierten wir zunächst die Migration individueller Pax2-Zellen. Exakt dieselben individuellen, nachweislich migrierenden Pax2-Zellen wurden unmittelbar im Anschluss mit der Patch-clamp-Technik auf synaptische Innervation untersucht. Insgesamt wurden 35 Pax2-Zellen, die in 9 min bis 3 h Beobachtungsdauer zwischen 2,8 und 42,6 μm (Median der Distanz 11,2 μm) gewandert waren, elektrophysiologisch abgeleitet. In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 3.2.1 dargestellten Daten waren die meisten dieser Pax2-Zellen synaptisch innerviert: In der ML waren 15 von 19 Pax2-Zellen nachweislich innerviert, in der IGL 8 von 13. In der WM hingegen war von drei untersuchten Pax2-Zellen keine nachweislich synaptisch innerviert.

Nachfolgend untersuchten wir, ob von migrierenden Pax2-Zellen auch Aktionspotential-unabhängige PSCs abgeleitet werden können. Abbildung 15I zeigt beispielhaft eine Stromkurve mit sPSCs einer Pax2-Zelle aus der ML bei einem Haltepotential von -80 mV . Durch nachfolgendes Einwaschen von TTX ($1\ \mu\text{M}$) wurde die Generierung von Aktionspotentialen durch Blockierung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle unterdrückt. Unter diesen Bedingungen verschmelzen, in Abhängigkeit von der basalen intrazellulären Calciumkonzentration, in einem stochastischen Prozess spontan einzelne Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Die dadurch ausgelösten PSCs werden demzufolge durch monosynaptische Übertragung generiert. Wegen ihrer in der Regel kleinen Amplituden werden sie als postsynaptische Miniaturströme (mPSCs) bezeichnet (Abb. 15I, mittlere Stromkurve). Sie geben Hinweise auf wichtige biophysikalische Eigenschaften von Synapsen (Otsu und Murphy, 2003). Zusätzliches Ionomycin ($3\ \mu\text{M}$), ein Calcium-Ionophor (Liu und Hermann, 1978), erhöhte die intrazelluläre Calciumkonzentration in den präsynaptischen Terminalen und somit die Wahrscheinlichkeit der spontanen Vesikelfusion. Tatsächlich stieg die mPSC-Frequenz in unseren Messungen in Gegenwart von Ionomycin (Abb. 15I, untere Stromkurve). Die

Kinetik der gemittelten mPSC mit schnellem (Abb. 15J oben) bzw. langsamem (unten) Abfall unter Ionomycin ähnelte der zuvor ermittelten. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine „klassische“ synaptische Übertragung auf Pax2-Zellen.

Abbildung 15K zeigt für diese Messungen die kumulativen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (kWDF) der PSC-Momentanfrequenzen unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von TTX bzw. TTX und Ionomycin. Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Kurve durch TTX deutlich nach links verschoben. Dies impliziert sehr niedrige mPSC-Momentanfrequenzen und somit eine nahezu vollständige Eliminierung der PSCs. Ionomycin bewirkte hingegen eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurve, entsprechend höherer mPSC-Momentanfrequenzen (Vergleich der grauen mit der roten Kurve). Die Verteilungen wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests verglichen und unterschieden sich in den Bedingungen Kontrolle vs. TTX und TTX vs. TTX mit Ionomycin signifikant ($p < 0,001$; p -Werte Bonferroni-korrigiert). Im Gegensatz zu Pax2-Zellen in der ML und IGL (je $n = 1$) konnte Ionomycin in WM-Pax2-Zellen selbst ohne TTX keine sPSCs hervorrufen ($n = 3$).

Alle Pax2-Zellen mit elektrophysiologisch nachgewiesener synaptischer Innervation ($n = 43$), d. h. sowohl die zufällig ausgewählten Pax2-Zellen als auch die mit dokumentierter Migration, waren glutamaterg innerviert. Die Mehrzahl der Pax2-Zellen ($n = 35$) war zusätzlich auch GABAerg innerviert.

3.2.3 Synaptische Innervation reguliert die Migration von Pax2-Zellen

Abschließend fragten wir uns, ob die synaptische Innervation der Pax2-Zellen Einfluss auf ihre Migration hat. Hierbei wendeten wir die xyzt-2P-Zeittraffervideomikroskopie an.

Wir verglichen die Migration von 917 Pax2-Zellen aus drei akuten Schnitten von drei Tieren unter Kontrollbedingungen (ACSF, "Kontrolle") mit der Migration von 651 Pax2-Zellen in denselben Volumenelementen nach Blockierung der synaptischen Transmission durch Tetanus(neuro)toxin (100 $\mu\text{g/ml}$ TeNT, "Block"; s. M&M S. 34).

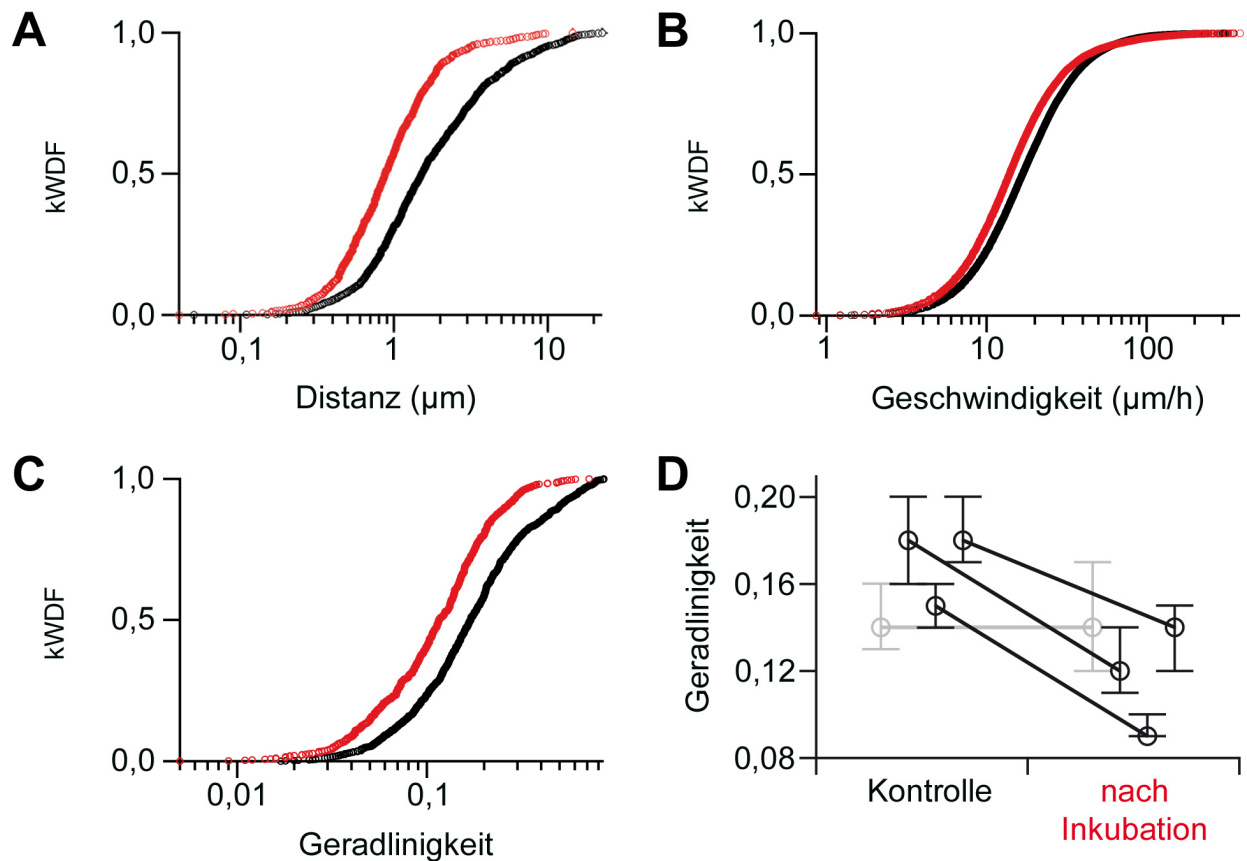


Abbildung 16: Synaptische Innervation lenkt die Migration von Pax2-Zellen. Pax2-Zellen wurden in drei Schnitten mittels xyz-t-2P-Zeittraffer-Videomikroskopie vor (insgesamt 917 Pax2-Zellen, schwarze Kreise) und nach Inkubation mit 100 µg/ml Tetanustoxin (TeNT; 651 Pax2-Zellen, rote Kreise) für je 30 min beobachtet. Dargestellt sind die kumulativen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (kWDF) der Distanz (**A**), der Geschwindigkeit (**B**) und der Geradlinigkeit (**C**) migrierender Pax2-Zellen. Abbildung (**D**) dokumentiert die experimentelle Reproduzierbarkeit dieser Befunde. Die Reduktion der Geradlinigkeit durch TeNT in drei unabhängigen Experimenten (schwarz) ist hier der Geradlinigkeit eines Sham-inkubierten Kontrollschnitts (grau) gegenübergestellt. Die Kreise markieren den jeweiligen Median, die Balken die mittels Bootstrapping ermittelten 95 %-Konfidenzintervalle. Pro Schnitt wurden zwischen 198 und 319 Kontroll- bzw. TeNT-behandelte Pax2-Zellen analysiert, für die Geschwindigkeit (**B**) 39091 bzw. 26489 Werte.

Da es Hinweise darauf gibt, dass das Migrationsverhalten neuronaler Vorläuferzellen alters- bzw. entwicklungsabhängig ist (s. z. B. Komuro und Rakic, 1995), verwendeten wir für diese Experimente ausschließlich P8 Mäuse.

Abbildung 16A–C zeigt die kumulativen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für die Distanz (A), die Geschwindigkeit (B) und die Geradlinigkeit (C), mit der Pax2-Zellen während des je 30-minütigen Beobachtungszeitraums vor (schwarz) und nach (rot) Inkubation mit TeNT wanderten. Zur Ermittlung des Effekts von TeNT auf diese Parameter berechneten wir die jeweiligen Mediane vor und nach Inkubation mit TeNT und bestimmten die 95%-Konfidenzintervalle (KI) mittels Bootstrapping (s. M&M S. 35). Unerwarteterweise wurde die Geschwindigkeit durch Inkubation mit TeNT nur leicht reduziert (Abb. 16B; Abnahme des Medians um 17,0 %; 95 %-KI 16,1–18 %). Die von TeNT-behandelten Pax2-Zellen zurückgelegte Distanz war hingegen deutlich geringer als die von Kontrollzellen (Abb. 16A; Abnahme des Medians um 42,4 %, 95 %-KI 37,7–45,0 %). Dies zeigt, dass sich die Pax2-Zellen ohne synaptische Innervation vorwiegend lokal bewegen, d. h. „auf der Stelle oszillieren“. Dementsprechend war auch die Geradlinigkeit (Batschelet, 1981; Benhamou, 2004) der Migration TeNT-behandelter Pax2-Zellen deutlich reduziert: der Median der Geradlinigkeit nahm um 29,4 % ab (Abb. 16C; 95 %-KI 23,5–35,3 %). Nach einer Sham-Inkubation ohne TeNT blieb der Median der Geradlinigkeit hingegen unverändert (Abb. 16D; 0 %, 95 %-KI –21,4–14,3 %). Diese Befunde belegen, dass die Ausschaltung der synaptischen Übertragung mit TeNT wie erwartet die Geschwindigkeit der Migration von Pax2-Zellen moduliert. Wesentlich ausgeprägter ist jedoch der Effekt auf die Geradlinigkeit der Migration dieser Pax2-Zellen.

Nachfolgend untersuchten wir die Richtungspersistenz der Pax2-Zellen, um die Verringerung der Geradlinigkeit nach Ausschaltung der synaptischen Transmitterübertragung weiter zu analysieren. Zunächst analysierten wir die Winkeländerungen während der Pax2-Zellmigration in der Sagittal (xy)- bzw. Horizontal (xz)-Ebene (M&M S. 39). Hierbei entsprechen kleine $\Delta\phi$ -Werte einer Richtungspersistenz i. S. einer geradlinigen Migration ohne stärkere Richtungsänderung. $\Delta\phi$ -Werte um $\pm\pi$ rad entsprechen dagegen Hin- und Herbewegungen der Pax2-Zellen. In Abbildung 17A und B sind die Ergebnisse eines von drei Versuchen gezeigt, die alle zu vergleichbaren Resultaten führten. Die Winkeländerungen $\Delta\phi$ waren unter Kontrollbedingungen am stärksten um 0 sowie $\pm\pi$ rad verteilt (Abb. 17A). Nach Inkubation mit TeNT nahmen $\Delta\phi$ -Werte um 0 ab, Werte

zwischen 0 und $\pm\pi$ rad hingegen zu (Abb. 17B). Somit ist nach einer Inkubation mit TeNT die Richtungspersistenz der Pax2-Zellmigration reduziert. Nach einer Sham-Inkubation ähnelte die Verteilung nach Inkubation mit TeNT der Verteilung in der Kontrollsituation (Abb. 17C).

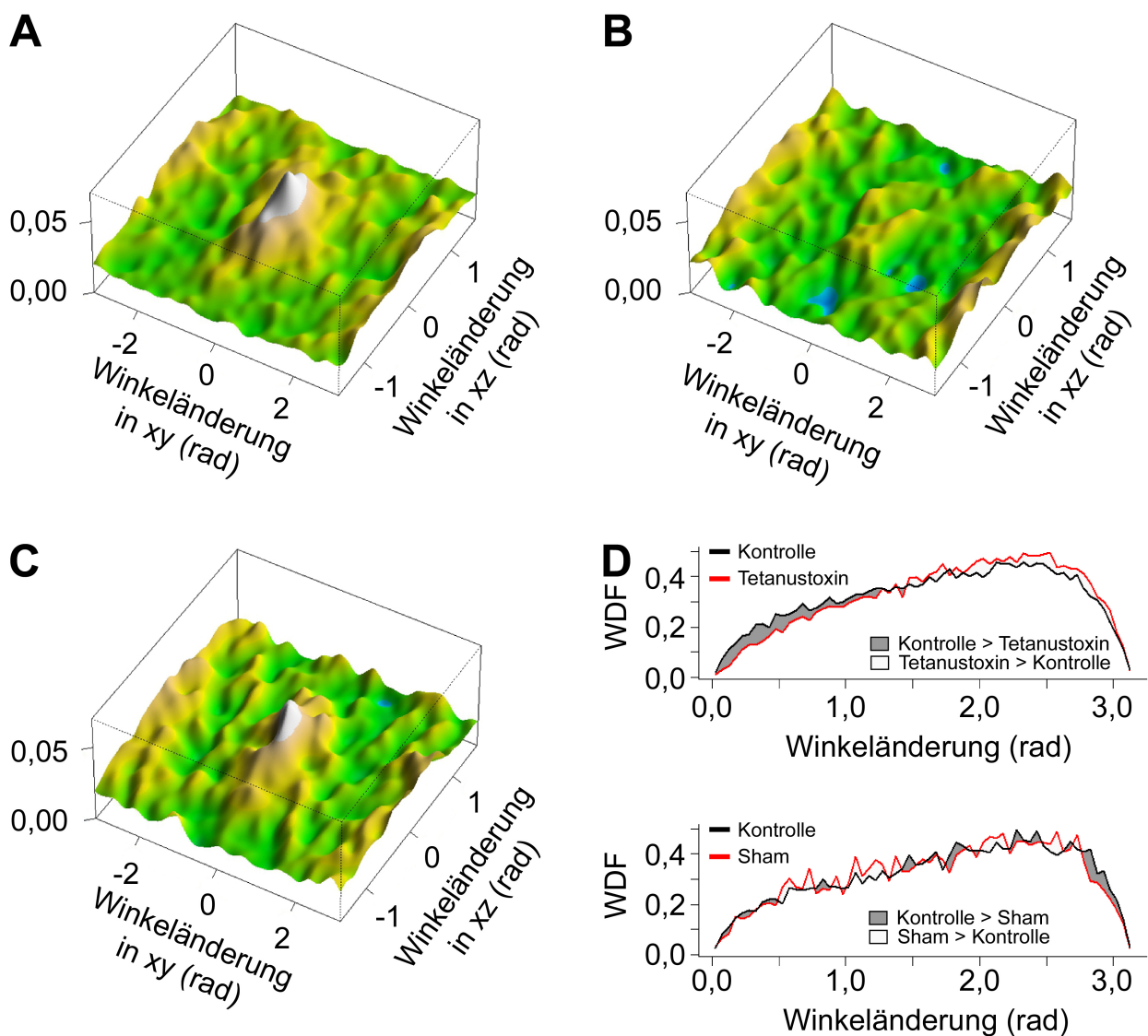


Abbildung 17 (vorherige Seite): Die synaptische Innervation unterstützt die Richtungspersistenz der Migration von Pax2-Zellen. (A) Verteilung der Winkeländerungen ($\Delta\phi$), die Pax2-Zellen während der Migration unter Kontrollbedingungen durchführten. $\Delta\phi$ -Werte wurden für die parasagittale (xy) und horizontale Ebene (xz) bestimmt. Die Häufigkeit, mit der individuelle $\Delta\phi$ -Werte auftraten, ist farbkodiert auf der z-Achse aufgetragen (blau: gering, weiß: hoch). (B) $\Delta\phi$ -Werte nach Inkubation der Schnitte mit TeNT (100 $\mu\text{g/ml}$). (C) $\Delta\phi$ -Werte nach einer Sham-Inkubation ohne TeNT (Vorkontrolle nicht gezeigt). (D) Oben: Vergleich der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (WDF) der absoluten Winkeländerungen in der Kontrollsituation mit der WDF nach Inkubation mit TeNT. Zugrunde liegen die auch für (A) und (B) analysierten Daten. Unten: Vergleich der WDF der Winkeländerungen in der Kontrollsituation mit der nach der zugehörigen Sham-Inkubation (vgl. (C)). Pro Bedingung wurden je mehr als 7300 $\Delta\phi$ -Werte von 198 bis 319 Pax2-Zellen analysiert.

Fokussiert man auf die absoluten Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Migrationsschritten, so fällt auf, dass diese nach Behandlung mit TeNT signifikant zu höheren Werten verschoben sind (Abb. 17D oben; $p = 3,7 \times 10^{-10}$, $p = 4,3 \times 10^{-14}$ und $p = 0,0017$ für die drei Tetanustoxin-inkubierten Schnitte, Kuiper-Test für zwei Proben; Batschelet, 1981). Nach einer Sham-Inkubation ohne TeNT war die Winkelverteilung hingegen nicht von der unter Kontrollbedingungen zu unterscheiden (Abb. 17D unten; $p = 0,06$, Kuiper-Test).

Dies lässt darauf schließen, dass die Richtungspersistenz der Migration durch synaptische Innervation vermittelt wird.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Migration und die elektrophysiologischen Eigenschaften von Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone der ML des Cerebellums. Ein zentraler Befund ist, dass diese neuronalen Vorläuferzellen schon während ihrer corticalen Wanderung in die ML synaptisch innerviert sind, und dass die synaptische Innervation für die Richtungspersistenz der Migration wichtig ist. Im Folgenden werde ich zunächst kurz wichtige methodische Aspekte unserer Arbeiten erörtern (Abschnitt 4.1) und danach die eigentlichen Ergebnisse diskutieren (Abschnitt 4.2).

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Untersucher Zelltyp in Pax2-GFP-Mäusen

Für die Experimente verwendeten wir Pax2-GFP-Mäuse der Linie BAC#30. In sagittalen Vermischnitten dieser Mäuse untersuchten wir kleine bipolare, kräftig GFP-positive Zellen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Expression des fluoreszenten Reporterproteins GFP vom Pax2-Locus qualitativ und quantitativ gut mit der Expression von Pax2 korreliert (Weisheit et al., 2006). Pax2 wiederum ist postnatal ein effizienter Marker für Vorläuferzellen von Korb-/Sternzellen, inhibitorischen Interneuronen der ML. Diese Korb-/Sternzell-Vorläufer werden vorwiegend in der ersten postnatalen Woche gebildet (Miale und Sidman, 1961). Pax2 wird aber auch von Golgi-Zellen, reifen Interneuronen der IGL, sowie ihren Vorläuferzellen exprimiert (Maricich und Herrup, 1999; Weisheit et al., 2006).

Können wir davon ausgehen, dass wir Vorläuferzellen von Korb-/Sternzellen und nicht Vorläuferzellen von Golgizellen untersucht haben? Hierfür spricht, dass die Generierung von Golgi-Zellen embryonal weitgehend abgeschlossen ist (Miale und Sidman, 1961; Zhang und Goldman, 1996). Somit erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass wir auch Golgi-Vorläuferzellen untersucht haben.

Können wir sicher sein, dass wir keine postmigratorischen Golgi- oder Korb-/Sternzellen untersucht haben?

Die Somata von Golgi-Zellen sind deutlich größer als die migrierender neuronaler Vorläuferzellen sowie reifer Korb-/Sternzellen. Ein Größenvergleich reifer Golgi- und Korb-/Sternzellen findet sich z. B. in der Abbildung 2 bei Schilling und Oberdick (2009). Hinzu kommt, dass die Somata von Golgizellen rundlich oder polygonal sind und zahlreiche Fortsätze tragen. Die Fortsätze gliedern sich in 4–10 Haupt-Dendriten und ein Haupt-Axon (Dieudonné, 1998). Migrierende Pax2-Zellen haben hingegen meist nur zwei Haupt-Fortsätze, den führenden und den nachfolgenden Fortsatz. Über ihre bipolare und teils spindelförmige Morphologie sind Pax2-Zellen daher klar von reifen Golgi-Zellen zu unterscheiden. Zusätzlich zu diesen morphologischen Kriterien lassen sich die Golgi-Zellen auch elektrophysiologisch anhand ihrer deutlich höheren Membrankapazität von Pax2-Zellen abgrenzen (Dieudonné, 1998). Daher ist nahezu ausgeschlossen, dass wir versehentlich Golgizellen analysiert haben.

Es ist ebenso unwahrscheinlich, dass wir innervierte postmigratorische Korb-/Sternzellen untersucht haben. Weder in der WM noch in der IGL finden sich reife Korb-/Sternzellen, da diese Schichten lediglich Durchgangsräume für ihre Vorläuferzellen, die Pax2-Zellen, sind. In der ML wandern neu ankommende kräftig GFP-positive Pax2-Zellen zunächst an die Grenze zur EGL (Weisheit et al., 2006). Eines der ersten Anzeichen der weiteren Differenzierung und synaptischen Integration dieser Zellen ist der Verlust der Expression von Pax2 (Pax2-mRNA: Abbildung 18; Pax2-Protein: s. Maricich und Herrup, 1999; Weisheit et al., 2006).

Schätzungen haben ergeben, dass das GFP in postmigratorischen Korb-/Sternzellen innerhalb von ein bis maximal zwei Tagen abgebaut wird (Weisheit et al., 2006). Deshalb haben wir für die Patch-clamp-Ableitungen konsequent kräftig GFP-positive Pax2-Zellen gewählt. Zudem haben reife(re) Korb-/Sternzellen als weiteres Unterscheidungsmerkmal einen stärker verzweigten Fortsatzbaum als Pax2-Zellen. Schließlich, und dies ist sicherlich das experimentell direktere „prima vista“ Argument, haben wir durch Kombination von Zeitraffer-Videomikroskopie mit nachfolgenden Patch-clamp-Ableitungen zweifelsfrei migrierende und daher explizit noch nicht an der endgültigen Lokalisation angekommene Pax2-Zellen studiert.

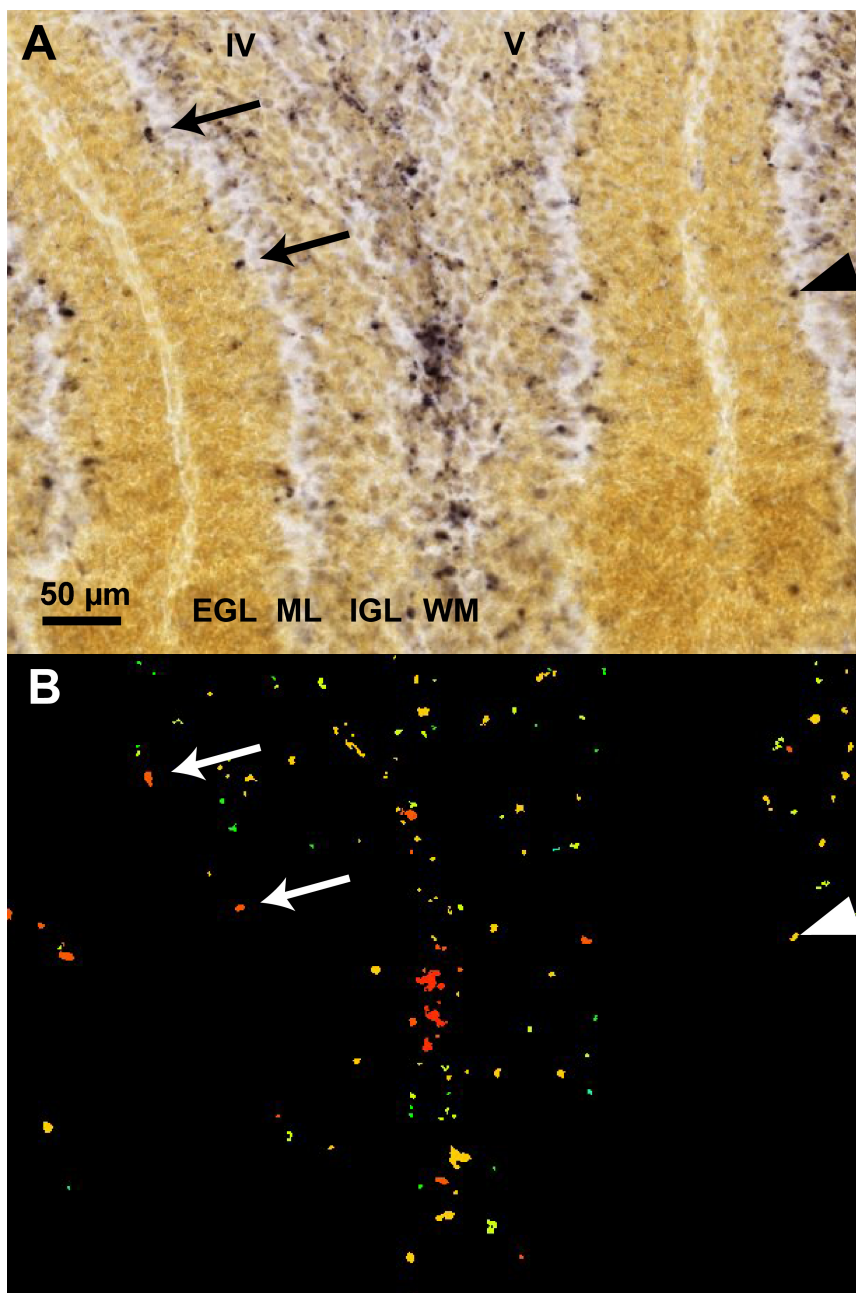


Abbildung 18: Cerebelläre Pax2-mRNA-Expression an P4. (A) In situ-Hybridisierung von Pax2-mRNA in L IV und V sowie den angrenzenden L III und VI einer P4 Maus. (B) Farbkodierte Expressionsstärke der Pax2-mRNA (rot = starke Expression, blau = schwache Expression). An der Grenze zwischen ML und EGL liegen mehrere Zellen, die die Pax2-mRNA stark exprimieren (Pfeile markieren Beispiel-Zellen), sowie Zellen, die die Pax2-mRNA schwächer exprimieren (Pfeilspitze). Abbildungen aus dem Allen Developing Mouse Brain Atlas; Internetseite: ©2013 Allen Institute for Brain Science. Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet]. Verfügbar auf: <http://developingmouse.brain-map.org>.

Wir können also davon ausgehen, dass die von uns untersuchten Pax2-Zellen tatsächlich migrierende Vorläuferzellen cerebellärer Korb-/Sternzellen waren.

4.1.2 Patch-clamp-Ableitungen

Nach unserem besten Wissen wurden Pax2-Zellen bisher nicht elektrophysiologisch untersucht. Wir konnten Patch-clamp-Ableitungen über Zeiträume von mehr als einer Stunde von diesen Zellen durchführen. Ich möchte hier kurz ein paar methodische Limitationen diskutieren.

Der Serienwiderstand R_s wurde in unseren Messungen nicht korrigiert, da die Kompensation schnell zu Oszillationen und nachfolgendem Zellverlust führte. Dadurch wich das tatsächliche Membranpotential U , in Abhängigkeit von der Stromamplitude, teils leicht von dem Pipettenpotential U_p ab. Dieser sogenannte Klemmfehler ist nach dem ohmschen Gesetz definiert als $\Delta U = U - U_p = R_s \times I$ (Sakmann und Neher, 1995). Allerdings haben wir, abgesehen von den Kalium- und Natriumströmen, überwiegend sehr kleine Ströme gemessen. Der Klemmfehler ist daher bei den meisten unserer Messungen, insbesondere bei der Messung postsynaptischer Ströme in Pax2-Zellen, zu vernachlässigen.

Die Strom-Spannungs-Kennlinie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle kann in Hirnschnitten aufgrund der schlechten Raumklemme nur abgeschätzt werden (Milescu et al., 2010). Das von uns beobachtete Amplitudenmaximum der Strom-Spannungs-Kennlinie bei etwa -10 mV ist allerdings nah an dem Erwartungswert von etwa -20 mV.

Die Bestimmung des Ruhemembranpotentials U_r der Pax2-Zellen war mit den verwendeten Methoden nicht möglich. Das im Current-clamp-Modus direkt nach Durchbrechen der Zellmembran gemessene Potential lag bei -31 ± 7 mV ($n = 70$). Allerdings lag bei unseren Messungen der Sealwiderstand der Pax2-Zellen in der gleichen Größenordnung wie der Membranwiderstand R_m . Sealwiderstand und Membranwiderstand wirken als Spannungsteiler, so dass über dem Sealwiderstand Spannung abfällt. Das tatsächliche Membranpotential der Pax2-Zellen ist deshalb negativer als das gemessene Membranpotential (Barry und Lynch, 1991; Tyzio et al.,

2003). Wie weit das gemessene und das tatsächliche Membranpotential voneinander abweichen, hängt vom Verhältnis des Sealwiderstandes zum Eingangswiderstand ab. Sind beide gleich groß, entspricht das tatsächliche Membranpotential der doppelten gemessenen Spannung. Wir können momentan keine Aussage darüber treffen, wie das Verhältnis in Pax2-Zellen ist. Eindeutig ist jedoch, dass das tatsächliche Membranpotential negativer als -31 mV ist.

4.1.3 Analyse der Zellmigration

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten wir die Migration der Vorläufer cerebellärer Korb-/Sternzellen an akuten Schnitten, die bei 35 °C von ACSF umspült wurden. Insgesamt wählten wir möglichst physiologische Bedingungen. Im Gegensatz dazu wurden bei den meisten bisher publizierten Untersuchungen zur Zellmigration Schnittkulturen verwendet. Wenn akute Schnitte benutzt wurden (z. B. Bagley und Belluscio, 2010; Komuro und Rakic, 1995), wurden diese teils in Zellkulturmedien gehalten.

Hirnschnitte verändern sich nach Anfertigung kontinuierlich. Unter anderem bildet sich durch die Proliferation glialer Zellen an der Schnittoberfläche eine sogenannte Glianarbe aus. Die synaptische Innervation kann sich in Schnittkulturen durch veränderte dendritische Komplexität ändern (De Simoni et al., 2003; Lossi et al., 2009). Wir können daher grundsätzlich davon ausgehen, dass akute Schnitte weniger Artefakt-behaftet sind und die Situation im Organismus *in toto* besser darstellen. Dennoch unterscheidet sich die Situation in akuten Schnitten von der *in vivo*. Es ist unvermeidbar, dass Zellen an der Schnittoberfläche beschädigt werden und das extrazelluläre Milieu durch das Umspülen mit ACSF verändert wird. Bis heute ist es aber nicht gelungen, Methoden zur *in vivo*-Beobachtung der Migration von Korb-/Sternzell-Vorläufern des Cerebellums zu entwickeln. Zu den limitierenden Faktoren gehört, dass diese Zellen aus der Tiefe der Cerebellum-Anlage nahezu senkrecht auf die Oberfläche zuwandern. Dieser Migrationsweg liegt wegen der limitierten Eindringtiefe verfügbarer optischer Techniken teils jenseits der Auflösungsgrenze. Vor allem aber müssen Bildstapel schnell aufgenommen werden, um Veränderungen der Zellmorphologie mit hoher Zeitauflösung zu erfassen. Dabei können nur wenige z-Ebenen aufgenommen werden, so dass die Auflösung in der z-Richtung wesentlich schlechter ist als in xy. Neben diesen

technischen Limitationen können noch gesäugte Tiere nur schlecht immobilisiert werden. Zudem würden sie ggf. nach der Beobachtung vom Muttertier nicht weiter versorgt. Dadurch wäre eine Beobachtung über längere Zeiträume nicht möglich. Versuche mit TeNT wären *in vivo* ebenfalls nicht möglich gewesen.

Vor diesem Hintergrund erscheinen akute Schnitte als ein gutes System, um die uns interessierenden Fragen klären zu können.

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Untersuchung der Pax2-Zellmigration zunächst mittels konfokaler Mikroskopie. Diese Technik wurde zur Selektion migrierender Pax2-Zellen für Patch-clamp-Ableitungen eingesetzt. Bei unseren konfokalen xyt-Zeitraffer-videomikroskopischen Aufnahmen war die GFP-Fluoreszenz über den gesamten Aufnahmezeitraum von bis zu 4:20 h stabil. Da eine Minimierung der Fototoxizität besonders im Hinblick auf länger dauernde Aufnahmen wichtig ist, wählten wir für morphologisch-quantitative Migrationsstudien dennoch die 2P-Anregung. Die Durchschnittsgeschwindigkeit betrug hier bei einem Aufnahmeintervall von $\approx 41,8$ s und 30-minütiger Aufnahme $22,3 \pm 0,4 \mu\text{m/h}$ ($n = 917$), bei Aufnahme über vier Stunden $21,7 \pm 0,7 \mu\text{m/h}$ ($n = 154$). Sie blieb damit auch bei längerer Aufnahmedauer gleich (Mann-Whitney-Test, $p \approx 0,5$), was gegen eine ausgeprägte Fototoxizität spricht.

Die Analyse der Zellmigration in der xyzt-2P-Zeitraffer-Videomikroskopie erforderte die Erstellung von 3D-Iso-Oberflächen und die Berechnung der daraus resultierenden Zellschwerpunkte (s. M&M S. 35). Obwohl die Vorbehandlung der so analysierten Zellen bei der Auswertung bekannt war, schloss das gewählte Vorgehen subjektive Einflüsse weitestgehend aus, da die Generierung der Iso-Oberflächen strikt algorithmisch in Imaris erfolgte. Ein Eingreifen war danach nur für minimale und genau vordefinierte Korrekturen wie zur Trennung algorithmisch nicht komplett separierter Zellen notwendig. Die Iso-Oberflächen wurden anhand eines Schwellenwerts für die GFP-Intensität erstellt. Hierbei war es nicht möglich, die Pax2-Zellfortsätze komplett zu erfassen, da die GFP-Intensität in den Fortsätzen sehr schwach war. Hätten wir einen niedrigeren Schwellenwert für unsere Bildsegmentierung gewählt, wären mehr peripher liegende Fortsatzstücke ohne Kontinuität zu den proximalen Fortsätzen fehlerhaft als Zellen markiert worden. Zudem wären die Somata benachbarter Zellen häufig nicht trennbar

gewesen. Da die Fortsätze sehr dünn sind, ist die Verschiebung des Schwerpunkts durch die inkomplette Erfassung der Fortsätze bei höherem Schwellenwert allerdings vermutlich vernachlässigbar.

Die Auswertung der Migration von Pax2-Zellen in der WM war mit unserem Algorithmus nicht möglich. Die Zellen liegen dort zu dicht beieinander, und die Iso-Oberflächen zahlreicher Zellen verschmelzen auch bei hohen Intensitäts-Schwellenwerten zu einem Objekt.

Bekannte Probleme bei Zeitraffer-videomikroskopischen Aufnahmen über einen längeren Zeitraum sind translatorische Bewegungen des experimentellen Aufbaus, Bewegungsartefakte durch die Perfusionslösung und die Schnittschwellung. Letztere führt dazu, dass sich die beobachteten Zellen ggf. aus dem Beobachtungsbereich bewegen. Wir korrigierten die Positionen der z-Ebenen im Schnitt während des Experiments, sobald die Drift in z-Richtung mehr als 4 μm betrug. Darüber hinaus führten wir mit Imaris nach der Messung eine Drift-Korrektur durch, um sämtliche Bewegungsartefakte zu eliminieren. Die rotatorische und translatorische Drift-Korrektur war eine unabdingbare Voraussetzung für die quantitative Bewegungsanalyse.

Zusammenfassend ist die xyzt-2P-Zeitraffer-Videomikroskopie eine gute und zellschonende Methode zur Aufnahme der Pax2-Zellmigration in akuten Schnitten. Die geringe inter-experimentelle Variabilität der quantifizierten Ergebnisse sowie die Ähnlichkeit der Ergebnisse vor und nach einer Sham-Inkubation (Abbildung 16D, S. 71) sprechen dafür, dass diese Methode mit der von uns gewählten Quantifizierungsmethode sehr robust ist.

4.2 Migrierende Pax2-Zellen erhalten direkte synaptische Innervation

Die in der vorliegenden Arbeit zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Pax2-positive Vorläuferzellen cerebellärer Korb-/Sternzellen unreife Neurone sind. Elektrophysiologisch exprimieren sie ionotrope Glutamat- und GABA-Rezeptoren der AMPA- und GABA_A-Subtypen, können aber noch keine Aktionspotentiale generieren. Ihre Migration durch den cerebellären Cortex kann in akuten Schnitten dargestellt und quantifiziert werden.

Sobald die Pax2-Zellen in den cerebellären Cortex eingewandert sind, jedoch lange vor Erreichen ihrer finalen Position, werden sie unerwarteterweise bereits synaptisch glutamaterg und GABAerg innerviert. Die synaptische Innervation ist für die Richtungssteuerung der Migration der Interneuron-Vorläuferzellen notwendig und daher wichtig für ihre exakte Positionierung.

Ich möchte zunächst auf die Migration von Pax2-Zellen eingehen.

4.2.1 Migration von Pax2-Zellen

Die Pax2-Zellen migrierten in den 30-minütigen Kontroll-Aufnahmen vor Inkubation mit TeNT mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von $22,3 \pm 0,4 \mu\text{m/h}$. Hier sei daran erinnert, dass die berechnete Durchschnittsgeschwindigkeit kurvilinearere Bewegungen grundsätzlich stark von der Länge des Aufnahmeintervalls abhängen kann. Das Aufnahmeintervall ist der Zeitabstand zwischen den aufeinander folgenden Zeitpunkten, für die der Schwerpunkt der Zelle ermittelt wurde. Da sich Zellen nie genau auf der direkten Verbindung vom Anfangspunkt und Zielpunkt bewegen, verlängern sich die Trajektorien mit der Verkürzung des Aufnahmeintervalls. Dementsprechend wird die errechnete Durchschnittsgeschwindigkeit umso höher, je kleiner das Aufnahmeintervall ist. Allerdings kann das Aufnahmeintervall aus technischen Gründen nicht beliebig kurz gewählt werden: eine Verkürzung des Zeitintervalls ist nur auf Kosten der räumlichen Auflösung möglich. Dies würde wiederum die Bestimmung der Geschwindigkeit beeinträchtigen. Das von uns gewählte Zeitintervall von $\approx 41,8 \text{ s}$ erlaubt eine hervorragende räumliche Auflösung und bietet eine zeitliche Auflösung, die deutlich besser als die vieler vorhergehender Migrationsstudien ist (z. B. Komuro und Rakic, 1995).

Die Migration von Vorläuferzellen der Korb-/Sternzellen wurde erstmals von Cameron et al. (2009) in früh postnatalen cerebellären Schnittkulturen untersucht. Die Autoren inkubierten die Schnittkulturen mit einem GFP-enthaltenden Vektor und definierten GFP-positive, Glutamat-Decarboxylase (GAD)-67-exprimierende migrierende Zellen als Vorläuferzellen von Korb-/Sternzellen. Sie beschrieben für diese Zellpopulation vier Phasen der Migration in der ML: (1) eine radiale Migration von der Grenze zwischen PCL und ML bis zur Grenze zwischen ML und EGL, (2) eine tangentielle Migration

entlang dieser Grenze, (3) eine radiale Migration ein Stück zurück in Richtung PCL und (4) eine tangentielle Migration parallel zur EGL.

Nach dieser Nomenklatur beobachteten wir die Phase 1 nach Cameron et al. sowie die davor erfolgende Migration durch die IGL. Cameron et al. machten alle 30 min mit einem 40× Objektiv eine konfokale Aufnahme bei einem z-Bereich von insgesamt 35 µm in bis zu 40 z-Ebenen. Sie errechneten für die beobachteten migrierenden Zellen eine Durchschnittsgeschwindigkeit von $\approx 14,9 \pm 1,1$ µm/h. Zum Vergleich hiermit berechneten wir die Geschwindigkeit aus der von Pax2-Zellen in 30 min zurückgelegten Distanz („30-Minuten-Durchschnittsgeschwindigkeit“). Sie beträgt $5,4 \pm 1,1$ µm/h.

Die Differenz der 30-Minuten-Durchschnittsgeschwindigkeit, die wir beobachteten, zu der von Cameron et al. resultiert vermutlich daraus, dass wir die Geschwindigkeiten für alle in unseren Volumenelementen enthaltenen corticalen Pax2-Zellen berechnet haben. Cameron et al. hingegen analysierten vermutlich nur Zellen, die sich deutlich, d. h. relativ schnell und über sehr lange Zeiträume von bis zu 70 h, bewegten.

Unsere Analysen legen allerdings nahe, dass sich viele Pax2-Zellen über den Beobachtungszeitraum von 30 min wenig gerichtet und daher nicht deutlich von der Stelle bewegen. Andere Pax2-Zellen scheinen den Cortex hingegen relativ kontinuierlich und gerichtet zu durchqueren (Spannbreite der Geradlinigkeit 0,02–0,85). Berechnet man bei einem Aufnahmeintervall von $\approx 41,8$ s die Durchschnittsgeschwindigkeit aller Pax2-Zellen, die in den 30 Minuten der Beobachtung eine Distanz von mehr als 2 µm zurückgelegt haben, so liegt die Geschwindigkeit bei $28,6 \pm 0,6$ µm/h ($n = 363$). Die erneut aus der Distanz berechnete 30-Minuten-Durchschnittsgeschwindigkeit dieser Zellen beträgt $10,6 \pm 0,4$ µm/h und ähnelt dem von Cameron et al. ermittelten Wert. Die Auswahl der Zellen hat demnach erwartungsgemäß einen großen Einfluss auf den ermittelten Wert. Die Durchschnittsgeschwindigkeit der schnellsten 10 % aller beobachteten Pax2-Zellen liegt bei einem Aufnahmeintervall von $\approx 41,8$ s sogar bei $49,0 \pm 1,1$ µm/h ($n = 92$). Insofern ist die Berechnung der Geschwindigkeit für alle Pax2-Zellen sicherlich die objektivste Herangehensweise. Allerdings ist die Spannbreite hierbei, wie ausgeführt, sehr groß.

Wie lange brauchen Pax2-Zellen, um den cerebellären Cortex zu durchqueren? Legt man die von uns für die gesamten corticalen Pax2-Zellen ermittelte mittlere Geschwindigkeit von etwa 22 $\mu\text{m}/\text{h}$ zu Grunde, so könnte man folgern, dass die an P8 etwa 83 μm dicke IGL in etwa 3,8 h sowie die etwa 10 μm breite PCL zusammen mit der etwa 38 μm breiten ML in weiteren 2,2 h durchwandert werden (Schwartz et al., 1997; Takács und Hátori, 1994). Der gesamte cerebelläre Cortex von etwa 130 μm Breite würde also im Mittel in etwa 6 h durchquert. Dies würde allerdings voraussetzen, dass die Wanderung strikt senkrecht zur Cortexoberfläche erfolgt und es keine wesentlichen Richtungswechsel während der Migration gibt. Beides ist nicht der Fall. Die genannten Zeitwerte müssen deshalb unter Einbeziehung der Geradlinigkeit der Migration deutlich nach oben korrigiert werden, um zu einer realistischeren Einschätzung des Zeitverlaufs für die Cortex-Durchquerung zu kommen. Die mittlere Geradlinigkeit der Pax2-Zellmigration betrug in unseren Experimenten $0,22 \pm 0,01$ bei einer Spannbreite von 0,02–0,85. Der niedrigste Wert der Geradlinigkeit spricht hierbei für eine starke Oszillation des Zellschwerpunktes. Der Mittelwert von 0,22 impliziert, dass der Korrekturfaktor 4–5 betragen könnte. Ein Korrekturfaktor 4 würde im Mittel zu einer Cortex-Durchquerung in etwa 24 h führen. Cameron et al. beobachten, dass die Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone die ML in $7,4 \pm 1,5$ h durchqueren. Bei konstanter Geschwindigkeit würden sie den gesamten cerebellären Cortex in etwa 25 h passieren. Dieser Wert kann aufgrund der Zellselektion nicht direkt mit unseren Werten verglichen werden, auch wenn er in einer ähnlichen Größenordnung liegt. Bei der von Cameron et al. angegebenen Durchschnittsgeschwindigkeit von rund 15 $\mu\text{m}/\text{h}$ hätten die Vorläuferzellen die ML bei geradliniger Migration in etwa 2,5 h durchqueren müssen. Für die Daten von Cameron et al. ergibt sich demzufolge ein Korrekturfaktor 3. Dass dieser niedriger als der für unsere Daten ist, liegt vermutlich erneut an den unterschiedlichen Aufnahmeintervallen sowie an der Zellselektion.

Zum Vergleich möchte ich diesen Werten erneut eine Berechnung für alle Pax2-Zellen mit einer zurückgelegten Distanz von mehr als 2 $\mu\text{m}/30$ min gegenüberstellen. In unserer Studie lag die Geradlinigkeit für diese Zellselektion mit $0,37 \pm 0,01$ bei einer Spannbreite von 0,09–0,85 deutlich höher als für die Gesamtkohorte. Dies impliziert einen Korrekturfaktor von etwa 3.

Der Cortex würde von dieser Subgruppe der Pax2-Zellen bei geradliniger Durchquerung mit der ermittelten Durchschnittsgeschwindigkeit in etwa 4,5 h, mit einem Korrekturfaktor 3 in etwa 13,5 h durchquert. Aussagen dazu, wie lange Pax2-Zellen zwischenzeitlich ruhen und wie viele Pax2-Zellen Ruhepausen einlegen, können aus diesem Datensatz bei einer Beobachtungsdauer von 30 min nicht gezogen werden. Grob geschätzt benötigen Pax2-Zellen somit bei kontinuierlicher Migration im Mittel etwa 14 h zur Durchquerung des cerebellären Cortex, mit Ruhepausen jedoch bis zu 24 h.

Dass einzelne Pax2-Zellen diese Strecke in deutlich kürzerer Zeit zurücklegen können, haben wir mittels konfokaler xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie gezeigt. Die in Abbildung 9 (S. 53) dargestellte Pax2-Zelle migrierte in 3 h von der Mitte der IGL bis zur Grenze zwischen ML und EGL. Insgesamt dürfte diese Zelle für die Durchquerung des gesamten cerebellären Cortex nur etwa 4,5 h benötigt haben.

Die größte Distanz, die eine Pax2-Zelle in den 30 min der xyzt-2P-Zeitraffer-Videomikroskopie zurückgelegt hat, betrug 22,63 μm . Hieraus errechnet sich eine Durchschnitts-Geschwindigkeit von 45,26 $\mu\text{m}/\text{h}$. Mit dieser Geschwindigkeit hätte diese Pax2-Zelle den cerebellären Cortex bei Wanderung senkrecht zur Cortexoberfläche in etwa 2,9 h durchquert, wenn sie die Geschwindigkeit über den gesamten Zeitraum beibehalten hätte.

In der Tat beobachteten wir aber, dass die Geschwindigkeiten einzelner Pax2-Zellen sehr stark über die Zeit variiert (Abbildung 10D, S. 57). Sichtbar ist dies auch an den Geschwindigkeiten, die exemplarisch mit der konfokalen xyt-Zeitraffer-Videomikroskopie für eine Zelle ermittelt wurden (Abbildung 9F, S. 53). Bei dieser Zelle unterscheidet sich zudem die Migrationsgeschwindigkeit in verschiedenen durchwanderten Schichten stark: In der IGL liegt sie die meiste Zeit deutlich höher als in der äußeren ML.

In der Zusammenschau bleibt festzuhalten, dass die von uns gemessene Migrationsgeschwindigkeit der Pax2-Zellen konsistent mit früheren, an Schnittkulturen ermittelten Werten ist. Die Differenzen der Werte beruhen wahrscheinlich auf der von Cameron et al. vorgenommenen Zellselektion. Zudem spiegeln unsere akuten Schnitte die Migration *in vivo* vermutlich besser wieder als Schnittkulturen. Unsere Daten zeigen

darüber hinaus, dass die inter-individuelle Variabilität der Migrationsgeschwindigkeit von Pax2-Zellen sehr hoch ist und dass zudem einzelne Pax2-Zellen phasenweise sehr unterschiedlich schnell wandern. Diese Variabilität erschwert die Abschätzung der effektiven Migrationsgeschwindigkeit und der Migrationsdauer einzelner Pax2-Zellen. Sie wirft aber die entwicklungsbiologisch interessante Frage auf, ob es sich hier um ein stochastisches Phänomen oder um den Ausdruck eines biologisch relevanten Regulationsmechanismus handelt.

4.2.2 Pax2-Zellen sind elektrophysiologisch unreife neuronale Zellen

Neuronale Vorläuferzellen unterscheiden sich elektrophysiologisch von reifen Neuronen. Sie haben einen höheren Eingangswiderstand und sie exprimieren, je nach Reifegrad, nicht alle von reifen Neuronen exprimierte Kanäle und Rezeptoren. Die von neuronalen Vorläuferzellen exprimierte Kanäle und Rezeptoren liegen zudem meist in geringerer Dichte als in adulten Neuronen vor. Dies führt zu kleineren Strömen (s. z. B. Carleton et al., 2003). Diese elektrophysiologischen Charakteristika neuronaler Vorläuferzellen konnten wir bei unseren Messungen auch an Pax2-Zellen nachweisen.

Pax2-Zellen haben einen Eingangswiderstand R_m von $> 1 \text{ G}\Omega$ und eine Zellkapazität C_m von $9,4 \pm 0,4 \text{ pF}$ (Abschnitt 3.1.2, S. 58). Diese Befunde ähneln den Werten, die für andere neuronale Vorläuferzellen gemessen wurden. Vorläuferzellen der Körnerzellen des Bulbus olfactorius wandern in der erwachsenen Maus entlang des rostralen migratorischen Stroms (RMS) in den Bulbus olfactorius. Sie haben initial einen R_m von etwa $2 \text{ G}\Omega$ und eine C_m von etwa 6 pF . Die Werte ändern sich mit zunehmender Reifung kontinuierlich: Die aus ihnen hervorgehenden Körnerzellen haben schließlich einen R_m von etwa $860 \text{ M}\Omega$ und eine C_m von etwa $15,9 \text{ pF}$ (Carleton et al., 2003). Vergleichbar hiermit liegt der Eingangswiderstand reifer Korb-/Sternzellen bei etwa $685 \text{ M}\Omega$ (Southan und Robertson, 1998). Dieser ist somit deutlich geringer als der der Pax2-positiven Vorläuferzellen.

Pax2-Zellen exprimieren wie reife Korb-/Sternzellen spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumkanäle (Llano und Gerschenfeld, 1993). Allerdings können Pax2-Zellen wie viele andere neuronale Vorläuferzellen (z. B. Metin et al., 2000; Carleton et al., 2003) selbst nach Strominjektion noch keine Aktionspotentiale generieren (Abschnitt 3.1.3, S. 60).

Könnte dies an einer zu geringen Dichte des spannungsgesteuerten Natriumstroms in Pax2-Zellen liegen? Die von uns berechnete Dichte lag bei $0,7 \pm 0,1 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$. Dadurch unterscheiden sich Pax2-Zellen deutlich von reifen Korb-/Sternzellen, die eine Natriumstromdichte von mehr als $30 \text{ pA}/\mu\text{m}^2$ haben (Southan und Robertson, 1998). Zudem generieren Korb-/Sternzellen spontan Aktionspotentiale mit einer Frequenz von bis zu 35 Hz (Ruigrok et al., 2011). Wir schließen hieraus, dass Pax2-Zellen noch keine Aktionspotentiale generieren können, da ihre Dichte des spannungsgesteuerten Natriumstroms noch zu gering ist.

Alle untersuchten Pax2-Zellen exprimierten GABA_A- und AMPA-Rezeptoren (Abschnitt 3.1.4, S. 61). KA-induzierte Einwärtsströme waren in Pax2-Zellen der ML deutlich größer als in Pax2-Zellen der WM. Dies kann als Hinweis darauf interpretiert werden, dass sich die AMPA-Rezeptor-Expression auf Pax2-Zellen während der Migration von der WM bis in die ML verändert. Ursächlich könnten eine zunehmende Dichte der AMPA-Rezeptoren und/oder eine geänderte Untereinheitenzusammensetzung sein (Traynelis et al., 2010; Smith et al., 2000).

Ähnliche Befunde wurden für andere neuronale Vorläuferzellen erhoben. Von sehr unreifen neuronalen Vorläuferzellen wie z. B. Körnerzellvorläufer der EGL oder neuronalen Vorläuferzellen des RMS exprimieren nur wenige Zellen AMPA-Rezeptoren (Smith et al., 2000; Carleton et al., 2003). Zudem sind die Amplituden KA-induzierter Ströme in AMPA-Rezeptor-exprimierenden Vorläuferzellen des RMS sehr klein und nehmen mit zunehmender Reifung der Zellen zu.

Cyclothiazid potenzierte lediglich KA-induzierte Ströme in Pax2-Zellen der WM, nicht hingegen in Pax2-Zellen der ML. Dies weist darauf hin, dass sich die Zusammensetzung der Rezeptoren bezüglich ihrer Flip-/Flop-Untereinheiten und/oder bezüglich der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluA1 bis GluA4 beim Einwandern der Pax2-Zellen aus der WM in den cerebellären Cortex oder während der Migration durch diesen ändert (Sommer et al., 1990; Monyer et al., 1991; Partin et al., 1993; Cotton und Partin, 2000; Liu und Cull-Candy, 2002). Insgesamt implizieren die Daten eine Änderung der AMPA-Rezeptorzusammensetzung und/oder -dichte auf Pax2-Zellen während der Migration aus der WM in die ML.

4.2.3 Direkte synaptische Innervation migrierender Interneuron-Vorläuferzellen

Alle Pax2-Zellen exprimieren Liganden-aktivierte Ionenkanäle vom GABA_A- und AMPA-Typ. Das legt nahe, dass ihre Migration ähnlich der anderer neuronaler Vorläuferzellen durch diese Transmitter beeinflusst wird (Evsyukova et al., 2013). Unklar ist jedoch, über welchen Mechanismus Neurotransmitter zu Pax2-Zellen gelangen.

Unerwarteterweise fanden wir klare elektrophysiologische Belege dafür, dass schon migrierende corticale Pax2-Zellen direkt synaptisch innerviert werden. Hierfür sprechen die von Pax2-Zellen abgeleiteten sPSCs mit typischer Kinetik, der Nachweis von mPSCs in Gegenwart von TTX und der Frequenzanstieg der mPSCs bei Applikation von Ionomycin. Im Gegensatz zu früheren Annahmen werden Korb-/Sternzell-Vorläufer somit bereits vor Erreichen ihrer endgültigen Position synaptisch innerviert (s. auch Diskussion Abschnitt 4.1.1, S. 75). Mit spezifischen Rezeptorantagonisten konnten wir elektrophysiologisch, wie auf reifen Korb-/Sternzellen (Llano und Gerschenfeld, 1993), sowohl glutamaterge als auch GABAerge Synapsen nachweisen. Die glutamaterge Innervation erfolgt wahrscheinlich vor der GABAergen Innervation. Während adulte Korb-/Sternzellen sowohl glutamaterg als auch GABAerg innerviert sind, waren zwar alle Pax2-Zellen mit gemessener synaptischer Innervation nachweisbar glutamaterg innerviert, jedoch nur 81 % GABAerg. Alternativ ist möglich, dass die verschiedenen Synapsentypen eine unterschiedliche Vesikel-Freisetzungswahrscheinlichkeit haben und wir so in dem begrenzten Beobachtungszeitraum einige GABAerge Synapsen nicht erfasst haben.

Eine elementare Frage bei der Bewertung der sPSCs als elektrophysiologisches Korrelat einer direkten synaptischen Innervation ist, ob diese Signale nicht auch durch Transmitter-Spillover generiert werden könnten. Dabei würden Neurotransmitter an Synapsen, die in der Nähe migrierender Pax2-Zellen liegen, an denen die Pax2-Zellen aber nicht selber beteiligt sind, freigesetzt. Die Neurotransmitter würden dann zu Pax2-Zellen diffundieren und durch Bindung an Neurotransmitterrezeptoren Ströme induzieren. Die folgenden Argumente sprechen dafür, dass die von uns gemessenen sPSCs tatsächlich als Zeichen einer direkten synaptischen Innervation migrierender

Interneuron-Vorläuferzellen und nicht als Zeichen von Transmitter-Spillover benachbarter Synapsen zu deuten sind.

Ein wichtiges Argument sind die schnellen Abfallzeiten der von Pax2-Zellen abgeleiteten PSCs.

Bei glutamaterger Transmission betragen diese etwa 1 ms (Abbildung 15G oben, S. 67). Für glutamatergen Spillover von Kletterfasern auf reife Korb-/Sternzellen liegen sie hingegen mit $3,4 \pm 1,4$ ms deutlich höher (Szapiro und Barbour, 2007). Auch der ebenfalls glutamaterge Spillover von Körnerzellen auf reife Korb-/Sternzellen, der bei starker Stimulation der Körnerzellen auftritt, führt zu langsameren Abfallzeiten (Carter und Regehr, 2000; Satake et al., 2012). Zahlenwerte wurden in diesen Studien nicht angegeben, aber die Kinetiken der gezeigten Signale unterscheiden sich deutlich von der Kinetik der von Pax2-Zellen abgeleiteten sPSCs (s. z. B. Carter und Regehr, 2000). Ein GABAerger Spillover auf Korb-/Sternzellen wurde bisher nicht beschrieben. An GABAergen Synapsen zwischen cerebellären Golgi- und Körnerzellen erhobene Befunde zeigen aber, dass dort auch bei GABAerger Transmission die Kinetik des Spillovers wesentlich langsamer ist als die direkter synaptischer Transmission (Rossi und Hamann, 1998): Die Abfallzeiten evozierter, d. h. durch elektrische Stimulation hervorgerufener, postsynaptischer Ströme (ePSCs), waren an der Golgizell-Körnerzell-Synapse durch zusätzlichen GABAergen Spillover länger als die der sPSCs (10 %-90 %-Abfallzeit ePSCs 116 ± 15 ms versus sPSCs $46,1 \pm 4,4$ ms, $n = 19$; die Abfallzeit wurde als 10 %-90 % berechnet, da sie durch mehrere Zeitkonstanten beschrieben wurde). Zudem wurden nach elektrischer Stimulation „reine Spillover-Signale“ von Körnerzellen, die nicht direkt durch die stimulierten Golgi-Zellen innerviert waren, abgeleitet. Diese Signale wiesen eine kleinere Amplitude und eine 10 %-90 %-Anstiegszeit von $3,2 \pm 9,6$ ms sowie eine 10 %-90 %-Abfallzeit von $630 \pm 74,8$ ms auf. Sowohl Anstiegs- als auch Abfallzeit der Spillover-Signale sind demzufolge wesentlich langsamer als die der von uns gemessenen PSCs. Unsere GABA-induzierten Signale ähneln mit einer Anstiegskonstante von < 1 ms und einer Abfallkonstante von ≈ 12 ms eher den von Rossi und Hamann gemessenen sPSCs.

Ein weiteres Argument für eine direkte synaptische Innervation von Pax2-Zellen und gegen einen Effekt durch Transmitter-Spillover ist, dass wir in Gegenwart von TTX mPSCs nachweisen konnten. Dies ist bei Spillover-Transmission nicht zu beobachten (Szapiro und Barbour, 2007). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass der Transmittergehalt eines Vesikels zu gering ist, um in Entfernungen, die über die Breite des synaptischen Spaltes hinausgehen, noch einen Strom auszulösen.

Die PSCs der Pax2-Zellen differieren in der Anstiegszeit auch deutlich von sogenannten Prä-Minis. Diese kleinen Ströme werden um P11–15 in reifenden Korb-/Sternzellen bei spontaner Neurotransmitterfreisetzung durch autokrine Aktivierung axonaler Rezeptoren generiert und in das Soma fortgeleitet (Trigo et al., 2010). Die Anstiegszeit der Prä-Minis liegt im Mittel bei etwa 2,5 ms, während die von uns gemessenen sPSCs Anstiegszeiten von < 1 ms hatten. Die Daten von Trigo et al. zeigen weiterhin, dass Prä-Minis erst nach Entwicklung reifer Axone generiert werden können. Diese sind von Pax2-Zellen noch nicht ausgebildet.

Die Kinetik der von uns gemessenen glutamatergen und GABAergen PSCs unterscheidet diese also sehr deutlich von Prä-Minis und von Signalen, die durch Spillover-Transmission hervorgerufen werden. Sie ist hingegen vergleichbar mit der Kinetik glutamaterger Signale, die nach axonaler Neurotransmitterfreisetzung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen des Corpus Callosums abgeleitet wurden. Diese Signale werden über Synapsen-ähnliche Strukturen vermittelt (Kukley et al., 2007; Ziskin et al., 2007). Die 20 %–80 %-Anstiegszeiten der von Kukley et al. gemessenen Signale betragen etwa 0,66 ms, die Abfallzeiten etwa 1,9 ms. Unsere Ergebnisse legen allerdings nahe, dass die synaptischen Signale auf Pax2-Zellen zumindest nicht durch eine (nicht-synaptische) Neurotransmitterfreisetzung unreifer Axone generiert werden. Dies schließen wir daraus, dass die Blockierung der Neurotransmitterfreisetzung mittels TeNT die Geradlinigkeit der Pax2-Zellmigration deutlich reduzierte. TeNT blockiert spezifisch die synaptische Neurotransmitterfreisetzung, hingegen nicht die Neurotransmitterfreisetzung durch unreife Axone (Verderio et al., 1999; vgl. S. 98).

In der Zusammenschau sind die von migrierenden Pax2-Zellen elektrophysiologisch abgeleiteten sPSCs ein klarer Beleg für ihre synaptische Innervation. Diese Interpretation wird auch durch morphologische Befunde gestützt, die wir in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. Johannes van der Want (Trondheim, Norwegen) erhoben. Herr Professor Dr. van der Want hat mir freundlicherweise erlaubt, die von ihm angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder hier zu zeigen (Abbildung 19). Für die elektronenmikroskopische Analyse selektierten wir stark GFP-positive Pax2-Zellen der inneren ML. Dort finden sich zwar auch reife(re) inhibitorische Interneurone. Diese lassen sich jedoch von ihren noch migrierenden Vorläufern eindeutig unterscheiden, da sie kein Pax2 und somit auch kein GFP mehr exprimieren (Weisheit et al., 2006).

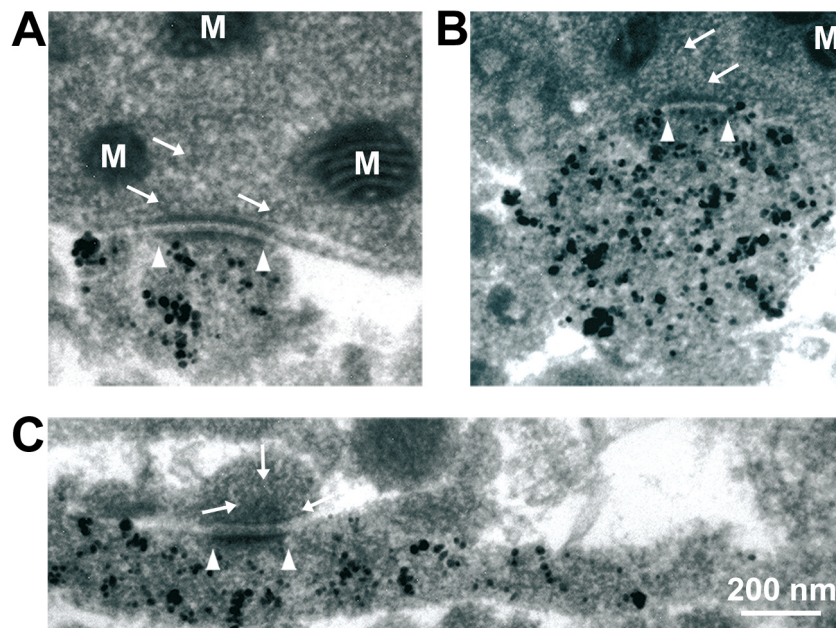


Abbildung 19: Pax2-Zellen in der Molekularschicht werden elektronenmikroskopisch von präsynaptischen Terminalen kontaktiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen symmetrische (A und B) sowie asymmetrische (C) Synapsen auf Pax2-Zellen. Pfeilspitzen markieren postsynaptische Verdichtungen, Pfeile präsynaptische Vesikel. Elektronendichte Granula: Pax2-GFP-positive Strukturen, M: Mitochondrium. Angefertigt von Johannes van der Want, Trondheim.

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie zeigte morphologisch zwei unterschiedliche Synapsentypen auf Pax2-Zellen: symmetrische Synapsen (Abb. 19A–B; Gray-Klassifikation Typ II) und eine asymmetrische Synapse mit einer postsynaptischen Verdichtung auf der Pax2-Zelle (Abb. 19C; Gray-Klassifikation Typ I, Klemann und Roubos, 2011). Der morphologische Nachweis von zwei unterschiedlichen Synapsentypen passt gut mit dem elektrophysiologischen Nachweis der Innervation durch zwei unterschiedliche Transmitter zusammen.

Wir wiesen elektrophysiologisch eine synaptische Innervation von 62 % der migrierenden Pax2-Zellen in der IGL sowie von 79 % der migrierenden Pax2-Zellen in der ML nach. Diese Zahlen stellen untere Grenzen dar, da wir wegen des teils kritischen Signal-Rausch-Verhältnisses und der geringen PSC-Frequenz vermutlich einige PSCs übersehen haben. Zudem wurden bei Anfertigung der akuten Schnitte möglicherweise Afferenzen durchtrennt, so dass *in vivo* mehr Pax2-Zellen innerviert sein könnten. Allerdings ist theoretisch auch möglich, dass die Pax2-Zellen während der Lagerung der Schnitte bei RT vor Durchführung der Experimente neue synaptische Afferenzen erhielten. Auf die möglichen Afferenzen werde ich auf S. 95 näher eingehen.

Im Gegensatz zur synaptischen Innervation migrierender corticaler Pax2-Zellen fanden wir keine Anhaltspunkte dafür, dass Pax2-Zellen auch während ihrer Migration durch die WM synaptisch innerviert sind. Dies impliziert, dass Synapsen auf Pax2-Zellen erst etabliert werden, sobald Pax2-Zellen den cerebellären Cortex erreicht haben. Denkbar ist aber auch, dass die Vesikel-Freisetzungswahrscheinlichkeit von Synapsen auf Pax2-Zellen der WM sehr gering ist und wir deshalb keine PSCs von ihnen ableiten konnten. Allerdings hätte die Frequenz der PSCs dann durch Ionomycin deutlich gesteigert werden müssen. Eine dritte Möglichkeit ist, dass die Amplituden von sPSCs in Pax2-Zellen der WM so klein sind, dass wir sie nicht vom Hintergrund-Rauschen unterscheiden konnten.

In Zusammenschau dieser Befunde schlussfolgern wir, dass migrierende corticale Pax2-Zellen, anders als bisher angenommen, bereits vor Erreichen ihrer endgültigen Position synaptisch innerviert werden.

Eine für das Verständnis der intrazellulären Umsetzung synaptischer Signale relevante Frage ist, ob die GABAerge Innervation bei Pax2-Zellen zur De- oder Hyperpolarisation führt. Bei vielen Neuronen wirkt GABA über GABA_A-Rezeptoren während der Entwicklung erst exzitatorisch, d. h. depolarisierend. Erst in Folge der während der Differenzierung erfolgenden Hochregulation des K⁺/Cl⁻-Kotransporters KCC2 verringert sich die intrazelluläre Chloridkonzentration, so dass das Umkehrpotential für Chloridströme hyperpolarisierter wird und GABA inhibitorisch wirkt (Rivera et al., 1999; Ganguly et al., 2001). Für Interneuron-Vorläuferzellen des Großhirncortex ist die Hochregulation von KCC2 auch für die Beendigung der Migration wichtig (Bortone und Polleux, 2009). Da KCC2 auch in reifenden Korb-/Sternzellen hochreguliert wird (Simat et al., 2007), bewirkt eine GABAerge Innervation in Pax2-Zellen möglicherweise wie in anderen neuronalen Vorläuferzellen eine Depolarisation.

Um die Wirkung von GABA auf Pax2-Zellen bewerten zu können, müsste man folglich ihre intrinsische Chloridkonzentration kennen. Bei unseren Ganzzell-Ableitungen wurde das Zytosol aber durch die Innenlösung ausgetauscht. Daher können wir keine Aussage zu der intrinsischen Chloridkonzentration der Pax2-Zellen treffen. Hier sei allerdings ergänzt, dass im Gegensatz zu z. B. Purkinjezellen selbst in reifen Korb-/Sternzellen das Umkehrpotential für Chloridströme nahe am Ruhemembranpotential von etwa -57 mV liegt. In Folge werden reife Korb-/Sternzellen durch GABAerge Innervation teils de- und teils hyperpolarisiert (Chavas und Marty, 2003).

Insgesamt ist wahrscheinlich, dass Pax2-Zellen sowohl durch glutamaterge als auch durch GABAerge Innervation depolarisiert werden.

Warum wurden bisher in der Literatur keine funktionellen Synapsen auf migrierenden neuronalen Vorläuferzellen beschrieben?

Der Einfluss von Transmittern auf die Migration neuronaler Zellen wurde in zahlreichen Studien untersucht (s. z. B. Behar et al., 1995; Behar et al., 1998; Bolteus und Bordey, 2004; Komuro und Rakic, 1998), die migrierenden Zellen wurden aber in der Regel nicht elektrophysiologisch oder ultrastrukturell untersucht. Es wurde meist davon

ausgegangen, dass endogene Transmitter nicht lokal-synaptisch, sondern allenfalls parakrin wirken.

In der Tat belegen die bisher vorliegenden elektrophysiologischen Studien eine autokrin/parakrine Neurotransmitterfreisetzung und -wirkung an neuronalen Vorläuferzellen. Explizit wurde dies u. a. durch Manent et al. (2005), Bolteus und Bordey (2004) und Cuzon et al. (2006) postuliert und mit Daten belegt. Manent et al. (2005) beschrieben die Wirkung von GABA und Glutamat auf die Migration der Vorläuferzellen hippocampaler Projektionsneurone als parakrin, da Antagonisten von GABA_A- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren auch in Schnitten von Munc18-1-defizienten Mäusen die Migration von Pyramidenzell-Vorläufern hemmten. In Munc18-1-defizienten Mäusen findet keine synaptische vesikuläre Neurotransmitterfreisetzung statt. Bolteus und Bordey (2004) wiesen in postnatal generierten neuronalen Vorläuferzellen der SVZ sowie des proximalen RMS tonische GABA-induzierte Ströme nach. GABA wurde hierbei von anderen neuronalen Vorläuferzellen freigesetzt, so dass es sich um einen autokrin/parakrinen Effekt handelt. Auch von Interneuron-Vorläuferzellen aus der MGE wurden nach Einwanderung in den Neocortex tonische GABA-Ströme elektrophysiologisch abgeleitet, die am ehesten durch parakrine GABA-Freisetzung hervorgerufen wurden (Cuzon et al., 2006).

Auch die synaptische Integration post-migratorischer Neurone und deren Zeitverlauf sind recht gut untersucht, wenngleich wenige Studien eine Migrationsanalyse mit Patch-clamp-Ableitungen kombinierten. Carleton et al. (2003) analysierten die elektrophysiologischen Eigenschaften von adult generierten Interneuron-Vorläuferzellen des Bulbus olfactorius während ihrer Migration durch den RMS und nach Einwanderung in den Bulbus olfactorius. Sie fanden keine funktionellen Anhaltspunkte für eine synaptische Innervation dieser Vorläuferzellen vor Erreichen ihrer endgültigen adulten Position. Zwar wurde in einer anderen Studie die Vermutung geäußert, dass die Vorläuferzellen der Körnerzellen des Bulbus olfactorius vor Erreichen der endgültigen Position synaptisch innerviert sein könnten (Panzanelli et al., 2009). Allerdings wurde lediglich aufgrund der unreifen, bipolaren Morphologie der Vorläuferzellen vermutet, dass sie migrieren, die Migration aber nicht untersucht. Als Indikator für die Existenz von

Synapsen diene hierbei die dichte Expression von Gephyrin auf diesen Zellen. Patch-clamp-Ableitungen wurden nicht durchgeführt.

Warum konnten Carleton et al. keine PSCs von migrierenden Interneuron-Vorläuferzellen ableiten? Es ist denkbar, dass sie sPSCs mit sehr kleiner Amplitude nicht vom Hintergrundrauschen differenzieren konnten, oder dass es sich um Unterschiede zwischen adulter Neurogenese und Neurogenese während der Entwicklung, oder Unterschiede bei der Entwicklung verschiedener Hirnregionen handelt.

Generell gibt es wie eingangs erwähnt sicherlich auch Unterschiede in der Entwicklung von Projektionsneuronen und Interneuronen (Manent und Represa, 2007). Auch unterscheiden sich verschiedene Interneuron-Vorläuferzellen bezüglich der Signale, die ihre Migration steuern. Dies dürfte u. a. von der Migrationsroute, d. h. der durchwanderten Hirnregion, und dem Entwicklungszeitraum abhängen.

Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, weitere neuronale Vorläuferzellen bezüglich direkter synaptischer Innervation zu untersuchen, um herauszufinden, ob es sich um ein generelles Phänomen oder eine Besonderheit während der Entwicklung von Pax2-Zellen handelt. Abschließend sei angemerkt, dass unsere Befunde keineswegs eine parakrine Wirkung von Transmittern auf die Migration und Differenzierung von Pax2-Zellen ausschließen. Sie belegen aber darüber hinaus eindeutig einen Einfluss synaptisch freigesetzter Neurotransmitter auf diese migrierenden Zellen.

Was sind mögliche Afferenzen der Pax2-Zellen?

Wie bereits diskutiert, werden Pax2-Zellen durch GABAerge und glutamaterge Synapsen innerviert. Da die glutamatergen und GABAergen Signale nicht zeitgleich auftraten, ist davon auszugehen, dass Pax2-Zellen von mindestens zwei verschiedenen afferenten Zelltypen innerviert werden (Shabel et al., 2014).

Adulte (reife) Korb-/Sternzellen werden GABAerg durch andere Korb-/Sternzellen (Lemkey-Johnston und Larramendi, 1968) sowie durch Lugaro-Zellen innerviert. Die Synapsen von Lugaro-Zellen auf Korb-/Sternzellen wurden bisher rein morphologisch,

d. h. nicht elektrophysiologisch, nachgewiesen (Laine und Axelrad, 1998). Korb-/Sternzellen erhalten zudem glutamaterge Afferenzen von Körnerzellen (Llano und Gerschenfeld, 1993; Liu und Cull-Candy, 2002).

Als Ursprung GABAerger Afferenzen für die migrierenden Pax2-Zellen kommen primär Purkinjezellen in Frage. Sie sind die ersten in die Cerebellum-Anlage einwandernden Zellen und differenzieren sich daher schon vergleichsweise früh. Purkinjezellaxone bilden in der entstehenden IGL durch Axon-Kollateralen einen ausgedehnten axonalen Plexus (Larramendi und Lemkey-Johnston, 1970; Chan-Palay, 1971; Watt et al., 2009). Dieser könnte an der Innervation von Pax2-Zellen beteiligt sein. Eventuell könnten Pax2-Zellen in der IGL auch von Golgi-Zellen innerviert werden. Funktionelle GABAerge Synapsen zwischen Golgi- und Körnerzellen konnten in der Ratte ab P4 nachgewiesen werden (Brickley et al., 1996). In der Maus entwickeln sich Golgi-Zellen eher früher als in der Ratte (Miale und Sidman, 1961; Das und Nornes, 1972).

Für Pax2-Zellen, die in die ML einwandern, kommen als Afferenzen grundsätzlich auch reife(re) Korb-/Sternzellen in Frage. Elektronenmikroskopische Aufnahmen an P9 zeigten einzelne Synapsen von Korbzellen auf Axoninitialsegmente von Purkinjezellen der Ratte (Sotelo, 2008). Axo-somatische Synapsen wurden morphologisch noch etwas früher nachgewiesen (Ango et al., 2004). Hingegen legen die funktionellen Untersuchungen (Brickley et al., 1996; Shimono et al., 1976) nahe, dass die elektrophysiologische Reifung von Korbzellen eher nach der von uns untersuchten Zeitspanne (P7–9) erfolgt. Zumindest bis zu dem von uns untersuchten Zeitpunkt von P7–9 sind daher Korb-/Sternzellen als GABAerge Afferenzen ihrer Pax2-positiven Vorläuferzellen eher unwahrscheinlich. Synaptische Innervation durch Lugaro-Zellen wurde bisher nur in einer einzigen Arbeit an Purkinje-Zellen untersucht (Dean et al., 2003). Die Charakteristika der Innervation von Korb-/Sternzellen durch Lugaro-Zellen sind demzufolge noch unbekannt, so dass eine Diskussion in Bezug auf eine mögliche Innervation von Pax2-Zellen durch Lugaro-Zellen nicht sinnvoll erscheint.

Mögliche glutamaterge Afferenzen migrierender Pax2-Zellen könnten von Moosfasern oder Kletterfasern stammen. Da bei der Präparation alle von extracerebellär in das Cerebellum eintretenden Fasern durchtrennt werden, bleiben nur intracerebelläre

Moosfasern aus den cerebellären Kernen (Batini et al., 1992) intakt. Deshalb ist die glutamaterge Innervation *in vivo* möglicherweise stärker als die von uns gemessene. Dass die Pax2-Zellen durch präparationsbedingt von den Somata abgetrennte distale Axone, z. B. von Kletterfasern, innerviert werden, erscheint aus zwei Gründen unwahrscheinlich. Erstens degenerieren distale, abgetrennte Axone, zumindest im Rückenmark, nach Axotomie schnell über eine Distanz von mehreren 100 μm (Kerschensteiner et al., 2005). Wahrscheinlich trifft dies auch im Cerebellum auf die abgetrennten extracerebellären Kletter- und Moosfasern zu. Zweitens würde man bei einer Innervation durch abgetrennte Axone, wenn überhaupt, nur mPSCs erwarten, da die Axone keine Aktionspotentiale mehr generieren können. In der Literatur finden sich diesbezüglich keine Daten.

Eine Innervation durch Körnerzellen erscheint, zumindest für die Pax2-Zellen in der IGL, unwahrscheinlich. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Pax2-Zellen der IGL über entwicklungspezifische Körnerzell-Axonkollateralen oder durch den aufsteigenden Teil von Körnerzellaxonen innerviert werden (Huang et al., 2006; Cesana et al., 2013). Die Parallelfasern der Körnerzellaxone werden bei der Präparation durchtrennt, was eine mögliche Innervation von Pax2-Zellen in der ML durch Körnerzellen beeinträchtigen könnte. Eine Innervation über die aufsteigenden Teile der Körnerzellaxone wäre hingegen gut möglich.

Zusammenfassend erscheint es wahrscheinlich, dass Pax2-Zellen zumindest zum Teil von Projektionsneuronen (Purkinjezellen, Moosfasern) innerviert werden, während reife Korb-/Sternzellen ausschließlich von Interneuronen (Korb-/Sternzellen, Körnerzellen) innerviert werden (Liu, 2013). Sollte dies zutreffen, müsste während der Differenzierung der Pax2-Zellen zu reifen Korb-/Sternzellen ein Wechsel der Afferenzen stattfinden. Die Synapsen auf migrierenden Pax2-Zellen wären deshalb transient. Dieser Prozess würde sich klar von dem Synapsenumbau unterscheiden, der für Synapsen auf reifenden post-migratorischen Zellen beschrieben wurde (s. z. B. Gianola et al., 2003; Kalinovsky et al., 2011; Watanabe und Kano, 2011; Watt et al., 2009). Transiente Synapsen wurden bisher selten beschrieben, so dass auch dies eine Eigenheit der Synapsen auf migrierenden Korb-/Sternzellen wäre.

Was könnte(n) die biologische(n) Funktion(en) und Konsequenzen der hier erstmals beschriebenen synaptischen Innervation der Vorläufer cerebellärer inhibitorischer Interneurone noch während ihrer Migration durch den cerebellären Cortex sein? Wie bereits erwähnt gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die die Wirkung von Transmittern auf die Migration neuronaler Vorläuferzellen in verschiedenen Regionen des ZNS (und auch des peripheren Nervensystems) beschreiben (s. z. B. Behar et al., 1995; Behar et al., 1998; Bolteus und Bordey, 2004; Komuro und Rakic, 1998). Diese Studien untersuchten durchweg den Effekt der Transmitter auf die Migrationsgeschwindigkeit. Teils hatten die Neurotransmitter eine Geschwindigkeitssteigernde Wirkung wie z. B. Glutamat bei Wirkung über NMDA-Rezeptoren von Körnerzell-Vorläufern (Komuro und Rakic, 1993) oder GABA bei Wirkung über GABA_B-Rezeptoren von Neuroblasten des Rückenmarks (Behar et al., 1995). Teils hatten sie aber auch eine Geschwindigkeits-mindernde Wirkung wie z. B. GABA bei Wirkung über GABA_A-Rezeptoren von neuronalen Vorläuferzellen der postnatalen Subventrikulärzone sowie des RMS (Bolteus und Bordey, 2004).

Um der Frage nachzugehen, welche Bedeutung synaptisch freigesetztes GABA oder Glutamat für die Migration von Pax2-Zellen hat, blockierten wir die synaptische Neurotransmitter-Freisetzung spezifisch und selektiv mit TeNT. TeNT schneidet Synaptobrevin1/2 (Vesikel-assoziiertes Membranprotein (VAMP) 1/2), ein v-SNARE, das essentiell für die Freisetzung synaptischer Vesikel ist (Schiavo et al., 1992). Deshalb ist es gut geeignet, um die synaptische Freisetzung von Neurotransmittern zu blockieren, und die Effekte der fehlenden synaptischen Innervation auf Pax2-Zellen zu untersuchen.

TeNT hat für unsere Fragestellung zwei entscheidende Vorteile gegenüber anderen Substanzen, die ebenfalls die synaptische Neurotransmitterfreisetzung blockieren: Erstens hat es, im Gegensatz zu Botulinumtoxin A bzw. C, weder einen hemmenden Effekt auf das Auswachsen von Axonen und die Synaptogenese noch einen toxischen Effekt auf Neurone (Osen-Sand et al., 1996). Zweitens inhibiert TeNT, wiederum im Gegensatz zu Botulinumtoxin A, spezifisch die synaptische Freisetzung von Neurotransmittervesikeln, nicht hingegen die vesikuläre Freisetzung von Neurotransmittern durch unreife Axone vor der Synaptogenese (Verderio et al., 1999).

Im Umkehrschluss erlaubt dies die Aussage, dass durch TeNT vermittelte Effekte auf eine spezifische Blockade der synaptischen vesikulären Neurotransmitterfreisetzung zurückzuführen sind.

Wie nach den oben zitierten Arbeiten zum Einfluss von Neurotransmittern auf neuronale Migration zu vermuten, beobachteten wir, dass sich die Geschwindigkeit der Migration nach Ausschalten der synaptischen Übertragung mittels TeNT leicht verringerte. Dies ist durchaus auch mit der bisherigen Interpretation einer parakrinen Wirkung von Neurotransmittern konsistent. Letztendlich sollte in Schnitten eine Blockade der Neurotransmitterfreisetzung auch zu einer Verringerung der allgemeinen ambienten Transmitterkonzentration führen. Weiterhin ist dies auch mit Beobachtungen an enterischen Neuralleistenzellen konsistent, bei denen ebenfalls beobachtet wurde, dass TeNT ihre Migrationsgeschwindigkeit reduzierte (Vohra et al., 2006).

Überraschend war jedoch der Befund, dass die Geradlinigkeit der Zellmigration nach der Eliminierung der synaptischen Kommunikation sehr deutlich abnahm (Abbildung 16C–D, S. 71). Dies ist auf eine verringerte Richtungspersistenz der Pax2-Zellen zurückzuführen (Abbildung 17, S. 73). Die zellulären mechanistischen Grundlagen der reduzierten Geradlinigkeit sind angesichts der bisher bestenfalls bruchstückhaften Kenntnisse zur Richtungspersistenz migrierender neuronaler Zellen nicht klar. Auch unsere Untersuchungen zielen nicht auf die Identifizierung intrazellulärer Prozesse der Migrationssteuerung. Dennoch lassen sich einige Aussagen zur möglichen Umsetzung des synaptischen Signals machen.

Da Pax2-Zellen selbst keine Aktionspotentiale generieren können und somit empfangene synaptische Signale zumindest nicht über Aktionspotentiale weitergeben können, wirkt ihre synaptische Innervation höchstwahrscheinlich rein lokal. Die synaptischen Effekte auf die Geschwindigkeit und Geradlinigkeit der Pax2-Zellen werden also zell-intrinsisch realisiert. TeNT blockiert, wie erwähnt, spezifisch die synaptische Freisetzung von Neurotransmittern, nicht aber generell die vesikuläre Dynamik, die für das Neuritenwachstum wichtig ist (Osen-Sand et al., 1996; Verderio et

al., 1999; Chilcote et al., 1995). Dies ist wichtig, da die TeNT-unempfindliche Vesikeldynamik eine Voraussetzung für die Migration ist.

Wie könnte das synaptische Signal intrazellulär in gerichtete Bewegung umgesetzt werden? Hier können wir momentan nur spekulieren. Die 2-stündige Inkubation der Schnitte mit TeNT würde prinzipiell eine Steuerung der beobachteten Effekte (auch) über Transkriptions-abhängige Mechanismen erlauben (Rosenberg und Spitzer, 2011). Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass es sich um eher lokal begrenzte Mechanismen handeln könnte, denen primär eine synaptisch induzierte Veränderung des freien intrazellulären Calciums zu Grunde liegt. Zahlreiche Studien belegen die Rolle von Calcium in der Steuerung neuronaler Migration (s. z. B. Komuro und Rakic, 1998). Insbesondere ist bekannt, dass bei der Richtungssteuerung von Wachstumskegeln zahlreiche Faktoren wie der Freisetzungsort und die Stärke des primären Calciumsignals, das Verhältnis zahlreicher sekundärer Botenstoffe sowie Mechanismen der sekundären Calciumfreisetzung in einem komplexen Netzwerk regulieren, ob ein auf den Wachstumskegel einwirkendes Signal attraktiv oder repulsiv wirkt. Ein und dasselbe Signal, z. B. Netrin-1, kann dabei attraktiv oder repulsiv wirken, abhängig u. a. vom Verhältnis von cAMP zu cGMP. Über nachfolgenden Einbau von Membranvesikeln am Ort des Signals oder lokale Endozytose von Membranvesikeln sowie Effekte auf die Zelladhäsion und das Zytoskelett wird das Signal dann in eine Bewegung des Wachstumskegels zu dem Signal hin oder davon fort umgesetzt (Tojima et al., 2011; Akiyama und Kamiguchi, 2015). Synaptische Neurotransmitter könnten daher über eine Beeinflussung der lokalen Calciumkonzentration und/oder der Konzentration sekundärer Botenstoffe attraktiv auf eine migrierende neuronale Vorläuferzelle wirken und somit auch die Geradlinigkeit der Migration beeinflussen.

Da synaptische Signale, ganz im Gegensatz zu der parakrinen Freisetzung von Neurotransmittern, räumlich *und* zeitlich extrem lokalisierte Signale darstellen (für eine grafische Darstellung s. Manent und Represa, 2007, Abb. 3), scheinen sie ideal, um als Richtungsgeber zu fungieren. Pax2-Zellen besitzen während der Migration noch eine deutliche Plastizität bezüglich des aus ihnen hervorgehenden Subtyps inhibitorischer Interneurone. Sie integrieren zur Spezifizierung unbekannte Signale aus ihrer

Umgebung (Leto et al., 2009). Präsynaptische Zellen könnten deshalb über direkte synaptische Innervation Einfluss auf die Positionierung wandernder Interneuron-Vorläuferzellen nehmen und sie gegebenenfalls bedarfsangepasst leiten. Eine Purkinje-Zelle, die wenige GABAerge Synapsen besitzt, könnte z. B. gezielt Pax2-Zellen in die ML leiten und in ihrem Einzugsgebiet platzieren, um nach Differenzierung der Pax2-Zellen weitere GABAerge Innervation zu erhalten. Über die Positionierung der Pax2-Zellen würde möglicherweise auch der Interneuron-Subtyp definiert. Es wäre sogar denkbar, dass die Präsynapsen bereits vor dem Kontakt zu der postsynaptischen Pax2-Zelle gebildet werden und Neurotransmitter freisetzen (Hume et al., 1983; Young und Poo, 1983). Daraufhin könnte eine Pax2-Zelle die Neurotransmitter über ihre Rezeptoren wahrnehmen und eine postsynaptische Spezialisierung ausbilden (Andreae und Burrone, 2014). Eine Wirkung über die Freisetzung von Neurotransmittern aus unreifen Axonen ist, wie bereits diskutiert, aufgrund des Effekts von TeNT auf die Geradlinigkeit der Migration eher unwahrscheinlich (Andreae et al., 2012).

Zusammenfassend beschreiben wir erstmalig eine direkte synaptische Innervation migrierender neuronaler Vorläuferzellen und identifizieren eine Steigerung der Geradlinigkeit ihrer Migration durch synaptische Innervation.

4.3 Ausblick

Die hier an Vorläuferzellen von inhibitorischen Interneuronen der ML des Cerebellums beobachtete direkte synaptische Innervation sowie die Abhängigkeit der Geradlinigkeit ihrer Migration von Synapsen werfen eine Reihe von Fragen auf.

Zunächst einmal sind weiterführende Fragen bezüglich ihrer synaptischen Innervation offen: Welche präsynaptischen Neurone bilden die Synapsen mit Pax2-Zellen? Wo sitzen die Synapsen auf den Pax2-Zellen? Sind sie tatsächlich transient, und wird eine Pax2-Zelle während der Wanderung von verschiedenen Zellen synaptisch kontaktiert? Besonders interessant wird es sein zu klären, welcher Mechanismus bzw. welche intrazellulären Prozesse den Einfluss von synaptischer Innervation auf die Geradlinigkeit der Pax2-Zellmigration vermitteln. Studien diesbezüglich könnten weitere mechanistische Details der Migrationssteuerung von Interneuron-Vorläuferzellen identifizieren.

Sehr interessant wird es auch zu klären, ob die direkte synaptische Innervation neuronaler Vorläuferzellen sowie die Abhängigkeit der Geradlinigkeit ihrer Migration von synaptischer Innervation auch in anderen Regionen des ZNS und eventuell des PNS nachweisbar sind.

Eine sich hiervon ableitende Schlüsselfrage ist, welche physiologische Bedeutung das hier beobachtete Phänomen für die Entwicklung und normale Funktion des Cerebellums oder ggf. anderer Hirnregionen hat. Gehen Störungen der synaptischen Innervation migrierender neuronaler Vorläufer ursächlich mit Migrationsstörungen und daraus resultierenden Funktionsdefiziten oder Erkrankungen (Barkovich et al., 2005; Penagarikano et al., 2011; Riviere et al., 2012) einher? Zur Bearbeitung dieser Frage könnte es hilfreich sein, die Migration in Munc18-1 Knockout-Mäusen zu untersuchen, in denen keine synaptische Neurotransmitter-Freisetzung stattfinden kann. Zwar scheint hier das ZNS embryonal histologisch weitgehend regelrecht aufgebaut zu sein. Allerdings wurde die Wanderung definierter neuronaler Zelltypen in diesen Tieren ebenso wenig untersucht wie ihre genaue Verteilung. Morphologisch subtilere, funktionell aber eventuell essentielle Fehlplatzierungen von Nervenzellen können daher

nicht ausgeschlossen werden, zumal in Munc18-1 Knockout-Mäusen nachgewiesenermaßen Neurone nach initial elektronenmikroskopisch normaler Synaptogenese apoptotisch werden (Verhage et al., 2000) und diese Mäuse eine wesentlich geringere Dichte an Synapsen haben (Bouwman et al., 2004).

Im Hinblick auf die Prävention oder Therapie möglicher Entwicklungsstörungen, die eventuell mit der synaptischen Innervation migrierender neuronaler Vorläufer assoziiert sein könnten, wird es auch interessant sein zu klären, welche Neurotransmitter die Richtungspersistenz regulieren. Unsere Patch-clamp-Messungen deuten an, dass die Geradlinigkeit von Pax2-Zellen über die Stimulation von GABA_A- und AMPA-Rezeptoren vermittelt werden könnte. Alternativ könnten auch metabotrope GABA- oder Glutamat-Rezeptoren eine Rolle spielen. Da mittels TeNT die gesamte synaptische Übertragung blockiert wurde, könnten jedoch auch Rezeptoren für andere Neurotransmitter oder sogar Substanzen, die zusammen mit Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln freigesetzt werden, den Effekt vermitteln. Weitere Neurotransmitter sind besonders dann in Betracht zu ziehen, wenn andere Hirnregionen als das Cerebellum untersucht werden sollen.

Zusammenfassend sind die wichtigsten Fragen, die sich aus den vorliegenden Arbeiten ergeben, ob migrierende neuronale Vorläuferzellen in anderen Hirnregionen ebenfalls direkt synaptisch innerviert sind, und welche Bedeutung synaptische Innervation für den korrekten Aufbau und die regelrechte Funktion des ZNS hat.

5. Zusammenfassung

Interneuron-Vorläuferzellen migrieren während der Entwicklung weite Strecken von den Orten, an denen sie generiert werden, zu ihren Bestimmungsorten, an denen sie sich differenzieren und synaptisch in neuronale Netzwerke eingebunden werden. Die Mechanismen, die ihre Migration, ihre nachfolgende Verteilung im Zielgebiet sowie ihre Zuordnung zu den zugehörigen, früher generierten Projektionsneuronen zwecks Netzwerkintegration präzise steuern, sind bisher noch unzureichend erforscht. Jedoch ist bekannt, dass Neurotransmitter bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen.

Als Modell zur Untersuchung migrierender Interneuron-Vorläuferzellen verwendeten wir 7–9 Tage alte Pax2-GFP-Mäuse. In diesen exprimieren postmitotische, Pax2-positive Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone („Pax2-Zellen“) das grün fluoreszierende Protein GFP vom Pax2-Locus. Sie wandern aus der weißen Substanz in den cerebellären Cortex und differenzieren sich um P7–9 überwiegend in die Korb-/Sternzellen der Molekularschicht.

Wir fragten uns:

1. Kann die Migration dieser Zellen in akuten cerebellären Schnitten dargestellt werden?
2. Welche grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften weisen die Zellen auf?
Sind sie möglicherweise bereits synaptisch innerviert?
3. Sollten sie bereits synaptisch innerviert sein, beeinflusst die direkte synaptische Innervation ihre Migration?

Die corticale Migration von Pax2-Zellen konnten wir mittels konfokaler xyt- und xyzt-Zwei-Photonen-Zeitraffer-Videomikroskopie in akuten Vermischnitten gut verfolgen.

Patch-clamp-Messungen zeigten, dass Pax2-Zellen als unreife neuronale Vorläuferzellen einen hohen Eingangswiderstand von meist mehr als 1 G Ω sowie eine geringe Membrankapazität von $9,4 \pm 0,4$ pF (Mittelwert \pm SEM) aufweisen. Sie exprimieren spannungsgesteuerte Kaliumkanäle vom A- und verzögert gleichrichtenden Typ. Da die Dichte spannungsgesteuerter Natriumkanäle relativ gering ist, generieren

Pax2-Zellen bei Injektion depolarisierender Ströme keine reifen Aktionspotentiale, sondern nur sogenannte Spikelets. Sie exprimieren zudem GABA_A- und AMPA-Rezeptoren, ionotrope Liganden-aktivierte Ionenkanäle für GABA bzw. Glutamat.

Unerwarteterweise waren etwa 70 % der Pax2-Zellen bereits während der Migration durch den cerebellären Cortex, d. h. vor Erreichen ihrer endgültigen Position, synaptisch innerviert. Alle synaptisch innervierten Pax2-Zellen waren glutamaterg innerviert, 81 % zusätzlich GABAerg.

Daraufhin untersuchten wir den Einfluss der synaptischen Innervation auf die Migration der Pax2-Zellen. Wir verglichen in drei akuten Vermischnitten mittels xyz-Zwei-Photonen-Zeitraffer-Videomikroskopie die Migration in ACSF („Kontrolle“) mit der Migration nach Blockade der Freisetzung synaptischer Vesikel durch Tetanustoxin. Die Ausschaltung der synaptischen Transmission durch Tetanustoxin verringerte die mediane Geschwindigkeit der Pax2-Zellmigration nur um etwa 17 %. Hingegen verkürzte sich der Median der zurückgelegten Distanz um etwa 42 %. Dementsprechend verringerte sich auch die Geradlinigkeit der Migration um 29 %. Zudem war die Richtungspersistenz der Migration beeinträchtigt. Wir schließen daraus, dass die synaptische Innervation wichtig ist, um migrierende Pax2-Zellen zu leiten.

Die vorgestellten Ergebnisse belegen, dass migrierende Vorläuferzellen cerebellärer inhibitorischer Interneurone bereits während ihrer Migration durch den cerebellären Cortex direkt synaptisch innerviert sind, und dass die Ausschaltung der synaptischen Innervation mittels Tetanustoxin die Geradlinigkeit ihrer Migration beeinträchtigt. Wir identifizieren einen Mechanismus, wie synaptische Aktivität während der Entwicklung die Positionierung von Interneuron-Vorläuferzellen und somit die Entwicklung neuronaler Netzwerke beeinflussen kann.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie des cerebellären Vermis	15
Abbildung 2: Pränatale (links) und postnatale (rechts) Entwicklung des Cerebellums	16
Abbildung 3: Corticale Migration der Interneuron-Vorläuferzellen	18
Abbildung 4: Pax2-BAC-Konstrukt #30	31
Abbildung 5: xyzt-Zwei-Photonen-Zeitraffer-Videomikroskopie	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Patch-clamp-Ableitung in der Ganzzellkonfiguration	41
Abbildung 7: Bestimmung des R_s sowie der passiven Membranparameter R_m und C_m	43
Abbildung 8: Pax2-Zellen in einem parasagittalen Vermischnitt einer P8 Pax2- GFP-Maus	52
Abbildung 9: Pax2-Zellen migrieren in akuten Schnitten weite Distanzen	53
Abbildung 10: Quantifizierung der Migration von Pax2-Zellen	57
Abbildung 11: Pax2-Zellen exprimieren spannungsgesteuerte Kalium- und Natriumkanäle	59
Abbildung 12: Pax2-Zellen generieren nach Injektion depolarisierender Ströme "Spikelets", aber keine reifen Aktionspotentiale	60
Abbildung 13: Pax2-Zellen exprimieren GABA _A -Rezeptoren und AMPA-Rezeptoren	63
Abbildung 14: Pax2-Zellen kommen während der Migration durch den cerebellären Cortex in engen Kontakt zu präsynaptischen Terminalen	65
Abbildung 15: Migrierende Pax2-Zellen sind synaptisch GABAerg und glutamaterg innerviert	67
Abbildung 16: Synaptische Innervation lenkt die Migration von Pax2-Zellen	71
Abbildung 17: Die synaptische Innervation unterstützt die Richtungspersistenz der Migration von Pax2-Zellen	73
Abbildung 18: Cerebelläre Pax2-mRNA-Expression an P4	77
Abbildung 19: Pax2-Zellen in der Molekularschicht werden elektronenmikroskopisch von präsynaptischen Terminalen kontaktiert	91

7. Literaturverzeichnis

Akiyama H, Kamiguchi H. Second messenger networks for accurate growth cone guidance. *Dev Neurobiol* 2015; 75: 411–422

Altman J, Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J Comp Neurol* 1985; 231: 42–65

Andreae LC, Ben Fredj N, Burrone J. Independent Vesicle Pools Underlie Different Modes of Release during Neuronal Development. *J Neurosci* 2012; 32: 1867–1874

Andreae LC, Burrone J. The role of neuronal activity and transmitter release on synapse formation. *Curr Op Neurobiol* 2014; 27: 47–52

Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at Purkinje axon initial segment. *Cell* 2004; 119: 257–272

Bagley JA, Belluscio L. Dynamic imaging reveals that brain-derived neurotrophic factor can independently regulate motility and direction of neuroblasts within the rostral migratory stream. *Neuroscience* 2010; 169: 1449–1461

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 2005; 65: 1873–1887

Barry PH, Lynch JW. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membrane Biol* 1991; 121: 101–117

Barski JJ, Hartmann J, Rose CR, Hoebeek F, Morl K, Noll-Hussong M, De Zeeuw CI, Konnerth A, Meyer M. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *J Neurosci* 2003; 23: 3469–3477

Batini C, Compoin C, Buisseret-Delmas C, Daniel H, Guegan M. Cerebellar nuclei and the nucleocortical projections in the rat: Retrograde tracing coupled to GABA and glutamate immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1992; 315: 74–84

Batschelet E. *Circular Statistics in Biology*. London: Academic Press, 1981

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

Behar TN, Schaffner AE, Tran HT, Barker JL. GABA-induced motility of spinal neuroblasts develops along a ventrodorsal gradient and can be mimicked by agonists of GABA_A and GABA_B receptors. *J Neurosci Res* 1995; 42: 97–108

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL. Differential Response of Cortical Plate and Ventricular Zone Cells to GABA as a Migration Stimulus. *J Neurosci* 1998; 18: 6378–6387

Bell CC, Han V, Sawtell NB. Cerebellum-Like Structures and Their Implications for Cerebellar Function. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 1–24

Benhamou S. How to reliably estimate the tortuosity of an animal's path: straightness, sinuosity, or fractal dimension? *J Theor Biol* 2004; 229: 209–220

Bolteus AJ, Bordey A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 2004; 24: 7623–7631

Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *TiPS* 2000; 21: 16–19

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

Bouwman J, Maia AS, Camoletto PG, Posthuma G, Roubos EW, Oorschot VMJ, Klumperman J, Verhage M. Quantification of synapse formation and maintenance in vivo in the absence of synaptic release. *Neuroscience* 2004; 126: 115–126

Bouzigues C, Morel M, Triller A, Dahan M. Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 11251–11256

Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA_A receptors. *J Physiol* 1996; 497: 753–759

Cameron DB, Kasai K, Jiang Y, Hu T, Saeki Y, Komuro H. Four Distinct Phases of Basket/Stellate Cell Migration after Entering their Final Destination (the Molecular Layer) in the Developing Cerebellum. *Dev Biol* 2009; 332: 309–324

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 2003; 6: 507–518

Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the Cerebellum. *Neuroscientist* 2008; 14: 91–100

Carter AG, Regehr WG. Prolonged synaptic currents and glutamate spillover at the parallel fiber to stellate cell synapse. *J Neurosci* 2000; 20: 4423–4434

Cesana E, Pietrajtis K, Bidoret C, Isope P, D'Angelo E, Dieudonne S, Forti L. Granule cell ascending axon excitatory synapses onto Golgi cells implement a potent feedback circuit in the cerebellar granular layer. *J Neurosci* 2013; 33: 12430–12446

Chan-Palay V. The recurrent collaterals of Purkinje cell axons: A correlated study of the rat's cerebellar cortex with electron microscopy and the Golgi method. *Z Anat Entwickl Gesch* 1971; 134: 200–234

Chavas J, Marty A. Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network. *J Neurosci* 2003; 23: 2019–2031

Chen R, Chung SH. Mechanism of tetrodotoxin block and resistance in sodium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 446: 370–374

Chilcote TJ, Galli T, Mundigl O, Edelmann L, McPherson PS, Takei K, De Camilli P. Cellubrevin and synaptobrevins: similar subcellular localization and biochemical properties in PC12 cells. *J Cell Biol* 1995; 129: 219–231

Cotton JLS, Partin KM. The contributions of GluR2 to allosteric modulation of AMPA receptors. *Neuropharmacology* 2000; 39: 21–31

Cuzon VC, Yeh PW, Cheng Q, Yeh HH. Ambient GABA Promotes Cortical Entry of Tangentially Migrating Cells Derived from the Medial Ganglionic Eminence. *Cereb Cortex* 2006; 16: 1377–1388

Das G, Nornes H. Neurogenesis in the cerebellum of the rat: An autoradiographic study. *Z Anat Entwickl Gesch* 1972; 138: 155–165

De Lima AD, Gieseler A, Voigt T. Relationship between GABAergic interneurons migration and early neocortical network activity. *Dev Neurobiol* 2009; 69: 105–123

De Marco Garcia NV, Karayannis T, Fishell G. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 2011; 472: 351–355

De Simoni A, Griesinger CB, Edwards FA. Development of rat CA1 neurones in acute Versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol* 2003; 550: 135–147

Dean I, Robertson SJ, Edwards FA. Serotonin drives a novel GABAergic synaptic current recorded in rat cerebellar Purkinje cells: a Lugaro cell to Purkinje cell synapse. *J Neurosci* 2003; 23: 4457–4469

Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990; 248: 73–76

Dieudonné S. Submillisecond kinetics and low efficacy of parallel fibre-Golgi cell synaptic currents in the rat cerebellum. *J Physiol* 1998; 510: 845–866

Doischer D, Aurel HJ, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, Vida I, Bartos M. Postnatal Differentiation of Basket Cells from Slow to Fast Signaling Devices. *J Neurosci* 2008; 28: 12956–12968

Dunn KW, Young PA. Principles of multiphoton microscopy. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 103: e33–e40

Evsyukova I, Plestant C, Anton ES. Integrative Mechanisms of Oriented Neuronal Migration in the Developing Brain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013; 29: 299–353

Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marín O. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 2004; 44: 251–261

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo MM. GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition. *Cell* 2001; 105: 521–532

Gao Z, Godbout R. Reelin-Disabled-1 signaling in neuronal migration: splicing takes the stage. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 2319–2329

Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GI, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 2006; 439: 589–593

Gianola S, Savio T, Schwab ME, Rossi F. Cell-Autonomous Mechanisms and Myelin-Associated Factors Contribute to the Development of Purkinje Axon Intracortical Plexus in the Rat Cerebellum. *J Neurosci* 2003; 23: 4613–4624

Goldowitz D, Hamre K. The cells and molecules that make a cerebellum. *TiNS* 1998; 21: 375–382

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 473–508

Haberlandt C, Derouiche A, Wyczynski A, Haseleu J, Pohle J, Karram K, Trotter J, Seifert G, Frotscher M, Steinhäuser C, Jabs R. Gray Matter NG2 Cells Display Multiple Ca^{2+} -Signaling Pathways and Highly Motile Processes. *PLoS ONE* 2011; 6: e17575

Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Palgrave Macmillan, 2001

Huang CM, Wang L, Huang RH. Cerebellar granule cell: ascending axon and parallel fiber. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1731–1737

Hume RI, Role LW, Fischbach GD. Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* 1983; 305: 632–634

Ikin AF, Annaert WG, Takei K, De Camilli P, Jahn R, Greengard P, Buxbaum JD. Alzheimer Amyloid Protein Precursor Is Localized in Nerve Terminal Preparations to Rab5-containing Vesicular Organelles Distinct from Those Implicated in the Synaptic Vesicle Pathway. *J Biol Chem* 1996; 271: 31783–31786

Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4137–4141

Jossin Y, Cooper JA. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci* 2011; 14: 697–703

Kalinovsky A, Boukhtouche F, Blazeski R, Bornmann C, Suzuki N, Mason CA, Scheiffele P. Development of Axon-Target Specificity of Ponto-Cerebellar Afferents. *PLoS Biol* 2011; 9: e1001013

Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med* 2005; 11: 572–577

Klemann CJHM, Roubos EW. The gray area between synapse structure and function - Gray's synapse types I and II revisited. *Synapse* 2011; 65: 1222–1230

Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 1993; 260: 95–97

Komuro H, Rakic P. Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci* 1995; 15: 1110–1120

Komuro H, Rakic P. Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca^{2+} fluctuations. *J Neurobiol* 1998; 37: 110–130

Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D. Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 2007; 10: 311–320

Kwon SE, Chapman E. Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons. *Neuron* 2011; 70: 847–854

Laine J, Axelrad H. Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 1998; 9: 2399–2403

Larramendi LMH, Lemkey-Johnston N. The distribution of recurrent Purkinje collateral synapses in the mouse cerebellar cortex: An electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1970; 138: 451–482

Larsell O. *Anatomy of the Nervous System*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1951

Larsell O. The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 1952; 97: 281–356

Lemkey-Johnston N, Larramendi LM. Types and distribution of synapses upon basket and stellate cells of the mouse cerebellum: an electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1968; 134: 73–112

Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 2002; 417: 645–649

Leto K, Carletti B, Williams IM, Magrassi L, Rossi F. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *J Neurosci* 2006; 26: 11682–11694

- Leto K, Bartolini A, Yanagawa Y, Obata K, Magrassi L, Schilling K, Rossi F. Laminar Fate and Phenotype Specification of Cerebellar GABAergic Interneurons. *J Neurosci* 2009; 29: 7079–7091
- Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 1978; 253: 5892–5894
- Liu SJ, Cull-Candy SG. Activity-dependent change in AMPA receptor properties in cerebellar stellate cells. *J Neurosci* 2002; 22: 3881–3889
- Liu S. Stellate Cells: Synaptic Processing and Plasticity. In: Manto M, Schmähmann J, Rossi F, Gruol D, Koibuchi N, Hrsg. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer Netherlands, 2013: 809–828
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1179–1187
- Llano I, Gerschenfeld HM. Inhibitory synaptic currents in stellate cells of rat cerebellar slices. *J Physiol* 1993; 468: 177–200
- Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, Arlotta P. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 2011; 69: 763–779
- Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 221–245
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJS, Davis MBE, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 1995; 15: 1287–1298
- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben Ari Y, Aniksztejn L, Represa A. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 2005; 25: 4755–4765

Manent JB, Represa A. Neurotransmitters and Brain Maturation: Early Paracrine Actions of GABA and Glutamate Modulate Neuronal Migration. *Neuroscientist* 2007; 13: 268–279

Maricich SM, Herrup K. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol* 1999; 41: 281–294

Marín O. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* 2013; 2019–2029

Marín O, Valdeolmillos M, Moya F. Neurons in motion: same principles for different shapes? *TiNS* 2006; 29: 655–661

Marín O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. Guiding neuronal cell migrations. *CSH Perspect Biol* 2010; 2: a001834

Marín O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JLR. Sorting of Striatal and Cortical Interneurons Regulated by Semaphorin-Neuropilin Interactions. *Science* 2001; 293: 872–875

Marshall J, Molloy R, Moss GW, Howe JR, Hughes TE. The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 1995; 14: 211–215

Martinez S, Andreu A, Mecklenburg N, Echevarria D. Cellular and Molecular Basis of Cerebellar Development. *Front Neuroanat* 2013; 7: 18

Metin C, Denizot JP, Ropert N. Intermediate Zone Cells Express Calcium-Permeable AMPA Receptors and Establish Close Contact with Growing Axons. *J Neurosci* 2000; 20: 696–708

Miale IL, Sidman RL. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 1961; 4: 277–296

Milescu LS, Bean BP, Smith JC. Isolation of somatic Na⁺ currents by selective inactivation of axonal channels with a voltage prepulse. *J Neurosci* 2010; 30: 7740–7748

Monyer H, Seeburg PH, Wisden W. Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 1991; 6: 799–810

Numberger M, Draguhn A. *Patch-Clamp-Technik*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1996

Osen-Sand A, Staple JK, Naldi E, Schiavo G, Rossetto O, Petitpierre S, Malgaroli A, Montecucco C, Catsicas S. Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J Comp Neurol* 1996; 367: 222–234

Otsu Y, Murphy TH. Miniature Transmitter Release: Accident of Nature or Careful Design? *Sci Signal* 2003; 2003: e54

Panzanelli P, Bardy C, Nissant A, Pallotto M, Sassoe-Pognetto M, Lledo PM, Fritschy JM. Early Synapse Formation in Developing Interneurons of the Adult Olfactory Bulb. *J Neurosci* 2009; 29: 15039–15052

Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 1993; 11: 1069–1082

Penagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E, Geschwind DH. Absence of CNTNAP2 Leads to Epilepsy, Neuronal Migration Abnormalities, and Core Autism-Related Deficits. *Cell* 2011; 147: 235–246

Pfeffer PL, Payer B, Reim G, di Magliano MP, Busslinger M. The activation and maintenance of Pax2 expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separate enhancers. *Development* 2002; 129: 307–318

Pla R, Borrell V, Flames N, Marín O. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci* 2006; 26: 6924–6934

Pusch M, Neher E. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch* 1988; 411: 204–211

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011

Rice DS, Curran T. Role of Reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1005–1039

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; 397: 251–255

Riviere JB, van Bon BWM, Hoischen A, Kholmanskikh SS, O'Roak BJ, Gilissen C, Gijssen S, Sullivan CT, Christian SL, Abdul-Rahman OA, Atkin JF, Chassaing N, Drouin-Garraud V, Fry AE, Fryns JP, Gripp KW, Kempers M, Kleefstra T, Mancini GMS, Nowaczyk MJM, van Ravenswaaij-Arts CMA, Roscioli T, Marble M, Rosenfeld JA, Siu VM, de Vries BBA, Shendure J, Verloes A, Veltman JA, Brunner HG, Ross ME, Pilz DT, Dobyns WB. De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome. *Nat Genet* 2012; 44: 440–444

Rosenberg SS, Spitzer NC. Calcium Signaling in Neuronal Development. *CSH Perspect Biol* 2011; 3: a004259

Rossi DJ, Hamann M. Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity $\alpha 6$ subunit GABA_A receptors and glomerular geometry. *Neuron* 1998; 20: 783–795

Ruigrok TJH, Hensbroek RA, Simpson JI. Spontaneous Activity Signatures of Morphologically Identified Interneurons in the Vestibulocerebellum. *J Neurosci* 2011; 31: 712–724

Rymar VV, Sadikot AF. Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J Comp Neurol* 2007; 501: 369–380

Sakmann B, Neher E. Single-Channel Recording. Springer, 1995

Sanchez-Alcaniz JA, Haege S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, Lopez-Bendito G, Stumm R, Marín O. Cxcr7 Controls Neuronal Migration by Regulating Chemokine Responsiveness. *Neuron* 2011; 69: 77–90

Satake S, Inoue T, Imoto K. Paired-pulse facilitation of multivesicular release and intersynaptic spillover of glutamate at rat cerebellar granule cell-interneurone synapses. *J Physiol* 2012; 590: 5653–5675

Schiavo GG, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, de Laureto PP, DasGupta BR, Montecucco C. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992; 359: 832–835

Schilling K. Specification and Development of GABAergic Interneurons. In: Manto M, Gruol DL, Schmähmann JD, Koibuchi N, Rossi F, Hrsg. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. New York Heidelberg: Springer, 2013: 207–235

Schilling K, Oberdick J. The Treasury of the Commons: Making Use of Public Gene Expression Resources to Better Characterize the Molecular Diversity of Inhibitory Interneurons in the Cerebellar Cortex. *Cerebellum* 2009; 8: 477–489

Schilling K, Oberdick J, Rossi F, Baader SL. Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 601–615

Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. Abnormal Cerebellar Development and Foliation in BDNF^{-/-} Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning. *Neuron* 1997; 19: 269–281

Shabel SJ, Proulx CD, Piriz J, Malinow R. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science* 2014; 345: 1494–1498

Shimono T, Nosaka S, Sasaki K. Electrophysiological study on the postnatal development of neuronal mechanisms in the rat cerebellar cortex. *Brain Research* 1976; 108: 279–294

Simat M, Ambrosetti L, Lardi-Studler B, Fritschy JM. GABAergic synaptogenesis marks the onset of differentiation of basket and stellate cells in mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 2239–2256

Smith TC, Wang LY, Howe JR. Heterogeneous conductance levels of native AMPA receptors. *J Neurosci* 2000; 20: 2073–2085

Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 1990; 249: 1580–1585

Sotelo C. Development of "Pinceaux" formations and dendritic translocation of climbing fibers during the acquisition of the balance between glutamatergic and gamma-aminobutyric acid inputs in developing Purkinje cells. *J Comp Neurol* 2008; 506: 240–262

Southan AP, Robertson B. Patch-clamp recordings from cerebellar basket cell bodies and their presynaptic terminals reveal an asymmetric distribution of voltage-gated potassium channels. *J Neurosci* 1998; 18: 948–955

Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 2006; 444: 707–712

Svoboda K, Yasuda R. Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience. *Neuron* 2006; 50: 823–839

Szapiro G, Barbour B. Multiple climbing fibers signal to molecular layer interneurons exclusively via glutamate spillover. *Nat Neurosci* 2007; 10: 735–742

Takács J, Hámori J. Developmental dynamics of Purkinje cells and dendritic spines in rat cerebellar cortex. *J Neurosci Res* 1994; 38: 515–530

Tan SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PPL, Reese BE, Faulkner-Jones B. Separate Progenitors for Radial and Tangential Cell Dispersion during Development of the Cerebral Neocortex. *Neuron* 1998; 21: 295–304

Tojima T, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H. Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 191–203

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 405–496

Trigo FF, Bouhours B, Rostaing P, Papageorgiou G, Corrie JET, Triller A, Ogden D, Marty A. Presynaptic Miniature Gabaergic Currents in Developing Interneurons. *Neuron* 2010; 66: 235–247

Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R. Membrane Potential of CA3 Hippocampal Pyramidal Cells During Postnatal Development. *J Neurophysiol* 2003; 90: 2964–2972

Ulbricht W. Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation. *Physiol Rev* 2005; 85: 1271–1301

Valiente M, Marín O. Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2010; 20: 68–78

Verderio C, Coco S, Bacci A, Rossetto O, De Camilli P, Montecucco C, Matteoli M. Tetanus Toxin Blocks the Exocytosis of Synaptic Vesicles Clustered at Synapses But Not of Synaptic Vesicles in Isolated Axons. *J Neurosci* 1999; 19: 6723–6732

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC. Synaptic Assembly of the Brain in the Absence of Neurotransmitter Secretion. *Science* 2000; 287: 864–869

Vohra BPS, Tsuji K, Nagashimada M, Uesaka T, Wind D, Fu M, Armon J, Enomoto H, Heuckeroth RO. Differential gene expression and functional analysis implicate novel mechanisms in enteric nervous system precursor migration and neuritogenesis. *Dev Biol* 2006; 298: 259–271

Voogd J, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum. *TiNS* 1998; 21: 370–375

Watanabe M, Kano M. Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 1697–1710

Watt AJ, Cuntz H, Mori M, Nusser Z, Sjöström PJ, Häusser M. Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat Neurosci* 2009; 12: 463–473

Weisheit G, Gliem M, Endl E, Pfeffer PL, Busslinger M, Schilling K. Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 466–478

Young SH, Poo MM. Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature* 1983; 305: 634–637

Zhang L, Goldman JE. Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 1996; 16: 47–54

Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, Gerstmann K, Steinecke A, Gampe C, Bolz J. Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J Neurosci* 2011; 31: 18364–18380

Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 2007; 10: 321–330

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zahlreichen Menschen herzlich danken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Karl Schilling. Dieser hat mir, zusammen mit Herrn Professor Dr. Christian Steinhäuser, das hier vorgestellte spannende Projekt zur Entwicklung inhibitorischer Interneurone im Cerebellum ermöglicht. Die zahlreichen hilfreichen und inspirierenden Gespräche und Diskussionen mit ihm zu wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Themen sowie seine wertvollen Ratschläge habe ich stets sehr geschätzt.

Ebenso herzlich danken möchte ich Herrn Professor Dr. Christian Steinhäuser. Auch dieser hat mich stets in vielfältiger Hinsicht unterstützt und hilfreich beraten. Ihm verdanke ich insbesondere auch die Möglichkeit, einen Großteil der Messungen unter hervorragenden Bedingungen in seinem Institut durchzuführen.

Weiterhin möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Ronald Jabs ganz herzlich für die hervorragende methodische und fachliche Betreuung in dem Projekt danken. Seine Ideen und zahlreiche lebhaften Diskussionen mit ihm haben maßgeblich zur Weiterentwicklung des Projekts beigetragen.

Allen Kollegen aus dem Institut für Zellulären Neurowissenschaften sowie dem Anatomischen Institut der Universität Bonn danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, stete Hilfsbereitschaft, zahlreiche Ratschläge und eine erlebnisreiche und bereichernde Zeit. Ganz besonders möchte ich Christian Haberlandt für die wertvolle produktive und vergnügliche Zusammenarbeit in dem Projekt danken.

Herrn Professor Dr. Johannes van der Want danke ich für die angenehme und produktive Kooperation im Bereich der Elektronenmikroskopie.

Herrn Professor Dr. Stein danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) verdanke ich das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 246, das mir, neben der finanziellen Unterstützung,

Einblicke in weitere Bereiche und Methoden der neurowissenschaftlichen Forschung und den wertvollen Austausch mit anderen Stipendiaten ermöglichte.

Meinen Freunden danke ich für zahlreiche gute Ratschläge und die Bereicherung des Lebens außerhalb des Labors. David Heilmann möchte ich darüber hinaus auch für das sorgfältige Lesen der Dissertation und die vielen hilfreichen Kommentare und Diskussionen danken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich dafür, dass sie mich stets in jederlei Hinsicht liebevoll unterstützt hat.