

Neuromodulatorische Wirkungen von  
Lysophosphatidsäure *in vitro*  
—  
Untersuchungen in der Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**ARNE BATTEFELD**

aus Bremen

Berlin 2011

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde an der

Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Centrum für Anatomie  
Institut für Zell- und Neurobiologie

im Bearbeitungszeitraum: vom 01.06.2007 - 30.03.2011 angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ulf Strauß

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger

Disputation am 14.12.2011

Im vorliegenden Text wurden Wörter kursiv gesetzt, für die es keine deutsche Übersetzung gibt bzw. die auf Grund von Konventionen kursiv geschrieben werden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>VII</b>
<b>2 Summary</b>	<b>IX</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>1</b>
3.1 Lysophosphatidsäure . . . . .	1
3.1.1 Synthese und Abbau von LPA . . . . .	2
3.1.2 LPA-Rezeptoren und Signalwege . . . . .	3
3.1.3 Wirkungen von LPA . . . . .	4
3.1.4 Lipidphosphatphosphatasen . . . . .	6
3.2 Entwicklung des ZNS . . . . .	6
3.2.1 Entwicklung des Neokortex . . . . .	7
3.2.2 Elektrische neuronale Eigenschaften während der entwicklungsabhängigen Migration im Neokortex . . . . .	9
3.3 Neuronale Plastizität . . . . .	11
3.3.1 Synaptische Plastizität . . . . .	11
3.3.2 Plastizität spannungsabhängiger Ströme . . . . .	11
3.4 Zielstellung dieser Arbeit . . . . .	13
<b>4 Materialien und Methoden</b>	<b>14</b>
4.1 Geräte . . . . .	14
4.2 Software . . . . .	14
4.3 Materialien . . . . .	15
4.3.1 Essentielle Verbrauchsgegenstände für elektrophysiologische Experimente . . . . .	15
4.3.2 Chemikalien . . . . .	15
4.3.3 Plasmide . . . . .	15
4.3.4 Zellkulturmedien und Materialien . . . . .	16
4.4 Lösungen . . . . .	17
4.4.1 Extrazelluläre Lösungen . . . . .	17
4.4.2 Intrazelluläre Lösungen . . . . .	18
4.5 Pharmaka . . . . .	18
4.6 Lysophosphatidsäure (LPA) . . . . .	19
4.7 Versuchstiere . . . . .	19
4.8 Beschichtung von Deckgläsern . . . . .	20
4.9 Präparation und Kultivierung von primären Mausneuronen . . . . .	20
4.10 <i>In utero</i> -Elektroporation . . . . .	21
4.11 Anfertigung von Gehirnschnitten . . . . .	22
4.11.1 Präparation von Mäusen E18 . . . . .	22
4.11.2 Präparation von Mäusen P5 bis Adult . . . . .	22

4.12	Experimentelle Setups . . . . .	23
4.13	Darstellung der Zellmorphologie mit Biocytin . . . . .	23
4.13.1	Aufnahme und Bearbeitung von mikroskopischen Bildern . . . . .	24
4.14	Erfassung und Analyse von elektrophysiologischen Daten . . . . .	24
4.14.1	Messung von primär kultivierten Neuronen . . . . .	25
4.14.2	Messung von Neuronen im akuten Gehirnschnitt . . . . .	25
4.14.3	Auswertung von allgemeinen Zellparametern . . . . .	25
4.14.4	Aufzeichnung und Analyse von minatur postsynaptischen Strömen (mPSCs)	27
4.14.5	Auswertung von schnellen einwärtsgerichteten und langsam auswärtsgerich-	
	teten Strömen . . . . .	28
4.14.6	Analyse von Aktionspotenzialen . . . . .	29
4.14.7	Auswertung von HCN medierten Strömen ( $I_h$ ) . . . . .	29
4.14.8	Statistik . . . . .	30
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
5.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von LPP1/1a-shRNA exprimierenden	
	Neuronen während der kortikalen Entwicklung . . . . .	31
5.1.1	Intrinsische Eigenschaften von Neuronen am Tag E18 . . . . .	32
5.1.2	Elektrophysiologisches Profil von Neuronen am Tag P5 . . . . .	37
5.1.3	Analyse der Aktionspotenziale . . . . .	40
5.1.4	Analyse der spontanen synaptischen Ströme an den Tagen E18 und P5 . . . .	43
5.1.5	Zusammenfassung Abschnitt 5.1 . . . . .	44
5.2	Einfluss von Lysophosphatidsäure auf die synaptische Transmission im akuten Ge-	
	hirnschnitt . . . . .	45
5.2.1	Intrinsische Eigenschaften der untersuchten pyramidalen Neurone der CA1-	
	Region . . . . .	45
5.2.2	LPA Applikation führte zu einem Anstieg von mEPSCs . . . . .	47
5.2.3	Einfluss von LPA auf die spontane inhibitorische synaptische Transmission .	48
5.2.4	LPA <sub>2</sub> -Rezeptor vermittelte LPA-Wirkung . . . . .	49
5.2.5	Einfluss von LPA auf pyramidale CA1 PRG1-KO-Neurone . . . . .	52
5.2.6	Zusammenfassung vom Abschnitt 5.2 . . . . .	54
5.3	Einfluss von Lysophosphatidsäure auf die synaptische Transmission in der primären	
	neuronalen Zellkultur . . . . .	55
5.3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von primär kultivierten hippocam-	
	palen Neuronen . . . . .	55
5.3.2	Verifizierung des LPA vermittelten Effekts . . . . .	56
5.3.3	Lokalisierung des LPA vermittelten Effekts . . . . .	59
5.3.4	Funktion des LPA <sub>2</sub> -Rezeptors . . . . .	61
5.3.5	Zusammenfassung Abschnitt 5.3 . . . . .	62
5.4	Untersuchungen zur LPA-Modulation des durch Hyperpolarisation aktivierten Stroms	
	und $I_h$ . . . . .	64

---

<b>6 Diskussion</b>	<b>66</b>
6.1 Kontext der LPA-Effekte . . . . .	67
6.1.1 Neuronale Entwicklung . . . . .	67
6.1.2 Modulation der synaptischen Transmission . . . . .	67
6.2 Mechanismen der LPA-Effekte . . . . .	68
6.2.1 Neuronale Entwicklung . . . . .	68
6.2.2 Intrinsische Ströme . . . . .	70
6.2.3 Synaptische Transmission . . . . .	73
6.3 Funktionelle Konsequenzen . . . . .	75
6.3.1 Klinische Implikationen . . . . .	77
6.4 Ausblick . . . . .	77
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>92</b>
7.1 Sequenzen . . . . .	92
7.2 Proteindomänenhomologie von LPP1 . . . . .	92
7.3 Klonierung, Expression und Charakterisierung von rHCN1 . . . . .	92
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>Publikationen</b>	<b>99</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>100</b>
<b>Danksagung</b>	<b>101</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>102</b>

## 1 Zusammenfassung

Dem bioaktiven Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA) wird ein Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose, Migration und Entwicklung im Nervensystem zugeschrieben, häufig über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums. Die LPA-Wirkungen werden über G-Protein gekoppelte LPA-Rezeptoren vermittelt. Vor dem Hintergrund des Nachweises von LPA-Rezeptoren im Gehirn und der Anwesenheit von Signalwegen ist das Interesse an LPA-Wirkungen im Gehirn gestiegen. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels der *patch-clamp*-Technik Aspekte der neuromodulatorischen Wirkung von LPA an Neuronen von Mäusen untersucht.

Während der Gehirnentwicklung wurden Funktionen von LPA beschrieben. Eine Familie von LPA abbauenden Enzymen sind die Lipidphosphatphosphatasen (LPP). Im Embryo führt ein verringertes LPP1/1a-Level in neokortikalen Neuronen zu einer retardierten Migration. Da die Entwicklung von Ionenströmen eng mit der Migration von Neuronen gekoppelt ist, wurde in dieser Arbeit ein elektrophysiologisches Profil von diesen Neuronen erstellt. Neurone, die am embryonalen Tag 18 unabhängig vom LPP1/1a-Level ihren Zielort erreichten, unterschieden sich elektrophysiologisch nicht von den Neuronen der Kontrolle. Hingegen waren Neurone, die sich durch Expression von shRNA in tieferen Schichten befanden, nicht in der Lage, regenerative Potenziale zu generieren. Ein wahrscheinlicher Grund war ein ausgeglichenes Verhältnis von einwärts- und auswärtsgerichteten Strömen im Gegensatz zu einem größeren Verhältnis von einwärtsgerichteten Strömen in Kontrollneuronen. Am postnatalen Tag 5 befanden sich diese Neurone in der Schicht 5 und unabhängig von ihrem LPP1/1a-Gehalt waren sie elektrophysiologisch nicht mehr zu unterscheiden. Die Migrationshemmung führte damit zur einer verlangsamten Stromentwicklung und einer anschließenden elektrophysiologischen Reorganisation von betroffenen Neuronen im Neokortex.

Im akuten Gehirnschnitt konnte gezeigt werden, dass Neurone der CA1-Region des Hippocampus mit Veränderungen auf LPA reagierten. Extrazellulär appliziertes LPA führte zu einem Anstieg von spontanen exzitatorischen synaptischen Strömen (mEPSCs). Hingegen war die inhibitorische synaptische Transmission durch LPA-Applikation nicht verändert. Die Erhöhung der mEPSC-Frequenz war über die Aktivierung von LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt. Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus wurde in der primären hippocampalen Neuronenkultur eine genauere Lokalisation des LPA-Effekts untersucht. Im Gegensatz zu Neuronen in akuten Gehirnschnitten wurde in diesem *in-vitro* Modell nach LPA-Applikation kein Anstieg der Frequenz der mEPSCs gemessen, sondern ein Abfall. Auch hier wurde keine Modulation der inhibitorischen synaptischen Transmission sowie der mEPSCs in LPA<sub>2</sub>-Rezeptor *knock-out*-Neuronen beobachtet. Die wahrscheinlichste Modulation durch Calcium wurde im Anschluss untersucht. Die Pufferung von postsynaptischem Calcium verringerte die mEPSC-Frequenz nach LPA. Hingegen war ohne Calcium in der extrazellulären Umgebung keine Reduktion der mEPSCs nach LPA-Applikation zu beobachten. Die gegenläufigen Resultate deuteten darauf hin, dass möglicherweise astrozytäre Faktoren benötigt werden oder andere Kulturartefakte ein Problem sind.

Der durch Hyperpolarisation aktivierte, zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Kationenstrom  $I_h$  kann von G-Proteinsignalwegen moduliert werden. Die Aktivierung von LPA-Rezeptoren könnte daher zu einer Modulation von  $I_h$  führen. Eine putative Modulation dieses Stroms wurde an Neuronen

der CA1-Region untersucht. Somatische Messungen zeigten keine Veränderung des Stroms. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Rezeptoraktivierung entweder nicht spezifisch ist oder eine Stromveränderung nicht gemessen werden kann.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse machen deutlich, dass Lysophosphatidsäure zu vorübergehenden als auch dauerhaften physiologischen Veränderungen in Neuronen führt. Diese Erkenntnisse können damit den Ausgangspunkt für weiterführende Studien darstellen.

## 2 Summary

The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid (LPA) has an impact on cell-proliferation, apoptosis, cell-migration and development in the central nervous system, often via increases in intracellular calcium  $[Ca^{2+}]_i$  levels. The majority of the described LPA actions are g-protein mediated and both, receptors and signaling pathways are present in the brain. Thus, LPA mediated actions in the brain came into focus. In this thesis the patch-clamp technique was utilized to investigate neuromodulatory actions of LPA in mouse neurons.

During brain development LPA actions are described. A family of LPA degrading enzymes the lipidphosphate phosphatases (LPPs) are present early in development. Reduced levels of LPP1/1a via shRNA in the embryonic brain resulted in a slowed migration of neocortical neurons. Neurons with changed LPP1/1a levels were electrophysiological profiled, because the maturation of ionic currents is tightly coupled to the migration of neurons. Neurons reaching their target at embryonic day 18 independent of their LPP1/1a levels did not differ. However, neurons that migrated slower due to shRNA expression did not generate regenerative potentials. A probable underlying cause was the same ratio of inward and outward rectifying conductances in contrast to a higher inward ratio in controls. On postnatal day 5 these neurons were mostly in layer 5 and no longer electrophysiologically different. In conclusion, the migration deficit lead to a delayed current development and an electrophysiological re-organisation of affected neurons in the neocortex.

CA1 hippocampal neurons in acute brain slices responded to LPA. When LPA was applied extracellularly miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) increased in frequency. However, the inhibitory miniature postsynaptic currents (mIPSCs) were unchanged. The mEPSC increase was mediated by  $LPA_2$ -receptors as there was no increase in  $LPA_2$ -receptor knock-out mice. Further investigations were carried out in primary cultured hippocampal neurons to pin-point the LPA localisation. Contrary to acute slices the *in vitro* model responded with a reduction of mEPSCs. Neither mIPSCs of wildtype nor mEPSCs of  $LPA_2$  knock-out neurons were changed. The most probable modulation by calcium was further investigated. Buffering postsynaptic  $[Ca^{2+}]_i$  and applying LPA reduced mEPSCs whereas no reduction was observed after omitting extracellular  $Ca^{2+}$ . These contrary results between acute slices and cultured neurons point to an involvement of glial factors and/ or artifacts as a result of culturing.

Furthermore, the hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated current  $I_h$  can be modulated by g-protein signaling cascades. Activation of these, therefore, could lead to  $I_h$  modulation. A putative modulation was investigated in CA1 neurons, but somatic whole-cell recordings revealed no change of  $I_h$ . These results show that LPA-receptor activation is either not specific or a modification of  $I_h$  cannot be measured.

Taken together these data show that lysophosphatidic acid has transient and long lasting physiological implications in neurons. Furthermore, the conducted experiments might be the starting point for future studies.

### 3 Einleitung

Zu den eindrucksvollsten Leistungen des Gehirns gehören Lernen, Speichern sowie Abrufen von Informationen zum jeweils richtigen Zeitpunkt. Diesen Vorgängen liegt eine komplexe zelluläre Maschinerie zu Grunde, die aus einem Netzwerk von Neuronen besteht. Die Verbindung zwischen einzelnen Neuronen wird durch Synapsen gewährleistet, deren Hauptfunktion die Übersetzung von Aktionspotenzialen (elektrisches Signal) in ein chemisches Signal ist, das in Form von Botenstoffen (Transmittern) von der Präsynapse erzeugt wird (Kandel et al., 2000). Eine Freisetzung von Transmittern erfolgt dabei aus Vesikeln, die in der Präsynapse lokalisiert sind. Synapsen werden während der Gehirnentwicklung gebildet (Synaptogenese), dennoch sind einmal gebildete Synapsen nicht statisch, sondern verändern sich je nach Benutzungsgrad. Für die Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) ist die richtige Ausbildung von Neuronen und ihren Verbindungen durch Synapsen essentiell, da Störungen während der Entwicklung zu Fehlfunktionen oder Missbildungen führen. An der Entwicklung und Modulation sind vielfältige Signalwege sowie Modulatoren beteiligt. Eine Gruppe von Modulatoren sind Lipide und deren Derivate, welche ubiquitäre Zellbestandteile sind (Alberts et al., 2002) und die mehr als die Hälfte des Trockengewichts des Gehirns ausmachen (Piomelli et al., 2007). Untersuchungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass Lipide im Gehirn in vielfältiger Form von der Entwicklung bis zur Verarbeitung von komplexen Verhaltensweisen (Piomelli et al., 2007) eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Untersuchungen zu Lysophosphatidsäure, einem Phospholipid, durchgeführt. Diese Lipiduntergruppe ist durch eine oder mehrere Phosphatgruppen gekennzeichnet und kommt ubiquitär im Organismus vor. Die vielfältigen beschriebenen Wirkungen wurden mit der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Verbindung gebracht, außerdem sind die Stoffwechselwege für die Synthese von Phospholipiden sowie zugehörige Signaltransduktionswege im Gehirn vorhanden (Choi et al., 2010). Weiterführende Erkenntnisse zu Phospholipiden können daher zum tieferen Verständnis der Funktionsweise des Gehirns beitragen.

#### 3.1 Lysophosphatidsäure

Sowohl während der Gehirnentwicklung als auch im adulten Gehirn werden viele Stoffwechselprozesse sowie Ionenströme von G-Protein abhängigen Signalkaskaden moduliert. Ein möglicher Aktivator von G-Proteinen ist das einfachste Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA), welches in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer neuronalen Modulation untersucht wurde. LPA (1-Acyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphat; Strukturformel siehe Abbildung 1) besteht aus einem Molekül Glycerol ( $C_3H_8O_3$ ), einer Hydroxylgruppe, einer Phosphatgruppe sowie einer Fettsäurekette (Pagès et al., 2001). Die Positionen der Hydroxylgruppe und der Fettsäurekette können variieren, wodurch sie sich entweder an der sn-2- oder der sn-1-Position befinden. In Abbildung 1 ist in der LPA-Strukturformel die Fettsäurekette an der sn-1-Position eingezeichnet. Über eine Acyl- oder Alkylgruppe ist die Fettsäure mit Glycerol verbunden und besteht entweder aus einer gesättigten Fettsäure (C18:0, C16:0) oder einer ungesättigten Fettsäure (C18:1, C20:4) (Pagès et al., 2001), wobei die Länge der Acylkette im Gewebe von der Art des Vorläuferphospholipids abhängt (Choi et al., 2010).

An der sn-3-Position ist jeweils die Phosphatgruppe mit Glycerol verestert. Die Bezeichnung LPA bezieht sich meistens auf das C18:1 Molekül, welches hauptsächlich experimentell benutzt wird (Choi et al., 2010).

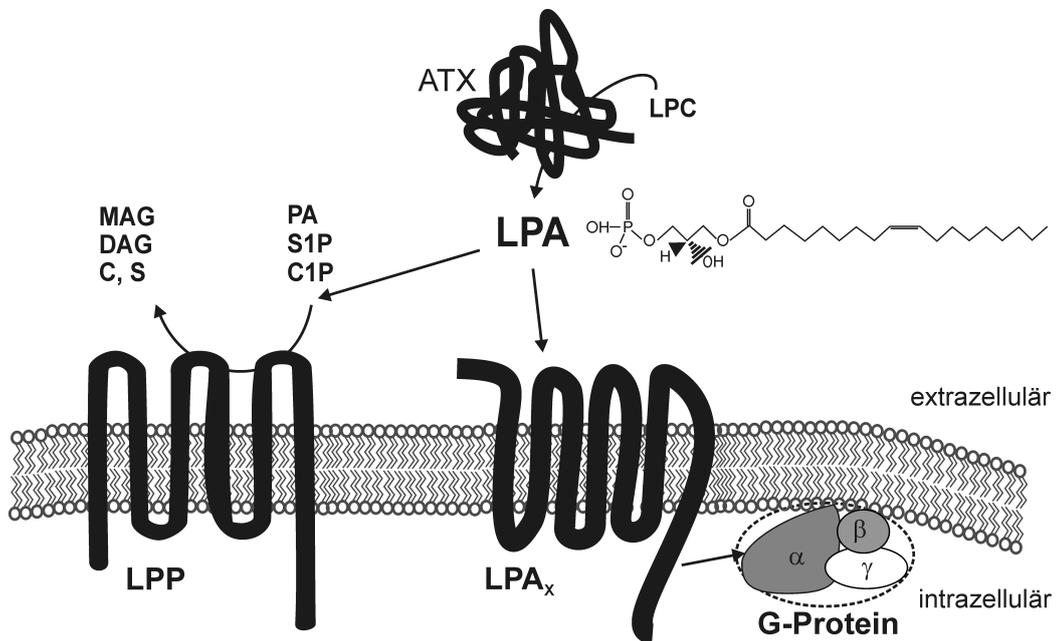


Abbildung 1: **Synthese, Rezeptoren und Abbau von LPA**

Gezeigt sind drei wichtige Proteine des LPA-Stoffwechsels und Signalerkennung (schwarz) und Wege der LPA-Wirkung bzw. des LPA-Abbaus. LPA (auch als Strukturformel abgebildet) wird von Autotaxin (ATX) durch Hydrolyse von Lysophosphatidylcholin (LPC) gebildet. LPA bindet an Rezeptoren (LPA<sub>x</sub>) oder wird von Lipidphosphatphosphatasen zu Monoacylglycerol umgebaut. Eine Bindung an LPA-Rezeptoren führt zur Aktivierung einer membranständigen G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit und der Dissoziation dieser vom inaktiven G-Protein-Komplex bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Lipidphosphatphosphatasen sind in der Lage eine Anzahl von Substraten *in vitro* umzusetzen. Die Abkürzungen stehen für: LPA – Lysophosphatidsäure; PA – Phosphatidsäure; S1P – Sphingosin-1-Phosphat; C1P – Ceramid-1-Phosphat. Auf der linken Seite sind die entsprechenden Produkte nach Abspaltung einer Phosphatgruppe angegeben. Die Abkürzungen bezeichnen: MAG – Monoacylglycerol; DAG – Diacylglycerol; S – Sphingosin; C – Ceramid. (Zusammengestellt aus: Hama und Aoki, 2010; Aoki et al., 2008; Piomelli et al., 2007).

### 3.1.1 Synthese und Abbau von LPA

Die LPA-Synthese erfolgt hauptsächlich extrazellulär durch zwei wichtige Stoffwechselwege. Im ersten Syntheseweg wird aus Phospholipiden der Membran durch das Enzym Phospholipase D ein Zwischenprodukt gebildet, welches von Phospholipase A<sub>2</sub> zu LPA umgesetzt wird. Der zweite Syntheseweg findet über die Bildung von z.B. Lysophosphatidylcholin durch Phospholipase A<sub>2</sub> statt, welches durch die extrazellulär lokalisierte Lysophospholipase D, nachfolgend nur noch als Autotaxin (ATX) bezeichnet, zu LPA synthetisiert wird (Choi et al., 2010; Bräuer und Nitsch, 2008). Mäuse, die heterozygot für Autotaxin sind (8-12 Wochen alt), besitzen ein reduziertes LPA-Level im Plasma (van

Meeteren et al., 2006), was darauf hindeutet, dass extrazellulär befindliches LPA hauptsächlich über Autotaxin generiert wird.

Da LPA als Signalmolekül fungiert, ist eine biologische Inaktivierung von Bedeutung. Einer der wichtigsten Abbaupfade erfolgt über eine Dephosphorylierung von LPA durch membranständige Lipidphosphatphosphatasen (LPPs) und führt zur Bildung von Monoacylglycerol (MAG, siehe Abbildung 1, Pyne et al., 2005). Die Lipidphosphatphosphatasen-Familie wird der Superfamilie der Phosphatasen zugeordnet und beinhaltet 3 Mitglieder: LPP1, LPP2 und LPP3, zusätzlich wurde LPP1a beschrieben, eine Splicevariante von LPP1 (Brindley und Pilquil, 2009). Außer LPA können diese Phosphatasen auch die verwandten Phospholipide Phosphatidsäure, Sphingosin-1-Phosphat und Ceramid-1-Phosphat *in vitro* dephosphorylieren (Roberts et al., 1998). Alternativ kann LPA durch eine Acyltransferase zu Phosphatidsäure abgebaut werden (Saba, 2004).

### 3.1.2 LPA-Rezeptoren und Signalwege

Die Mehrzahl der LPA-Wirkungen werden über membranständige G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt, die als LPA<sub>1-5</sub>-Rezeptoren bezeichnet werden. Es gibt Unterschiede in der Gewebeexpression und den jeweils aktivierbaren Signalwegen (Choi et al., 2010, und Tabelle 1). LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub> (Hecht et al., 1996; An et al., 1998; Bandoh et al., 1999) sind näher miteinander verwandt als die zwei anderen Rezeptoren LPA<sub>4</sub> (Lee et al., 2007) und LPA<sub>5</sub> (Lee et al., 2006), die Purinrezeptoren ähneln (Choi et al., 2010). Drei weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>10</sub> und GPR87 (Yanagida et al., 2009; Murakami et al., 2008; Tabata et al., 2007), werden zur Zeit als putative LPA-Rezeptoren diskutiert (Choi et al., 2010). Der erste identifizierte Rezeptor LPA<sub>1</sub> ist ein Protein mit 7 prognostizierten Transmembrandomänen (Hecht et al., 1996). Neben diesen extrazellulär lokalisierten Rezeptoren wurde auch die Bindung von LPA an den intrazellulär lokalisierten Rezeptor *peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$  beschrieben (McIntyre et al., 2003).

Das Gehirn ist eines der Organe, in denen LPA-Rezeptoren prominent exprimiert werden. Bereits ab dem embryonalen Tag 12,5 wird LPA<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA in Zellen der ventrikularen Zone (Hecht et al., 1996) exprimiert. Auch LPA<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA ist im sich entwickelnden Gehirn ab Tag E12,5 detektierbar (Ohuchi et al., 2008). Weiterhin wird LPA<sub>4</sub>-Rezeptor-mRNA zwischen den embryonalen Tagen 13,5 und 15,5 (Lee et al., 2007) detektiert. In adulten Stadien kommt mRNA der LPA<sub>1</sub>- (Hecht et al., 1996) und LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren (An et al., 1998) in Gesamthirnextrakten vor. Außerdem zeigt eine weitere Studie die Expression der LPA-Rezeptoren 1-3 im adulten Maushirn (Goldshmit et al., 2010). Neben diesen Gesamthirn- oder Gehirnextraktstudien ist eine genauere Lokalisation der LPA-Rezeptoren in Primärkulturen von unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. Kortikale Mausneurone, die am Tag E12 präpariert und nach einem Tag *in vitro* analysiert wurden, exprimieren hauptsächlich LPA<sub>2</sub>-Rezeptor und schwach LPA<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA (Fukushima et al., 2002). Hingegen zeigen primär kultivierte hippocampale Mausneurone (präpariert E18) nach 4 Tagen *in vitro* sowohl eine Expression von LPA<sub>2</sub> als auch LPA<sub>1</sub> (Kieselmann, 2010). Nach 14 Tagen in Kultur wird auch in diesen Neuronen LPA<sub>2</sub> viel stärker exprimiert als LPA<sub>1</sub> und Transkripte von LPA<sub>3</sub>, LPA<sub>4</sub> und LPA<sub>5</sub> sind nicht nachweisbar (Kieselmann, 2010). Auf Proteinebene zeigen immunhistochemische Untersuchungen eine neuronale Lokalisation des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors auf der präsynaptischen Seite von

glutamatergen Synapsen (Trimbuch et al., 2009).

Die Kopplung von LPA-Rezeptoren an G-Proteine führt nach Rezeptoraktivierung zur intrazellulären Verstärkung des Signals. LPA-Rezeptoren sind an die G-Proteine  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$  und  $G_s$  gekoppelt (für eine rezeptorspezifische Übersicht der aktivierbaren Signalkaskade siehe Tabelle 1). Die aktivierte Signalkaskade ist für jeden LPA-Rezeptor vom jeweiligen Zelltyp oder Gewebe abhängig (Hama und Aoki, 2010). Daher besteht die Möglichkeit, dass nicht jeder aktivierbare Signalweg in Neuronen vorhanden ist. In Neuronen kann eine LPA-Rezeptor gekoppelte  $G_{i/o}$ -Aktivierung zu einer Reduktion von cAMP oder  $G_s$ -Aktivierung zu einem Anstieg von cAMP führen (Neves et al., 2002). Eine Aktivierung von  $G_{q/11}$  durch LPA-Rezeptoren führt zu einem PLC vermittelten Anstieg des intrazellulären Calciumniveaus (Contos et al., 2002).

Um die Spezifität des Signals zu erhalten und eine erneute Aktivierung zu ermöglichen, erfolgt eine Abschaltung von aktivierten LPA-Rezeptoren. Einerseits wird auf intrazellulärer Seite das Signal automatisch abgeschaltet, indem die intrinsische Phosphataseaktivität der G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit GTP zu GDP konvertiert. Damit verbunden sind eine Inaktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit und eine nachfolgende Assoziation mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zu einem erneut aktivierbaren Proteinkomplex. Des Weiteren ist eine Endozytose des LPA<sub>1</sub>-Rezeptors beschrieben (Murph et al., 2003; Moolenaar et al., 2004) wodurch eine Abschaltung des Signals vermutet wird. Eine Endozytose nach Rezeptoraktivierung ist unter G-Protein gekoppelten Rezeptoren weit verbreitet (Ferguson, 2001), zusätzlich wäre eine Desensitivierung des Rezeptors denkbar, wie für andere G-Protein gekoppelten Rezeptoren beschrieben ist (Ferguson, 2001). Außerdem kann, wie bereits erwähnt, LPA auf der extrazellulären Seite von LPPs dephosphoryliert und damit biologisch inaktiviert werden (Hooks et al., 2001). Eine Neusynthese von LPA wird durch die Autoinhibition auf das produzierende Enzym Autotaxin verhindert, so dass weniger LPA aus LPC synthetisiert wird (van Meeteren et al., 2005).

LPA-Rezeptor	G-Protein Kopplung	Signalweg
LPA <sub>1</sub>	$G_{i/o}$ , $G_{q/11}$ , $G_{12/13}$	PI-3K, PLC, RhoGEF
LPA <sub>2</sub>	$G_{i/o}$ , $G_{q/11}$ , $G_{12/13}$	PI-3K, PLC, RhoGEF
LPA <sub>3</sub>	$G_{i/o}$ , $G_{q/11}$	PI-3K, PLC
LPA <sub>4</sub>	$G_{i/o}$ , $G_{q/11}$ , $G_{12/13}$ , $G_s$	PI-3K, PLC, RhoGEF, Adenylatcyclase
LPA <sub>5</sub>	$G_{q/11}$ , $G_{12/13}$	PLC, RhoGEF

Tabelle 1: **LPA-Rezeptoren, ihre G-Protein Kopplung und die aktivierbaren Signalwege.** Zusammengestellt aus Moolenaar et al. (2004); Neves et al. (2002); Noguchi et al. (2009). Abkürzungen: PI-3K - Phosphoinositol-3 Kinase, PLC - Phospholipase C, RhoGEF - *Rho-specific exchange factor*.

### 3.1.3 Wirkungen von LPA

Die beschriebenen Wirkungen von LPA sind abhängig von den untersuchten Zellen bzw. Geweben und es sind zahlreiche Wirkungen in der Literatur beschrieben. In diesen Publikationen wurden ein Einfluss oder eine Modulation durch LPA auf die Fortpflanzung, die generelle Entwicklung von Em-

bryonen, die Entwicklung von Blutgefäßen, die Apoptose, die Zellmigration und das Zentrale Nervensystem dargestellt (Choi et al., 2010).

### 3.1.3.1 LPA-Effekte während der Gehirnentwicklung

Durch die unterschiedliche Rezeptorexpression und die daraus resultierende unterschiedliche Aktivierung von Signalkaskaden (siehe Tabelle 1) sind die beobachteten Effekte im Gehirn mannigfaltig. Zu erwähnen sind u.a., dass eine *ex vivo*-Kultivierung von Maushirnen in LPA-haltigem Medium zu einer Einfaltung des Neokortex führt (Kingsbury et al., 2003) und ein Fehlen des LPA<sub>1</sub>-Rezeptors eine verringerte Neurogenese im Gyrus Dentatus (Matas-Rico et al., 2008) zur Folge hat. Weiterhin wurde in einer Nebenlinie der LPA<sub>1</sub>-Rezeptor-*knock-out*-Maus eine gestörte Schichtenbildung des Kortex beobachtet (Estivill-Torrús et al., 2008). Weiterhin bewirkt LPA im ZNS zelluläre Antworten wie Proliferation, Änderung der Zelldifferenzierung, Zelladhäsion (Goetzl und An, 1998) und eine Retraktion von Neuriten (Kranenburg et al., 1999).

### 3.1.3.2 Modulation von Ionenströmen durch LPA

Neben einer generellen Wirkung von LPA auf Entwicklungsprozesse des Gehirns sind die Modulationen, Änderung der Aktivierung und Inaktivierung von unterschiedlichen Ionenströmen oder Ionenkanaluntereinheiten durch LPA beschrieben. Da Ionenkanäle für die Erregbarkeit und elektrische Aktivität von Neuronen essentiell sind, können Änderungen der Ströme zu einer funktionellen Veränderung des neuronalen Netzwerkes führen. So ruft LPA-Applikation in Zellen der Zelllinie N1E-115 (Neuro-Blastom abgeleitet) eine G<sub>α13</sub>-Aktivierung hervor, der eine Chlorid mediierte Depolarisation folgt (Postma et al., 2001). Mikrogliazellen reagieren auf LPA mit einer Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen (Schilling et al., 2002). In primär kultivierten Ganglienzellen der Radix dorsalis führt LPA zu einer Hyperpolarisation der Aktivierungs- und Deaktivierungskurve von Natriumströmen sowie zu einer Konduktivitätszunahme von TTX-resistenten Natriumströmen (Lee et al., 2005). Außerdem kann LPA-Applikation im selben Zelltyp zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums (Elmes et al., 2004) führen. Weiterhin wird in akut dissoziierten Ganglienzellen der Radix dorsalis durch LPA ein Calciumstrom vom T-Typ hochreguliert, was durch die Untereinheit Ca<sub>v</sub>3.2 vermittelt wird (Iftinca et al., 2007). Im Gegensatz dazu werden im Expressionssystem und in Neuronen einer *in vitro*-Präparation des lateralen habenularen Nukleus Ca<sub>v</sub>3.1 und Ca<sub>v</sub>3.3 vermittelte T-Typ Calciumströme durch LPA (via Rho-Aktivierung) inhibiert (Iftinca et al., 2007). Auch in hippocampalen Neuronen *in vitro* ist nach einer Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch extrazelluläres LPA ein Anstieg des intrazellulären Calciums zu beobachten, der sich aber durch Blockade von AMPA/Kainat- und NMDA-Rezeptoren verringern oder ganz verhindern lässt (Holtsberg et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass LPA bereits an E11/E12 in kortikalen Vorläuferzellen neurotransmitterähnliche Ströme induzieren kann (Dubin et al., 1999) und damit eher als GABA<sub>A</sub> oder L-Glutamat auftritt.

Unabhängig von einer LPA-Rezeptoraktivierung werden die mechano-sensitiven Kalium leitenden Kanäle TREK-1, TREK-2 und TRAAK durch LPA moduliert. In primär kultivierten striatalen Neuronen verändern sich, nach LPA-Applikation auf die intrazelluläre Membranseite, die normalerweise mechano-sensitiven Kanäle zu *leak conductances*. Die maximale Wirkung wird mit einer

Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  LPA erreicht (Chemin et al., 2005). Dies ist eine Konzentration, die oft in Experimenten benutzt wird (siehe unter anderem: Bandoh et al., 1999; Bernhart et al., 2010; Bräuer et al., 2003; Hains et al., 2006; Todorova et al., 2009). Extrazellulär appliziertes LPA in Ganglienzellen der Radix dorsalis inhibiert hingegen TREK-1 medierte Ströme. Diese Inhibition erfolgt wahrscheinlich über den LPA<sub>1</sub>- oder LPA<sub>3</sub>-Rezeptor, da eine spezifische Blockade dieser Rezeptoren die Inhibition verhindert (Cohen et al., 2009).

### 3.1.4 Lipidphosphatphosphatasen

LPPs sind an der Inaktivierung bzw. dem Abbau von LPA durch ihre Phosphataseaktivität (Abschnitt 3.1.1) beteiligt. LPPs besitzen sechs Transmembrandomänen und sind entweder in der Zellmembran oder intrazellulären Membran lokalisiert (Brindley und Pilquil, 2009). Es gibt drei aktive Domänen, die sich alle auf der extrazellulären Seite befinden und für die Phosphataseaktivität verantwortlich sind (Brindley, 2004). Die Proteine werden nicht durch *N*-Ethylmaleimid inhibiert und Magnesium wird nicht für die Aktivität benötigt (Zhang et al., 2000). Alle Mitglieder der LPPs werden gewebe-spezifisch exprimiert unter anderem auch im Gehirn (Sigal et al., 2005). Im Neokortex wurde eine Expression von LPP1 ab E14 gezeigt (Velmans, 2010). LPPs können *in vitro* LPA, Phosphatidsäure (PA), Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Ceramid-1-Phosphat (C1P) dephosphorylieren, dabei zeigen sie eine unterschiedliche Substratspezifität und in Bezug auf LPP1 ist diese LPA > PA > S1P > C1P (Roberts et al., 1998).

LPPs wurden durch Homologievergleiche als verwandte Gruppe zu den *wun*-Genen aus *Drosophila* im Menschen (Kai et al., 1997) und in der Maus (Zhang et al., 2000) identifiziert. Bereits 1996 konnte gezeigt werden, dass *wun* zur richtigen Wanderung bzw. Orientierung von Keimzellen benötigt wird (Zhang et al., 1996). In einer weiteren Studie wurden die genomische Lokalisation bestimmt und Ähnlichkeiten zu Lipidphosphatphosphatasen festgestellt. Daher wurde vermutet, dass das Proteinprodukt *wun* am Lipid-Metabolismus beteiligt ist (Zhang et al., 1997). Im beschriebenen Phänotyp (Zhang et al., 1997) liegen zwei Gene, *wun* und *wun2* (Starz-Gaiano et al., 2001), die beide redundant wirken und in den beschriebenen Mutanten beide betroffen sind (Starz-Gaiano et al., 2001). Die katalytische Aktivität der *wun*-Proteine wird benötigt, damit diese Zellen nicht vom Zielort der Wanderung abgewiesen werden (Starz-Gaiano et al., 2001). In Maus-Fibroblasten wurde gezeigt, dass LPP1 eine Rolle bei der LPA induzierten Migration spielt (Long et al., 2006). Im Gehirn von embryonalen Mäusen wurde durch shRNA *knock-down* von LPP1/1a die Migration von Neuronen im embryonalen Neokortex verändert und auch am Tag P5 waren nur wenige der betroffenen Neurone in der richtigen Schicht anzutreffen (Velmans, 2010).

## 3.2 Entwicklung des ZNS

Während der embryonalen Entwicklung entsteht die Vorläuferstruktur des Gehirns mit der Ausbildung der Neuralplatte aus dem Ektoderm. Daraufhin beginnt sich die Neuralplatte zu falten und einzustülpen, wodurch sich am Ende das Neuralrohr bildet, das durch eine Epidermis bedeckt wird (Wolpert et al., 2007). Durch die Bildung des Neuralrohrs entstehen dorsal gelegene Neuralleisten-

zellen, die auch ektodermalen Ursprungs sind (Wolpert et al., 2007). Aus diesen bilden sich im Zuge der Entwicklung sowohl sensorische Neurone des peripheren als auch Neurone des vegetativen Nervensystems. Im vorderen Teil des Neuralrohrs entsteht das Gehirn und im mittleren bis hinteren das Rückenmark (Wolpert et al., 2007). Die Bildung des Gehirns im vorderen Abschnitt beginnt mit der Bildung von 3 Bläschen, dem Prosencephalon, dem Mesencephalon und dem Rhombencephalon (Vieira et al., 2010). Die Vorläuferzellen der Neurone und Gliazellen werden in der Proliferationszone des Neuralrohrs gebildet, die das Lumen des Neuralrohrs auskleidet (auch Ventrikularzone) und die nur eine Zellschicht dick ist (Wolpert et al., 2007). Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich zwischen den embryonalen Tagen 8 (E8) und 20 (E20) pyramidale Neurone und zeitversetzt Gliazellen (E12 bis postnataler Tag 13 (P13) mit dem Höhepunkt um die Geburt, Wang und Bordey, 2008). Eine Übersicht des Auftretens der einzelnen Zelltypen ist in Abbildung 2 dargestellt.

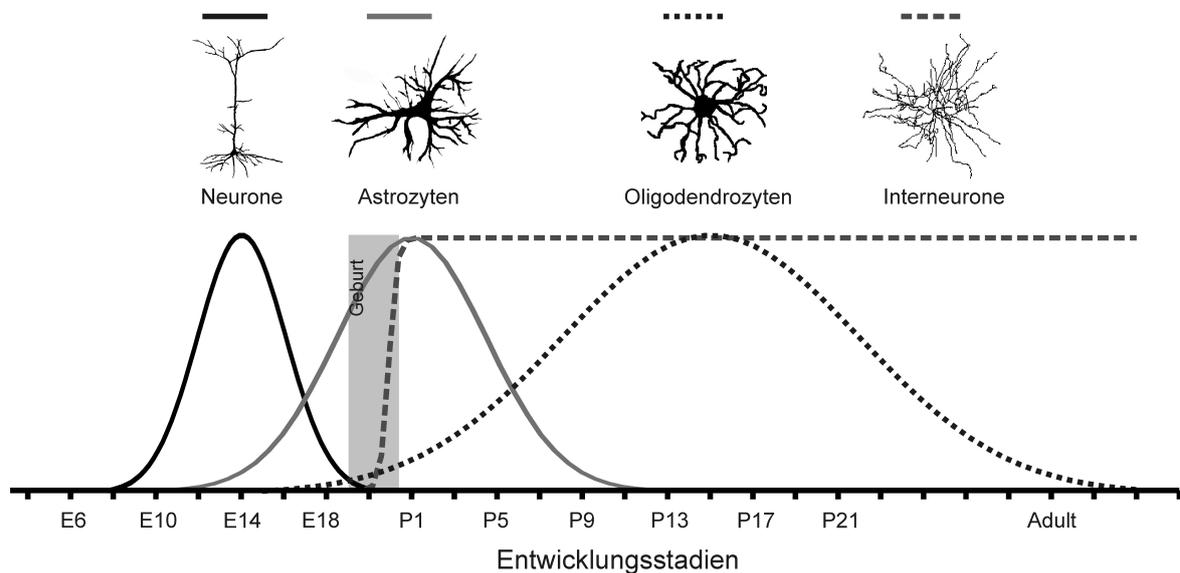


Abbildung 2: **Abfolge der Zellentwicklung im ZNS von Nagern**

Darstellung, in welchen Zeiträumen pyramidale Neurone (Neurone), Astrozyten, Oligodendrozyten und Interneurone aus Vorläuferzellen entstehen. Ab E8 werden pyramidale Neurone gebildet und später entstehen Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) und Interneurone. Bei letztgenannten hält die Neurogenese in einigen Regionen (Riechkolben, Gyrus Dentatus) bis ins Alter an (Wang und Bordey, 2008). Diagramm nach Wang und Bordey (2008); Oligodendrozyt aus Anitei et al. (2006); Interneuron (neuromorpho.org; Eintrag: 030228-1, Yuste).

### 3.2.1 Entwicklung des Neokortex

Der Neokortex ist eine Gehirnstruktur, die evolutionär in Reptilien und Säugetieren zu finden ist. Nachdem die Grundstruktur des Gehirns angelegt wurde (siehe vorherigen Abschnitt 3.2), bildet sich der Neokortex heraus, wobei die Entwicklung zeitlich stark reguliert ist. Er wird aus pyramidalen Neuronen (Projektionsneuronen) und Interneuronen gebildet, die in horizontalen Schichten organisiert sind. Ein Merkmal aller post-mitotischen Neurone ist, dass sie nach ihrer Entstehung von ihrem

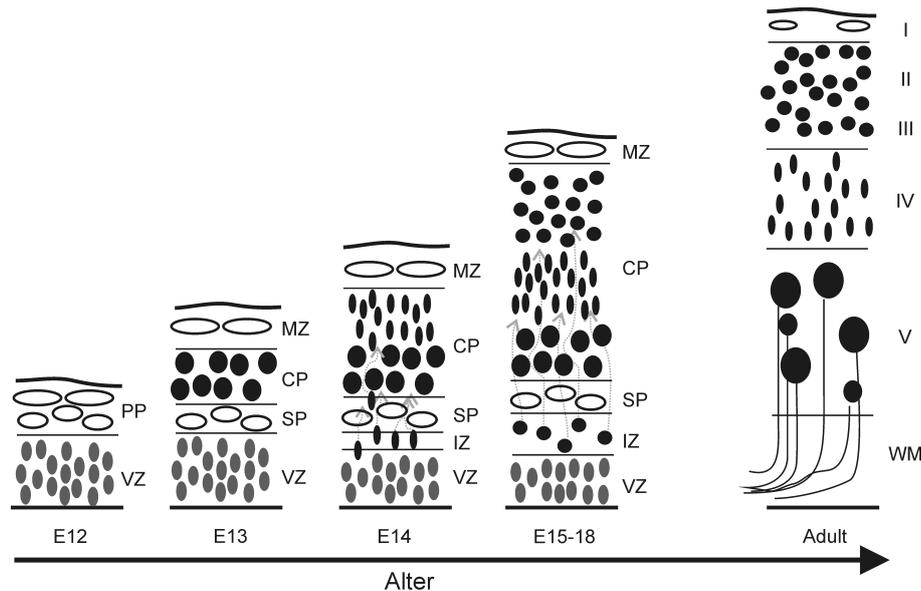


Abbildung 3: **Entwicklung des Neokortex**

Schematische Zeichnung, in der die Entwicklung des Neokortex einer Maus dargestellt ist. In den frühen embryonalen Stadien (bis E12) sind nur Ventrikularzone (VZ) und Präplatte (PP) vorhanden. In sukzessiven Stadien bildet sich die kortikale Platte (CP) heraus, welche die Präplatte in die Marginalzone (MZ) und Subplatte (SP) teilt (E13). Nachfolgend geborene Neurone wandern aus der Ventrikularzone über die Intermediärzone (IZ) in die kortikale Platte ein und bilden eine neue Zellschicht in der kortikalen Platte, die sich über den bereits anwesenden Neuronen befindet (E14-E18). Im adulten Tier haben sich aus der kortikalen Platte die Lagen I - V sowie die weiße Substanz (WM), in der sich hauptsächlich Axone befinden, gebildet. Darstellung nach Gupta et al. (2002) und Dehay und Kennedy (2007)

Entstehungsort zum Destinationsort hinwandern müssen (Rakic, 2009). Pyramidale Neurone des cerebralen Kortex (Neokortex) entstehen aus Vorläuferzellen in der ventrikularen oder subventrikularen Zone (Rakic, 2009) durch symmetrische oder asymmetrische Teilung und wandern hauptsächlich radial (d.h. an Radialgliazellen entlang) in den sich entwickelnden Kortex (Kriegstein und Noctor, 2004). Zu Beginn der Kortexentwicklung entstehen die Präplatte mit den ersten gebildeten Neuronen und die darunterliegende Ventrikularzone (Kriegstein und Noctor, 2004). Nachfolgend entstandene post-mitotische Neurone wandern nun in die Präplatte ein und bilden die kortikale Platte, wodurch die Präplatte in die Marginalzone und die Subplatte aufgeteilt wird (Kriegstein und Noctor, 2004). Da der Kortex von innen nach außen entsteht, bedeutet dies, dass später geborene Neurone an früher geborenen Neuronen in der kortikalen Platte vorbeiwandern müssen und in der Folge eine neue Schicht bilden (Angevine und Sidman, 1961). Damit sind Neurone, die früher geboren werden, in tieferen Schichten der kortikalen Platte lokalisiert, wohingegen später geborene Neurone in oberen Schichten der kortikalen Platte auftreten (siehe auch Abbildung 3 für eine schematische Darstellung). Die Interneurone bzw. ihre Vorläuferzellen des Kortex wandern hingegen aus der ventral gelegenen ganglionischen Eminenz, der Vorläuferstruktur des Striatums, tangential in den sich entwickelnden Kortex ein (Anderson et al., 1997).

Diese kurze Darstellung zeigt, wie komplex die Entstehung des Kortex ist, daher können bereits geringe Störungen zu Fehlbildungen führen (Gleeson, 2000; Tanaka und Gleeson, 2000). Zum Beispiel ruft eine Mutation im *doublecortin* Gen (*DCX*) eine Fehlbildungen des menschlichen Neokortex hervor (Gleeson, 2000; Tanaka und Gleeson, 2000). Das Mausmodell weist auf eine Migrationsstörung von Neuronen als Ursache für dieser Fehlbildung hin (Bai et al., 2003).

### 3.2.2 Elektrische neuronale Eigenschaften während der entwicklungsabhängigen Migration im Neokortex

Was zeichnet Neurone aus und unterscheidet sie von anderen Zellen? Neurone entwickeln sich von einfachen Zellen zu stark kompartimentierten Zellen, die intrinsische elektrische Aktivität besitzen, welche durch eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle in der Zellmembran generiert wird. Dabei können sehr ähnliche Output-Muster in Form von Aktionspotenzialen durch eine veränderte Mixtur von Konduktivitäten generiert werden (Marder und Goaillard, 2006). Scheinbar entsteht die neuronale Aktivität nach einem festen Muster (*hardwired*), aber über die Expression von neuen oder unterschiedlichen Ionenströmen können die intrinsische oder die Netzwerkaktivität verändert werden. Diese elektrischen Änderungen beeinflussen wiederum die Reifung von Neuronen während der Entwicklung oder auch den *Output* während bestimmter Phasen. Als Folge kann die Genexpression durch z.B. Calciumerhöhungen oder Aktivierung von G-Protein gekoppelten Signalkaskaden moduliert werden. In diesem Zusammenhang wird auch vom *developmental handshake* (siehe Abbildung 4) gesprochen, der genau dieses Zusammenspiel beschreibt (Spitzer, 1991).

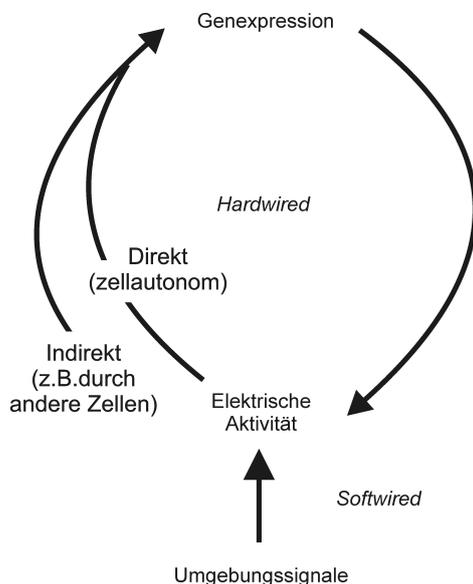


Abbildung 4: **Developmental Handshake**  
Die Expression von Genen läuft während der Entwicklung nach einem festgelegten Schema ab (*hardwired*). Ionenkanäle, die exprimiert werden, nehmen durch ihre Aktivierung entweder einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Genexpression. Als *softwired* wird die Modulation der elektrischen Aktivität durch Umgebungssignale (z.B. Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren) bezeichnet. Modifiziert nach Spitzer (2006).

#### 3.2.2.1 Elektrische Kopplung durch *gap-junctions*

Im sich entwickelnden Kortex haben bereits nicht migrierende Vorläuferzellen in der ventrikularen Zone charakteristische elektrische Eigenschaften. Sie sind gekennzeichnet durch einen geringen

Eingangswiderstand<sup>1</sup>, der wahrscheinlich durch elektrische *gap-junction*-Kopplung mit anderen Zellen bedingt ist (LoTurco und Kriegstein, 1991). Mit Beginn der Migration steigt nachfolgend der Eingangswiderstand an (Noctor et al., 2001), was auf eine elektrische Entkopplung hindeutet. Die Anzahl von elektrisch gekoppelten Zellen verringert sich mit fortschreitendem Embryonalalter, was wiederum mit einer Abnahme der Neurogenese korreliert (Sutor und Hagerty, 2005).

### 3.2.2.2 Intrinsische spannungsabhängige Ströme

Spannungsabhängige Ströme werden durch Änderungen der Membranspannung aktiviert und weisen charakteristische Eigenschaften auf. Bereits Vorläuferzellen, die sich in der ventrikularen Zone befinden, besitzen spannungsabhängige Kaliumströme (Noctor et al., 2001). Mit dem Beginn der neuronalen Wanderung in die intermediäre Zone entwickeln sich in postmitotischen Neuronen spannungsabhängige einwärtsgerichtete Ströme (Noctor et al., 2001), welche durch Natriumkanäle vermittelt werden (Bahrey und Moody, 2003; Noctor et al., 2004). Mit dem Eintritt dieser Neurone in die kortikale Platte verändert sich bis E16 wenig an den maximalen Amplituden der Natrium- und Kaliumströme. Ab E18 hingegen vergrößern sich beide Ströme und die maximalen Amplituden steigen in den Folgetagen weiter an (Bahrey und Moody, 2003). Weiterhin erscheint ab dem postnatalen Tag P2 der hyperpolarisations-aktivierte zyklisch-Nukleotid modulierte nicht-selektive Kationenstrom  $I_h$  (Bahrey und Moody, 2003), welcher um das Ruhemembranpotenzial aktiviert. In der Folgezeit steigt die maximale Amplitude von  $I_h$  an (Bahrey und Moody, 2003; Zhu, 2000). Dies korreliert damit, dass sich bis P2 wenig am Eingangswiderstand ändert, aber in der ersten postnatalen Woche eine drastische Verkleinerung stattfindet (Bahrey und Moody, 2003).

### 3.2.2.3 Migration und die Rolle von Calcium

Die Wanderung von Neuronen ist nicht spezifisch für den Neokortex, sondern ist ein genereller Vorgang während der Gehirnentwicklung. Für das Cerebellum wurde gezeigt, dass während der embryonalen Entwicklung die Wanderung von Körnerzellen mit einer Erhöhung des intrazellulären Calciums korreliert (Komuro und Rakic, 1996). Dies wird durch spannungsabhängige N-Typ Calciumkanäle vermittelt und eine Blockierung durch  $\omega$ -Conotoxin reduziert die Wanderungsgeschwindigkeit erheblich (Komuro und Rakic, 1992). Im Neokortex treten spontane *calcium transients* zwischen E16 und P2 auf, die ihre maximale Anzahl und Synchronisation an P0 haben (Corlew et al., 2004). Da über calciumabhängige Signalkaskaden unter anderem die Genexpression modifiziert wird, wäre so eine Regulation der Genexpression über unterschiedliche Aktivitätsniveaus denkbar. Außerdem gibt es die Möglichkeit, dass auch im Neokortex calciumabhängige Mechanismen vorhanden sind (ähnlich wie im Cerebellum), die für die Migration von Neuronen von Bedeutung sind (Moody und Bosma, 2005).

---

<sup>1</sup>Der Eingangswiderstand ist abhängig von der Membranoberfläche, der Anzahl von Ionenkanälen, welche um das Ruhemembranpotenzial aktiviert sind, sowie von den passiven Ionenleitfähigkeiten beim Membranpotenzial. Bei einem Verbund aus *gap-junction* gekoppelten Neuronen sind diese in Reihe geschaltet, wodurch sich der Widerstand verringert. Eine Entkopplung führt bei unveränderter Anzahl der Kanäle zu einem Anstieg des Eingangswiderstands.

### 3.3 Neuronale Plastizität

Elektrische Aktivität ist die Grundlage für die Kommunikation zwischen Neuronen, die ein Input/Output-System sind (Reyes, 2001). Der Input in Form von Rezeptor-medierten-Strömen erfolgt an den Synapsen, die hauptsächlich dendritisch lokalisiert sind. Entlang des Dendriten und im Soma erfolgt eine lokale Verrechnung der Ströme und beim Überschreiten einer bestimmten Schwelle am Axonhügel kommt es zum Auslösen eines Aktionspotenzials, welches sich hauptsächlich entlang des Axons fortpflanzt. An der Präsynapse, dem Axonende, kommt es zur Ausschüttung von Vesikeln, die an einem anderen Neuron durch Rezeptoraktivierung zum Input führen. Nach dem Hebb'schen Postulat wird die Verstärkung der Verknüpfung zwischen zwei Neuronen (Hebb, 1949) als Grundlage für Lernprozesse angesehen. Die so ausgelöste molekulare Veränderung an einer Synapse wird auch als synaptische Plastizität bezeichnet. Neuronale Plastizität hingegen bezieht sich nicht nur auf Veränderungen an Synapsen, sondern umschließt alle molekularen Änderungen, die in Neuronen zu einer Veränderung von Strömen führen (Zhang und Linden, 2003). Zusätzlich werden diese Veränderungen der intrinsischen und synaptischen Aktivität, der Speicherung von Informationen auf zellulärer Ebene zugeschrieben (Zhang und Linden, 2003), wodurch solche Veränderungen eine Auswirkung auf neuronale Netzwerke haben können.

#### 3.3.1 Synaptische Plastizität

Synaptische Plastizität umfasst alle Vorgänge, die an der Prä- oder Postsynapse zu einer Veränderung der synaptischen Transmission beitragen. An exzitatorischen Synapsen wird hauptsächlich die Stärke der Verbindung gemessen, die sich auch experimentell in Form von *long-term potentiation* (LTP) oder *long-term depression* (LTD) verändern lässt (Zhang und Linden, 2003). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Messung von spontanen synaptischen Strömen, an denen auch Änderungen der Prä- und Postsynapse messbar sind (siehe z.B., Huang et al., 2011).

Eine Aktivierung von LPA-Rezeptoren durch LPA führt zu einer Aktivierung von Signalkaskaden, die unter anderem den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen (siehe 3.1.2) oder Calciumleitfähigkeiten verändern können (siehe 3.1.3). In Neuronen führt eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in der Präsynapse zu einer gesteigerten Vesikelausschüttung. Um eine Modulation der synaptischen Transmission zu untersuchen, wurde im Labor ein Feldpotenzial-Vorexperiment durchgeführt. In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob LPA einen Einfluss auf die Erregung von Neuronen hat. Die Feldpotenziale wurden in der CA1-Region des Hippocampus nach Stimulation der Schaffer-Kollaterale aufgezeichnet. Bei diesen Experimenten werden die Axone von CA-3 Neuronen stimuliert und die synaptischen Potenziale an den empfangenden CA-1 Neuronen aufgezeichnet. Diese Experimente zeigen, dass im akuten hippocampalen Gehirnschnitt der Maus nach LPA-Applikation die Erregbarkeit gesteigert wird (siehe Abbildung 5).

#### 3.3.2 Plastizität spannungsabhängiger Ströme

Eine Modulation von spannungsabhängigen Ionenkanälen kann zu einer lokalen oder globalen Änderung von intrinsischen Leitfähigkeiten des Neurons führen und verändert damit Input und Out-

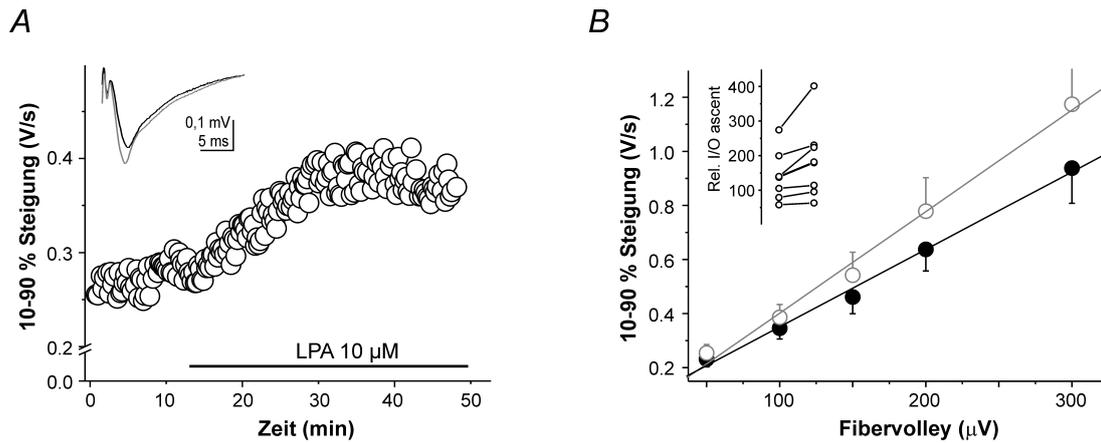


Abbildung 5: LPA-Applikation erhöht die Erregbarkeit im Hippocampus

A. Experimenteller Verlauf eines Feldpotential-Experiments, in dem 10 µM LPA bei gleichbleibender Stimulationsintensität der Schaffer-Kollateralen zu einem Anstieg der Erregbarkeit führt. Verkleinert dargestellt sind die aufgezeichneten Feldpotential-Spannungen vor (schwarz) und nach (grau) der Applikation von LPA.

B. Eine Zusammenfassung von 8 Experimenten zeigt, dass eine Erhöhung der Erregbarkeit mit erhöhter Stimulationsstärke (Angabe als Größe des Fibervolleys) erreicht wird. Einzelne Experimente sind verkleinert dargestellt.

put (Zhang und Linden, 2003). Änderungen können z.B. ein veränderter subzellulärer Transport von Ionenkanälen oder eine veränderte Untereinheitenzusammensetzung sein. Außerdem können transiente Proteinmodifikationen erfolgen, z.B. Phosphorylierungen. Nach solchen Veränderungen kann es zu einem modifizierten Aktivitätsmuster kommen, womit die Informationsübertragung und damit die Kodierung von Informationen geändert werden. Da durch LPA induzierte Wirkungen auf Ionenströme bzw. auf die zugrunde liegenden Ionenkanäle beschrieben sind, wäre es möglich, dass die neuronale Plastizität durch LPA beeinflusst wird. Eine Ionenkanalfamilie, die durch ihre Lokalisation am Dendriten und ihren physiologischen Eigenschaften eng mit neuronaler Plastizität in Verbindung gebracht wird, sind die hyperpolarisationsaktivierten-zyklisch-Nukleotid modulierten Kanäle (HCNs, Magee, 1999; Strauss et al., 2004; Fan et al., 2005). Eine Modulation findet neben interagierenden Proteinen (Santoro et al., 2004) direkt durch cAMP statt, das an die cAMP-Bindungsdomäne von HCN-Kanälen binden kann (Wahl-Schott und Biel, 2009). Die Aktivierung der LPA-Rezeptoren eins bis vier kann  $G_i$ -Proteine aktivieren, welche die Adenylatcyclase inhibieren und damit das intrazelluläre cAMP-Level verändern. Daher wäre über diesen Signalweg eine Auswirkung auf HCN-Kanäle denkbar. Weiterhin hat eine  $G_{q/11}$  Aktivierung durch LPA zur Folge, dass über eine Aktivierung von Phospholipase C (PLC), Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden kann (Neves et al., 2002). Da auch eine PLC-Aktivierung eine Modulation von HCN-Kanälen induzieren kann (Pian et al., 2007), wäre durch PLC eine weitere Beeinflussung dieser Ionenkanäle möglich.

### 3.4 Zielstellung dieser Arbeit

- Durch eine indirekte Veränderung des LPA-Mikroenvironments im entwickelnden Neokortex durch LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone zeigten diese eine Migrationsstörung (Velmans, 2010). Da sich die Mehrzahl der Entwicklungsstudien meistens auf morphologische und molekulare Untersuchungen beschränkt, aber ein Verständnis der elektrischen Eigenschaften wichtig ist (siehe *developmental handshake*), sollte in diesen Neuronen eine mögliche indirekte Implikation von LPA auf die neuronale Entwicklung ermittelt werden. Es wurde ein Profil von Ionenströmen und elektrischen Eigenschaften dieser migrationsgestörten Neuronen zu zwei Zeitpunkten erstellt.
- Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass extrazelluläre LPA-Applikation einen intrazellulären Calciumanstieg in kultivierten hippocampalen Neuronen auslöst (Holtsberg et al., 1997). Weiterhin zeigten Feldpotenzial-Vorversuche im akuten Gehirnschnitt des Hippocampus, dass LPA zu einer gesteigerten Erregbarkeit führt. Da Calcium eine zentrale Rolle bei der Vesikelfreisetzung aus der Präsynapse einnimmt und eine gesteigerte Erregbarkeit auf Netzwerkebene gezeigt wurde, sollte von diesen Ergebnissen ausgehend eine Modulation der synaptischen Transmission durch Lysophosphatidsäure im Hippocampus näher untersucht werden.
- Die Mehrzahl der LPA-Wirkungen erfolgt über eine Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Aktivierung der LPA-Rezeptoren führt sowohl zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC), einer Inhibition von Adenylatcyclase (Verringerung von cAMP) als auch zu einer cAMP-Erhöhung durch Aktivierung der Adenylatcyclase. cAMP und PLC sind beides Modulatoren des HCN-Kanals. Diese Proteinfamilie wird prominent in hippocampalen Neuronen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der dendritischen Integration. Eine Modulation dieses Stroms durch Aktivierung von LPA-Rezeptoren wurde untersucht.

#### Experimenteller Ansatz

Für die Experimente wurde die Maus als Untersuchungsobjekt benutzt, da von Beginn an *knock-out*- und transgene Mäuse für Experimente verfügbar waren. Weiterhin war die *in-utero* Elektroporation in der Maus etabliert. Von den Gehirnen wurden akute Schnitte hergestellt, die experimentell mit der *patch-clamp* Technik untersucht wurden. Im weiteren experimentellen Verlauf wurden außerdem primäre hippocampale Neuronenkulturen präpariert, mit denen nach einigen Tagen in Kultur Experimente mit der *patch-clamp* Methode durchgeführt wurden. In den Experimenten erfolgte die Messung von synaptischen sowie intrinsischen Strömen.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Geräte

Für die Untersuchungen und Experimente kamen folgende Geräte und Apparaturen zum Einsatz:

- Osmometer – Osmomat030 (Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland)
- Spektrophotometer BioMate 3 (Thermo Electron Corp., Madison, WI, USA)
- Vibratom Leica VT1200S (Leica Microsystems, Deutschland)
- SM5-9 Steuereinheit und Badcontroller V (Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland)
- HEKA EPC10 double und USB (HEKA, Lambrecht, Deutschland)
- Tillphotonics IR-VideoCamera VX-55 (TILL Photonics GmbH, Gräfeling, Deutschland)
- Fernseher Panasonic TC1470Y (Panasonic, Hamburg, Deutschland)
- Oszilloskope HM1507-3 & HM1508-2 (Hameg Instruments GmbH, Mainhausen, Deutschland)
- Sutter P-97 Pipette Puller (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA)
- Newport IG-Breadboard (1x1m) (Newport Corporation, Irvine, CA, USA)
- AD-Wandler NI-USB 6251 (National Instruments Germany GmbH, München, Deutschland)
- ISO-Flex (A.M.P.I, Jerusalem, Israel)
- Axiovert S100 mit HBO 100 W (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Axioskop2 FS plus ausgestattet mit DIC-IR Optik (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Olympus BX 51WI mit DIC-IR Optik (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Wasserimmersionsobjektive 10x (NA 0,3) & 60x (NA 0,9) (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- Filtersatz für eGFP: BP436/20, FT 455, BP480/40 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Filtersatz für dsRED: BP 546, FT 580, LP 590 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Zentrifugen 5415R und 5804R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Thermomixer comfort (Eppendorf AG)
- KNF Laborpumpe (KNF Neuberger AG, Balterswil, Schweiz)
- Computer – IBM kompatible PCs mit Windows XP
- Microprocessor ph-Meter pH537 (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland)
- Sartorius Laborwaagen BP221S und BP110 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Clean Air Sterilwerkbank (Air Clean Systems Inc., Raleigh, NC, USA)
- Wasserbad (GfL, Burgwedel, Deutschland)

### 4.2 Software

Folgende Software wurde für die Planung, Durchführung, Analyse und Darstellung von Experimenten benutzt:

- PatchMaster, Fitmaster v.7.3-7.5 (HEKA, Lambrecht, Deutschland)
- Origin 7.0 und Origin 7.5 (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA)

- Mini Analysis Programm (Synaptosoft, Decatur, GA, USA)
- ABF Utility (Synaptosoft, Decatur, GA, USA)
- 4 Peaks, Enzyme X, Papers (Mekentosj B.V, Aalsmeer, Niederlande)
- StatView (Abacus Corporation, CA, USA)
- SOFA Statistics (Paton-Simpson & Associates Ltd)
- Corel Draw 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada)

### 4.3 Materialien

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die nachfolgenden angegebenen Materialien und Chemikalien benutzt.

#### 4.3.1 Essentielle Verbrauchsgegenstände für elektrophysiologische Experimente

- Rotbart Rasierklingen extra dünn (Procter & Gamble, Schwalbach am Taunus, Deutschland)
- UHU Sekundenkleber - Cyanacrylat (UHU GmbH & Co.KG, Bühl/Baden, Deutschland)
- Pasteurpipetten aus Glas 150 mm (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland)
- Microloader tips (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- 0,2 µm Nylonfilter 4 mm (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark)
- Glaskapillaren 1,65 mm Außendurchmesser, Glastyp #0010 (WPI, Sarasota, FL, USA)

#### 4.3.2 Chemikalien

Benutzte Chemikalien (höchste Reinheit) wurden von den angegebenen Herstellern bezogen.

- Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumchlorid· 6\*H<sub>2</sub>O (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), D-Glucose, Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), Saccharose (Sucrose), HEPES, DMSO (alle **Carl Roth**)
- K<sup>+</sup>-Glukonat, Na<sup>+</sup>-Phosphocreatine, Tris-GTP, Mg<sup>2+</sup>-ATP, EGTA, BAPTA-K<sup>+</sup>, HEPES, LPA, Low gelling temperature Agarose Typ VII (alle **Sigma-Aldrich**)

#### 4.3.3 Plasmide

##### 4.3.3.1 pCLEG

Dieser Vektor wurde für die *in utero*-Elektroporation benutzt. Er besaß eine IRES-*site* (interne Ribosomen Eintrittsstelle), an die der *open-reading frame* für *eGFP* anschloss, und hatte ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion. Er wurde im Labor von Nenad Sestan hergestellt und von dort zur Verfügung gestellt (Chen et al., 2005).

#### 4.3.3.2 Plasmidisolierung

Plasmide für die *in utero*-Elektroporation wurden mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers aus *E. coli*-Übernachtskulturen hergestellt. Es wurden chemisch kompetente *E. coli*-Stämme (XL-10 Gold und XL-1 Blue) in sterilem dYT-Medium (1,6 % w/v Trypton, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH = 7,5 mit NaOH), dem Antibiotika zugesetzt wurde, angezogen.

#### 4.3.4 Zellkulturmedien und Materialien

Für die Präparation und Kultivierung von Neuronen wurden folgende sterile Medien benutzt.

##### Platiermedium

Bestandteil	Menge	Stocklösung	Hersteller
0,6 % Glukoselösung	3 ml	20×	
Pferdeserum	10% w/v		PAN
Penicillin/Streptomycin	1 ml	100×	Gibco
MEM mit Earle's Salzen	86 ml	1×	Gibco

##### Wachstumsmedium

Bestandteil	Menge	Stocklösung	Hersteller
B27	1 ml	50×	Gibco
L-Glutamin	0.5 mM	200 mM	PAN
Neurobasal A	50 ml	1×	Gibco

Neurobasal A und der Zusatz B27 (Brewer et al., 1993) waren serumfrei und für hippocampale Neurone optimiert. Die Kultivierung erfolgte in Abwesenheit von Antibiotika.

#### 4.3.4.1 Zellkulturmaterialien

Für die Präparation und Kultivierung von Neuronen wurden folgende Materialien von den angegebenen Herstellern benutzt:

- DMEM, FBS (PAN Biotech)
- HBSS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (# 14170-088, Gibco)
- DPBS (# 14190, Gibco/ Invitrogen)
- 2,5 % Trypsin 10× (#15090, Gibco/ Invitrogen)
- Poly-D-Lysin Molekulargewicht 70000-150000 (P0899, Sigma-Aldrich)
- Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich)

## 4.4 Lösungen

Alle Lösungen in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 (elektrophysiologische Experimente) wurden mit bi-destilliertem Wasser (Millipore 2) hergestellt.

### 4.4.1 Extrazelluläre Lösungen

Für Experimente an akuten Gehirnschnitten wurde artifizielle-cerebro-spinal-Flüssigkeit (ACSF) hergestellt. Für eine schonende Präparation von akuten Gehirnschnitten wurde die ACSF modifiziert und als sucrosehaltige ACSF (sACSF) bezeichnet. In dieser wurden die Natriumkonzentration gesenkt, Calcium reduziert und die Magnesiumkonzentration erhöht. Die Reduktion von Natrium diente der Verringerung von Aktionspotenzialen und eine erhöhte Magnesiumkonzentration verhinderte Glutamat induzierte *Excitotoxicity*, ausgelöst durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. Eine verringerte Calciumkonzentration sollte die Vesikelausschüttungswahrscheinlichkeit reduzieren. Eine weitere Modifikation der ACSF ist die divalente Kationenlösung (DCS), die für die Isolierung von  $I_h$  diente. Natriumdihydrogenphosphat wurde weggelassen und die Kaliumchloridkonzentration erhöht. Glucose war für Neurone von Bedeutung, da sie direkt als Substrat für die Stoffwechselwege zur Energieversorgung (ATP-Produktion) diente.

sACSF, ACSF und DCS Lösungen wurden mindestens 30 Minuten vor Verwendung mit Carbogen (95 %  $O_2$  und 5 %  $CO_2$ ) begast, wodurch der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt wurde (Carbonatpuffersystem). Um eine Schädigung der Gehirnschnitte durch Hypoxie zu vermeiden (negative Auswirkungen auf Experimente), wurden alle Lösungen mit Sauerstoff gesättigt.

Lösung	Chemikalien in [mM]	Osmolarität [mOsm]
ACSF	119 NaCl, 26 NaHCO <sub>3</sub> , 1 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 2,5 KCl 1,3 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 2,5 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10 Glucose	290-305
sACSF	87 NaCl, 26 NaHCO <sub>3</sub> , 1,25 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 2,5 KCl 7 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0,5 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 75 Sucrose, 25 Glucose	340-355
DCS	119 NaCl, 26 NaHCO <sub>3</sub> , 10 KCl 1,3 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 2,5 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10 Glucose	295-310
Kulturlösung für Neurone	124 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 3 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 25 HEPES, 10 D(+)-Glucose, pH = 7,3 mit NaOH	295-310

Für Experimente an kultivierten Neuronen wurde die Kulturlösung für Neurone benutzt, bei welcher der pH-Wert mit HEPES gepuffert wurde. In einigen Experimenten mit primär kultivierten Neuronen wurde eine modifizierte Kulturlösung benutzt. Diese war wie die oben angegebene, jedoch wurde Calcium in der Lösung weggelassen.

#### 4.4.2 Intrazelluläre Lösungen

Lösung	Chemikalien in [mM]	pH; Osmolarität [mOsm]
Lösung 1	120 K <sup>+</sup> -Glukonat, 10 KCl, 10 Na <sup>+</sup> -Phosphocreatine, 1 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 1 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 11 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg <sup>2+</sup> -ATP, 0,3 Tris-GTP	7,2 mit KOH; 290
Lösung 2	100 K <sup>+</sup> -Glukonat, 10 KCl, 10 Na <sup>+</sup> -Phosphocreatine, 1 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 11 BAPTA-K <sup>+</sup> , 10 HEPES, 2 Mg <sup>2+</sup> -ATP, 0,3 Tris-GTP	7,2 mit KOH; 270
Lösung 3	130 KCl, 10 Na <sup>+</sup> -Phosphocreatine, 1 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 11 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg <sup>2+</sup> -ATP, 0,3 Tris-GTP	7,2 mit KOH; 300

Intrazelluläre Lösungen wurden auf Eis angesetzt. Damit sollten Zersetzungsprozesse von ATP, GTP und Phosphocreatin verlangsamt bzw. vermieden werden. Alle Lösungen wurden filtriert (0,2 µm Porengröße), aliquotiert (0,5 -1 ml) und bei -20°C gelagert. Einmal aufgetaute Lösungen wurden nicht erneut eingefroren.

#### 4.5 Pharmaka

Alle benutzten Pharmaka wurden, mit Ausnahme von Cyclothiazid (gelöst in DMSO), in bi-destilliertem Wasser gelöst.

Substanz	Hersteller	Stock [mM]	Arbeitskonzentration [mM]
Cyclothiazid	Sigma, Alexis	100	0,1
CNQX-di-Na <sup>+</sup>	Sigma	20	0,01
Gabazine	Sigma	20	0,002
CsOH	Sigma	1000	2
Tetrodotoxin-Citrat (TTX)	Sigma, Tocris	3	0,0005-0,001
Bicuculline Methiodid	Tocris	10	0,01
D-AP5	Tocris	50	0,05
Tetraethylamonium (TEA)	Sigma	1000	10

#### 4.6 Lysophosphatidsäure (LPA)

Das Phospholipid LPA (18:1 bzw. 1-Oleoyl-sn-3-Glycerophosphat; MW = 436,52) wurde in einer Pufferlösung gelöst, damit es stabil blieb und sich nicht zersetzen konnte. Der Puffer war wie folgt zusammengesetzt:

Substanz	Konzentration [mM]
HEPES	50
NaCl	138
KCl	2,7
CaCl <sub>2</sub>	1
MgCl <sub>2</sub>	1
BSA	1%

Es wurde eine 2,6 mM Stock-Lösung hergestellt, welche in Glasröhrchen aliquotiert und bei -20° C bis zum Experiment gelagert wurde. Einmal aufgetaute Lösung wurde nicht erneut eingefroren. Für Kontrollversuche wurde diese Pufferlösung ohne LPA benutzt.

#### 4.7 Versuchstiere

Es wurden männliche Mäuse (Alter: P21-P30) der Stämme C57Bl6/J oder N, LPA<sub>2</sub> KO (Contos et al., 2002), Balb/c und PRG1 KO (Trimbuch et al., 2009) benutzt, die in der Zentralen Tierzucht der Charité (FEM) gezüchtet und in den Tierstall der Anatomie nach Bedarf eingestellt wurden. Die Mäuse wurden in Standardkäfigen (Größe: 370-426 cm<sup>2</sup>) mit Holzeinstreu (Lignocel, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland) gehalten. Mäuse kamen aus dem SPF-Status (specific pathogen free), der mit einem Gesundheitszeugnis bestätigt wurde. Die Tiere hatten Zugang zu Nahrung (SSniff Experimentalfuttermittel, SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser *ad libitum* und wurden in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus bei 21-23°C und 50-60% Luftfeuchte gehalten. Alle Vorgänge, an deren Durchführung Tiere beteiligt waren, wurden konform zur Direktive des Europäischen Rats vom 24.11.1986 (86/609/EEC) vorgenommen.

#### Genotypisierung von *knock-out*-Mäusen

Aus Schwanzspitzenbiopsien wurde mittels des Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Stratec Biomedical Systems AG, Deutschland) genomische DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. 1 µl wurde als *Template* für die PCR benutzt, der Rest zur eventuellen Nachkontrolle bei -20°C gelagert. Die PCR zur Bestimmung des Genotyps von LPA<sub>2</sub> KO-Mäusen wurde wie beschrieben (Primer und Programm) durchgeführt (Contos et al., 2002). Zur Genotypisierung von PRG1 KO-Mäusen wurden die beschriebenen Primer (Trimbuch et al., 2009) benutzt. Das Programm im Thermocycler begann mit einem 3-minütigen Denaturierungsschritt. Im Anschluss wurden 30 Zyklen mit 95°C für 30 s, 63°C für 30 s und 72°C für 30 s wiederholt und mit einem einmaligen Amplifikationsschritt für 5 min abgeschlossen. Für die Amplifizierungen wurde die GoTaq DNA Polymerase (Promega GmbH, Deutschland) eingesetzt. Um Fehler bei der ersten Genotypisierung auszuschließen, erfolgte eine postmortale

Nachkontrolle aller im Versuch beteiligten *knock-out*-Mäuse über eine erneute Schwanzspitzenbiopsie.

#### 4.8 Beschichtung von Deckgläsern

Deckgläser ( $\varnothing$  12 mm) wurden mehrfach mit 70% Alkohol gewaschen und in 100% Alkohol gelagert. Für elektrophysiologische Experimente an akuten Gehirnschnitten wurden die Deckgläschen auf Filterpapier getrocknet und dann mit einem 100  $\mu$ l Tropfen 0,1 mg/ml Poly-D-Lysin (aus 1 mg/ml Stocklösung in H<sub>2</sub>O bidest) beschichtet. Die fertig beschichteten Deckgläschen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Zellkultur wurden die Objektträger unter der Sterilwerkbank aus dem 100% Alkohol entnommen, abgeflammt und in 12-well-Platten platziert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit 0,5 ml steriler Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) bedeckt und bei 37°C für mindestens 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde die Poly-L-Lysin-Lösung abgenommen und mit DPBS einmal gewaschen. Bis zur Benutzung erfolgte die Lagerung im Inkubator bedeckt mit DPBS.

#### 4.9 Präparation und Kultivierung von primären Mausneuronen

Tragende Mäuse wurden betäubt (CO<sub>2</sub>) und dann enthauptet oder durch zervikale Dislokation getötet. Der Bauch der tragenden Mäuse wurde mit 70% Alkohol desinfiziert, der Bauchraum geöffnet, der Uterus entnommen und in kaltes HBSS Medium (auf Eis) transferiert. Die Embryonen (E18-E20) wurden einzeln aus dem Uterus geschnitten, der Kopf abgetrennt und das Gehirn vorsichtig isoliert. Die Meningen wurden vorsichtig abpräpariert, der Hippocampus entnommen und in kaltem HBSS gesammelt. Diese Schritte wurden für jeden Embryo wiederholt.

Das Gewebe wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und vor der Weiteraufarbeitung zweimal mit je 5-10 ml HBSS gewaschen und anschließend in 5 ml HBSS resuspendiert. Zum Verdauen des Gewebes wurden 100-500  $\mu$ l Trypsin (2,5% 10 $\times$  Stocklösung) hinzugegeben und es folgte eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 12-20 Minuten unter regelmäßiger Kontrolle des Verdaus (Menge und Zeit waren abhängig von der Gewebemenge).

Am Grund des Zentrifugenröhrchens befand sich das verdaute Gewebe mit den Neuronen, daher musste die Verdauung vorsichtig abgenommen werden. Anschließend wurden 3 ml *Plating* Medium und 2  $\mu$ l DNaseI einer 5-10 mg/ml Stammlösung in HBSS zum Gewebepellet hinzugegeben. Das Pellet wurde mit einer abgeflamnten Pasteurpipette tituriert, wodurch die Zellen mechanisch vereinzelte wurden.

Unverdaute und größere Gewebestücke setzten sich ab, der Überstand mit den Neuronen wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Neurone wurden mit einer nominellen Dichte von 120000 -150000 Zellen pro Well (3,86 cm<sup>2</sup>) in die Mitte des Deckplättchens ausgesät. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C (5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 ml Wachstumsmedium pro Well hinzugefügt. Nach der Präparation wurden die Zellen 10-15 Tage *in vitro* bei 37° C sowie

5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> inkubiert. Ein halber Mediumwechsel fand alle 3 Tage statt. Eine Kontamination der Kulturen durch Mycoplasmen wurde regelmäßig untersucht. Da bis auf die Präparation die Neurone ohne Antibiotika im Kulturmedium kultiviert wurden, kam es in Einzelfällen zu bakteriellen Kontaminationen. In diesem Fall kam es zum Ausschluss der gesamten Kulturplatte von Experimenten.

#### 4.10 *In utero*-Elektroporation

Die *in utero*-Elektroporation ist eine Methode, die entwickelt wurde, um Neurone *in vivo* mit Expressionsvektoren zu transfizieren (Saito und Nakatsuji, 2001) und nach *in utero*-Elektroporation erschienen die elektrophysiologischen Eigenschaften normal (Borell et al., 2005). Die Operationen und Injektionen wurden wie beschrieben (Trimbuch et al., 2009) von Jan Baumgart (Tierarzt) durchgeführt. In den Experimenten wurden tragende Mäuse des Stammes C57Bl6 am Embryonaltag 13,5 (E13,5) mit den Konstrukten shRNA230 (gegen LPP1/1a gerichtet) oder siRNA-Luziferase (Kontrolle; Sequenzen im Anhang) im pCLEG Vektor (EndoFree Plasmid isolation) elektroporiert (siehe schematische Darstellung in Abbildung 6A). Es wurden in jedem Muttertier zwei Embryos elektroporiert, womit ein Entwicklungsunterschied zwischen LPP1/1a und Kontroll-shRNA Tieren am gleichen Experimenttag ausgeschlossen werden sollte. Es erfolgte keine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Embryos. Ein Tierversuchsantrag Nr. G 0074/06, genehmigt vom LAGeSo Berlin, lag vor.

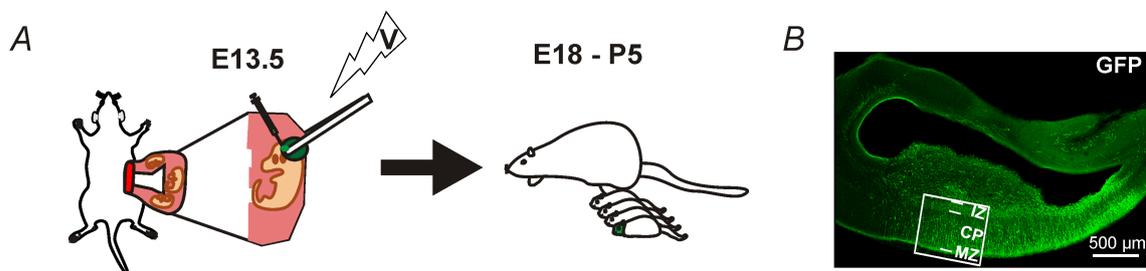


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der *in utero*-Elektroporation**

**A.** Der Uterus einer tragenden Maus wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle herausgenommen und einem Embryo wurde DNA in den Ventrikel injiziert. Nach Anlegen von Spannung an den Kopf des Embryos erfolgte die Transfektion von neuronalen Vorläuferzellen mit der injizierten DNA. Eine Identifikation der Embryos erfolgte mittels Fluoreszenz am Tag E18 oder P5 (Schema modifiziert nach Kawauchi et al. (2003)).

**B.** Gehirnschnitt eines Maushirns, in dem elektroporierte Neurone durch Expression von eGFP grün fluoreszieren. Mit einem Rahmen ist der Bereich markiert, in dem Neurone untersucht wurden. IZ - Intermediärzone, CP - kortikale Platte, MZ - Marginalzone. (Foto von Tanja Velmans - unpubliziert).

## 4.11 Anfertigung von Gehirnschnitten

Akute Gehirnschnitte wurden mit einem Vibratom (VT1200S, Leica) angefertigt. Durch vorherige Kalibrierung konnte die vertikale Abweichung auf ein Minimum reduziert werden. Dadurch wurde die Integrität von Zellen, die dichter an der Oberfläche lagen (ca. 10  $\mu\text{m}$  von der Oberfläche), weniger geschädigt (Geiger et al., 2002) und eine Konstanz bei der Präparation erreicht. Nach der Kalibrierung (gemäß Anleitung) wurde zum Schneiden die Amplitude auf 2 mm gesetzt und der Vorschub auf 0,12 mm eingestellt.

### 4.11.1 Präparation von Mäusen E18

Am 18. Tag nach der Befruchtung wurden tragende Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Mischung aus Esketaminhydrochlorid (7,5 mg, Pfizer, Karlsruhe) und Xylazin (2,3 mg, Bayer Health Care, Leverkusen) im Verhältnis 3:1 in eine tiefe Narkose versetzt. Nach dem Einsetzen der Narkose und der Überprüfung der Narkosetiefe mittels Reflextestung (Schwanzreflex, Augenlidreflex) wurden die Mäuse mit dem Rücken auf eine Styroporunterlage gelegt. Im Anschluss wurde die Bauchhöhle vorsichtig geöffnet und der Uterus mit einer Pinzette herausgeholt. Alle Embryos im Uterus waren auf dem Operationsprotokoll vermerkt und elektroporierte Embryos konnten auf diese Weise anhand ihrer Position identifiziert werden. Nacheinander wurden die elektroporierten Embryos vorsichtig aus dem Uterus herausgeschnitten, das Gehirn entfernt und in eiskalte sACSF transferiert. Die Gehirne wurden für minimal 5 Minuten inkubiert und anschließend in 3% *low gelling temperature* Agarose, die in sACSF gelöst war, eingebettet. Zum schnelleren Aushärten wurde der Behälter mit den Gehirnen und der Agarose auf Eis gekühlt. Die eingebetteten Gehirne wurden mit umgebender Agarose ausgeschnitten und ausgerichtet. Anschließend wurden die Gehirne auf die occipital gelegene Seite mit Sekundenkleber aufgeklebt, mit eiskalter sACSF bedeckt und in coronare 400  $\mu\text{m}$  (nominale Dicke) dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden bei 36°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend in ACSF bei Raumtemperatur für die Dauer eines experimentellen Tages gelagert.

### 4.11.2 Präparation von Mäusen P5 bis Adult

Die Präparation von Maushirnen erfolgte nach Dekapitation (P5) oder nach Genickbruch und anschließender Dekapitation (ab P21). Auf der Schädeldecke wurde das Fell aufgeschnitten und im Anschluss ein Schnitt an der Sutura sagittalis zur Schnauze hin gesetzt. Mit einer Pinzette wurde beidseitig die Schädeldecke gegriffen und durch seitliches Umknicken das Gehirn vorsichtig frei präpariert. Das Gehirn wurde entfernt (Dauer ca. 1 min) und in eiskalte sACSF überführt, in der es für maximal 5 Minuten verblieb. Im Anschluss an die Präparation wurden coronare Schnitte für Versuche des Kapitels 5.1 mit einer Dicke von 400  $\mu\text{m}$  angefertigt. Für die Versuche in Kapitel 5.2 wurden horizontale Schnitte mit einer Dicke von 300  $\mu\text{m}$  hergestellt.

### 4.12 Experimentelle Setups

In Abbildung 7 ist ein Slicesetup abgebildet. Gehirnschnitte wurden mit Licht im nahen Infrarotbereich (IR) beleuchtet und mit dem Differentialinterferenzkontrast (DIC) nach Nomarski sichtbar gemacht. Das menschliche Auge kann keine Wellenlängen im nahen Infrarotbereich wahrnehmen, daher wurden die Bilder mit einer Kamera, die im IR-Wellenlängenbereich (bis 800 nm) sensitiv war, auf einem Monitor dargestellt. Zwischen Mikroskop und Kamera wurde eine Nachvergrößerung montiert.

Der für die Experimente benutzte Kultursetup ist in Abbildung 8 abgebildet. Auf einem inversen Mikroskop wurde die Kammer für die Neurone montiert. Über dem Mikroskop befand sich die Zuleitung für das Schwerkraftperfusionssystem, mit dem die Badlösung ausgetauscht werden konnte.

Beide Setups waren auf einem schwingungsfreien Tisch montiert, um Vibrationen so gering wie möglich zu halten.



Abbildung 7: Slicesetup mit Vorverstärker (rechts), Stimulationselektrode (links), Brücke, Kamera und aufrechtem Mikroskop



Abbildung 8: Kultursetup mit Kammer, Vorverstärker und inversem Mikroskop

### 4.13 Darstellung der Zellmorphologie mit Biocytin

Um die Morphologie von untersuchten Zellen darzustellen, wurde in einigen Experimenten eine Biocytinfärbung durchgeführt. Hierzu wurde 1% w/v Biocytin zur intrazellulären Lösung 1 gegeben und anschließend für eine Minute gemixt. Nach dem Ende eines Versuchs oder nach mindestens 30 Minuten wurde der Slice mit der nun biocytinhaltigen Zelle in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurde der Gehirnschnitt 2 mal mit 0,1 M PB gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur in Blocklösung (0,1M PB, 10 % PBS, 0,1% Triton X-100) inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte der Wechsel in Avidin-Texas-Red Färbelösung (10 µg/ml) und danach eine In-

kubation bei 4°C über Nacht. In Folge wurde ein Gehirnschnitt mindestens 3 mal gewaschen und auf einen gelatinierten Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde der Schnitt in einer Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol, 50% Ethanol und 50% Xylol, 100 % Xylol) entwässert. Die Eindecklung erfolgte mit Entellan.

Die gefärbten Neurone wurden nach der Färbung mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Mikroskop (für Rekonstruktionen) angeschaut und fotografiert.

#### 4.13.1 Aufnahme und Bearbeitung von mikroskopischen Bildern

Mikroskopische Bilder wurden mit minimal notwendiger Bearbeitung dargestellt. Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop wurden als Graustufenbild aufgenommen und im Steuerungsprogramm entsprechend des Farbkanals dargestellt. Für die Darstellung in der Dissertation (siehe Abbildung 18) wurde aus einem Z-Stapel eine Projektion berechnet und diese erneut in ein Graustufenbild im Programm Photoshop umgewandelt. Es erfolgte eine Einstellung des Kontrasts und der Helligkeit. In Abbildung 11 und 24 wurden analoge Bilder der Mikroskopkamera über einen *framegrabber* als Graustufenbild digitalisiert. Die Überlagerung von einem DIC- mit einem Fluoreszenzbild erfolgte, indem ein Kanal entsprechend der Fluoreszenz koloriert und die Deckkraft reduziert wurde.

#### 4.14 Erfassung und Analyse von elektrophysiologischen Daten

Die *patch-clamp*-Technik wurde von Bert Sakmann und Erwin Neher entwickelt (Neher und Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981). Mit dieser Methode ist es möglich, Ströme von Zellen oder Geweben im pico-Ampere-Bereich zu messen, und sie wird inzwischen zu einer Standardmethode gezählt, weswegen an dieser Stelle keine detailliertere Beschreibung folgt. Beim *patch-clampen* kommt es zur Ausbildung einer Verbindung zwischen einer Glaspipette und einer Zellmembran, wodurch eine Verbindung mit hohem elektrischem Widerstand (*Giga-Seal*) entsteht. Durch Unterdruck wird der *Giga-Seal* aufgerissen und man bekommt einen Zugang (elektrisch und physisch) zur Zelle mit einem geringen Widerstand (Hamill et al., 1981).

Die experimentelle Kontrolle erfolgte über PatchMaster-Software, von der ein HEKA EPC 10 *patch-clamp*-Verstärker angesteuert wurde. Um analoge Daten auf einem Computer darzustellen, wurden diese über einen analog/digital-Wandler (Instrutech) umgewandelt. Es fand eine analoge Filterung mit einem Bessel-Filter bei 2,9 kHz im Verstärker statt. Der Bessel-Filter hat den Vorteil gegenüber anderen Filtern, dass der Schwingungsverlauf der Signale erhalten bleibt (minimales Überschwingen). Um die Daten mit einer ausreichend hohen Auflösung aufzuzeichnen, musste nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem mit einer mindestens doppelt so hohen Abtastrate wie Filterrate aufgezeichnet werden. Die minimale Abtastrate lag in allen Experimenten bei 6 kHz und die maximale Abtastrate bei 200 kHz. Die Speicherung der Daten erfolgte nach AD-Wandlung digital. Für jeden experimentellen Tag wurde eine Datei erstellt, die mit dem Datum und dem Kürzel a in der Form JJMMTTa.dat bezeichnet wurde. Die Routinen zur Aufnahme wurden je nach Experiment angepasst. Es erfolgte in den Experimenten keine Korrektur des *liquid-junction*-Potenzials, welches durch die unterschiedliche Ionenzusammensetzung von intra- und extrazellulärer Lösung entsteht

#### 4.14.1 Messung von primär kultivierten Neuronen

Deckgläschen mit Neuronen, die 10 bis 15 Tage in Kultur (DIV - *days in vitro*; Mehrzahl der Ableitungen zwischen DIV 11 und DIV 14) waren, wurden in einer Messkammer platziert, die auf einem inversen Mikroskop montiert war. Die extrazelluläre Lösung (siehe 4.4.1 - Kulturlösung für Neurone) wurde über ein Schwerkraftperfusionssystem in die Messkammer geleitet mit einer Durchflusgeschwindigkeit von 1-2 ml pro Minute. Neurone wurden im Phasenkontrast-Verfahren visualisiert und identifiziert. In der primären Zellkultur ließen sich Interneurone und Pyramidalneurone morphologisch nicht mehr gut unterscheiden, deshalb wurden Neurone mit einer bipolaren Morphologie nicht für Experimente gewählt. Die Experimente wurden bei einer Raumtemperatur von 21-24°C durchgeführt. Pipetten für die Experimente wurden mit einem horizontalen Pipettenziehgerät hergestellt. Wenn sie mit intrazellulärer Lösung (siehe 4.4.2) gefüllt waren, hatten sie einen Widerstand von 2-5 M $\Omega$ .

#### 4.14.2 Messung von Neuronen im akuten Gehirnschnitt

Die angefertigten Gehirnschnitte (siehe 4.11) wurden auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen transferiert und durch anschließendes schnelles Entfernen der ACSF fest angeheftet. Ein Tropfen ACSF wurde auf den Gehirnschnitt gegeben, um eine Austrocknung zu verhindern. Es erfolgte eine Platzierung der Deckgläschen in einer *submerged*-Kammer. Eine Visualisierung von Neuronen und weiteren Strukturen im Gehirnschnitt erfolgte mit einem aufrechten Mikroskop, welches mit dem differentiellen Interferenz-Kontrast und Licht im Infrarotbereich ausgestattet war. Die für Experimente geeigneten Neurone fanden sich ab ungefähr 20  $\mu$ m unter der Oberfläche. Zellen, die dichter an der Oberfläche des Gehirnschnitts lokalisiert waren, wurden nicht gewählt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sie durch die Präparation beschädigt worden waren. Die Auswahl von Neuronen erfolgte via Position im Schnitt und nach morphologischen Eigenschaften. In der CA1-Region des Hippocampus wurden Neurone ausgewählt, die in der Zellschicht lokalisiert waren und einen sichtbaren Dendriten in Richtung Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare besaßen. Neurone im Cortex befanden sich in der kortikalen Platte (E18) oder in Schicht 5 (P5) und hatten eine pyramidale Form. Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 32-34°C durchgeführt. Dafür wurde sowohl die ACSF (siehe 4.4.1) vorher erwärmt als auch die Kammer über eine Temperaturkontrollereinheit beheizt.

#### 4.14.3 Auswertung von allgemeinen Zellparametern

Die Kapazität der Neurone, mit der eine ungefähre Größe der Zelle angegeben werden kann, wurde mittels eines rechteckigen Spannungspulses bestimmt. Vom Haltepotenzial wurden die Neurone für 50 ms 10 mV negativer als das Haltepotenzial geklemmt und dann für weitere 50 ms 10 mV positiver als das Haltepotenzial (maximales  $\Delta$  mV = 20 mV). Dieser Puls wurde dreimal wiederholt und in der Auswertung der Mittelwert berechnet. Die Kapazität (C) lässt sich durch die Formel (1) berechnen, wobei Q die berechnete Ladung (Integral) und  $\Delta U$  der Betrag der Spannungsdifferenz von 10 mV

war.

$$C = \frac{Q}{\Delta U} \quad (1)$$

Der Eingangswiderstand ( $R_{in}$ ) von Neuronen ist durch die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran und deren Aktivierung um das Ruhemembranpotenzial definiert. Der Eingangswiderstand wurde in Neuronen aus *current-clamp*-Experimenten berechnet. Hierzu wurde die im *steady-state* gemessene Spannung um 0 Ampere gegen den injizierten Strom in einer Strom-Spannungs-Kurve grafisch dargestellt und diese Punkte linear gefittet (siehe Abbildung 9A und B). Die Steigung der Gerade entspricht  $R_{in}$ , da

$$R_{in} = \frac{\Delta U}{\Delta I} \quad (2)$$

ist, wobei  $\Delta U$  die Spannungsdifferenz und  $\Delta I$  die Stromdifferenz darstellt.

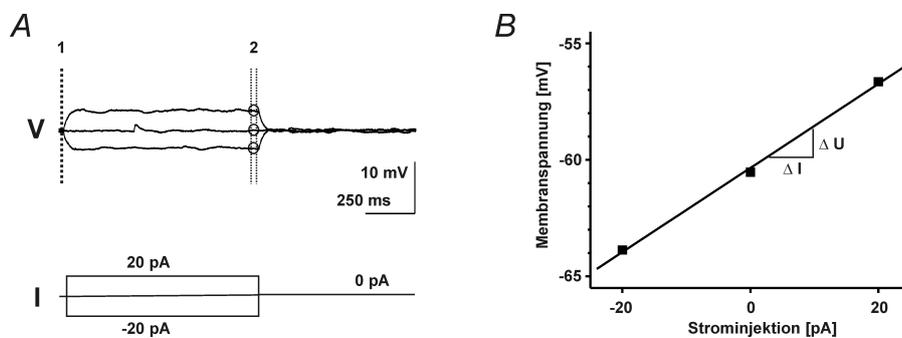


Abbildung 9: Darstellung der Analyse von  $R_{in}$  und  $V_m$

**A.** Abgebildet sind Spannungsantworten ( $V$ ) eines Neurons, die nach Strominjektion ( $I$ ) gemessen wurden. Mit der gestrichelten Linie unter 1 ist der Bereich markiert, innerhalb dessen  $V_m$  gemessen wurde. Mit 2 ist ein Intervall im *steady-state* markiert, von dem die Spannungswerte als Mittelwerte berechnet wurden.

**B.** Die mit Kreisen markierten Abschnitte in **A** (unter 2) sind in in einer Strom-Spannungs-Beziehung abgebildet. Ein Steigungsdreieck, das  $R_{in}$  ergibt (siehe Gleichung 2), ist an der linearen Regression eingezeichnet.

Das Ruhemembranpotenzial der Neurone ( $V_m$ ) wurde im *current-clamp* bestimmt, wenn kein Strom injiziert wurde. Hierzu wurde entweder die Spannung der Neurone in der Verstärkersoftware abgelesen (*online*; wenn  $I = 0$ ) oder die Berechnung erfolgte *offline*, indem ein Mittelwert über 10 ms berechnet wurde. Bei der *offline*-Berechnung wurde so für 10 bis 15 individuelle *Traces* ein Wert gemessen, aus denen der Mittelwert berechnet wurde (siehe auch Abbildung 9A).

Ein weiterer Parameter, der etwas über die Qualität des Experiments aussagt, ist der serielle Widerstand  $R_S$ . Um Veränderungen des seriellen Widerstands zu erkennen, wurde in den Experimenten durch das Anlegen eines rechteckigen Pulses dieser regelmäßig überprüft. Die Berechnung von  $R_S$  erfolgte mit der Formel (2), wobei dann  $R_{in} = R_S$ .  $\Delta U$  entsprach der Spannungsdifferenz von 10 mV und  $\Delta I$  bezeichnete die Differenz zwischen dem minimalen Strom beim Haltepotenzial und dem maximalen Strom an der Spitze der Transiente. Damit eine genaue Messung möglich war, wurden diese

Pulse mit einer Abtastrate von 100 kHz aufgenommen. Bis auf einige Ausnahmen (Messung von Natriumströmen, siehe Abbildung 15) erfolgte in den Experimenten keine elektronische Kompensation des seriellen Widerstands, weil die untersuchten Ströme meistens langsame Ströme waren.

#### 4.14.4 Aufzeichnung und Analyse von minatur postsynaptischen Strömen (mPSCs)

Neurone wurden, bis auf einige Ausnahmen, auf ein Haltepotenzial von  $-70$  mV geklemmt und nach dem Einwaschen von entsprechenden Blockersubstanzen wurden miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme (mEPSCs) oder miniatur inhibitorische postsynaptische Ströme (mIPSCs) aufgenommen. mEPSCs wurden mit der intrazellulären Lösung 1 (siehe 4.4.2) und den Blockern TTX (Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen) und Gabazin oder Bicucullin (beide Substanzen blocken GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren) pharmakologisch isoliert. Für die Aufnahme von mIPSCs wurde das Chloridumkehrpotenzial durch equimolare Konzentration von  $[Cl^-]_i$  und  $[Cl^-]_o$  durch Anpassung der intrazellulären Lösung (siehe Lösung 3 unter 4.4.2) auf  $0$  mV verändert. Dadurch konnten nach Einwaschen von TTX und CNQX (Block der AMPA-/Kainatrezeptoren) pharmakologisch isolierte mIPSCs bei einem Haltepotenzial von  $-70$  mV gemessen werden (siehe auch Abbildung 10). Solange CNQX nicht anwesend war, konnten mit dieser intrazellulären Lösung sowohl mEPSCs als auch mIPSCs gemessen werden.

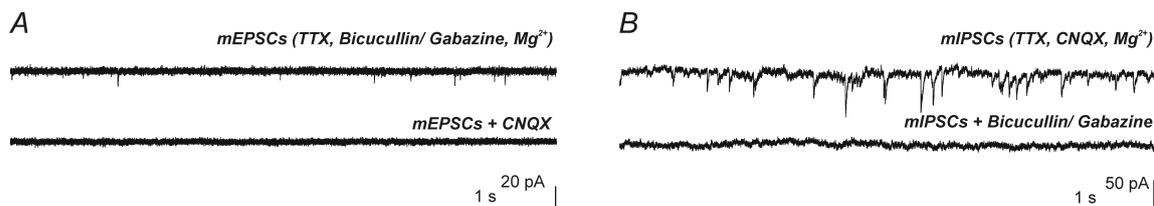


Abbildung 10: **Pharmakologische Isolation von mPSCs in pyramidalen hippocampalen Neuronen bei einer Spannung von  $-70$  mV**

**A.** Die Isolation von mEPSCs erfolgte mit TTX und Bicucullin (Kultur) oder mit TTX und Gabazin (Gehirnschnitt) in Anwesenheit von Magnesium (*oben*). Einwaschen von CNQX blockte alle mEPSCs (*unten*).

**B.** mIPSCs wurden nach dem Einwaschen von TTX und CNQX in Anwesenheit von Magnesium aufgezeichnet (*oben*). Die Zugabe von Bicucullin (Kultur) oder Gabazin (Gehirnschnitt) blockte alle mIPSCs (*unten*).

Die Analyse der Experimente erfolgte *offline*. Zu Beginn jeder Minute wurde der serielle Widerstand gemessen und Änderungen von  $>20\%$  führten zum Ausschluss eines Experiments. Die aufgezeichneten experimentellen Daten wurden für die *Event detection* aus PatchMaster als Igor Pro Datei mit den Einstellungen *Trace time relative to Sweep* und *Igor - Allow Raw Data Access* exportiert. Diese Dateien wurden als bekanntes Dateiformat mit dem ABF Utility in .ABF-Dateien konvertiert. Es erfolgte im Anschluss die Korrektur des *sample intervalls* auf  $6$  kHz. Nach Umwandlung konnten diese nun im *Mini Analysis Programm* geöffnet und anschließend ausgewertet werden. Zur *Noise-Reduktion* wurden die Daten digital mit einem Tiefpass-Butterworth-Filter bei  $1000$  Hz nachgefiltert. Ein *Event* war charakterisiert durch eine plötzliche Änderung des Stroms und wurde als solches er-

kannt, wenn eine festgelegte Schwelle überschritten wurde. Die Schwelle (*threshold*) wurde für die automatische Detektion auf 10 pA gesetzt, da ansonsten viele falsch-positive *Events* detektiert worden wären. Im Anschluss an die automatische Detektion erfolgte eine Nachkontrolle per Hand. Die *cut-off*-Amplitude für die Aufnahme von mEPSCs in die Analyse wurde auf 6 pA festgelegt. Das gemittelte *Noise* betrug ungefähr 4 pA, womit die untere Grenze 2 pA größer als das *Noise* war. Die *Baseline* eines *Events* wurde als Durchschnitt von den vorhergehenden 1000 Samplingpunkten berechnet. Eine Analyse der Frequenzen von den mPSCs wurde im *steady-state* durchgeführt. Dafür wurden die letzten 4 Minuten der Kontrolle mit den letzten 4 Minuten nach der Applikation von LPA miteinander verglichen.

#### 4.14.5 Auswertung von schnellen einwärtsgerichteten und langsam auswärtsgerichteten Strömen

Für die Auswertung von Experimenten des Abschnitts 5.1 wurde angenommen, dass einwärtsgerichtete Ströme durch die spannungsabhängige Aktivierung von Natriumkanälen und auswärtsgerichtete Ströme durch die spannungsabhängige Aktivierung von Kaliumkanälen entstehen. Das Umkehrpotenzial ( $E_{\text{rev}}$ ) wurde für die beiden Ionen Natrium und Kalium mit der Nernst-Gleichung (3) in der Form

$$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Ion}]_o}{[\text{Ion}]_i} \quad (3)$$

berechnet, wobei  $R$  die universelle Gaskonstante,  $T$  die Temperatur von 32°C in Kelvin,  $z$  die Ladungszahl (positiv für Kationen; negativ für Anionen),  $F$  die Faraday-Konstante und  $[\text{Ion}]$  Kalium oder Natrium innerhalb (i) oder außerhalb (o) der Zelle war. Für die benutzten Lösungen (ACSF und intrazelluläre Lösung 1, siehe 4.4.1 und 4.4.2) wurde ein Umkehrpotenzial für Natriumionen von 68,65 mV und für Kaliumionen von -101,17 mV berechnet.

Die Leitfähigkeit ( $G_{\text{Ion}}$ , siehe Formel (4)) für Kalium ( $G_{\text{K}^+}$ ) und Natrium ( $G_{\text{Na}^+}$ ) wurde für jeden Spannungsschritt aus dem maximal gemessenen Strom berechnet, wobei  $E_{\text{rev}}$  das berechnete Umkehrpotenzial für Natrium oder Kalium,  $V$  die angelegte Spannung und  $I_{\text{max}}$  der jeweilige maximale Strom bei der angelegten Spannung war.

$$G_{\text{Ion}} = \frac{I_{\text{max}}}{(V - E_{\text{rev}})} \quad (4)$$

Natriumströme aktivierten und deaktivierten innerhalb weniger Millisekunden und waren einwärtsgerichtet. Kaliumströme waren auswärtsgerichtet, aktivierten mit einer Verzögerung und deaktivierten relativ langsam (hunderte von Millisekunden). Ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV wurden in 10 mV Intervallen spannungsabhängige Ströme von -90 mV bis 40 mV aktiviert. Um die Ströme von Neuronen unterschiedlicher Größe besser miteinander vergleichen zu können, wurde die maximale Leitfähigkeit für Natrium und Kalium auf die jeweilige gemessene Kapazität (C) (siehe Gleichung (1)) der Neurone normalisiert und in pS/pF angegeben.

In den Experimenten wurde keine Kompensation des seriellen Widerstands vorgenommen. Um die schnellen Natriumströme genauer analysieren zu können, wurde in der *offline*-Analyse die Zellkapazität der Experimente am Tag E18 korrigiert. Hierzu konnte die Deaktivierungstransiente von der

Aktivierungstransiente subtrahiert werden, da bei dem gewählten Pulsprotokoll (siehe Abbildung 12A) die Spannungsdifferenz für die Aktivierung und Deaktivierung gleich war. Die Subtraktion erfolgte nach Import der Daten in Origin. Es wurden die Samplingpunkte 14500-15000 der Deaktivierungstransiente von den Samplingpunkten 4500-5000 der Aktivierungstransiente für korrespondierende Spannungsdifferenzen subtrahiert. Diese 500 Datenpunkte umfassten die ungefähre Dauer der Kapazitivtransiente in jedem Neuron. Nach der Subtraktion wurde die maximale Amplitude des korrigierten einwärtsgerichteten Stroms bestimmt.

#### 4.14.6 Analyse von Aktionspotenzialen

Es wurde für die Experimente in Abschnitt 5.1 eine Analyse von Aktionspotenzialen durchgeführt. Für jedes Neuron, welches nach positiver Strominjektion ein Aktionspotenzial generierte, wurde das jeweils erste Aktionspotenzial basierend auf einer bereits beschriebenen Methode analysiert (Henze und Buzsaki, 2001; Kole und Stuart, 2008). Vom aufgezeichneten Strom wurde für jeden Datenpunkt die erste Ableitung erstellt. Dies erfolgte durch Berechnung des Mittelwerts des Anstiegs von zwei benachbarten Punkten mit folgender Formel (5):

$$f'(x_i) = \frac{1}{2} \left( \frac{y_{i+1} - y_i}{x_{i+1} - x_i} + \frac{y_i - y_{i-1}}{x_i - x_{i-1}} \right) \quad (5)$$

Sukzessive wurden von der ersten Ableitung die zweite und die dritte Ableitung berechnet. Das erste Maximum der ersten Ableitung definierte den maximalen Anstieg ( $\max dV/dt$ ) des Aktionspotenzials. Der erste Peak der dritten Ableitung korrespondierte mit der Schwelle des Aktionspotenzials. Die Höhe des Aktionspotenzials ( $\Delta mV$ ) wurde als Differenz zwischen der Aktionspotenzialschwelle und des Maximums des Aktionspotenzials berechnet. Die Aktionspotenzialdauer ( $\Delta t_{AP}$ ) wurde als Differenz zwischen der Schwelle und dem erneuten Schnittpunkt des Aktionspotenzials mit der Schwelle definiert.

#### 4.14.7 Auswertung von HCN mediierten Strömen ( $I_h$ )

Für jeden Spannungsschritt wurde die maximale  $I_h$ -Amplitude zum Ende des Aktivierungspulses gemessen. Von der maximalen gemessenen  $I_h$ -Amplitude erfolgte für jeden Spannungsschritt eine Subtraktion des linearen Lecks. Dafür musste zuerst eine Berechnung des linearen Lecks erfolgen. Hierfür wurde der Strom von Spannungen zwischen -40 mV und -55 mV in einer Strom-Spannungs-Beziehung aufgetragen ( $I_h$  war nicht aktiviert). Diese Punkte wurden mit einer Geraden gefittet und von dieser konnte durch Interpolation das lineare Leck für alle Aktivierungsspannungen berechnet werden.

Die Spannungsabhängigkeit HCN-mediierter Ströme wurden aus *steady-state*-Aktivierungskurven berechnet. Hierfür wurden die Maxima der *tail-currents* für jeden Spannungsschritt bestimmt. Anschließend erfolgte die Normalisierung auf den maximalen *tail-current* und die Darstellung gegen die Spannung des Vorpulses. Für jedes Experiment wurden die Datenpunkte mit einer Boltzmann-

Gleichung (6) in der Form

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}} + A_2 \quad (6)$$

gefittet. Dabei wurden  $A_1$  auf 1 und  $A_2$  auf 0 gesetzt und die freien Parameter  $x_0$ , die halbmaximale Aktivierungsspannung, und  $dx$ , der Anstieg, durch die Anpassung der Kurve an die experimentellen Daten berechnet.

Die Aktivierungskinetik wurde mit einer doppelt exponentiellen Funktion in der Form

$$y(x) = y_0 + A_1(1 - e^{-x/\tau_1}) + A_2(1 - e^{-x/\tau_2}) \quad (7)$$

beschrieben und ergab eine schnelle ( $\tau_1$ ) und langsame ( $\tau_2$ ) Zeitkonstante. Die Deaktivierungskinetik wurde mit einer einfachen exponentiellen Funktion beschrieben. Für diese wurde die Gleichung (7) ohne den Term  $[A_2(1 - e^{-x/\tau_2})]$  benutzt und ergab nur eine Zeitkonstante ( $\tau_1$ ). Für die Fits wurde eine initiale Verzögerung des Stroms von der Prozedur ausgeschlossen.

#### 4.14.8 Statistik

Die gemessenen Daten wurden neben der deskriptiven Statistik (Mittelwert und Standardabweichung) mit statistischen Tests analysiert. In der Arbeit wurde bei jeder Angabe eines  $p$ -Wertes die statistische Methode angegeben und die Auswahl erfolgte wie nachstehend erklärt. Wenn  $n \leq 7$  oder wenn die Datenpunkte einer Stichprobe nicht normal verteilt waren, wurde ein nicht-parametrischer Test ausgewählt. Zwei unabhängige Datenmengen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft und gepaarte Daten mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Für den Fall, dass mehr als zwei Stichproben vorlagen, wurden die Daten mit einem Kruskal-Wallis-Test untersucht. Für den Fall, dass  $n \geq 8$ , wurden die Stichproben auf ihre Normalverteilung mit einem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Stichproben, die nicht normal verteilt waren, wurden mit den vorher genannten nicht-parametrischen Tests überprüft. Bei zwei Stichproben wurden diese mit einem gepaarten oder ungepaarten t-Test untersucht. Bei drei oder mehr Stichproben wurde eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*) benutzt, an die eine *post-hoc*-Analyse der Mittelwerte, in diesem Fall Bonferroni, angeschlossen wurde. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 5\%$  Irrtumswahrscheinlichkeit gesetzt, d.h.  $p < 0.05 = *$  (signifikant),  $p < 0.01 = **$  (hoch signifikant) und  $p < 0.001 = ***$  (höchst signifikant). Die Tests wurden, wie in den Programmen Origin 7.5 (Shapiro-Wilk-Test, t-Test, ANOVA) und StatView oder SOFA (Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Kruskal-Wallis-Test) implementiert, durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen während der kortikalen Entwicklung

Während der kortikalen Entwicklung treten in einer zeitabhängigen Abfolge verschiedene Ionenströme auf. Eine präzise Abfolge des Auftretens ist dabei für die Entwicklung von Neuronen essentiell. Das Erscheinen und die Größe von Kalium- und Natriumströmen korrelieren mit dem Zellzyklus und der radialen Wanderung von Neuronen oder ihren Vorläuferzellen (Bahrey und Moody, 2003). LPP1/1a wird sowohl im Gehirn während der Entwicklung im Kortex als auch in Neuronen exprimiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass Neurone im Kortex in ihrer radialen Migration gestört waren, wenn sie mit shRNA transfiziert wurden, die gegen LPP1/1a gerichtet war (Velmans, 2010). Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für elektrophysiologische Untersuchungen von Neuronen, die nach einer *in utero* Transfektion LPP1/1a-shRNA exprimierten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine elektrophysiologische Charakterisierung von Neuronen, die in ihrer Migration gestört waren, mit der *whole-cell patch-clamp*-Methode durchgeführt. Dafür wurden von Gehirnen der *in utero* elektroporierten Embryos akute Gehirnschnitte angefertigt und diese *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

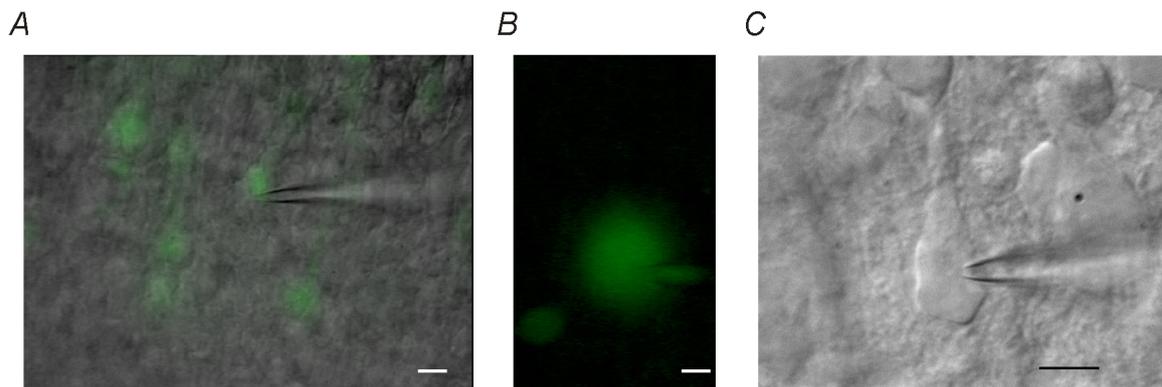


Abbildung 11: **Identifizierung von Neuronen im akuten Gehirnschnitt**

**A.** Abgebildet ist ein Ausschnitt von einem elektroporierten Gehirnschnitt am Tag E18. Neurone exprimierten nach Transfektion das Reporterprotein eGFP (grün), was der Visualisierung der shRNA-Expression diente. Zur Darstellung wurde das Fluoreszenzbild mit einem DIC-IR Bild überlagert. An einem Neuron in der Mitte des Bildes ist eine Pipette für *whole-cell*-Ableitungen zu erkennen. Die Pia mater befand sich oberhalb des Bildes.

**B.** Vergrößerung eines fluoreszierenden Neurons (E18) und einer Ableitungspipette, bei der sich ein Teil der grün fluoreszierenden Zellmembran in der Pipette befand (*whole-cell*-Konfiguration).

**C.** DIC-IR Bild eines Neurons am Tag P5 in der Schicht V im Neokortex. Im Kontakt mit dem Neuron ist eine Patchpipette zu erkennen. Der Maßstab gibt in allen Bildern 10  $\mu\text{m}$  an.

### 5.1.1 Intrinsische Eigenschaften von Neuronen am Tag E18

In allen beschriebenen Versuchen wurden Neurone untersucht, deren embryonale Vorläuferzellen am Tag 13,5 mittels *in utero*-Elektroporation mit shRNA-Konstrukten transfiziert wurden. Bei der *in utero*-Elektroporation wurde von einer tragenden Maus in einen Embryo ein LPP1/1a-shRNA-Konstrukt und in einen anderen Embryo ein Luziferase shRNA-Kontrollkonstrukt in den Ventrikel injiziert. Die Transfektion erfolgte, nachdem zwischen zwei an den Kopf gehaltenen Elektroden Spannung angelegt wurde. Die Vorläuferzellen nahmen durch diesen Spannungspuls die Konstrukte auf und exprimierten diese in den folgenden Tagen. Die Expression der Konstrukte wurde über ein eGFP-Reporter sichtbar gemacht und Neurone, die mit shRNA gegen LPP1/1a oder einer shRNA gegen Luziferase (Kontrolle) transfiziert waren, fluoreszierten nach Anregung grün (Beispiele siehe Abbildung 11). Die Kontroll-shRNA war gegen die Leuchtkäfer Luziferase gerichtet, ein Protein, das nicht in Nagern vorkommt. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt, dem embryonalen Tag 18 (E18), befanden sich die meisten LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone in anderen Abschnitten der kortikalen Platte als bei den Kontrollen (bereits beschrieben in Velmans, 2010).

Für die im Folgenden beschriebenden Experimente wurden die Neurone in zwei Gruppen eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehörten Neurone, die sich in den unteren Lagen der kortikalen Platte befanden. Dies waren LPP1/1a-shRNA transfizierte Neurone und nicht transfizierte Neurone in der direkten Umgebung dieser. Es wurden nicht transfizierte Neurone als Kontrolle gewählt, da sich nur sehr wenige Kontroll-shRNA transfizierte Neurone in dieser Region befanden. Die zweite Gruppe bildeten Neurone der oberen Schicht der kortikalen Platte, die unabhängig von der exprimierten shRNA dorthin gewandert waren.

#### 5.1.1.1 Neurone in den unteren Schichten der kortikalen Platte

Nach Etablierung der *whole-cell*-Konfiguration wurden Neurone zunächst im *current-clamp* untersucht. Eine Charakterisierung der Neurone wurde durch Injektion von negativen und positiven Strompulsen und anschließender Analyse der Spannungen vorgenommen. Negative Strominjektion führte in allen Neuronen zu einer langsamen Hyperpolarisation (langsame Membranzeitkonstante). Bereits kleine Strompulse waren ausreichend, um eine große Auslenkung zu bekommen, was auf einen hohen Eingangswiderstand hindeutet (siehe Tabelle 2 für eine Zusammenfassung). Neurone, die als Kontrolle gemessen wurden, waren nach positiver Strominjektion alle in der Lage Aktionspotenzial ähnliche regenerative Potenziale zu erzeugen. Hingegen führte das gleiche Experiment in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen selten zur Generierung von Aktionspotenzial ähnlichen Potenzialen. Dies war in 3 von 7 Neuronen der Fall, aber diese Potenziale waren weder repetitiv noch überschwellig. In Abbildung 12A sind von den aufgezeichneten Neuronen zwei typische Spannungsantworten, je von einem Kontroll- und einem LPP1/1a-shRNA transfizierten Neuron, abgebildet.

Im *current-clamp* ist keine genaue Analyse der Ströme möglich. Daher wurden die spannungsaktivierten Ströme im *voltage-clamp*-Modus näher untersucht. Dies erfolgte an denselben Neuronen, die bereits im *current-clamp* untersucht wurden, da der Verstärker eine Änderung des Aufnahmemodus erlaubte. Die Neurone wurden auf ein Haltepotenzial von -60 mV geklemmt und von diesem wurde von -90 mV in Intervallen von 10 mV bis zu einer Spannung von 30 mV die Stromantwort der

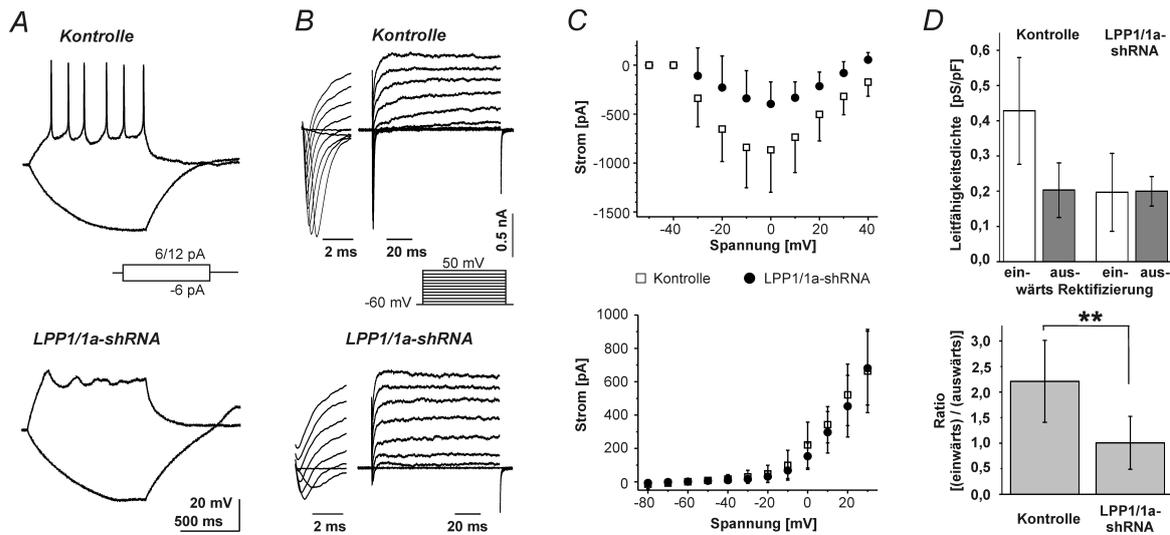


Abbildung 12: **Verringerte Einwärtsströme in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen der unteren kortikalen Platte.**

**A.** Beispiele von Spannungsantworten auf Strominjektionen für ein Kontroll- (*oben*) und ein LPP1/1a-shRNA exprimierendes Neuron (*unten*). Eine Strominjektion führte zum Auslösen von repetitiven Potentialen in dem Neuron der Kontrolle, aber zu keinen im LPP1/1a defizienten Neuron. Zu beachten ist, dass doppelt so viel positiver Strom in das LPP1/1a defiziente Neuron injiziert wurde.

**B.** Repräsentative Beispiele von Stromantworten auf negative- und positive Spannungsschritte. Von einem Haltepotential von -60 mV wurden die Neurone für 100 ms in 10 mV Intervallen von -60 bis auf 50 mV geklemmt. Native Neurone zeigten einen größeren, schnell aktivierbaren einwärtsgerichteten Strom im Gegensatz zu Neuronen, die LPP1/1a-shRNA exprimierten. Die vergrößert dargestellten Ströme der ersten 3 ms wurden *offline* um die kapazitive Transiente korrigiert. Langsam aktivierende auswärtsgerichtete Ströme waren in beiden Gruppen vorhanden.

**C.** Strom-Spannungsbeziehungen der einwärtsgerichteten Ströme (*oben*) und der auswärtsgerichteten Ströme (*unten*) zeigten, dass ausschließlich einwärtsgerichtete Ströme verändert waren. Die Daten der Kontrollen sind jeweils mit offenen Quadraten dargestellt und von den LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen mit einem gefüllten Kreis. Die Aufnahmen erfolgten ohne Kompensation des seriellen Widerstands. Fehlerbalken (Standardabweichung) im oberen Graph sind zur besseren Darstellung nur in eine Richtung gezeigt.

**D.** Aus den aufgezeichneten Strömen wurden die maximalen einwärts- und auswärtsgerichteten Leitfähigkeiten berechnet (siehe 4.14.5) und auf die Kapazität normalisiert. Es wurden 8 Kontrollen und 7 LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone gemessen (*oberer Graph*). Um diese Daten besser miteinander zu vergleichen, wurde für jede Zelle ein Ratio der Einwärts- und Auswärtsströme berechnet und dieses dargestellt (*unten*). Dieses ist signifikant kleiner in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,003$ ).

Neurone für 200 ms gemessen. Mit diesem beschriebenen Spannungsprotokoll wurden verschiedene spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert (Spannungsprotokoll in Abbildung 12B). Die Darstellung in Abbildung 12B erfolgte erst ab -60 mV, da keine substantiellen ein- oder auswärtsgerichteten Ströme zwischen -90 mV und -60 mV aktiviert wurden. Zwei prominente Ströme wurden aktiviert. Der erste Strom war einwärtsgerichtet und aktivierte ab einer Spannung von -30 mV, gefolgt von einer schnellen Deaktivierung. Die maximale Stromamplitude wurde bei 0 mV gemessen und bei

positiveren Spannungsschritten wurde der Strom wieder kleiner. Eine Strom-Spannungs-Beziehung für diesen Strom für Kontroll- und LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone ist in Abbildung 12C im oberen Graph gezeigt. Auch in Neuronen, die mit LPP1/1a-shRNA transfiziert waren, wurde dieser beschriebene Strom gemessen. Hingegen hatten diese Neurone einen kleineren einwärtsgerichteten Strom als die Neurone der Kontrolle (siehe Abbildung 12B und C). Dieses Ergebnis spiegelte die im *current-clamp* gemessene verringerte Erregbarkeit von LPP1/1a-shRNA Neuronen wieder.

Der zweite Strom, der mit diesem Protokoll aktiviert wurde, war auswärtsgerichtet und langsamer. Ab einer Spannung von -20 bis -10 mV konnte dieser Strom aktiviert werden und die Amplitude vergrößerte sich, je positiver die Spannungsschritte wurden. Die Auswertung für alle Zellen ergab, dass die maximale Amplitude bei einer Spannung von 30 mV lag. Eine Strom-Spannungs-Beziehung ist in Abbildung 12C im unteren Graph dargestellt.

Um zu überprüfen, ob der gemessene Strom tatsächlich kleiner war, oder ob die Ströme gleich waren, sich aber auf Grund der Zellgröße unterschieden, erfolgte von jedem Neuron eine Normierung der Ströme auf die gemessene Zelloberfläche ( $C_m$ ). Für diese Berechnung wurde angenommen, dass zu diesem Entwicklungszeitpunkt die gemessenen einwärtsgerichteten Ströme hauptsächlich durch Natriumströme und auswärtsgerichtete Ströme durch Kaliumströme entstehen (siehe Diskussion und Bahrey und Moody, 2003). Durch diese Annahme konnte nun die Berechnung der Leitfähigkeiten, basierend auf dem Umkehrpotenzial für Kalium und Natrium (siehe Gleichung 3), erfolgen. Die maximale Leitfähigkeit wurde in der Folge für jedes Neuron bestimmt und auf die Kapazität normiert ( $G_{\max}/C_m$ ), womit die Leitfähigkeitsdichte erhalten wurden. In LPP1/1a-shRNA exprimierenden Zellen ( $n = 7$ ) war die einwärtsgerichtete ( $0,20 \pm 0,11$  pS/pF) und die auswärtsgerichtete ( $0,20 \pm 0,04$  pS/pF) Leitfähigkeitsdichte gleich verteilt (Abbildung 12D *oben*). Hingegen war die einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte ( $0,43 \pm 0,15$  pS/pF) in Neuronen der Kontrolle ( $n = 8$ ) ungefähr doppelt so groß wie die auswärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte ( $0,20 \pm 0,07$  pS/pF). Dies zeigte sich in einem doppelt so großen Verhältnis von  $2,21 \pm 0,80$  (Kontrolle) zu  $1,01 \pm 0,52$  (LPP1/1a-shRNA, siehe Abbildung 12D *unten*). Dieser Unterschied zwischen LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und Neuronen der Kontrolle war signifikant ( $p = 0,003$ ).

Aus diesen Experimenten schließe ich, dass die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone, welche in den tieferen Lagen der kortikalen Platte verblieben, eine verringerte Erregbarkeit (gemessen an Aktionspotenzialen) auf Grund veränderter Leitfähigkeiten zeigten. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zur Kontrolle, in der die Neurone ein größeres Verhältnis von einwärtsgerichteten Leitfähigkeitsdichten zu auswärtsgerichteten Leitfähigkeitsdichten besaßen.

### 5.1.1.2 Neurone in den oberen Lagen der kortikalen Platte

Unabhängig davon, ob LPP1/1a-sh-RNA oder Kontroll-shRNA exprimiert wurde, gab es Neurone, die in den oberen Schichten der kortikalen Platte lokalisiert waren. Es stellte sich daher die Frage, ob sich diese Neurone von den Neuronen, die in den unteren Schichten verblieben waren, anhand ihrer Ströme unterscheiden. Weiterhin wurde die Frage gestellt, ob Unterschiede zwischen den Neuronen der oberen Lage der kortikalen Platte vorhanden waren. Die durchgeführten Experimente waren analog zu den Experimenten, wie sie für die unteren Schichten der kortikalen Platte beschrieben wurden. Die Neurone beider Gruppen reagierten im *current-clamp* nach positiven Strominjektionen mit der

Generierung von Aktionspotenzial ähnlichen regenerativen Potenzialen. Wenn negativer Strom injiziert wurde, war eine langsame Membranzeitkonstante zu beobachten (siehe Abbildung 13A).

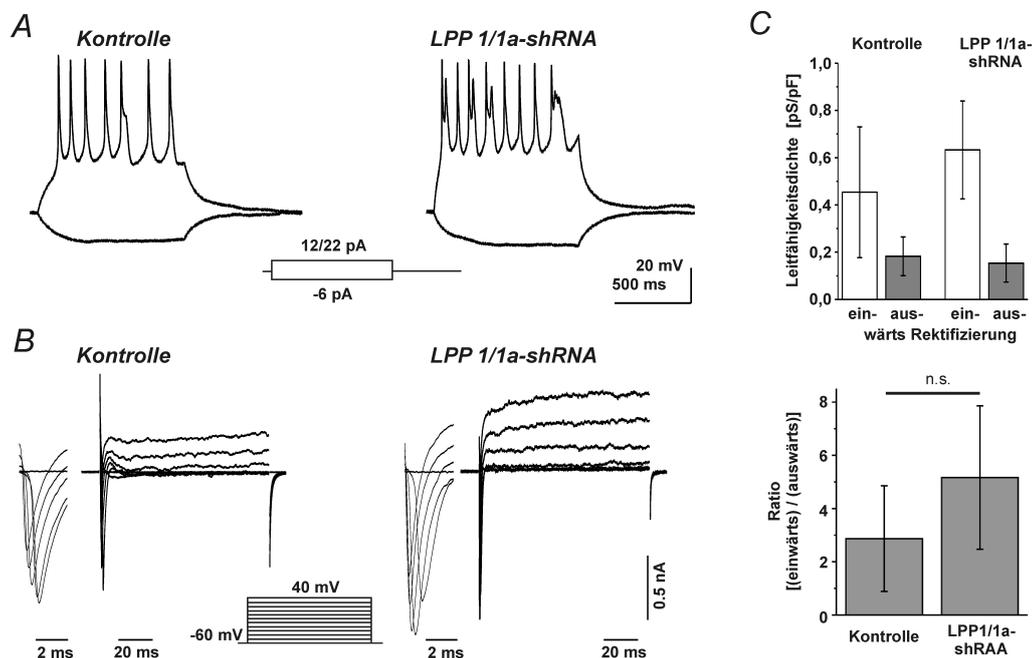


Abbildung 13: **E18 Analyse von Neuronen der oberen kortikalen Schicht**

**A.** Beispiele von Spannungsantworten von Neuronen (Kontroll- und LPP1/1a-shRNA) in der oberen Schicht der kortikalen Platte. Positive Strominjektionen führten in beiden gezeigten Neuronen zur Ausbildung von aktionspotenzialähnlichen repetitiven Potenzialen.

**B.** Strom-Beispiele als Antwort auf 100 ms lange Schritte bei Spannungen von -90 mV bis 40 mV von einem Haltepotential von -60 mV ausgehend. In beiden gezeigten Neuronen wurden spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert und es waren schnell aktivierende und deaktivierende Einwärtsströme sowie langsamer aktivierenden Auswärtsströme messbar. Die vergrößert dargestellten Ströme der ersten Millisekunden wurden um die kapazitive Transiente korrigiert.

**C.** Die Verteilung der einwärts- und auswärtsgerichteten Rektifizierungen wurde in Abhängigkeit der Leitfähigkeitsdichte dargestellt (*oben*). Beide Gruppen zeigten eine höhere einwärts- als auswärtsgerichtete Rektifizierung. Dies ist auch im Verhältnis der beiden Rektifizierungen dargestellt ( $n = 5$ , Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,35$ ; *unten*). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Um die Ströme von spannungsabhängigen Ionenkanälen zu charakterisieren, wurden weitere Untersuchungen im *voltage-clamp* durchgeführt. Die Aktivierung von Strömen erfolgte von einem Haltepotential von -60 mV aus in 10 mV Intervallen bis 40 mV (Spannungsprotokoll siehe Abbildung 13B). Typische Beispielströme, die mit diesem Protokoll aufgezeichnet wurden, sind in der gleichen Abbildung dargestellt. Vergleichbar mit Neuronen der unteren Lagen wurde ein schnell aktivierender und deaktivierender Einwärtsstrom sowie ein langsamerer aktivierender Auswärtsstrom gemessen. Von den Strömen wurde die maximale Leitfähigkeit berechnet (gleiche Annahmen wie für die Neurone in den unteren Schichten) und diese zur besseren Vergleichbarkeit auf die Zellkapazität normalisiert. Im Anschluss wurde dann die Dichte der Leitfähigkeit (pS/pF) miteinander verglichen. Die Auswertung ergab, dass sowohl LPP1/1a-shRNA als auch Kontroll-shRNA exprimierende Neurone eine größere einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte als auswärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte besa-

ßen (siehe Abbildung 13C *oben*). Die einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte war  $0,45 \pm 0,28$  pS/pF in den Neuronen der Kontrolle und  $0,63 \pm 0,21$  pS/pF in den LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen. Die Gruppen unterschieden sich damit nicht (je  $n = 5$ ; Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,25$ ). Auch die auswärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte war in beiden Gruppen vergleichbar:  $0,18 \pm 0,08$  pS/pF in Neuronen der Kontrolle und  $0,15 \pm 0,08$  pS/pF in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen (je  $n = 5$ , Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,60$ ). Aus den einwärtsgerichteten und auswärtsgerichteten Leitfähigkeitsdichten wurde ein Verhältnis (einwärts/auswärts) berechnet und zeigt, dass beide Gruppen eine höhere auswärts- als einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte besaßen (Kontrolle:  $2,86 \pm 1,99$  LPP1/1a-shRNA:  $5,16 \pm 2,69$ ) und sich nicht unterschieden (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,35$ ).

In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass Neurone, die trotz der Expression von LPP1/1a-shRNA in die oberen Schichten der kortikalen Platte gewandert waren, sich nicht von ihren Kontrollen unterschieden. Im Gegensatz zu Neuronen, die zum Untersuchungszeitpunkt in tieferen Schichten der kortikalen Platte anzufinden waren, hatten sie eine erhöhte einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte und waren damit erregbarer.

### 5.1.1.3 Intrinsische neuronale Membraneigenschaften

Neben der Analyse der intrinsischen Ströme erfolgte von allen untersuchten Neuronen eine Analyse von allgemeinen neuronalen Parametern. Diese waren Eingangswiderstand ( $R_{in}$ ), Ruhemembranpotenzial ( $V_m$ ) und spezifische Kapazität ( $C_m$ ) der Neurone. Charakteristisch für alle untersuchten Neurone war ein sehr hoher Eingangswiderstand im Gigaohm-Bereich, was keine Kopplung der Neurone via *gap-junctions* vermuten ließ (LoTurco und Kriegstein, 1991) sowie auf eine geringe Dichte von Ionenkanälen hindeutete. Der hohe Eingangswiderstand war unabhängig davon, in welchem Teil der kortikalen Platte sich die Neurone befanden. Weiterhin wurde das Ruhemembranpotenzial gemessen, es konnte aber nicht von allen Neuronen bestimmt werden, da einige Neurone nicht im *current-clamp* untersucht wurden. Die Kapazität war in allen untersuchten Neuronen in einer ähnlichen Größenordnung. Eine statistische Analyse zeigte keine Unterschiede der gemessenen Parameter zwischen den Gruppen. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in Tabelle 2 für die untersuchten Neurone in der unteren und oberen kortikalen Platte zusammengefasst.

In den vorhergehenden Ergebnissen wurden Experimente vom embryonalen Tag 18 dargestellt, in denen Neurone, die mit LPP1/1a-shRNA oder entsprechender Kontroll-shRNA transfiziert waren, physiologisch untersucht wurden. Neurone der oberen und unteren kortikalen Platte unterschieden sich nicht im Eingangswiderstand, dem Ruhemembranpotenzial und der spezifischen Kapazität. Neuronen der unteren kortikalen Platte waren nach positiver Strominjektion nicht in der Lage aktionspotenzialähnliche regenerative Potenziale zu generieren. Eine genaue Analyse der verantwortlichen Ströme zeigte, dass in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Zellen die einwärtsgerichteten Ströme verkleinert waren. Hingegen gab es keinen Unterschied in Neuronen der oberen kortikalen Platte. Die auswärtsgerichteten Ströme waren weder in Neuronen der oberen, noch der unteren kortikalen Platte unterschiedlich.

E18	Untere kortikale Platte		
	Parameter	Kontrolle	LPP1/1a-shRNA
$R_{in}$ [G $\Omega$ ]	5,26 $\pm$ 2,64 (8)	3,69 $\pm$ 1,97 (9)	0,08
$V_m$ [mV]	-65,18 $\pm$ 7,24 (5)	-58,31 $\pm$ 7,67 (6)	0,27
$C_m$ [pF]	29,91 $\pm$ 9,48 (8)	28,56 $\pm$ 5,19 (9)	0,73
	Obere kortikale Platte		
$R_{in}$ [G $\Omega$ ]	4,61 $\pm$ 2,39 (5)	3,86 $\pm$ 2,65 (5)	0,46
$V_m$ [mV]	-69,39 $\pm$ 4,58 (5)	-64,28 $\pm$ 13,1 (5)	0,75
$C_m$ [pF]	24,32 $\pm$ 6,86 (5)	27,05 $\pm$ 9,05 (5)	0,56

Tabelle 2: **Membraneigenschaften von Neuronen am embryonalen Tag 18 (E18).** Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und in Klammern die Anzahl der Experimente.

### 5.1.2 Elektrophysiologisches Profil von Neuronen am Tag P5

In vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone nicht nur langsamer wandern, sondern es auch zu einem Migrationsstopp kommt (Velmans, 2010). Am Tag P5 waren LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone vermehrt in den tieferen Schichten IV und V des Kortex lokalisiert. Hingegen war die Mehrzahl der Kontroll-shRNA exprimierenden Neurone in den Schichten II/III anzufinden (Velmans, 2010). Um einen Vergleich mit den früher untersuchten Neuronen zu erhalten, erfolgte eine elektrophysiologische Analyse der LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone in der Schicht V des Kortex sowie untransfizierten Neuronen als Kontrollen.

Entsprechend der Experimente am Tag E18 wurde von den Neuronen nach Etablierung der *whole-cell*-Konfiguration eine Charakterisierung im *current-clamp* durchgeführt. Hier zeigte sich, dass alle Neurone, unabhängig von der Menge an LPP1/1a, in der Lage waren regenerative Aktionspotenziale zu generieren (siehe Abbildung 14A). Eine präzise Analyse der Aktionspotenziale wurde durchgeführt, ist aber zur besseren Übersicht in Abschnitt 5.1.3 näher erläutert (siehe auch Abbildung 16).

Im Anschluss wurden die Neurone im *voltage-clamp* auf eine Spannung von -70 mV geklemmt und die einwärts- und auswärtsgerichteten spannungsabhängigen Ströme experimentell untersucht. In LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und entsprechenden Kontrollen wurden Ströme nach Spannungsschritten von -90 mV bis 50 mV in 10 mV-Intervallen aktiviert (dargestellt nur von -50 mV bis 50 mV). Die gemessenen Ströme waren sowohl einwärts- als auch auswärtsgerichtet und mehrere Nanoampere groß (siehe Abbildung 14B, *links*: Kontrolle, *rechts*: LPP1/1a-shRNA). Für die einwärts- und auswärtsgerichteten Ströme wurde die Leitfähigkeit des maximalen Stroms berechnet (basierend auf Natrium- und Kaliumumkehrpotenzialen für den einwärts- oder auswärtsgerichteten Strom) und diese zur Vergleichbarkeit auf die jeweilige Kapazität der Zelle normiert. In LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen ( $n = 8$ ) wurde eine einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte von  $0,75 \pm 0,24$  pS/pF und eine auswärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte von  $0,32 \pm 0,13$  pS/pF gemessen. Wenn die Leitfähigkeitsdichten dividiert wurden (einwärtsgerichtet/auswärtsgerichtet), ergab dies ein Verhältnis von  $2,43 \pm 0,47$  (siehe Abbildung 14C unten). Auch in nativen Neuronen der Schicht V,

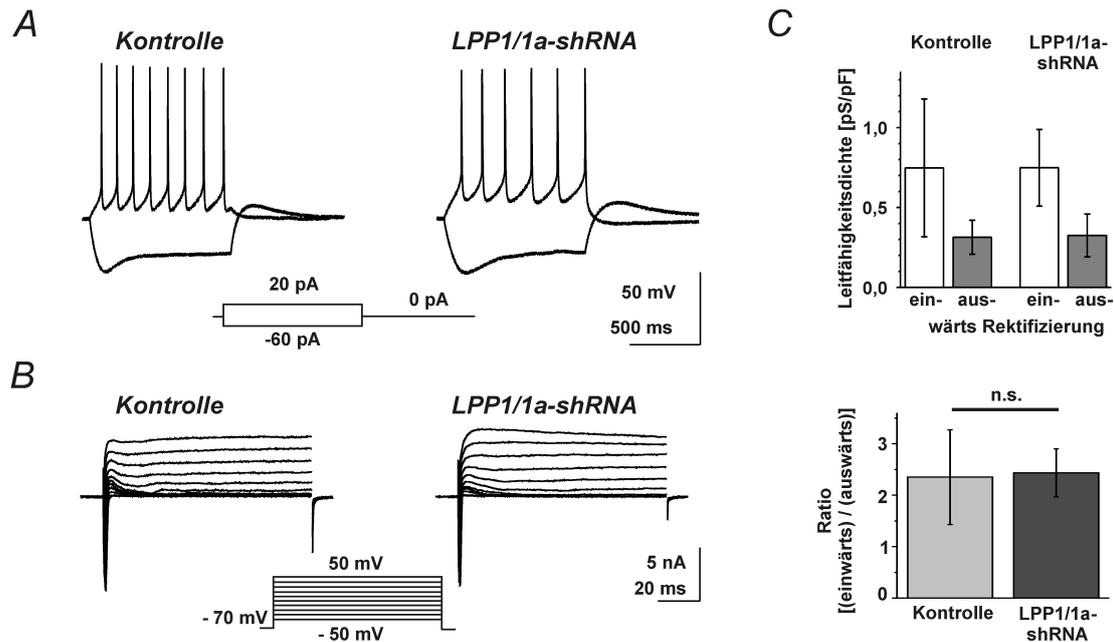


Abbildung 14: **Eigenschaften von Neuronen am Tag P5**

**A.** Spannungsantworten von kortikalen Schicht V LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und nativen Neuronen der Schicht V sind gleich. Gezeigt sind zwei Beispiele, die nach positiver Strominjektion repetitive Aktionspotenziale generierten.

**B.** Typische Stromantworten von LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und entsprechenden Kontrollen auf Spannungsschritte zwischen -50 mV und 50 mV ausgehend von einem Haltepotenzial von -70 mV. Die Amplituden der einwärts- und auswärtsgerichteten Ströme waren in beiden Gruppen vergleichbar. Das Spannungsprotokoll für beide Neurone ist verkleinert dargestellt.

**C.** Populationsdaten der einwärts- und auswärtsgerichteten Leitfähigkeit nach Normalisierung auf die Kapazität der einzelnen Neurone. Kontrollen ( $n = 11$ ) und LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone ( $n = 8$ ) hatten eine gleichartige Verteilung der einwärts- und auswärtsgerichteten Ströme (*oben*). Dies war auch im ähnlichen Verhältnis der Einwärts- und Auswärtsleitfähigkeitsdichten repräsentiert (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,1$ ; *unten*). Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

die als Kontrollen benutzt wurden ( $n = 11$ ), war die einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte größer als die auswärtsgerichtete, womit dies vergleichbar zu den LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen war. Die einwärtsgerichtete Leitfähigkeitsdichte der Kontrollen betrug  $0,74 \pm 0,43$  pS/pF und die auswärtsgerichtete  $0,31 \pm 0,11$  pS/pF, was einem Verhältnis von  $2,35 \pm 0,92$  entsprach (siehe Abbildung 14C). Das Verhältnis war in beiden Versuchsgruppen gleich (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,1$ ).

In diesen Experimenten wurde keine Kompensation des seriellen Widerstands durchgeführt, daher hatte die altersabhängige Vergrößerung der einwärtsgerichteten Ströme zur Folge, dass keine vollständige Spannungskontrolle über die schnell aktivierenden Einwärtsströme in den durchgeführten Experimenten vorhanden war. Erkennbar war die mangelnde Kontrolle daran, dass die Einwärtsströme nicht graduell aktivierten, sondern dass um die Aktivierungsschwelle der maximale Strom messbar war. Lösungen für dieses Problem sind die Kompensation des seriellen Widerstands, eine Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration, ein partieller Block mit TTX (falls Natriumströme vorliegen) oder ein Block mit Calciumkanalblockern. Die drei letztgenannten haben eine Reduktion

des maximalen Stroms zur Folge, wodurch keine Aussage über die maximale Leitfähigkeit zu treffen ist, hingegen eine genauere Beschreibung der Kinetik ermöglicht wird (Huguenard et al., 1988). Da die maximale Leitfähigkeit untersucht werden sollte, habe ich mich in einigen Experimenten auf eine Kompensation des seriellen Widerstands beschränkt. Nicht für jedes Neuron war eine gute Kompensation möglich, da, durch den Schaltkreis des Verstärkers bedingt, ein Überschwingen des Neurons verursacht wurde. Dies hatte zur Folge, dass in diesen Fällen das Neuron meistens gestorben ist.

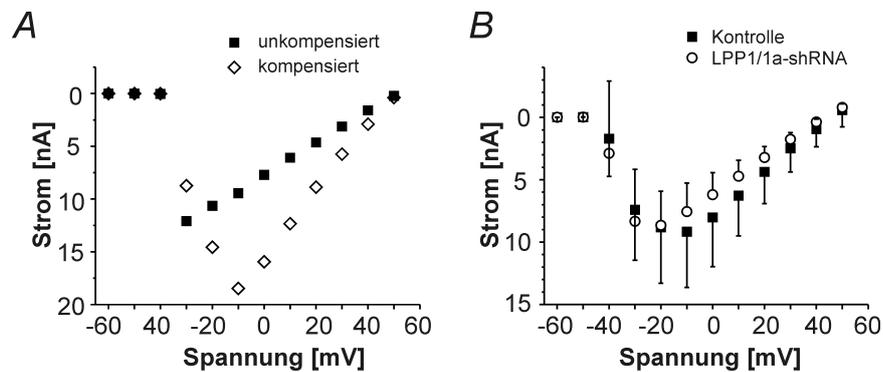


Abbildung 15: **Kompensation des seriellen Widerstands**

**A.** Dargestellt ist eine Strom-Spannungs-Beziehung eines P5 Neurons, von dem nach Depolarisation die schnellen spannungsabhängigen einwärtsgerichteten Ströme gemessen wurden. Der Strom wurde ohne (■) und mit (◇) Kompensation des seriellen Widerstands gemessen.

**B.** Zusammenfassung des einwärtsgerichteten Stroms nach Kompensation des seriellen Widerstands von 10 Kontrollen und 4 LPP1/1a-shRNA-Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an und sind zur verbesserten Übersicht nur in eine Richtung dargestellt.

In Abbildung 15A ist für ein Neuron beispielhaft in einer Strom-Spannungsbeziehung der gemessene Strom vor und nach Kompensation des seriellen Widerstands dargestellt. Wenn der serielle Widerstand unkompensiert war, aktivierte der Strom maximal, sobald die Aktivierungsspannung erreicht wurde. Hingegen ist nach Kompensation vom seriellen Widerstand eine graduelle Vergrößerung des Stroms zu erkennen mit der maximalen Stromamplitude bei -10 mV. Es konnte für 10 native Neurone (Kompensation  $41,2 \pm 23,6\%$ ) und für 4 LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone (Kompensation  $16,75 \pm 3,1\%$ ) der serielle Widerstand kompensiert werden. Von diesen Strömen wurde für jede Spannung der Mittelwert berechnet und das Ergebnis wurde in Abbildung 15B dargestellt. Der maximale Strom vergrößerte sich durch die Kompensation des seriellen Widerstands und betrug  $9,72 \text{ nA} \pm 4,85 \text{ nA}$  für die Kontrollen und  $9,19 \text{ nA} \pm 3,56 \text{ nA}$  für die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone. Auch nach Kompensation des seriellen Widerstands unterschied sich der maximale Strom nicht (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,99$ ). Da nicht für jedes Neuron eine Kompensation des seriellen Widerstands durchgeführt werden konnte und es keinen Unterschied in der maximalen Amplitude gab, wurden diese Ergebnisse nicht zur Berechnung der Leitfähigkeiten benutzt. Die maximalen Amplituden sind durch diesen methodischen Fehler kleiner, als sie nach Kompensation des seriellen Widerstands waren.

Im vorherigen Abschnitt wurde Ergebnisse dargestellt, die an Neuronen des Tags P5 gemessen wurden. Die stehengebliebenen Neurone waren nicht mehr von Neuronen in ihrer unmittelbaren

Umgebung zu unterscheiden, wenn die einwärts- und auswärtsgerichteten Leitfähigkeitsdichten als Vergleichsparameter herangezogen wurden.

### 5.1.2.1 Neuronale Membranparameter

Weiterhin wurden zur vollständigen Charakterisierung die bereits erwähnten allgemeinen Zellparameter  $R_{in}$ ,  $V_m$  und  $C_m$  analysiert. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den Versuchen am Tag E18 eine Reduktion des Eingangswiderstands in den Neuronen erfolgt war. Dies korrelierte mit dem Auftreten eines durch Hyperpolarisation aktivierten Stroms (17 von 17 Neuronen) und war vergleichbar mit anderen Entwicklungsstudien (Bahrey und Moody, 2003). Die Neurone wurden außerdem größer, gemessen an der Kapazität der Neurone. Das Ruhemembranpotenzial war in ähnlichen Spannungsbereichen wie bei den jüngeren Neuronen zu finden. Am Tag P5 wurde kein Unterschied der Membranparameter zwischen den Kontrollen und LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen gemessen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

P5	Pyramidale Neokortikale Schicht V Neurone			
	Eigenschaft	Kontrolle (n = 11)	LPP1/1a-shRNA	<i>p</i>
$R_{in}$ [M $\Omega$ ]		634,2 $\pm$ 271,5	539,7 $\pm$ 192,8 (n = 9)	0,47
$V_m$ [mV]		-67,6 $\pm$ 5,3	-69,6 $\pm$ 2,3 (n = 7)	0,19
$C_m$ [pF]		89,9 $\pm$ 29,5	72,5 $\pm$ 17,8 (n = 9)	0,24

Tabelle 3: **Membraneigenschaften von pyramidalen Neuronen an Tag P5.**

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung mit der Anzahl der Experimente in Klammern.

In dem vorherigen Abschnitt wurden Untersuchungen an Neuronen der Schicht V des Kortex am Tag P5 dargestellt. Es wurden Neurone miteinander verglichen, die entweder shRNA gegen LPP1/1a exprimierten oder sich in der gleichen Schicht befanden, aber untransfiziert waren. Die Experimente zeigten, dass die untersuchten Neurone unabhängig von ihrem LPP1/1a-Gehalt in der Lage waren repetitive Aktionspotenziale zu generieren. Außerdem waren die einwärts- und auswärtsgerichteten Ströme gleich, womit die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone eine Stromentwicklung nachgeholt haben. Eine Unterscheidung anhand allgemeiner neuronaler Membranparameter war nicht möglich. Daraus wurde geschlossen, dass sich diese Neurone an ihre Umgebung angepasst hatten, denn sie waren elektrophysiologisch nicht mehr von nativen Schicht V Neuronen zu unterscheiden.

## 5.1.3 Analyse der Aktionspotenziale

### 5.1.3.1 Aktionspotenziale am Tag E18

Aktionspotenzialen liegen einwärtsgerichtete Natriumströme und auswärtsgerichtete Kaliumströme zu Grunde. Da sich am Tag E18 einwärtsgerichtete Ströme von Neuronen der unteren Schichten der kortikalen Platte abhängig von ihrem LPP1/1a-Gehalt unterschieden und im *current-clamp* die regenerativen Potenziale verändert aussahen, wurden diese genauer analysiert. Für die Neurone am embryonalen Tag 18 (siehe Abbildung 12A und 13A) wurden dafür die regenerativen Potenziale nach positiver Strominjektion als Aktionspotenziale behandelt. Für Neurone am Tag P5 (siehe Abbildung

14A) wurde angenommen, dass es sich um Aktionspotenziale handelt. Im Folgenden wird nun ausschließlich der Begriff Aktionspotenzial benutzt, um eine einheitliche Beschreibung zu ermöglichen. Die Analyse von allen Aktionspotentialen erfolgte, wie in den Methoden beschrieben.

Wenn ein Neuron Aktionspotenziale (APs) nach überschwelliger Strominjektion generierte, wurde das erste ausgelöste Aktionspotenzial ausgewertet. Als erstes wurden am Tag E18 die APs der Neurone in den unteren kortikalen Schichten analysiert. Es konnten in den Neuronen der Kontrolle in 5 von 5 Zellen APs ausgelöst werden und in 3 aus 6 in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen. Zwischen diesen Neuronen gab es keine Unterschiede bezüglich der Aktionspotenzialschwelle ( $p = 0,65$ ), der Dauer ( $p = 0,99$ ) und des maximalen Anstiegs ( $p = 0,11$ ). Hingegen war die Amplitude der APs zwischen LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und den Kontrollen unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,03$ ). Eine Zusammenfassung der Daten ist zur besseren Übersichtlichkeit in Tabelle 4 dargestellt.

E18	Untere kortikale Platte		
	Kontrolle	LPP1/1a	$p$
1. Aktionspotenzial			
<b>Schwelle (mV)</b>	$-24,59 \pm 6,18$ (5)	$-24,71 \pm 4,52$ (3)	0,65
<b>Amplitude (mV)</b>	$39,04 \pm 8,16$ (5)	$22,9 \pm 6,59$ (3)	0,03
<b>Dauer (ms)</b>	$8,15 \pm 4,03$ (5)	$9,85 \pm 4,49$ (2)	0,99
<b>max <math>dV/dt</math> (mV/s)</b>	$33,34 \pm 10,94$ (5)	$17,98 \pm 13,14$ (3)	0,11

Tabelle 4: **Aktionspotenzialeigenschaften von Neuronen der unteren kortikalen Platte an E18.** In Klammern ist die Anzahl der analysierten Aktionspotenziale angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

Neuronen der oberen kortikalen Platte zeigten keine Unterschiede der Aktionspotenzialschwelle ( $p = 0,99$ ), der Aktionspotenzialhöhe ( $p = 0,81$ ), der Dauer ( $p = 0,23$ ) und des maximalen Anstiegs ( $p = 0,52$ ). Diese Daten sind zur besseren Übersicht in Tabelle 5 zusammengefasst.

E18	Obere kortikale Platte		
	Kontrolle (4)	LPP1/1a (5)	$p$
1. Aktionspotenzial			
<b>Schwelle (mV)</b>	$-18,39 \pm 6,93$	$-20,7 \pm 3,39$	0,99
<b>Amplitude (mV)</b>	$39,71 \pm 13,50$	$41,87 \pm 7,75$	0,81
<b>Dauer (ms)</b>	$21,34 \pm 13,44$	$54,75 \pm 41,19$	0,23
<b>max <math>dV/dt</math> (mV/s)</b>	$32,98 \pm 23,11$	$40,13 \pm 13,85$	0,52

Tabelle 5: **Aktionspotenzialeigenschaften von Neuronen der oberen kortikalen Platte an E18.** Analyse der Aktionspotenziale für 4 Kontroll-shRNA- und 5 LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone. Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Die Aktionspotenziale von Neuronen am Tag E18 waren nur in den unteren Schichten der kortikalen Platte in ihrer Amplitude verändert. Hingegen waren alle anderen Parameter unverändert. Neurone in den oberen Schichten der kortikalen Platte zeigten keine Unterschiede in den Aktionspotentialen.

### 5.1.3.2 Aktionspotenziale am Tag P5

Auch am Tag P5 wurde das jeweils erste Aktionspotenzial eines Neurons analysiert. Im Vergleich zu den Aktionspotenzialen am Tag E18 war die Aktionspotenzialamplitude am Tag P5 signifikant vergrößert (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ ). In Abbildung 16A sind Aktionspotenziale von einem nativen Neuron (schwarz) und einem LPP1/1a-shRNA exprimierendem Neuron (blau) am Tag P5 vergrößert dargestellt. In der Abbildung 16B wurde die berechnete 3. Ableitung der abgebildeten Aktionspotenziale dargestellt. Der erste Peak der 3. Ableitung korrespondierte mit der Aktionspotenzialschwelle, die mit einer gestrichelten Linie in Abbildung 16A markiert wurde. Die in der Abbildung 16 beispielhaft dargestellte Analyse der Aktionspotenziale ergab für alle Neurone am Tag P5, dass LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone gegenüber Neuronen der Kontrolle eine depolarisierte Aktionspotenzialschwelle besaßen ( $p = 0,006$ ). Außer der AP-Schwelle waren weder die Höhe ( $p = 0,25$ ), die Dauer ( $p = 0,92$ ) oder die maximale Steigung ( $p = 0,12$ ) zwischen nativen Neuronen und LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen verändert. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 6 zusammengestellt.

1. Aktionspotenzial	Kontrolle (n = 10)	LPP1/1a (n = 7)	<i>p</i>
Schwelle (mV)	-34,30 ± 2,15	-30,61 ± 2,0	0,006
Amplitude (mV)	69,76 ± 8,01	65,67 ± 2,72	0,25
Dauer (ms)	6,56 ± 3,17	7,54 ± 0,73	0,92
max $dV/dt$ (mV/s)	121,39 ± 42,81	101,11 ± 12,86	0,12

Tabelle 6: Aktionspotenzialeigenschaften von Neuronen der Schicht V am Tag P5. Ergebnisse der Analyse für 10 native Neurone und 7 LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone am Tag P5.

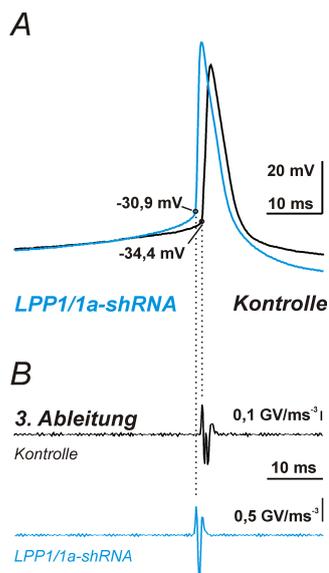


Abbildung 16: Analyse von Aktionspotenzialen.

**A.** Dargestellt ist das jeweils erste Aktionspotenzial eines LPP1/1a-shRNA exprimierenden (blau) sowie eines nativen Neurons (schwarz) am Tag P5. Die Aktionspotenziale wurden durch die Injektion von positivem Strom ausgelöst. Markiert sind die jeweiligen Aktionspotenzialschwellen durch eine gestrichelte Linie mit einer Wertangabe.

**B.** Das erste Maximum der 3. Ableitung des Aktionspotenzials korrespondiert mit der Aktionspotenzialschwelle (gepunktete Linie).

Die am Tag E18 gemessene verringerte Amplitude in Neuronen der unteren Schichten der kortikalen Platte war am Tag P5 nicht mehr vorhanden. Weiterhin erfolgte eine Hyperpolarisation der Aktionspotenzialschwelle und eine Beschleunigung der Aktionspotenziale im Vergleich zu den Mes-

sungen an E18. LPP1/1a-shRNA exprimierende Neuronen hatten eine depolarisiertere Aktionspotenzialschwelle im Vergleich zu den Kontrollen.

#### 5.1.4 Analyse der spontanen synaptischen Ströme an den Tagen E18 und P5

Im Zuge der Entwicklung des ZNS bilden sich synaptische Verknüpfungen zwischen den Neuronen aus. Diese Verknüpfungen lassen sich als postsynaptische Ströme messen. Eine präsynaptische Ausschüttung von exzitatorischen (häufig Glutamat) oder inhibitorischen (häufig GABA) Neurotransmittern führt zur Aktivierung von postsynaptisch lokalisierten ligandengesteuerten Ionenkanälen wie z.B. AMPA- oder GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Die Etablierung von Synapsen während der Synaptogenese ist ein dynamischer Prozess, der axonale und dendritische Kompartimente verfeinert. Um eine eventuelle Implikation von einem veränderten LPP1/1a-Level auf die Ausbildung von Synapsen zu untersuchen, wurden die postsynaptischen Ströme der Neurone näher untersucht.

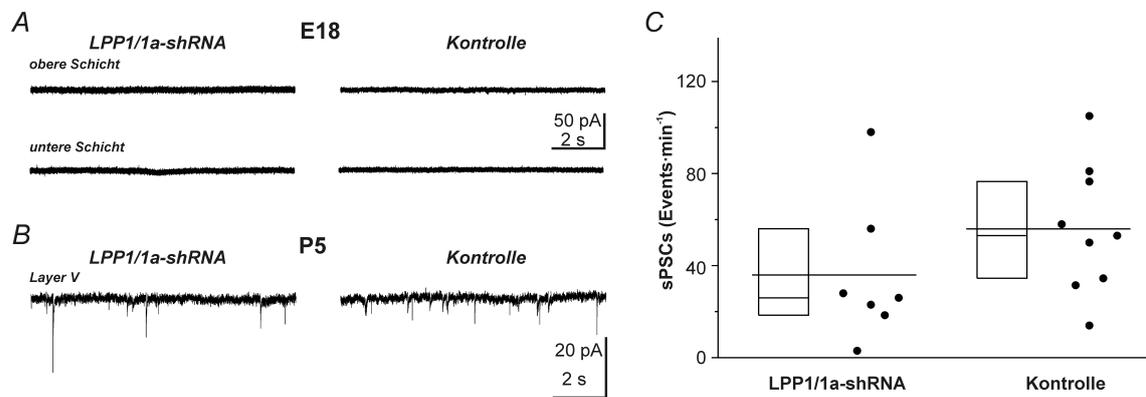


Abbildung 17: **Entwicklung von spontanen postsynaptischen Strömen (sPSCs)**

**A.** Am Tag E18 wurden keine spontanen postsynaptischen Ströme bei einer Haltespannung von -60 mV gemessen. Dies war unabhängig von der Lokalisation der Neurone in der kortikalen Platte und auch dem Level von LPP1/1a.

**B.** Am Tag P5 konnten bei einem Haltepotenzial von -70 mV sowohl in Kontrollen als auch in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen der Schicht V spontane postsynaptische Ströme (sPSCs) gemessen werden.

**C.** Die Häufigkeit der sPSCs am Tag P5 wurde in einem Boxplot mit einzelnen Experimenten dargestellt. LPP1/1a-shRNA exprimierende ( $36,1 \pm 31,5 \text{ Events} \cdot \text{min}^{-1}$ ) und native Neurone ( $55,9 \pm 28,1 \text{ Events} \cdot \text{min}^{-1}$ ) zeigten keine Unterschiede in der sPSC-Frequenz ( $p = 0,12$ ). Die Begrenzung der Box sind das 25. und 75. Perzentil, der Strich innerhalb der Box der Median und der waagerechte Balken, der die einzelnen Datenpunkte umschließt, der Mittelwert.

Am embryonalen Tag 18 wurden die Neurone in der unteren und oberen Schicht des Kortex auf eine Spannung von -60 mV geklemmt. Jedes untersuchte Neuron wurde über einen Zeitraum von mindestens einer Minute auf dieser Spannung gehalten. In den untersuchten Neuronen wurde kein postsynaptischer Strom gemessen (siehe Abbildung 17A).

Am Tag 5 nach der Geburt wurden die postsynaptischen Ströme (PSCs) bei einer Spannung von -70 mV aufgenommen und *post-hoc* ausgewertet. Dabei wurde keine Unterscheidung zwischen ex-

zitorischen und inhibitorischen Strömen vorgenommen. Auf Grund der benutzten Lösung wurden eher exzitatorische als inhibitorische Ströme gemessen, obwohl GABA zu diesem Zeitpunkt noch erregend ist (Tyzio et al., 2006). In der Mehrzahl der nativen Neurone der Schicht V wurden postsynaptische Ströme gemessen (9 von 12). Auch in der Mehrzahl der LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone (7 aus 9) wurden postsynaptische Ströme gemessen (siehe Abbildung 17B). Die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone hatten im Mittel  $36,1 \pm 31,5$  Events $\cdot$ min $^{-1}$  und damit weniger Eingänge als die nativen Neurone der Schicht V mit  $55,9 \pm 28,1$  Events $\cdot$ min $^{-1}$ . Eine Überprüfung auf Signifikanz ergab, dass die beiden Gruppen sich nicht unterschieden (Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,12$ ; Abbildung 17C).

In den untersuchten Neuronen am Tag P5 wurden, unabhängig vom LPP1/1a-Level, spontane synaptische Ströme gemessen. Es gab keine Unterschiede in der Häufigkeit der PSCs zwischen LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und Neuronen der Kontrolle. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die ortsfremden LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone sich in der Umgebung soweit integriert hatten, dass sich synaptische Verbindungen herausbilden konnten.

### 5.1.5 Zusammenfassung Abschnitt 5.1

Neurone, die induziert durch verringerte LPP1/1a-Level in der kortikalen Entwicklung langsamer migrierten als entsprechende Kontrollen, zeigten eine Verzögerung in der Entwicklung ihrer intrinsischen Ströme. LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone, die am embryonalen Tag 18 in tieferen Lagen der sich entwickelnden kortikalen Platte anzutreffen waren, hatten eine geringere Dichte an einwärtsgerichteten Leitfähigkeiten. Hingegen waren auswärtsgerichtete Ströme in ihrer Leitfähigkeitsdichte mit nativen Neuronen vergleichbar. Am Tag 5 nach der Geburt hatten sich die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone, die sich nun in Schicht V befanden, an ihre Umgebung angepasst und waren von den Kontrollen nicht mehr anhand ihrer intrinsischen einwärts- und auswärtsgerichteten Ströme zu unterscheiden. Die Mehrzahl der gemessenen Neurone beider Gruppen hatten synaptische Kontakte ausgebildet, was durch die Anwesenheit von spontanen postsynaptischen Strömen gezeigt wurde. Der einzige Unterschied, der am postnatalen Tag 5 festgestellt werden konnte, war eine depolarisiertere Aktionspotenzialschwelle in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen. Damit hatten LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone in 7 Tagen die Entwicklung ihrer intrinsischen Ströme nachgeholt.

## 5.2 Einfluss von Lysophosphatidsäure auf die synaptische Transmission im akuten Gehirnschnitt

### 5.2.1 Intrinsische Eigenschaften der untersuchten pyramidalen Neurone der CA1- Region

Die in den nachfolgenden Experimenten genauer untersuchten Neurone wurden zu Beginn der Experimente elektrophysiologisch charakterisiert, um auszuschließen, dass es sich um unterschiedliche Typen von Neuronen handelt. Neurone zwischen dem postnatalen Tag 21-30 wurden visuell als pyramidale Neurone (Lokalisation in der CA1 *cell-layer*, pyramidale Morphologie und Dendritenausrichtung) identifiziert und nach erfolgreicher Etablierung der *whole-cell*-Konfiguration wurden standardisierte Protokolle im *current*- und *voltage-clamp* ausgeführt. Drei Membranparameter, die untersucht wurden, waren der Eingangswiderstand ( $R_{in}$ ), das Ruhemembranpotenzial ( $V_m$ ) und die Kapazität ( $C_m$ ). Um die Qualität des Experiments zu überwachen, wurde zusätzlich der serielle Widerstand ( $R_S$ ) bestimmt. Änderungen des seriellen Widerstands im experimentellen Verlauf von mehr als 20 % oder von mehr als 20 M $\Omega$  führten zum Ausschluss des Experiments. Der Eingangswiderstand ermöglichte eine Einschätzung der Zellgröße und der Anzahl um das Ruhemembranpotenzial aktivierenden Kanäle. Die Kapazität diente zur Abschätzung der Zellgröße durch die kapazitive Aufladung der Zellmembran und damit der geklemmten Fläche. Die Auswertung der untersuchten Neurone wurde für die jeweiligen Stämme einzeln vorgenommen. Die Ergebnisse der beiden Wildtypstämme C57Bl/6 und BALB/c sowie der *Knock-out*-Stämme LPA<sub>2</sub>-KO und PRG1-KO sind in der Tabelle 7 dargestellt. In den nachfolgenden Ergebnissen wird genauer auf die Parameter von den drei Mausstämmen BALB/c, LPA<sub>2</sub>-KO und PRG1-KO eingegangen. Die Auswertung ergab, dass die Neurone der einzelnen Mausstämmen sich nicht anhand ihrer allgemeinen Zellparameter unterschieden.

Parameter	Pyramidale Neurone CA1				<i>p</i>
	C57Bl/6 (n = 10)	BALB/c (n = 9)	LPA <sub>2</sub> KO (n = 10)	PRG1 KO (n = 9)	
$R_{in}$ [M $\Omega$ ]	170,2 ± 51,8	164,8 ± 52,7	197,3 ± 69,4	164,9 ± 52,7	0,57
$V_m$ [mV]	-65,8 ± 2,8	-65,7 ± 2,0	-65,3 ± 3,7	-66,2 ± 2,5	0,93
$C_m$ [pF]	105,1 ± 29,4	109,3 ± 48,6	91,2 ± 34,2	84,1 ± 11,5	0,35
$R_S$ [M $\Omega$ ]	10,7 ± 3,0	11,5 ± 3,3	13,3 ± 3,5	9,5 ± 2,5	0,06

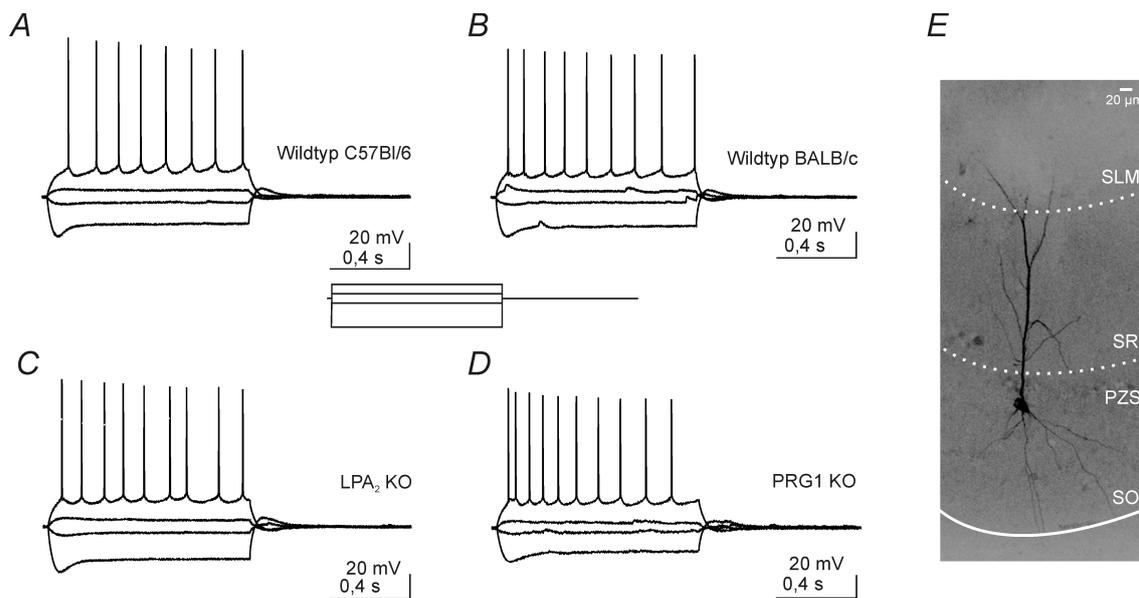
Tabelle 7: **Intrinsische Eigenschaften von pyramidalen CA1-Neuronen (P21-P30).**

Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde eine ANOVA durchgeführt. Der Fehler gibt die Standardabweichung an.

Des Weiteren wurde für die Dauer von 1 Sekunde Strom in die Neurone injiziert (siehe *inset* in Abbildung 18) und die Spannungsantworten der Neurone aufgezeichnet. Typische Spannungsantworten von C57Bl/6-, BALB/c-, LPA<sub>2</sub>-KO- und PRG1-KO-Neuronen sind in Abbildung 18 dargestellt. Nach Injektion eines stark negativen Stroms zeigten alle Neurone einen *sag*. Dieser *sag* ist ein Hinweis auf die Anwesenheit von einem hyperpolarisationsaktivierten Strom ( $I_{hyp}$ ), da diese Spannungsänderung die Aktivierung von  $I_h$  reflektiert (Poolos et al., 2006). *Suprathreshold*-Strom-

injektionen führten zur Generierung von Aktionspotenzialen. Eine Adaptation der Aktionspotenziale, sichtbar als Vergrößerung des *Inter-spike*-Intervalls, konnte in den Neuronen beobachtet werden (siehe Abbildung 18A, B und C). Es wurde keine genauere Auswertung des *Inter-spike*-Intervalls vorgenommen.

Die Neurone in den experimentell benutzten Mausstämmen unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer intrinsischen neuronalen Eigenschaften und es konnten auch keine Unterschiede in der Spannungsantwort nach Strominjektion beobachtet werden. Daher wurde angenommen, dass die untersuchten Gruppen homogen hinsichtlich ihrer neuronalen Identität waren und dass der Mausstamm keinen Einfluss auf die intrinsischen neuronalen Eigenschaften hatte.



**Abbildung 18: Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung von pyramidalen CA1-Neuronen**

**A.** Spannungsantworten eines CA1 pyramidalen Neurons (Wildtyp; Stamm: C57Bl/6), die im *current-clamp* aufgenommen wurden. Nach überschwelliger Strominjektion generierte das Neuron repetitive Aktionspotenziale. Eine Strominjektion von -120 pA führte zur Ausbildung von einem *Sag*.

**B.** Repräsentative Aufnahme eines pyramidalen CA1 Neurons eines anderen Mausstamms (BALB/c) ähnelte in seinen Charakteristika (Aktionspotenziale und *Sag*) dem Neuron in A.

**C und D.** Spannungsantwort eines CA1 pyramidalen Neurons aus einer (C) LPA<sub>2</sub>-KO- (Hintergrund: BALB/c) und (D) PRG1-KO-Maus (Hintergrund C57Bl/6) ähnelten den Neuronen der Wildtypen.

Für alle Neurone wurde das gezeigte Protokoll (siehe *inset*) verwendet. Die Dauer der Strominjektion betrug eine Sekunde und es wurde Strom in Schritten von 60 pA, 20 pA, -20 pA und -120 pA injiziert.

**E.** Biocytin gefülltes und post-experimentell fixiertes und anschließend gefärbtes CA1-Neuron. Zur kontrastreichereren Darstellung wurde das Bild in ein Graustufenbild umgewandelt und invertiert. SO - Stratum oriens; PZS - Pyramidale-Zell-Schicht; SR- Stratum radiatum; SLM - Stratum lacunosum moleculare. Größenbalken 20  $\mu$ m.

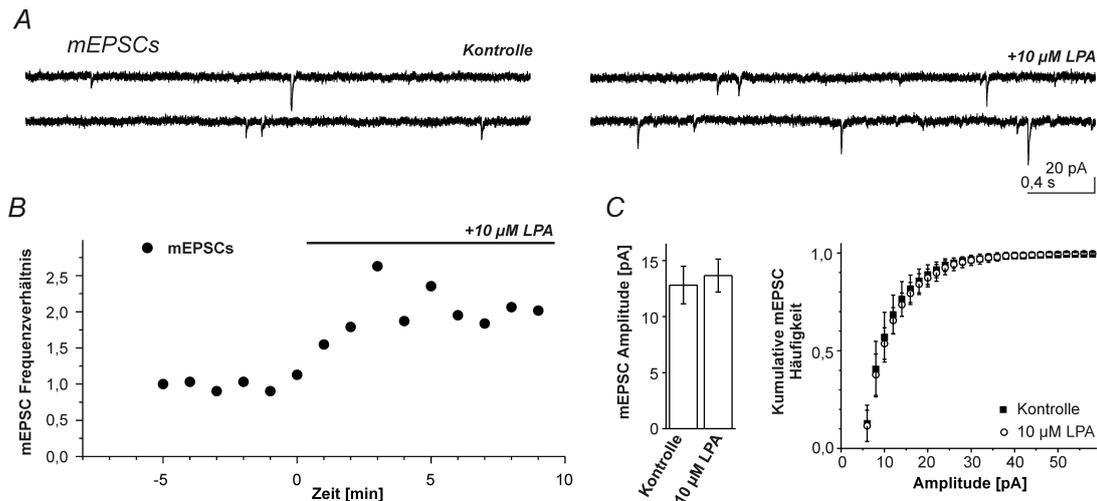


Abbildung 19: **10 µM LPA erhöht die mEPSC-Frequenz in CA1-Neuronen.**

**A.** Stromaufzeichnungen eines pyramidalen Neurons bei einem Haltepotenzial von -70 mV vor (*links*) und nach (*rechts*) der Applikation von 10 µM LPA. mEPSCs sind erkennbar als einwärtsgerichteter Strom.

**B.** Zeitverlauf des mEPSCs-Verhältnisses (LPA/Kontrolle) eines Neurons. Nach der Zugabe von 10 µM LPA stieg die mEPSC-Frequenz über mehrere Minuten an.

**C.** *links:* Die gemittelte mEPSC-Amplitude während der Kontrolle und nach Zugabe von 10 µM LPA. *Rechts:* Kumulative Darstellung der mEPSC Amplituden vor und nach der Kontrolle von LPA.

### 5.2.2 LPA Applikation führte zu einem Anstieg von mEPSCs

Eine bekannte Wirkung von LPA in Neuronen ist unter anderem eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Holtsberg et al., 1997). Da eine lokale Erhöhung des Calciumspiegels in Synapsen zu einer Ausschüttung von synaptischen Vesikeln führt, wurde im Labor in Feldpotenzialversuchen (siehe Abbildung 5) die synaptische Transmission an hippocampalen pyramidalen Neuronen der CA1 im akuten Gehirnschnitt (*in situ*) untersucht. Es wurde nach LPA-Applikation eine Vergrößerung der Feldpotenziale nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen und damit der Erregung gemessen. Dieses Ergebnis war der Ausgangspunkt für die hier dargestellten Experimente, um den Einfluss von LPA auf Einzelzellbasis an hippocampalen Neuronen zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse dieser Experimente im akuten Gehirnschnitt hinsichtlich einer Beeinflussung durch LPA dargestellt. Zur Lokalisierung des Effekts wurden zuerst Untersuchungen zur exzitatorischen und inhibitorischen spontanen synaptischen Transmission in unterschiedlichen Experimenten untersucht.

Nach Etablierung der *whole-cell*-Konfiguration der *patch-clamp*-Methode und der durchgeführten Charakterisierung (siehe 5.2.1) wurde von pyramidalen Neuronen der CA1-Region des Hippocampus (Alter P21 bis P30) eine pharmakologische Isolierung der spontanen exzitatorischen postsynaptischen Ströme (mEPSCs) durchgeführt (siehe Abbildung 19A, Kontrolle). Über einen Zeitraum von mehreren Minuten wurden bei einer Spannung von -70 mV die mEPSCs kontinuierlich aufgenommen. Wenn unter Kontrollbedingungen eine stabile *Baseline* beobachtet wurde, d.h. die Frequenz der mEPSCs blieb stabil, erfolgte eine Applikation von 10 µM LPA mit der ACSF. Die Neurone wurden

weiter kontinuierlich auf eine Spannung von  $-70$  mV geklemmt und die mEPSCs wurden durchgehend aufgenommen (siehe Abbildung 19A *rechts*). Ein beispielhafter experimenteller Zeitverlauf ist in Abbildung 19B dargestellt (gefüllte Kreise ●). Die Applikation von  $10 \mu\text{M}$  LPA führte in den untersuchten Neuronen zu einer Erhöhung der mEPSC-Frequenz von  $0,98 \pm 0,20$  Hz auf  $1,86 \pm 0,32$  Hz. Dies entsprach einer Erhöhung des Verhältnisses der mEPSC-Frequenz in Bezug auf die Kontrolle von  $2,00 \pm 0,11$  ( $n = 10$ ;  $p < 0.01$ , gepaarter t-Test).

Für die Neurone des Stammes C57Bl/6 wurde von den 10 gemessenen Neuronen von allen mEPSC-Amplituden der Mittelwert vor und nach der Zugabe von LPA berechnet. Dies waren für die Kontrolle  $12,8 \pm 1,7$  pA und nach LPA-Applikation  $13,6 \pm 1,5$  pA (siehe Abbildung 19C links). Die Amplituden jedes einzelnen mEPSCs wurden zusätzlich kumulativ dargestellt und zeigten keine Veränderung (Abbildung 19C rechts).

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass eine extrazelluläre Applikation von LPA zu einer Steigerung der mEPSC-Frequenz in CA1-Neuronen führte. Diese Änderung entwickelte sich über einen Zeitraum von wenigen Minuten.

### 5.2.3 Einfluss von LPA auf die spontane inhibitorische synaptische Transmission

In den bisherigen Ergebnissen wurde eine Erhöhung der Frequenz der exzitatorischen synaptischen Ströme nach extrazellulärer LPA-Applikation dargestellt. Pyramidale Neurone der CA1-Region des Hippocampus erhalten neben dem exzitatorischen Input auch inhibitorischen Input. Da zu Beginn dieser Experimente nicht bekannt war, wie LPA wirkt, wurde auch die inhibitorische synaptische Transmission untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Anstieg der Erregbarkeit durch eine indirekte Verringerung der Inhibition stattfindet, daher wurde untersucht, ob die extrazelluläre LPA-Applikation die inhibitorische synaptische Transmission moduliert. Um diese Frage zu klären, wurden hierzu Experimente in einem unabhängigen experimentellen Set durchgeführt. Es wurden inhibitorische Ströme pharmakologisch isoliert (siehe Abbildung 10B). Inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) entstehen nach Chloridinflux durch  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren. Durch eine Änderung des Umkehrpotenzials von Chlorid auf circa  $-70$  mV konnten IPSCs um das Ruhemembranpotenzial des Neurons aufgenommen werden. Durch einen Block von spannungsabhängigen Natriumkanälen wurden nur spontane (miniatur) inhibitorische Ströme (mIPSCs) aufgezeichnet. In Abbildung 20A sind repräsentative *Traces* vor und nach der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  LPA dargestellt. Von dem gleichen Neuron wie in Abbildung 20A ist in Abbildung 20B der experimentelle Zeitverlauf abgebildet. Die Dauer der Applikation von LPA ist mit einem schwarzen Balken indiziert. Für alle untersuchten Neurone zeigte eine Analyse der mIPSC-Frequenz, dass nach Applikation von LPA keine Veränderung der mIPSC-Frequenz zu beobachten war. In der Kontrolle betrug die Frequenz  $8,42 \pm 3,39$  Hz und nach  $10 \mu\text{M}$  LPA  $8,58 \pm 3,46$  Hz. Für jedes Neuron ( $n = 7$ ) erfolgte die Berechnung eines Verhältnisses, welches sich nicht veränderte (LPA/ Kontrolle:  $1,02 \pm 0,11$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,87$ ; siehe Abbildung 20C).

Wie bei den vorherigen mEPSC-Experimenten wurde ein Vergleich der Amplituden aller detektierten mIPSCs durchgeführt, denn eine Veränderung der Amplituden von postsynaptischen Strömen kann einen Hinweis auf die Lokalisation der Modulation geben. Die mIPSC-Amplitude betrug in der

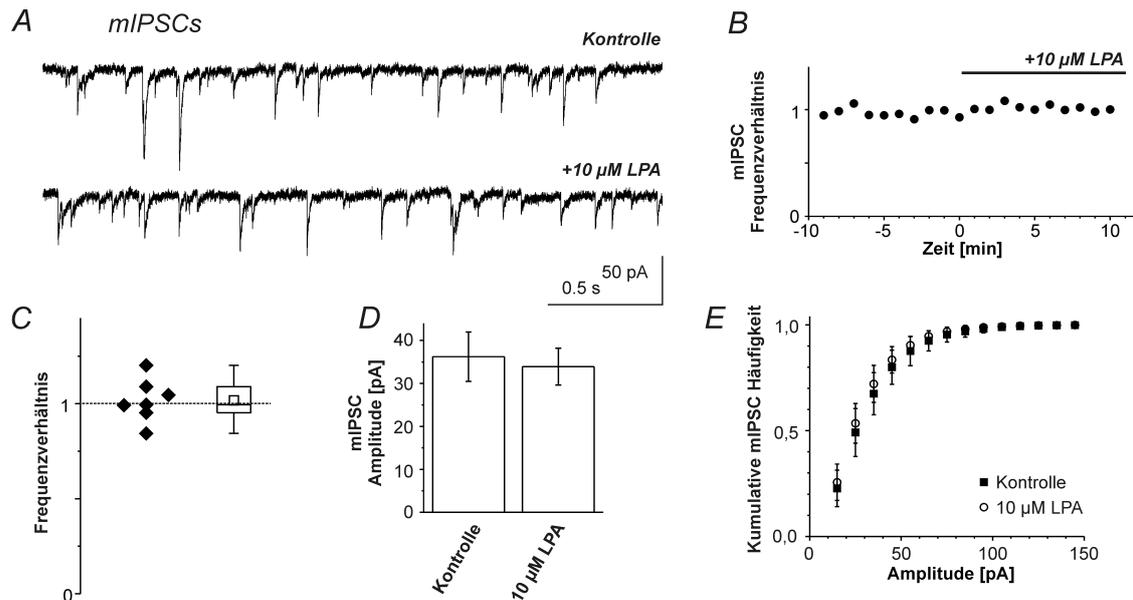


Abbildung 20: mIPSCs in CA1-Neuronen wurden nicht durch 10 µM LPA moduliert.

- A. Pharmakologisch isolierte mIPSCs eines CA1-Neurons (Wildtyp) vor und nach der Zugabe von 10 µM LPA. Während des Experiments wurde das Neuron bei einer Spannung von -70 mV gehalten.
- B. Zeitverlauf der mIPSC-Frequenz des Neurons aus A dargestellt als Frequenzverhältnis. Die Applikation von 10 µM LPA (ab Zeitpunkt 0) veränderte nicht die Frequenz der mIPSCs.
- C. Die Darstellung der Ergebnisse für alle untersuchten Neurone (n = 7) als Boxplot zeigte, dass keine Veränderung der mIPSC-Frequenz im Verhältnis zur Kontrolle zu beobachten war (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,86$ ).
- D. Die durchschnittliche Amplitude der mIPSCs vor und nach der Applikation von LPA war nicht verändert (n = 7;  $p = 0,13$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).
- E. Kumulative Darstellung der mIPSC-Amplituden vor und nach der Applikation von LPA zeigte keine Veränderung.

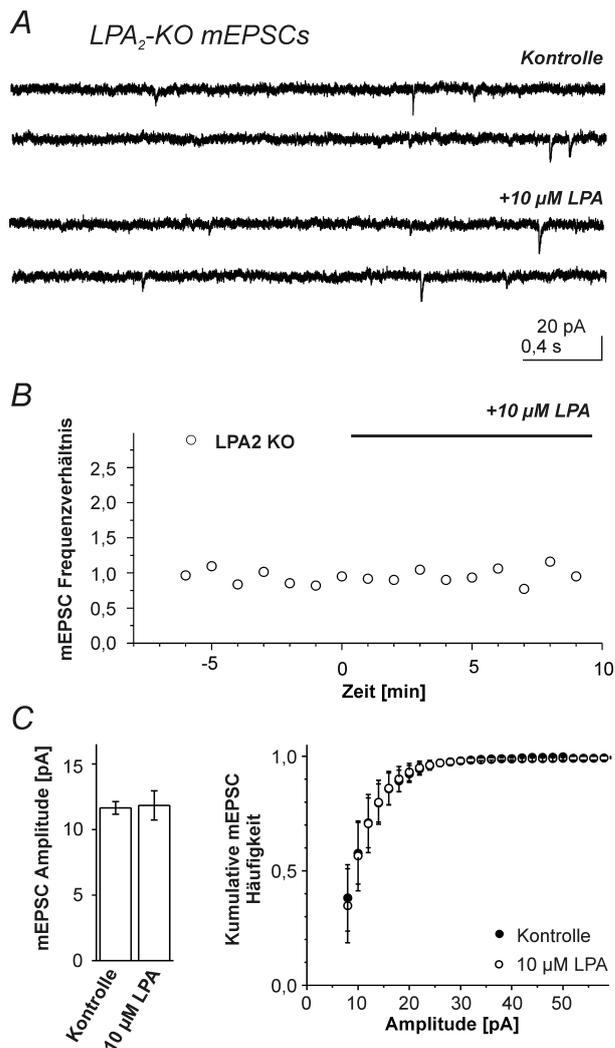
Kontrolle  $36,2 \pm 5,8$  pA und nach LPA-Applikation  $33,9 \pm 4,3$  pA. Es gab keinen Unterschied zwischen den gemessenen Neuronen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p = 0,13$ ; n = 7; siehe auch Abbildung 20D). Eine kumulative Darstellung der mIPSCs-Amplituden zeigte eine starke Überschneidung zwischen den Neuronen während der Kontrolle und nach der Applikation von LPA (siehe Abbildung 20E).

Eine Modulation der inhibitorischen synaptischen Transmission durch LPA wurde in CA1-Neuronen nicht nachgewiesen, was bedeutet, dass die Modulation durch LPA auf die exzitatorische synaptische Transmission beschränkt war. Aus diesem Grund beschränkten sich alle nachfolgenden Experimente auf eine Untersuchung der exzitatorischen synaptischen Transmission.

#### 5.2.4 LPA<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelte LPA-Wirkung

Lyso-phosphatidsäure vermittelte Wirkmechanismen wurden hauptsächlich nach Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren beobachtet und sind oft mit Calciumerhöhungen verbunden (siehe 3.1.2). Es wurde gezeigt, dass der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor vermehrt in ausdifferenzierten Neuronen exprimiert

wurde, hingegen andere LPA-Rezeptoren in Neuronen schwächer exprimiert wurden (Kieselmann, 2010). Außerdem wurde eine präsynaptische Lokalisation des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors nachgewiesen (Trimbuch et al., 2009). Die zentrale Rolle während der synaptischen Transmission (Südhof, 2004) und die präsynaptische Lokalisation des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors dienen als Hinweis darauf, dass der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor eine funktionelle Rolle in Neuronen spielen kann. In der Folge wurde analog zu den Experimenten im Wildtyp die exzitatorische synaptische Transmission in Neuronen der CA1-Region des Hippocampus von LPA<sub>2</sub>-*knock-out*-Mäusen vor und nach der Applikation von LPA untersucht.



### Abbildung 21: Modulation von mEPSCs in LPA<sub>2</sub>-KO-Neuronen

**A.** Stromaufzeichnung bei -70 mV vor (oben) und nach der Applikation von 10 µM LPA (unten) eines LPA<sub>2</sub> defizienten Neurons zeigen keine Veränderung der Amplituden durch LPA.

**B.** Zeitverlauf des gleichen Experiments wie in **A**, bei dem der Zeitpunkt von 10 µM LPA auf den Zeitpunkt 0 gesetzt wurde. Die Frequenz der mEPSCs veränderte sich nicht über den Zeitraum der LPA Applikation.

**C. links:** Die Mittelwerte der Amplituden der mEPSCs zwischen Kontrolle und nach 10 µM LPA waren nicht verändert ( $n = 6$ ,  $p = 0,75$ ). **rechts:** Die kumulative Darstellung der mEPSC-Amplituden zeigte keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und nach 10 µM LPA.

Die Isolation der mEPSCs erfolgte pharmakologisch (siehe 4.14.4 und Abbildung 10) und wurde in Abbildung 21A vor und nach der Applikation von 10 µM LPA dargestellt. Die Anzahl der mEPSCs wurde analysiert und ein typischer Zeitverlauf (offene Kreise ○) der mEPSC-Frequenz ist als Verhältnis zur Kontrolle (Mittelwert der letzten 4 Minuten) in Abbildung 21B dargestellt. In dieser Abbildung ist die Dauer der LPA-Applikation mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet und es lässt sich erkennen, dass die Frequenz der mEPSCs sich nicht während der Dauer der LPA-Applikation veränderte. Für alle gemessenen LPA<sub>2</sub>-*knock-out*-Neurone erfolgte ein Vergleich der mEPSC-Frequenz der Kontrolle ( $0,67 \pm 0,49$  Hz) mit der mEPSC-Frequenz der letzten vier gemessenen Minuten der LPA-Applikation ( $0,64 \pm 0,51$  Hz;  $n = 6$ ). Daraus wurde ein Frequenzverhältnis von

$0,96 \pm 0,23$  berechnet ( $10 \mu\text{M LPA}/\text{Baseline der Kontrolle}$ ) und die statistische Analyse ergab, dass die LPA-Applikation zu keiner Änderung der mEPSC-Frequenz führte (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,75$ ). Ein Vergleich mit dem Frequenzverhältnis von Neuronen des Wildtyps zeigte einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen an (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,001$ ). Dieses Ergebnis zeigte eine Funktion des  $\text{LPA}_2$ -Rezeptors in der durch LPA ausgelösten mEPSC-Reduktion.

Wie für den Wildtyp wurden von den gemessenen  $\text{LPA}_2$ -*knock-out*-Neuronen ( $n = 6$ ) die durchschnittliche Amplitude aller mEPSCs berechnet. Diese war für die Kontrolle  $11,7 \pm 0,5 \text{ pA}$  und nach dem Einwaschen von LPA  $11,8 \pm 1,1 \text{ pA}$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,75$ ).

Im Gegensatz zu pyramidalen Neuronen des Wildtyps führte LPA in Neuronen, denen der  $\text{LPA}_2$ -Rezeptor fehlte ( $\text{LPA}_2$ -KO), nicht zu einer Steigerung der mEPSC-Frequenz. Der  $\text{LPA}_2$ -Rezeptor wurde für die LPA induzierte Steigerung von mEPSCs benötigt.

Der Hintergrundstamm von den  $\text{LPA}_2$  *knock-out*-Mäusen war BALB/c, ein anderer Inzuchtstamm als der Wildtypstamm C57Bl/6, mit dem die ersten Experimente im Abschnitt 5.2.2 durchgeführt wurden. Da beide Stämme Inzuchtstämme waren, hat sich über die Zeit ein genetischer Unterschied zwischen den beiden Stämmen herausgebildet. Um auszuschließen, dass die nicht vorhandene Steigerung der mEPSCs-Frequenz in  $\text{LPA}_2$ -*knock-out*-Neuronen an dem unterschiedlichen Hintergrundstamm lag, wurden zusätzliche Kontrollexperimente mit BALB/c Mäusen durchgeführt. Diese Gruppe setzte sich sowohl aus *littermates* von  $\text{LPA}_2$ -*knock-out*-Mäusen als auch aus normalen BALB/c Wildtypen zusammen. Diese Experimente wurden analog zu den Experimenten an Neuronen der Wildtypen durchgeführt.

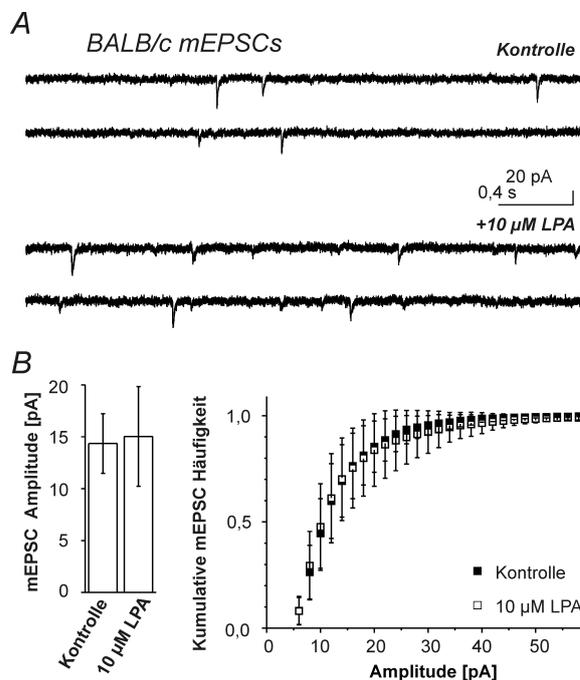


Abbildung 22: LPA Wirkung auf mEPSCs in CA1-Neuronen des Mausstamms BALB/c

A. mEPSCs wurden bei einer Spannung von  $-70 \text{ mV}$  aufgezeichnet. Dargestellt sind Ströme vor und nach der Applikation von  $10 \mu\text{M LPA}$ . LPA-Applikation erhöhte die mEPSC-Frequenz.

B. Die mittleren Amplituden der mEPSCs unterschieden sich nicht voneinander (*rechts*:  $n = 5$ ,  $p = 0,89$ ). Es ist keine Verschiebung der Amplituden zu erkennen, wenn diese kumulativ dargestellt werden (*links*).

Nach der pharmakologischen Isolierung von mEPSCs in BALB/c-Neuronen der CA1 (siehe Abbildung 22A) wurde nach dem Erreichen einer stabilen *Baseline*  $10 \mu\text{M LPA}$  eingewaschen (siehe Abbildung 22A unten). Diese Experimente wurden analog zu den Experimenten in Wildtyp (C57Bl/6)

und LPA<sub>2</sub> KO-Mäusen durchgeführt und, wie in den Methoden beschrieben, ausgewertet. Die Applikation von 10 µM LPA führte zu einer Steigerung der mEPSC-Frequenz von  $0,63 \pm 0,31$  Hz in der Kontrolle auf  $1,31 \pm 0,73$  Hz nach der Applikation von LPA. Diese Steigerung der mEPSC-Frequenz ergab ein Verhältnis von  $2,02 \pm 0,32$  (LPA/Kontrolle). Dieser Anstieg der mEPSC-Frequenz nach LPA-Gabe ist signifikant ( $n = 5$ ,  $p = 0,04$ , Mann-Whitney-U-Test). Eine Analyse der Amplituden ergab eine mittlere Amplitude der mEPSCs von  $14,35 \pm 2,87$  pA in der Kontrolle zu  $15,04 \pm 4,81$  pA nach LPA-Applikation (siehe Abbildung 22C und D).

Die Experimente mit Neuronen von BALB/c-Mäusen zeigten, dass auch in diesem Stamm ein Anstieg der mEPSC-Frequenz nach LPA-Applikation zu beobachten war. Dieses Ergebnis zeigte, dass der beobachtete mEPSC-Frequenzanstieg unabhängig vom untersuchten Hintergrundstamm war.

### 5.2.5 Einfluss von LPA auf pyramidale CA1 PRG1-KO-Neurone

Es wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass der *knock-out* von *plasticity-related gene 1* (PRG1) zu einer Erhöhung der Frequenz von glutamatergen postsynaptischen Strömen in CA-1 Neuronen führte (Trimbuch et al., 2009). PRG1 besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu Lipid-Phosphat-Phosphatasen (LPP), die in der Lage sind LPA zu dephosphorylieren und damit zu inaktivieren (Brindley, 2004). Aus den bekannten Befunden wurde die Hypothese aufgestellt, dass exzitatorische synaptische Neurone durch PRG1 vor erhöhten LPA-Konzentrationen geschützt werden (Trimbuch et al., 2009). Im Umkehrschluss wurde vermutet, dass in den *knock-out*-Mäusen eine erhöhte Menge von LPA zu einer erhöhten Ausschüttung von Vesikeln aus der Präsynapse führen könnte. In diesen Experimenten wurde untersucht, ob die exzitatorische synaptische Transmission in hippocampalen CA1-Neuronen von PRG1-*knock-out*-Mäusen durch extrazelluläre Applikation von LPA weiter moduliert werden kann. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

Zu Beginn der Untersuchung erfolgte eine Charakterisierung der Neurone im *current-clamp*, um eventuelle Einflüsse des PRG1-*knock-outs* auf intrinsische Ströme auszuschließen. Ein typisches Beispiel einer Spannungsantwort auf Strominjektion eines pyramidalen CA1-Neurons ist in Abbildung 18E gezeigt. Aus den aufgezeichneten Spannungen wurde der Eingangswiderstand und das Ruhemembranpotenzial berechnet. Weiterhin wurde im *voltage-clamp* die Kapazität der CA1-Neurone bestimmt. Es wurde kein Unterschied der Membraneigenschaften zwischen den anderen in dieser Arbeit untersuchten Mausstämmen gefunden. Zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellung sind diese Daten mit den anderen allgemeinen Membraneigenschaften der weiteren Mausstämmen in Tabelle 7 zusammengefasst.

Nachdem ich sichergestellt hatte, dass die intrinsischen Eigenschaften unverändert waren, erfolgte eine pharmakologische Isolierung von mEPSCs. Wie in den vorherigen Experimenten wurde nach dem Erreichen einer stabilen *Baseline* (siehe Abbildung 23B) 10 µM LPA eingewaschen. In Abbildung 23A sind Ströme eines Neurons, die bei einer Spannung von -70 mV aufgenommen wurden, vor und nach der Applikation von 10 µM LPA abgebildet. Die beschriebene Erhöhung der mEPSC-Frequenz in nativen PRG1-*knock-out*-Neuronen (Trimbuch et al., 2009) konnte bestätigt werden. Die Auswertung zeigte, dass im Vergleich zu den Experimenten im Wildtyp die mEPSC-Frequenz der Kontrollmessungen erhöht war ( $n = 7$  respektive  $n = 10$ , Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,04$ ).

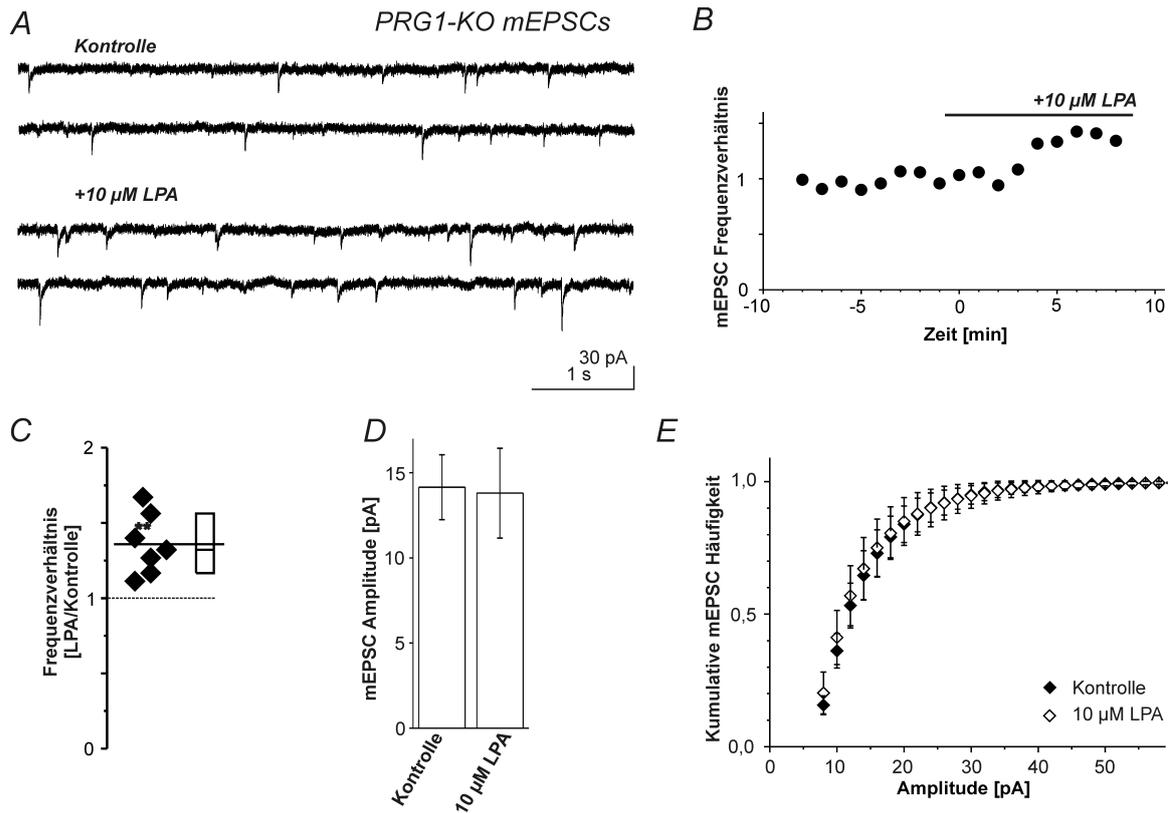


Abbildung 23: **Extrazellulär appliziertes LPA erhöhte mEPSCs in hippocampalen PRG1-KO-Neuronen**

**A.** Pharmakologisch isolierte mEPSCs eines PRG1-KO-Neurons vor (oben) und nach (unten) der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  LPA. Die Zugabe von LPA führte zu einer Erhöhung der mEPSCs.

**B.** Experimenteller Zeitverlauf der mEPSC-Frequenz dargestellt im Verhältnis zur Kontrolle. Die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  LPA (siehe Balken) erhöhte nach einer kurzen Verzögerung die mEPSC-Frequenz.

**C.** Zusammenfassung der mEPSC-Frequenz als Frequenzverhältnis (LPA/Kontrolle) für alle durchgeführten Experimente wie in A und B ( $n = 7$ ). Die mEPSC-Frequenz erhöhte sich nach LPA-Applikation (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,018$ ).

**D.** Die mittlere mEPSC-Amplitude von allen ausgewerteten mEPSCs veränderte sich nicht nach der Applikation von LPA.

**E.** Kumulative Darstellung der mEPSC-Amplituden vor und nach der Applikation von LPA.

Von den LPA-Applikationsexperimenten wurden nach der Auswertung der mEPSC-Frequenz Zeitverläufe über die Dauer des Versuchs erstellt. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 23B dargestellt. Im dargestellten experimentellen Zeitverlauf der mEPSCs (dargestellt als Verhältnis zur Kontrolle) wurde die Dauer der LPA-Applikation mit einem schwarzen Strich markiert. Mit andauernder Anwesenheit von LPA wurde ein Frequenzanstieg der mEPSCs beobachtet. In allen gemessenen PRG1-*knock-out*-Neuronen wurde ein Anstieg der mEPSC-Frequenz nach LPA-Applikation ( $2,17 \pm 0,61$  Hz) im Vergleich zur Kontrolle ( $1,64 \pm 0,53$  Hz) gemessen. Dies ergab für  $n = 7$  Neurone ein Verhältnis von  $1,36 \pm 0,20$  (LPA/Kontrolle). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 23C als Boxplot mit den einzelnen experimentellen Werten dargestellt. Dabei zeigt die Linie in der Box

den Median und der horizontale Strich, der die Datenpunkte und die Box einbezieht, den arithmetischen Mittelwert an. Eine Frequenzerhöhung von mEPSCs wird normalerweise mit einer erhöhten Ausschüttungswahrscheinlichkeit von Vesikeln in der Präsynapse in Verbindung gebracht. Um zu untersuchen, ob es sich um eine präsynaptische Veränderung handelte, wurden die Amplituden aller detektierten mEPSCs analysiert. Diese Analyse ergab einen Mittelwert von  $14,2 \pm 1,9$  pA in der Kontrolle und von  $13,8 \pm 2,6$  pA nach der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  LPA. Die Amplituden unterschieden sich nicht zwischen den beiden experimentellen Zuständen ( $n = 7$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,24$ ; siehe Abbildung 23D). Weiterhin wurden die Amplituden kumulativ dargestellt, um eventuelle Verschiebungen zu größeren oder kleineren Amplituden zu untersuchen. In Abbildung 23E wurde diese Darstellung gewählt und es war kein Unterschied zu erkennen.

Eine Untersuchung der allgemeinen Membranparameter von PRG-1-KO-Neuronen zeigte keine Veränderung zu den anderen untersuchten Mausstämmen (siehe 5.2.1). In den durchgeführten LPA-Applikationsexperimenten konnte ich zeigen, dass die mEPSC-Frequenz in PRG1-KO-Neuronen nach extrazellulärer LPA-Applikation anstieg. Im Gegensatz zu den gemessenen Neuronen der Wildtypen (C57Bl/6 oder BALB/c), war die Erhöhung der mEPSC-Frequenz jedoch geringer ausgeprägt.

### 5.2.6 Zusammenfassung vom Abschnitt 5.2

Es konnte an Neuronen im akuten Gehirnschnitt gezeigt werden, dass extrazellulär appliziertes LPA einen Einfluss auf die exzitatorische synaptische Transmission hatte. Im Einzelnen zeigte ich, dass LPA-Applikation eine Erhöhung der mEPSCs-Frequenz in CA1-Neuronen induzierte. In den Wildtyp-Mausstämmen C57Bl/6 sowie BALB/c wurde die mEPSC-Frequenz durch LPA um ungefähr das Doppelte erhöht. Im Gegensatz dazu war in CA1-Neuronen von Mäusen, denen der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor durch *knock-out* fehlte, keine Steigerung der mEPSC-Frequenz nach LPA-Applikation möglich. In Neuronen von PRG1-*knock-out*-Mäusen führte die Applikation von LPA nur in einem geringeren Maße zu einer mEPSC-Frequenzerhöhung verglichen zum Wildtyp. Im starken Gegensatz dazu stand die inhibitorische synaptische Transmission, die nicht durch LPA-Applikation moduliert wurde. Isolierte mIPSCs zeigten keine Veränderung nach LPA. Alle allgemeinen Membranparameter, die in den Neuronen der 4 Mausstämmen untersucht wurden, unterschieden sich nicht. Die hier vorgestellten Daten wurden in Trimbuch et al. (2009) publiziert.

### 5.3 Einfluss von Lysophosphatidsäure auf die synaptische Transmission in der primären neuronalen Zellkultur

Eine Lokalisation des LPA-Einflusses auf die synaptische Transmission sollte durch eine Vereinfachung des Modellsystems, in diesem Fall primäre neuronale Zellkultur, genauer untersucht werden. In der gewählten primären neuronalen Zellkultur wurden Neurone ohne die im Gehirn vorkommenden Gliazellen bzw. mit einer stark verringerten Anzahl an Gliazellen kultiviert. In dieser Arbeit sollte dieser experimentelle Ansatz dazu dienen zwischen einem rein neuronalen und einem astrozytär/neuronal vermittelten Effekt zu unterscheiden. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Neuronen in der primären Zellkultur dargestellt.

#### 5.3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von primär kultivierten hippocampalen Neuronen

Primär kultivierte Neurone wurden aus Mäuseembryos entnommen, daher befanden sich die Neurone zum Präparationszeitpunkt noch in der Entwicklungs- und Wachstumsphase. Die ersten Tage *in vitro* entwickeln sich intrinsische Ströme und die Synaptogenese setzt erst zu einem späteren Zeitpunkt ein. Die ersten exzitatorischen Synapsen treten nach 7 Tagen in Kultur auf und ausgereifte Synapsen werden nach 10 Tagen in Kultur beobachtet (Grabrucker et al., 2009). Aus diesem Grund wurden für die Experimente Neurone benutzt, die mindestens 10 Tage in Kultur waren. Beispielhaft ist ein kultiviertes Neuron, das durch den DIC visualisiert wurde, in Abbildung 24 dargestellt. Am rechten Bildrand ist die *patch-clamp*-Pipette zu erkennen, die im Kontakt mit dem Neuron steht. Eine Analyse der intrinsischen Membraneigenschaften der Neurone wurde durchgeführt, um einen Vergleich mit anderen Studien zu ermöglichen und Parameter zu erhalten, die etwas über die zelluläre Verfassung der Neurone aussagen können.

In der Analyse wurden die neuronalen Parameter Eingangswiderstand, Ruhemembranpotenzial und Kapazität sowie der technische Parameter serieller Widerstand bestimmt. Das, wie in den Methoden beschriebene, bestimmte Ruhemembranpotenzial im *current-clamp* betrug  $-61,5 \pm 6,2$  mV, der berechnete Eingangswiderstand im *voltage-clamp* war  $320,6 \pm 176,9$  M $\Omega$  und die Kapazität  $62,0 \pm 12,9$  pF. Der Mittelwert des seriellen Widerstands zu Beginn eines Experiments betrug  $12,4 \pm 2,6$  M $\Omega$ . In den Experimenten wurde keine Kompensation des seriellen Widerstands vorgenommen, eine Kontrolle erfolgte dennoch in regelmäßigen Intervallen, um Veränderungen auszuschließen. In Abbildung 24B sind diese Parameter in Boxplots dargestellt. Aus folgenden Gründen befinden sich in dieser Auswertung ein andere Anzahl Neurone als in den später beschriebenen Experimenten zur Lokalisation der LPA-Modulierung: Erstens, nicht mit allen dargestellten Neuronen konnten langfristige Ableitungen durchgeführt werden und zweitens, nur Neurone, von denen Kontrollaufzeichnungen mit der intrazellulären Lösung 1 sowie der normalen extrazellulären Kulturlösung für Neurone durchgeführt wurden, wurden in diese Auswertung einbezogen. Im Anschluss an die elektrophysiologische Charakterisierung wurden Experimente vor und nach der Applikation von LPA durchgeführt.

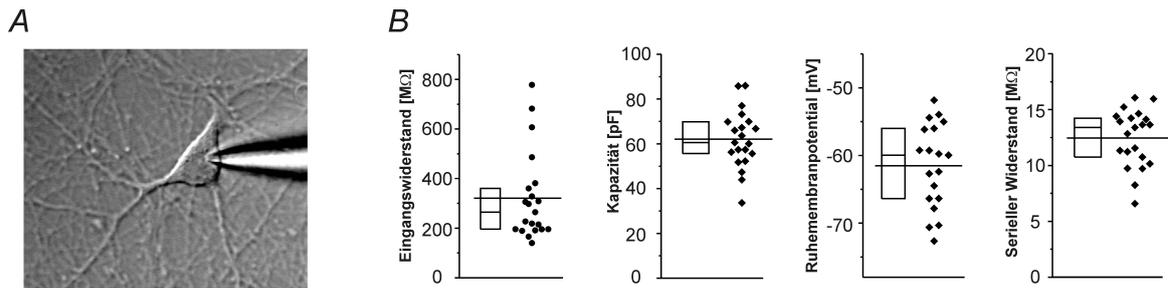


Abbildung 24: **Membraneigenschaften von primär kultivierten hippocampalen Neuronen**

**A.** Ein kultiviertes Neuron mit einer Ableitungspipette aufgenommen im Differential-Interferenz-Kontrast.

**B.** Eingangswiderstand ( $R_{\text{in}}$ ;  $n = 21$ ), Kapazität ( $n = 21$ ), Ruhemembranpotential ( $V_m$ ;  $n = 19$ ) und serieller Widerstand ( $R_S$ ;  $n = 21$ ) von primär kultivierten Neuronen sind in Boxplots dargestellt. Die Boxen zeigen das 25. und 75. Perzentil an, der waagerechte Strich innerhalb der Box den Median und der waagerechte Strich, der die Box und die Datenpunkte einschließt, den Mittelwert.

### 5.3.2 Verifizierung des LPA vermittelten Effekts

In Neuronen im akuten Gehirnschnitt konnte gezeigt werden, dass LPA selektiv zu einer Erhöhung der spontanen exzitatorischen synaptischen Transmission führt. Die spontane inhibitorische synaptische Transmission wurden hingegen nicht durch LPA modifiziert. Um dieses Ergebnis auch in der neuronalen Zellkultur zu verifizieren, wurden in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen sowohl mIPSCs als auch mEPSCs vor und nach der Applikation von LPA untersucht. Der Vernetzungsgrad von Neuronen in der primären neuronalen Zellkultur unterliegt Fluktuationen. So sind Neurone, die sich in Randpositionen befinden, mit weniger Neuronen verbunden, als zentral gelegene Neurone. Elektrophysiologisch war es möglich, dies grob an der Frequenz der postsynaptischen Ströme abzuschätzen, jedoch war dies nicht in allen Fällen ein verlässliches Maß. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass von Präparation zu Präparation die Dichte der Zellkultur differierte, wodurch eine zusätzliche Variable eingebracht wurde.

Die Herausbildung von GABA vermittelter Inhibition tritt in kultivierten hippocampalen Neuronen erst nach 7-9 Tagen in Kultur auf (Ganguly et al., 2001; Soriano et al., 2008). Die Experimente wurden aus diesem Grund nur mit Neuronen durchgeführt, die mindestens 9 Tage in Kultur waren. Die Messung von mIPSCs erfolgte nach pharmakologischer Isolation bei einem Haltepotential von  $-70 \text{ mV}$  durch Änderung des Chloridumkehrpotenzials (siehe Methoden 4.14.4 und Abbildung 10). Über eine Dauer von mehreren Minuten wurden in der Kontrolllösung mIPSCs in der Anwesenheit von TTX, CNQX und Magnesium aufgezeichnet, bevor  $10 \mu\text{M}$  LPA mit der Badlösung eingewaschen wurden. Es erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung von mIPSCs (siehe Abbildung 25A), um einen Zeitverlauf des Einwaschens von LPA zu erhalten (siehe Abbildung 25D für einen experimentellen Zeitverlauf). Für jedes gemessene Neuron erfolgte der Vergleich der mIPSCs zur internen Kontrolle vor LPA-Applikation. Die *offline*-Auswertung ergab, dass  $10 \mu\text{M}$  LPA keine Änderung der mIPSC-Frequenz induzierten (siehe Abbildung 25 B). Das Verhältnis der mIPSCs vor und nach der Applikation von LPA betrug  $0,99 \pm 0,11$  ( $n = 4$ ). In der Abbildung 25B sind 10 Experimente dar-

gestellt, da die restlichen Zellen von einem anderen Experimentator gemessen wurden. Das Ergebnis meiner Messungen wurde jedoch durch die erhöhte Anzahl von Messungen unterstützt. In der Analyse wurde auch die Größe der mIPSCs-Amplitude und ein eventueller Einfluss von LPA analysiert. Sowohl die kumulative Wahrscheinlichkeit der Amplituden als auch die mittlere Amplitude (Kontrolle:  $28,37 \pm 5,59$  pA; LPA:  $28,04 \pm 5,74$  pA) unterschieden sich nicht voneinander ( $p = 0,72$ ; siehe Abbildung 25C).

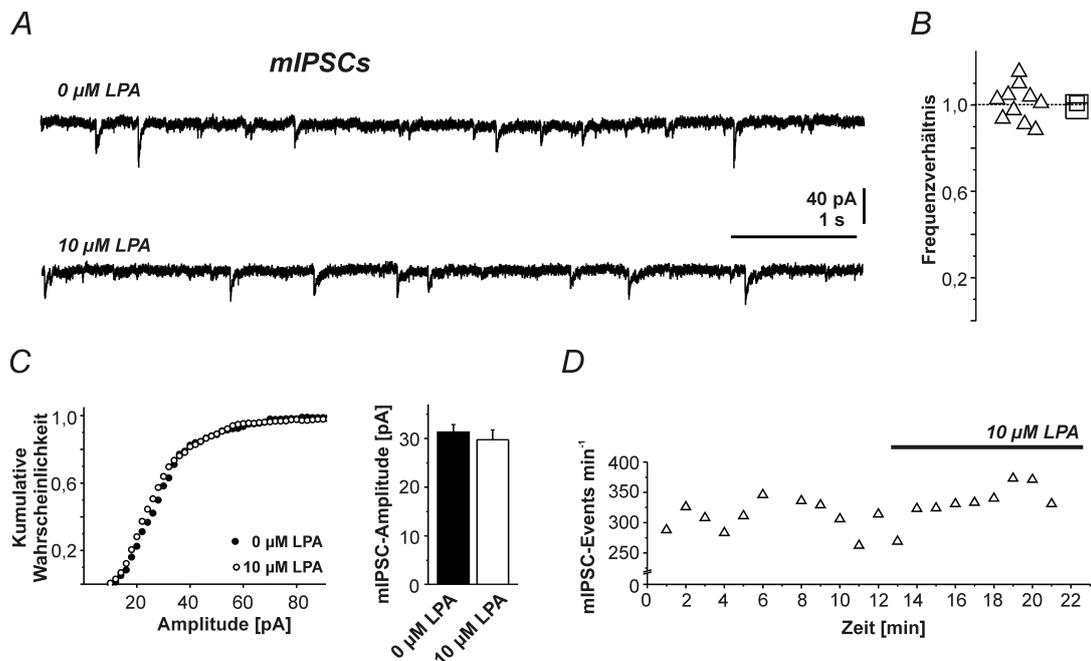


Abbildung 25: **Wirkung von LPA auf pharmakologisch isolierte mIPSCs in der neuronalen Zellkultur**

**A.** mIPSCs konnten durch equimolare intra- und extrazelluläre Chloridkonzentrationen bei einer Spannung von  $-70$  mV gemessen werden und wurden pharmakologisch durch die Applikation von TTX und CNQX isoliert. Dargestellt ist eine Beispielaufnahme eines Neurons vor (*oben*) und nach (*unten*) der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  LPA.

**B.** Die Applikation von LPA änderte nicht die Frequenz im Vergleich zur Kontrolle. 4 Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit gemessen.

**C. Links:** Die Amplituden der mIPSCs dargestellt als kumulativer Plot. **Rechts:** Die mittlere Amplitude der mIPSCs vor und nach der Applikation von LPA unterscheidet sich nicht ( $n = 10$ ).

**D.** Zeitverlauf eines typischen Experiments, der die mIPSCs-Events  $\text{min}^{-1}$  zeigt. Die Dauer der LPA-Applikation ist mit einem schwarzen Balken markiert. Eine Veränderung der mIPSC-Frequenz wurde nicht beobachtet.

In primär kultivierten Neuronen wurde keine Veränderung der Frequenz oder Amplituden der mIPSCs nach LPA-Applikation gemessen. Dieses Ergebnis ist analog zu den Befunden in akut präparierten Gehirnschnitten.

In dieser Arbeit wurde im Gehirnschnitt gezeigt, dass LPA-Applikation die Frequenz von mEPSCs in hippocampalen CA1-Neuronen erhöht. Ich stellte daher die Frage, ob auch in primär kultivierten hippocampalen Neuronen LPA zu einer Erhöhung der mEPSC Frequenz führt. Dafür wurden die

mEPSCs pharmakologisch isoliert (TTX, Bicucullin und Magnesium, siehe auch Abbildung 10) und nach einer Kontrollperiode von einigen Minuten wurde LPA mit der Badlösung appliziert. Die Analyse der mEPSCs erfolgte im Anschluss *offline* wie im Abschnitt 4.14.4 beschrieben.

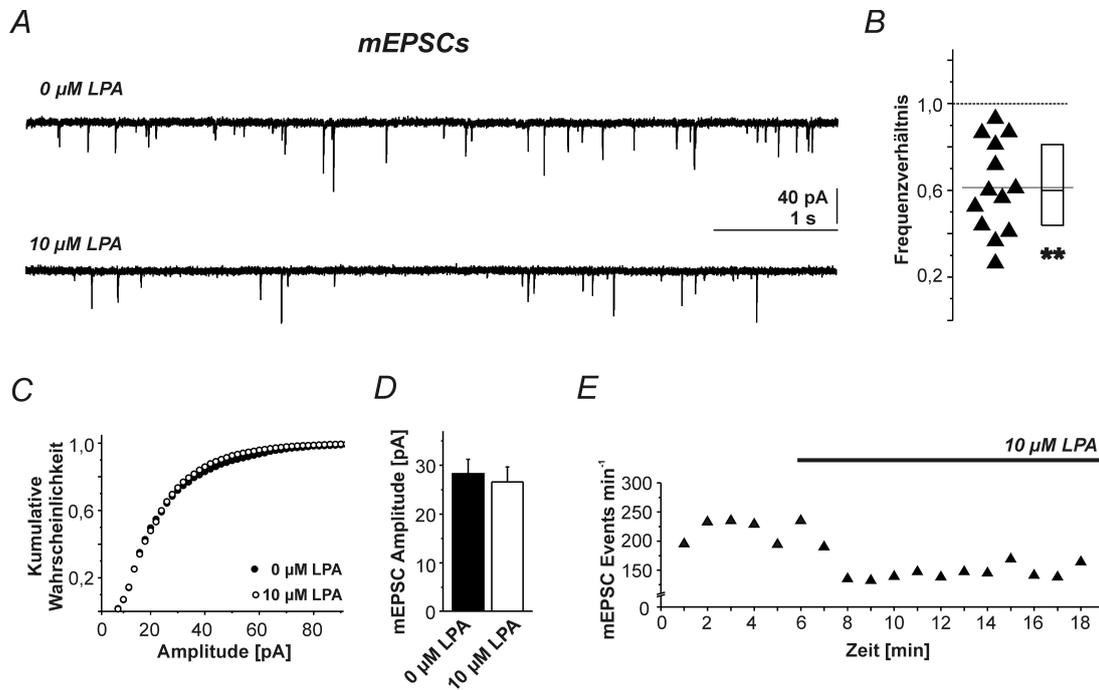


Abbildung 26: **Wirkung von LPA auf mEPSCs in der primären neuronalen hippocampalen Kultur**

**A.** Typische Aufzeichnungen von pharmakologisch isolierten mEPSCs eines Neurons vor (*oben*) und nach (*unten*) der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  LPA.

**B.** Zusammenfassung von 13 Experimenten, in denen das Frequenzverhältnis als Boxplot dargestellt ist. Der Mittelwert ist mit einem waagerechten Strich markiert, der sowohl Box als auch die individuellen Datenpunkte einschließt.

**C.** Kumulativer Wahrscheinlichkeitsplot der Amplituden in Kontrollbedingungen (●) und nach Applikation von 10  $\mu\text{M}$  LPA (○).

**D.** Die durchschnittliche Amplitude der mEPSCs vor und nach LPA-Applikation.

**E.** Ein experimenteller Zeitverlauf, in dem nach 6 Minuten Kontrollmessung 10  $\mu\text{M}$  LPA mit der Badlösung eingewaschen wurde. Mit LPA kam es zu einem Abfall der mEPSC-Frequenz und bereits nach einigen Minuten erreichte die mEPSC-Frequenz ein Plateau.

Repräsentative Stromaufzeichnungen bei -70 mV zeigen das Vorkommen von mEPSCs in primär kultivierten Neuronen. Im unteren *Trace* wurden Ströme des gleichen Neurons nach dem Einwaschen von 10  $\mu\text{M}$  LPA abgebildet (siehe Abbildung 26A). Im Vergleich zur Kontrolle wurden weniger mEPSCs gemessen. Dieses Ergebnis ließ sich in 13 Neuronen reproduzieren, von denen 6 innerhalb der Promotion gemessen wurden. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine Verringerung des mEPSC-Frequenzverhältnisses von  $0,61 \pm 0,21$  gemessen (siehe Abbildung 26B). Diese Verringerung stand im Gegensatz zu den Ergebnissen im akuten Gehirnschnitt. Daher stellte sich die Frage, ob es während des Experiments zu einer eventuellen kurzfristigen Steigerung der Frequenz kommt. Um dies näher zu untersuchen, wurden Experimentverläufe erstellt und ein Beispiel (gleiche Zelle wie in Abbildung

26A) ist in Abbildung 26D abgebildet. In diesem ist zu erkennen, dass die Frequenz innerhalb von 2-3 Minuten absank und auf diesem Niveau stabil blieb.

Um zwischen einer prä- oder postsynaptischen Modulation als Grund der mEPSC-Verringerung zu unterscheiden, wurden die Amplituden der mEPSCs analysiert. Dafür wurden die kumulativen Wahrscheinlichkeiten der mEPSC-Amplituden dargestellt (siehe Abbildung 26C) und die mittlere Amplitude der mEPSCs vor und nach der Applikation von LPA berechnet (Abbildung 26D). Es wurde keine Verschiebung zu größeren oder kleineren mEPSCs beobachtet. Die mittlere Amplitude der Kontrollen betrug  $28,30 \pm 8,78$  pA und nach LPA  $26,6 \pm 9,17$  pA und unterschied sich nicht voneinander ( $n = 10$ , gepaarter t-Test,  $p = 0,23$ ).

In den Experimenten, die in diesem Abschnitt beschrieben wurden, konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Neuronen des akuten Gehirnschnitts, 10  $\mu$ M LPA eine selektive Verringerung der Frequenz von exzitatorischen mPSCs ohne eine Änderung der Amplituden hervorruft. Vergleichbar mit Neuronen des Gehirnschnitts änderten sich weder Frequenz noch Amplitude der inhibitorischen mPSCs nach Applikation von LPA.

### 5.3.3 Lokalisierung des LPA vermittelten Effekts

In den vorhergehenden Experimenten wurde gezeigt, dass extrazellulär appliziertes LPA selektiv die spontane exzitatorische synaptische Transmission moduliert. Aus diesem Grund wurde in weiterführenden Experimenten ausschließlich die exzitatorische synaptische Transmission untersucht. Die gemessenen postsynaptischen Ströme beruhen auf der Freisetzung von Glutamat aus Vesikeln der Präsynapse und anschließender Aktivierung von AMPA / Kainat Rezeptoren (Liganden gesteuerte Ionenkanäle) auf der postsynaptischen Seite. Normalerweise ist die Exozytose von Glutamat eine Folge des lokalen Anstiegs der präsynaptischen Calciumkonzentration durch spannungsabhängige Aktivierung von Calciumkanälen. Dabei spielt das Protein Synaptotagmin 1 eine Rolle als Calciumsensor und durch Interaktion mit SNARE-Proteinen (Synaptobrevin oder auch VAMP, Syntaxin 1 und SNAP-25) können Vesikel exozytiert werden (Südhof, 2004). Die Freisetzungen von Vesikeln auf diese Art und Weise wird als schnelle Freisetzung bezeichnet. Die bisher durchgeführten Experimente hingegen basierten auf Messungen von synaptischen Strömen, die einem weiteren vermuteten Mechanismus der Vesikelfreisetzung, der spontanen langsamen Vesikelfreisetzung, zugeordnet werden. Bei diesem Mechanismus konnte die Rolle von Calcium bisher nicht aufgeklärt werden, da auch in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium eine spontane Freisetzung von Vesikeln zu beobachten ist (Llano et al., 2000). Hierfür könnte ein Anstieg des intrazellulären Calciums verantwortlich sein (Llano et al., 2000) oder aber spontan freigesetzte Vesikel stammen aus einem anderem Vesikelpool (Fredj und Burrone, 2009).

Für die Unterscheidung einer prä- oder postsynaptischen Modulation der spontanen Vesikelfreisetzung durch LPA wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Der erste Teil der Experimente bestand darin, extrazelluläres Calcium zu entfernen, wodurch sowohl in den prä- als auch in den postsynaptischen Zellen kein Calcium von außen einströmen konnte. Hiermit sollte die präsynaptische Calciumabhängigkeit des LPA-vermittelten Effekts untersucht werden. Im zweiten Teil des experimentellen Ansatzes wurde gezielt das postsynaptische intrazelluläre Calcium reduziert. Dies diente

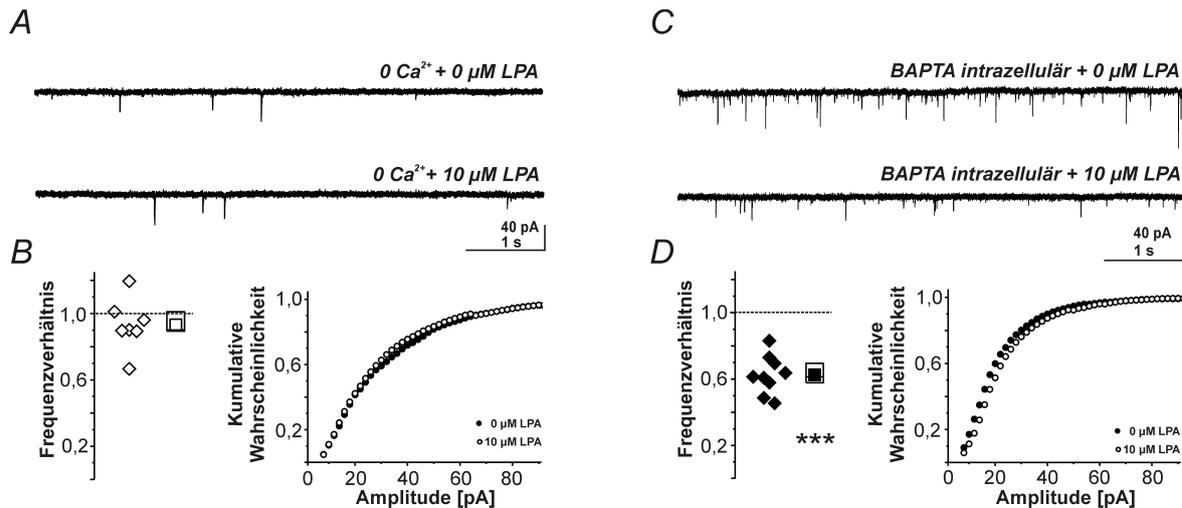


Abbildung 27: **Änderung von prä- und postsynaptischen Calciumkonzentrationen**

**A.** Gezeigt sind repräsentative Ströme (Haltepotenzial:  $-70$  mV) ohne extrazelluläres Calcium vor (*oben*) und nach (*unten*) der Applikation von  $10$   $\mu$ M LPA. In der oberen Stromaufzeichnung sind weniger mEPSCs zu erkennen als in den Kontrollmessung in Gegenwart von Calcium (Vergleich Abbildung 26).

**B. Links:** Zusammenfassung der Experimente dargestellt als Boxplot. In 7 Experimenten wurde keine Änderung der mEPSC-Frequenz nach LPA-Applikation gemessen (Wilcoxon Vorzeichen Rang Test,  $p = 0,24$ ). **Rechts:** Die kumulative Darstellung der Amplituden vor und nach der Applikation von LPA zeigten keine Änderung.

**C.** Stromaufzeichnungen bei  $-70$  mV nach intrazellulärer Pufferung des freien postsynaptischen Calciums durch BAPTA in der Pipettenlösung. Eine Kontrollmessung ist oben abgebildet und unten ist der Strom des gleichen Neurons nach Applikation von  $10$   $\mu$ M LPA gezeigt.

**D. Links:** Die Zusammenfassung dieser Experimente in einem Boxplot zeigt, dass in 9 gemessenen Zellen das Frequenzverhältnis nach LPA-Applikation absinkt (gepaarter t-Test,  $p = 0,002$ ). **Rechts:** Darstellung der Amplituden als kumulativer Plot der Wahrscheinlichkeit, in dem kein Unterschied der Amplituden zu erkennen ist. Es sind die Mittelwerte aus 9 Experimenten dargestellt. Zur Übersichtlichkeit wurde die Standardabweichung der einzelnen Punkte nicht eingezeichnet.

zur Klärung der Frage, ob der LPA-Effekt von einer postsynaptischen Calciumänderung abhängig war.

### 5.3.3.1 Globale (extrazelluläre) Calciumreduktion

Nach der Etablierung des *whole-cell*-Modus wurde extrazelluläre Lösung ohne Calcium und mit Blockern, welcher der LPA-Puffer ohne LPA zugesetzt war, eingewaschen. Im Anschluss wurden die pharmakologisch isolierten mEPSCs bei einer Spannung von  $-70$  mV gemessen. Diese Kontrollperiode wurde analog zu den Experimenten in Abschnitt 5.3.2 durchgeführt. Nachdem eine stabile *baseline* erreicht war, wurde über mehrere Minuten  $10$   $\mu$ M LPA eingewaschen und die mEPSCs fortwährend gemessen. Die Analyse ergab, dass sich in Abwesenheit von Calcium die mEPSC-Frequenz nach LPA-Applikation nicht änderte. Die Frequenz vor LPA war  $2,7 \pm 2,6$  Hz und nach der Applikation von LPA  $2,5 \pm 2,6$  Hz. Daraus errechnete sich ein Verhältnis von  $0,93 \pm 0,16$  ( $n = 7$ ,  $p = 0,24$ ). Bei der Analyse der Amplituden konnte keine Veränderung festgestellt werden.

### 5.3.3.2 Postsynaptische Calciumreduktion

Um freies Calcium gezielt in der postsynaptischen Zelle zu reduzieren, wurden Experimente durchgeführt, bei denen sich BAPTA in der Pipette befand (siehe Intrazelluläre Lösung 2). BAPTA ist ein Calciumchelator mit hoher Calciumaffinität sowie -Spezifität und schneller Bindung ( $500 \mu\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ , Ricci et al. (1998)). Intrazelluläres freies Calcium wurde auf diese Art und Weise so weit wie möglich reduziert und auch neu freigesetztes Calcium sollte durch die Bindungsgeschwindigkeit von BAPTA ausreichend gepuffert werden. Nachdem der *whole-cell*-Modus erlangt wurde, erfolgte grundsätzlich eine Periode, in der sich die Pipettenlösung mit dem Inneren der Zelle vermischen konnte. In diesen Experimenten wurde die Wartezeit ausgedehnt, dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass BAPTA möglichst weit im Neuron verteilt wurde und Calcium gepuffert werden konnte. Nach dieser Wartezeit wurden die Experimente durchgeführt. Als erstes wurden mEPSCs mit normaler extrazellulärer Lösung pharmakologisch isoliert. Nachdem über einen längeren Zeitraum Kontrollströme bei  $-70 \text{ mV}$  aufgenommen wurden, erfolgte die Applikation von  $10 \mu\text{M}$  LPA mit der extrazellulären Lösung. Aufgezeichnete Ströme sind in Abbildung 27B abgebildet. Eine Analyse dieser Experiment ergab, dass LPA in der Lage war die mEPSC-Frequenz im Vergleich zur Kontrolle zu verringern. Vor LPA-Applikation betrug die Frequenz  $4,0 \pm 3,9$  und nach  $2,9 \pm 3,2$ . Um die großen Unterschiede der mEPSC-Frequenz zwischen den Kulturen zu verringern, wurde für jedes Experiment ein Ratio im Verhältnis zur Kontrolle berechnet, das  $0,62 \pm 0,12$  in 9 experimentellen Wiederholungen war. Diese Änderung war signifikant (gepaarter t-Test  $p = 0,002$ ). Die Amplituden waren  $18,38 \pm 5,55 \text{ pA}$  in der Kontrolle und  $20,13 \pm 5,64 \text{ pA}$  nach LPA und unterschieden sich nicht ( $n = 8$ ,  $p = 0,08$ , gepaarter t-Test). Wenn die Amplituden kumulativ aufgetragen wurden, war keine Verschiebung zu größeren oder kleineren Amplituden zu erkennen (siehe Abbildung 27B).

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass extrazelluläres Calcium für eine Reduktion von mEPSCs nach LPA-Applikation eine Rolle spielt, da das Weglassen von extrazellulärem Calcium eine mEPSC-Reduktion verhindern konnte. Hingegen ist eine Pufferung und damit Reduktion von postsynaptischen Calcium nicht in der Lage, eine Reduktion der mEPSCs zu verhindern. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die LPA vermittelte Wirkung über einen präsynaptischen Mechanismus abläuft, der Calcium benötigt. Die Aktivierung dieses Mechanismus führte zu einer Reduktion von mEPSCs.

### 5.3.4 Funktion des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors

Im akuten Gehirnschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor für den LPA vermittelten Anstieg der mEPSCs benötigt wird. Außerdem wurde die Expression des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors spezifisch in primär kultivierten Neuronen gezeigt (Kieselmann, 2010). Andere LPA-Rezeptoren wurden nur sehr gering in kultivierten Neuronen exprimiert beziehungsweise lagen diese unter dem Detektionslevel (Kieselmann, 2010). Um die Rezeptorabhängigkeit der LPA induzierten Reduktion von mEPSCs an kultivierten Neuronen zu untersuchen, wurden von embryonalen LPA<sub>2</sub>-*knock-out*-Mäusen hippocampale Neurone isoliert und kultiviert.

Für diese Experimente wurden Neurone verwendet, die 11-14 Tage kultiviert wurden. Die Kapazität der untersuchten Neurone betrug  $60,5 \pm 14,4 \text{ pF}$  und der Eingangswiderstand  $332 \pm 113,3$

M $\Omega$  (je  $n = 6$ ). Im Anschluss an die Charakterisierung erfolgte die Durchführung der Experimente analog zu den vorherigen Experimenten. Nach der pharmakologischen Isolation von mEPSC in Anwesenheit des LPA-Puffers (Kontrollmessung Abbildung 28A oben) wurde 10  $\mu\text{M}$  LPA mit der extrazellulären Lösung eingewaschen (Abbildung 28A unten). Die Auswertung von 6 Experimenten ergab, dass LPA nicht zu einer Reduktion der mEPSC-Frequenz führte (siehe Abbildung 28A und B). Das Verhältnis von der mEPSC-Frequenz vor und nach LPA-Applikation betrug  $0,98 \pm 0,04$  (dargestellt in Abbildung 28B). Die mittlere mEPSC-Amplitude vor LPA-Applikation betrug  $20,5 \pm 8,7$  pA und nach LPA-Applikation  $20,6 \pm 7,6$  pA (Abbildung 28C), womit die mEPSC-Amplitude nicht unterschiedlich war (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,9$ ). Die kumulative Darstellung der Amplituden zeigte auch keine Verschiebung zu größeren oder kleineren Amplituden (Abbildung 28D).

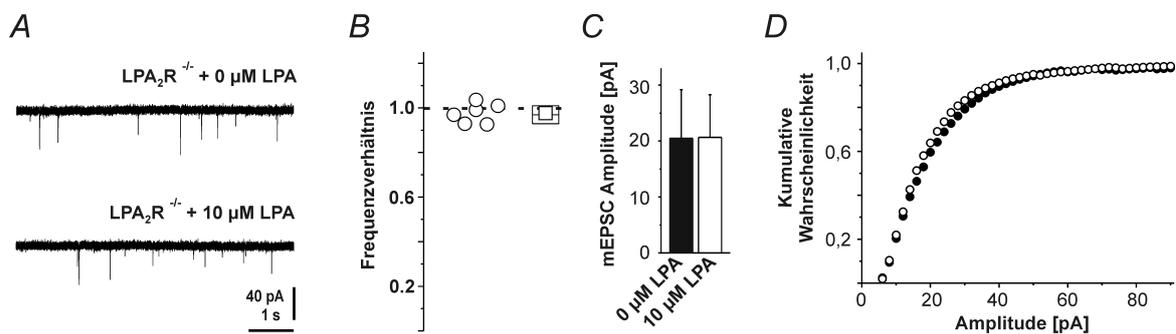


Abbildung 28: **Neuronen, denen der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor fehlte, zeigten keine LPA induzierte Reduktion der mEPSCs**

**A.** Stromaufzeichnungen im *voltage-clamp* von einem LPA<sub>2</sub>-Rezeptor-*knock-out*-Neuron während der Kontrolle (*oben*) und nach Einwaschen von 10  $\mu\text{M}$  LPA (*unten*). Die Frequenz der mEPSCs veränderte sich nicht durch LPA.

**B.** Die Zusammenfassung von 6 durchgeführten Experimenten zeigte, dass in allen Experimenten keine mEPSC-Reduktion durch LPA in LPA<sub>2</sub>-Rezeptor-*knock-out*-Neuronen ausgelöst wurde (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,  $p = 0,6$ ).

**C.** Die gemittelte mEPSC-Amplitude der LPA<sub>2</sub>-*knock-out*-Neurone veränderte sich nicht nach LPA-Applikation.

**D** Darstellung der kumulativen Amplituden vor und nach der Applikation von LPA. Für eine deutlichere Darstellung ist der Mittelwert ( $n = 6$ ) ohne die Standardabweichung abgebildet.

Experimente mit LPA<sub>2</sub>-Rezeptor-*knock-out*-Neuronen zeigten, dass LPA in diesen Neuronen keine Reduktion der mEPSC-Frequenz auslösen konnte. Außerdem war eine weitere Modulation der mEPSCs (Amplitude, Kinetik) nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch in der Kultur eine Aktivierung des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors für eine LPA vermittelte Wirkung benötigt wird. In der Zellkultur führt dies zu einer Reduktion von mEPSCs.

### 5.3.5 Zusammenfassung Abschnitt 5.3

Um die Ergebnisse von Abschnitt 5.2 in einem einfacheren System zu untersuchen, wurde die primäre neuronale Zellkultur gewählt. Daraus hervorgegangene Ergebnisse wurden im Abschnitt 5.3 erläutert und werden hier kurz zusammengefasst.

Nach dem Wechsel auf primär kultivierte hippocampale Neurone wurde der Einfluss von LPA auf die synaptische Transmission untersucht. Auch in diesen Experimenten wurde spezifisch die exzitatorische Transmission moduliert, hingegen konnte keine Modulation der inhibitorischen synaptischen Transmission experimentell bestätigt werden. Überraschenderweise führte LPA in diesem Modellsystem aber zu einer Verringerung der mEPSC-Frequenz. Weiterführende Experimente zeigten, dass sowohl präsynaptisches Calcium als auch der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor für die Frequenzverringerng von mEPSCs notwendig sind. Da postsynaptische Calciumänderungen keinen Einfluss auf die Modulation hatten, deutet dies daraufhin, dass ein hauptsächlich präsynaptischer Mechanismus vorliegt. Eine Reduktion der mEPSCs könnte daher durch präsynaptische Aktivierung von LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren erfolgen wodurch es im Anschluss zu einer präsynaptischen Calciumerhöhung kommt. Die Reduktion der mEPSCs ist mit elektrophysiologischen Methoden nicht gut erklärbar, da ein Anstieg von präsynaptischen Calcium eigentlich eine Erhöhung der Frequenz zur Folge hätte.

#### 5.4 Untersuchungen zur LPA-Modulation des durch Hyperpolarisation aktivierten Stroms und $I_h$

Eine Modulation von HCN-Ionenkanälen durch LPA erschien wahrscheinlich, da LPA-Rezeptoren sowohl an PLC als auch an den Phosphoinositol-Stoffwechsel und die Adenylatcyclase gekoppelt sind. Die letztgenannten können cAMP reduzieren oder erhöhen, womit ein direkter Einfluss auf die cAMP-Bindedomäne der HCN Kanäle erfolgen könnte. Die Modulation von HCN durch PLC-Aktivierung kann zu einer Vergrößerung des  $I_h$  führen (Pian et al., 2007). Weiterhin kann eine Veränderung von  $I_h$  eine Erhöhung oder Reduktion von exzitatorischen synaptischen Strömen erklären, da dieser Strom eine zentrale Rolle in der dendritischen Integration einnimmt (Magee, 1999). Aus diesem Grund wurde die Frage gestellt, ob LPA den hyperpolarisationsaktivierten Strom modifiziert.

Um die Frage zu beantworten, wurden somatische *whole-cell*-Ableitungen an hippocampalen CA1-Neuronen im *voltage-clamp* in der Gegenwart von TTX und Gabazin durchgeführt. TTX wurde benutzt, um schnelle Natriumströme zu blocken, die bei einem Haltepotenzial von -50 mV aktivieren können, Gabazine diente dem Block von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Eine Hyperpolarisation vom Haltepotenzial aktivierte einen Strom ( $I_{hyp}$ ), der sich aus  $I_h$  und  $I_{Kir}$  zusammensetzte (siehe Abbildung 29A). Zu Beginn erfolgte eine Kontrollmessung und eine weitere Messung nach Badapplikation von 10  $\mu$ M LPA. In der Auswertung wurde *offline* das lineare Leck subtrahiert (siehe Methoden 4.14.7) und für jedes Neuron die Kontrollen mit Werten nach LPA-Applikation miteinander verglichen. Bei einer maximalen Aktivierungsspannung von -120 mV unterschieden sich die Amplituden der Kontrollmessungen mit  $270,6 \pm 45,2$  pA nicht von den Messungen nach LPA-Applikation,  $251,7 \pm 50,5$  pA ( $n = 5$ ,  $p = 0,14$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, siehe Abbildung 29A und B). Dies entsprach einem Verhältnis von  $0,93 \pm 8,4$  (LPA/Kontrolle). Weiterhin wurde die Spannungssensitivität des Stroms von den *tail-currents* bei -50 mV berechnet. Bei -50 mV können in CA1-Neuronen *low-voltage-gated*-Calciumkanäle aktiviert werden, der Beitrag zum Gesamtstrom wurde aber als vernachlässigbar gering eingeschätzt (Magee und Johnston, 1995; Klugbauer et al., 1999). Für jedes Neuron wurden die normalisierten *tail-currents* mit der Boltzmann-Gleichung gefittet (siehe Abbildung 29C). Für die Kontrolle ergab dies eine halbmaximale Aktivierungsspannung von  $-86,6 \text{ mV} \pm 2,0 \text{ mV}$  und nach LPA-Applikation von  $-86,2 \text{ mV} \pm 3,6 \text{ mV}$  ( $n = 4$ , siehe Abbildung 29D), womit kein Unterschied bestand ( $p > 0,99$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Weiterhin ergab sich aus dem Fit mit der Boltzmann-Gleichung der Anstieg der Aktivierungskurve ( $k$ ). Dieser betrug für die Kontrolle  $9,4 \pm 0,7$  und nach LPA-Applikation  $8,8 \pm 1,0$  und unterschied sich damit auch nicht ( $n = 4$ ,  $p = 0,47$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Für eine Beschreibung der Stromkinetik wurde die Aktivierung bei -120 mV mit einer doppelten exponentiellen Funktion gefittet und ergab eine schnelle ( $\tau_1$ ) und eine langsame ( $\tau_2$ ) Zeitkonstante. In der Kontrolle betrug  $\tau_1$   $31,1 \text{ ms} \pm 2,9 \text{ ms}$  und nach LPA-Applikation  $33,6 \text{ ms} \pm 4,6 \text{ ms}$  ( $n = 5$ ). Die langsamere zweite Zeitkonstante  $\tau_2$  betrug  $246,9 \text{ ms} \pm 36,6 \text{ ms}$  in der Kontrolle und  $280,6 \text{ ms} \pm 76,9 \text{ ms}$  nach LPA-Applikation ( $n = 5$ ). Beide Zeitkonstanten unterschieden sich nicht zwischen den Kontroll- und LPA-Messungen ( $\tau_1$ :  $p = 0,35$ ;  $\tau_2$ :  $p = 0,23$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Von einem aktivierendem Präpuls von -120 mV wurde die Kinetik der Deaktivierung mit einer einfachen exponentiellen Funktion gefittet und ergab Zeitkonstanten für die Kontrolle von  $94,9 \pm 17,6 \text{ ms}$  und nach LPA-Applikation von  $97,0 \pm 20 \text{ ms}$  und unterschied sich

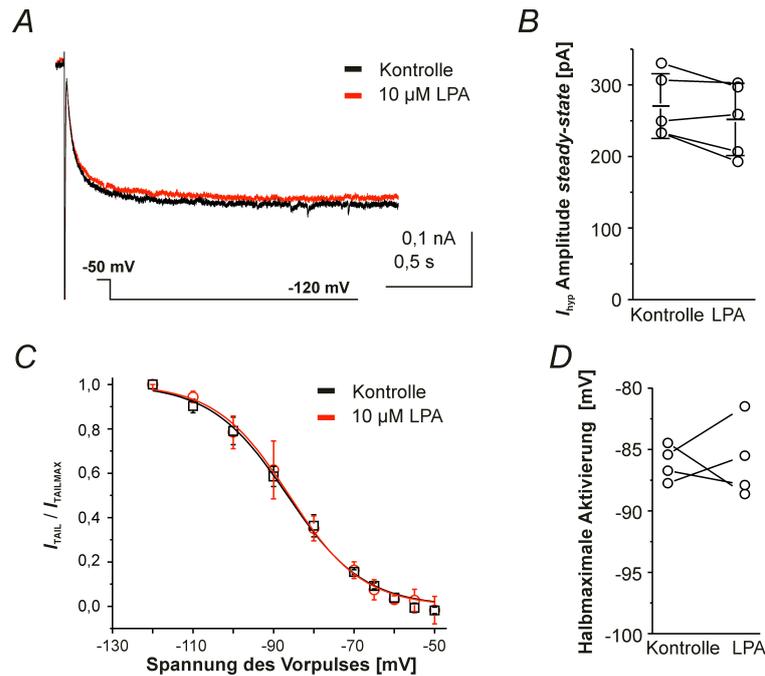


Abbildung 29: Einfluss von LPA auf  $I_{hyp}$

**A.** Im *voltage-clamp* wurde von einem Haltepotenzial von -50 mV der Strom mit einem Spannungsschritt auf -120 mV aktiviert. Gezeigt sind Ströme für die Kontrolle (schwarz) und während der Applikation von 10 μM LPA (rot).

**B.** Die Auswertung der *steady-state*-Amplituden nach Subtraktion des linearen Lecks zeigte keine Veränderung zwischen der Kontrolle und 10 μM LPA ( $n = 5$ ).

**C.** Spannungssensitivität des  $I_h$  für die Kontrolle und während der Applikation von LPA. Die *tail-currents* wurden im *steady-state* gemessen und auf den maximalen Strom normalisiert. Für die Darstellung wurden die Mittelwerte der normalisierten Ströme von allen Experimenten gegen die Aktivierungsspannung des Vorpulses aufgetragen und mit einer Boltzmann-Gleichung gefittet.

**D.** Zusammenfassung der halbmaximalen Aktivierungsspannung für die Kontrolle und nach LPA Applikation ( $n = 4$ ).

nicht ( $n = 5$ ,  $p = 0,787$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

In diesen Experimenten war  $I_h$  nicht vollständig pharmakologisch isoliert, daher wurden zusätzliche Experimente unter vollständiger pharmakologischer Isolation durchgeführt. Dies sollte den unwahrscheinlichen Fall ausschließen, dass Effekte von LPA auf  $I_h$  und  $I_{Kir}$  nicht gegenläufig waren. Dafür wurden in diesen Experimenten außer Natriumkanälen auch spannungsabhängige Calcium- und Kaliumkanäle (Nickel, 4-AP, TEA, Barium) sowie exzitatorische postsynaptische Ströme (DAP-5, CNQX) geblockt und die ACSF gegen DCS ausgetauscht. Eine Veränderung des isolierten  $I_h$  nach LPA wurde nicht beobachtet. Eine Analyse der Amplituden ergab,  $359,5 \pm 116,7$  pA in der Kontrolle und  $356,9 \pm 148,6$  pA nach LPA-Applikation ( $n = 2$ ). Von weiteren Analysen wurde abgesehen, da wie auch beim Gesamtstrom nach Hyperpolarisation keine Veränderung gemessen wurde.

Obwohl eine Modulation von  $I_h$  durch LPA wahrscheinlich war, konnte in diesen Experimenten nicht gezeigt werden, dass LPA in hippocampalen CA1-Neuronen einen Einfluss auf  $I_h$  hat. Aus diesem Grund wurden keine weiterführenden Experimente durchgeführt.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die neuromodulatorische Wirkung von LPA anhand von drei Beispielen dargestellt. Ein *in utero knock-down* von LPP1/1a führt in kortikalen Neuronen zu einer veränderten Migration in die kortikale Platte. LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone migrieren langsamer und sind in tieferen Schichten der kortikalen Platte anzutreffen als Neurone, die mit Kontrollvektoren transfiziert sind. Es findet eine zeitliche Regulation der intrinsischen Stromentwicklung während der neuronalen Migration statt (Bahrey und Moody, 2003), folglich wurden als Erstes intrinsische Ströme in betroffenen Neuronen in diesem *in utero knock-down*-Modell elektrophysiologisch untersucht. Neurone, die zum ersten Untersuchungszeitpunkt (E18) verzögert wanderten, zeigten eine verringerte Erregbarkeit. Am Tag P5 hatten sich diese Neurone hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften an umgebende Neurone angepasst. Eine Integration in das neuronale Netzwerk erfolgte, da postsynaptische Ströme gemessen werden konnten. Diese Experimente zeigen, dass durch ein verändertes LPP1/1a-Level die Entwicklung von intrinsischen Strömen verzögert wird. Weil LPP1/1a die Dephosphorylierung von LPA katalysiert, wird eine Implikation von LPA an diesen Vorgang angenommen. Die zur Zeit verfügbare Literatur zeigt keine Arbeiten, die darauf hinweisen, dass es während einer radialen Migrationsstörung zu einer verzögerten Entwicklung der intrinsischen Ströme kommen kann. Damit ist dies die erste Arbeit, in der auf Einzelzellebene Stromveränderungen während der frühen neokortikalen Migration beschrieben werden.

Außer perinatalen LPA-Wirkungen sind z.B. auch LPA induzierte Calciumerhöhungen in ausdifferenzierten Neuronen bekannt (z.B. Holtsberg et al., 1997). Nachdem bereits in Vorversuchen eine Erhöhung der synaptischen Erregbarkeit nach LPA-Applikation gezeigt wurde, konnten in der vorliegenden Arbeit diese Ergebnisse in CA1-Neuronen auf Einzelzellebene bewiesen werden. LPA erhöhte selektiv die Frequenz von exzitatorischen synaptischen Strömen und diese Erhöhung wurde durch den LPA<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt. Um den Mechanismus einzugrenzen, wurden diese Experimente in der primären hippocampalen Neuronenkultur wiederholt. Auch hier war der LPA-Effekt auf die exzitatorische synaptische Transmission beschränkt, jedoch wurde eine Reduktion der mEPSCs gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass auch in der neuronalen Zellkultur die LPA-Wirkung über den LPA<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt wird und abhängig vom extrazellulären Calciumlevel war. Aus diesen Experimenten und Ergebnissen einer weiteren Arbeit (Kieselmann, 2010) wurde geschlossen, dass LPA über einen präsynaptischen rezeptormediierten Mechanismus die synaptische Transmission modulieren kann.

Ein potentieller Modulator von exzitatorischen Strömen ist der intrinsische Strom  $I_h$ . Dieser hyperpolarisations-aktivierte Strom wurde von mir im letzten Abschnitt auf eine direkte Beeinflussung durch LPA untersucht.  $I_h$  ist für die Skalierung und Weiterleitung der exzitatorischen synaptischen Ströme von Bedeutung (Magee, 1999) und LPA-Rezeptor mediierte Signalwege stimmen mit bekannten HCN-Kanal-Modulatoren überein. In diesen Experimenten konnte keine Modulation dieses Stroms durch LPA nicht gezeigt werden, was den Schluss zulässt, dass eine direkte oder eine LPA-Rezeptor vermittelte Modulation nicht vorlag.

## 6.1 Kontext der LPA-Effekte

### 6.1.1 Neuronale Entwicklung

In einer vorangegangenen Dissertation wurde dargestellt, dass die Expression von shRNA gegen LPP1/1a eine Verlangsamung der neokortikalen Migration von Pyramidenzellen auslöst und zu einem frühzeitigen Stopp der Migration führt (Velmans, 2010). In dieser hier vorliegenden Arbeit beschreibe ich, dass in diesen langsamer migrierenden Neuronen eine Veränderung in der Entwicklung von einwärtsgerichteten Strömen stattfand, wohingegen auswärtsgerichtete Ströme unverändert blieben. Bisher sind zahlreiche Proteine und Signalmoleküle identifiziert (Ayala et al., 2007), die eine Rolle während der kortikalen Migration spielen und die z.B. durch Mutationen zu Fehlentwicklungen beitragen können. Dabei spielt die Perzeption von extrazellulären Signalen eine Rolle und letztendlich konvergieren diese Signalwege am Cytoskelett. Proteine wie Dcx, Lis1 und Filamin A sind intrazellulär lokalisiert und interagieren direkt mit dem Cytoskelett (Ayala et al., 2007). Außerdem existieren diffusible Proteine wie Reelin, ein Protein der extrazellulären Matrix (Mochida und Walsh, 2004), das über Rezeptoren/Signalwege auf das Cytoskelett wirkt (Ayala et al., 2007). Eine direkte Interaktion von LPP1/1a mit dem Cytoskelett ist unwahrscheinlich, da ein Homologievergleich der Proteinsequenz ausschließlich Ähnlichkeiten mit Phosphatasedomänen zeigt (siehe Anhang, Abbildung 31) und bisher auch keine weiteren Funktionen von LPPs in der Literatur beschrieben sind.

Außer Reelin sind zahlreiche weitere diffusible Moleküle beschrieben (Ayala et al., 2007), die sowohl über kurze oder lange Distanzen anziehend oder abstoßend auf Neurone wirken können (Wolpert et al., 2007). Der inhibitorische Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist für die Entwicklung von neokortikalen Neuronen von Bedeutung, denn nach einer Aktivierung von ionotropen und/oder metabotropen GABA-Rezeptoren zeigen Zellen im sich entwickelnden Kortex je nach Lokalisation eine Migration oder einen Migrationsstopp (Behar et al., 2000; Heck et al., 2007). Da LPA hauptsächlich extrazellulär produziert wird (siehe 3.1.1) und nicht durch die Zellmembran hindurch diffundieren kann (Davletov et al., 2007), ist auch eine Diffusion von LPA in der extrazellulären Matrix analog zu Reelin oder GABA möglich. *In vitro* besitzt LPP1/1a die Fähigkeit neben LPA weitere Phospholipide zu dephosphorylieren (Roberts et al., 1998). Daher ist erdenklich, dass andere Phospholipide, die als LPP1/1a-Substrat gelten, als Auslöser der langsameren Migration in Frage kommen. Gegen diese These spricht, dass die Affinität von LPP1/1a zu LPA sehr viel höher ist als für die anderen genannten Phospholipide (siehe 3.1.4 und Roberts et al., 1998).

Obwohl aus den vorliegenden Daten und den durchgeführten Experimenten kein endgültiger Schluss gezogen werden kann, wie ein Mangel an LPP1/1a und die Signalfunktion von LPA mit der Fehlmigration von Neuronen und der verlangsamten Stromentwicklung zusammenhängen, lassen die Experimente neue funktionelle Aspekte des Interaktionsduos LPA/LPP1/1a für die neokortikale Entwicklung vermuten.

### 6.1.2 Modulation der synaptischen Transmission

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass die extrazelluläre Applikation von LPA auf hippocampale Neurone eine selektive Veränderung der exzitatorischen synaptischen Transmission im akuten Ge-

hirnschnitt und der primären Zellkultur auslöste. Als Mechanismus wird eine Aktivierung des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors postuliert, da in LPA<sub>2</sub>-*knock-out*-Neuronen keine Veränderung der exzitatorischen synaptischen Transmission nach LPA-Applikation stattfand.

Synapsen sind für Lernprozesse und Gedächtnisformierung von Bedeutung bzw. werden diese Prozesse durch ständige Modifikationen von Synapsen vermittelt (siehe 3.3.1 und Kleim et al., 2002). Die Plastizität von Synapsen wird durch präsynaptische und/oder postsynaptische modifizierende Mechanismen oder Neuromodulatoren beeinflusst: Erstens befinden sich in einer Präsynapse mehr als 1000 funktionelle Proteine, von denen zahlreiche eine Rolle bei der Exozytose von Vesikeln spielen (Südhof, 2004). Die Exozytose von Vesikeln erfolgt durch ein Zusammenspiel aus Calciumsensoren, Cytoskelett, Vesikelbereitstellung und Membranstrukturen sowie G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Südhof, 2004). Zum Beispiel trägt allein die Expression von unterschiedlichen Isoformen des vesikulären Glutamat-Transporters zu einer Veränderung der Ausschüttungswahrscheinlichkeit bei (Weston et al., 2011). Zweitens kann durch Veränderungen des Rezeptorbesatzes (Liao et al., 1999) oder durch Aktivierung von z.B. CaMKII (Calcium/Calmodulin abhängige Protein Kinase II) auf der postsynaptischen Seite eine Modulation stattfinden (Lisman et al., 2002). Drittens können Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten zur synaptischen Modulation beitragen (Araque und Perea, 2004; Fellin et al., 2009). Viertens existieren natürlich vorkommende Neuromodulatoren, zu denen unter anderem Endocannabinoide (Wilson und Nicoll, 2002), Stickstoffmonoxid (NO, Feil und Klepisch, 2008), BDNF (Kovalchuk et al., 2002; Suzuki et al., 2004) und Serotonin (Horrigan et al., 1997) gezählt werden.

Wie hier cursorisch angerissen, existieren zahlreiche Faktoren, die Einfluss auf die synaptische Transmission haben. LPA besitzt eine enge strukturelle Verwandtschaft zu Endocannabinoiden (Brindley und Pilquill, 2009), für die bereits modulatorische Wirkungen der hippocampalen synaptischen Transmission gezeigt wurden (Wilson und Nicoll, 2001). Unklar ist bisher, welche Funktion LPA in den komplexen Regulationsvorgängen der Synapse übernimmt. Anzunehmen ist, dass LPA auch *in situ* in der Lage ist die synaptische Transmission zu modulieren. Weil LPA-Rezeptoren und Wirkungen aber für fast jedes Gewebe beschrieben sind, ist eine prominente Rolle als synaptischer Modulator unwahrscheinlich, jedoch ist eine wichtige Funktion nicht auszuschließen.

## 6.2 Mechanismen der LPA-Effekte

### 6.2.1 Neuronale Entwicklung

Für Larven von *Drosophila melanogaster* wurde nachgewiesen, dass Keimzellen, denen das LPP homologe Protein Wunen fehlt (siehe 3.1.4), ihren Zielort nicht erreichen (Starz-Gaiano et al., 2001). Auch in embryonalen Gehirnexplantaten *in vitro* wurde eine Funktion von LPA als chemotaxischer Stoff beschrieben (Fukushima et al., 2000). In der letztgenannten Studie wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem post-mitotische Neurone LPA in die Umgebung abgeben und neuronale Vorläuferzellen in der ventrikularen Zone mit Zellabrundung und der Retraktion von Fortsätzen reagieren. Die Abrundung von Zellen wird über einen zytoskelettalen Mechanismus vermittelt, der den G<sub>13</sub>-Signalweg mit anschließender RhoGEF-Aktivierung beinhaltet. Dieser Signalweg kann sowohl von LPA<sub>1</sub>- und

LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren aktiviert werden (Ishii et al., 2000; Noguchi et al., 2009). Velmans (2010) hat basierend auf ihren Daten und diesem Modell (Fukushima et al., 2000) postuliert, dass LPP1/1a exprimierende Zellen in der ventrikularen Zone extrazelluläres LPA dephosphorylieren und LPA in der Mikroumgebung dieser Zellen damit wirkungslos wird. Neurone, die ein verringertes LPP1/1a-Level haben, können LPA nicht im ausreichendem Maß dephosphorylieren und dann wirkt LPA chemotaktisch abstoßend. In dem vorliegenden Modell kann ein LPA-Diffusionsgradient mit der höchsten Konzentration in der Umgebung der produzierende Zellen und einer niedrigeren Konzentration in der ventrikularen Zone entstehen. Die Bildung eines Gradienten von diffusiblen Molekülen im entwickelnden Gehirn ist ein häufig vorkommender Mechanismus (Ayala et al., 2007). Ein Beispiel ist Reelin, das durch Bindung an *low-density lipoprotein*-Rezeptoren die richtige Positionierung von Neuronen im Kortex mediiert (Zhao und Frotscher, 2010). Da auch LPA an Rezeptoren bindet, wäre ein analoger rezeptorvermittelter Mechanismus denkbar und betroffene Neurone würden durch eine Veränderung des LPA-Gleichgewichts in der direkten Umgebung (Mikroumgebung) in ihrer Migration gestört werden (Velmans, 2010).

Weiterhin exprimieren kortikale Vorläuferzellen der ventrikularen Zone den LPA<sub>1</sub>-Rezeptor (auch *ventricular zone gene-1* - Vzg-1, Hecht et al., 1996). In der ersten beschriebenen LPA<sub>1</sub>-Rezeptor-*knock-out*-Maus waren keine anatomischen Veränderungen in der Gehirnentwicklung beschrieben, aber ca. 50% dieser Tiere starben pränatal an einer Exencephalie (Contos et al., 2000). Hingegen zeigt eine andere LPA<sub>1</sub>-Rezeptor defiziente Maus embryonale Veränderungen in der ventrikularen Zone und der kortikalen Schichtung in adulten Tieren (Estivill-Torrús et al., 2008). Der Grund für diesen Unterschied der Mauslinien ist bisher nicht bekannt. Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass es eine mögliche Verbindung zwischen LPA-Signalwegen und der richtigen Schichtenbildung im Neokortex gibt (Estivill-Torrús et al., 2008). Diese Veränderungen deuten daher darauf hin, dass LPA-Signalwege für eine optimale Ausbildung der Schichtung des Neokortex von Bedeutung sind. Der Phänotyp zwischen LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen und dem *knock-out*-Modell unterscheidet sich, aber beide haben gemeinsam, dass die Schichtenbildung im Neokortex verändert ist. Generell besteht die Möglichkeit, dass ein vollständiger *knock-out* von einem Gen keinen oder einen anderen Phänotyp zeigt als angenommen, da genetische Kompensationsmechanismen vorhanden sind (Bai et al., 2003). Der Vorteil von *in utero* induzierter RNA-Interferenz gegenüber einem *knock-out* ist, dass nur ein Teil der Zellen innerhalb eines normalen Gewebeverbands betroffen sind und es sehr unwahrscheinlich ist, dass ein Eingriff 100% effektiv ist (Bai et al., 2003). Daher kann ein gezieltes *silencing* von LPA-Signalwegen aussagekräftiger als ein *knock-out* sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen elektrophysiologischen Daten sind ein weiteres Indiz für eine funktionelle Rolle von LPA während der Kortexgenese.

Spät gebildete Neurone sind im Gegensatz zu früh gebildeten Neuronen nicht in der Lage Umgebungssignale, die Schichtzugehörigkeit festlegen, wahrzunehmen (Ayala et al., 2007). In den Kontrollexperimenten erreichten die transfizierten Neurone die oberen Schichten der kortikalen Platte und waren am Tag P5 auch fast vollständig in den Lagen II/III anzufinden. Im Gegensatz dazu befanden sich LPP1/1sh-RNA exprimierende Neurone an Tag P5 hauptsächlich in den tiefen Schichten (Velmans, 2010). Zu bedenken ist, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transfektion (E15,5) die LPP1/1a-shRNA-Neurone noch in der ventrikularen/subventrikularen Zone anzufinden

waren, während die Neurone der Kontrollexperimente bereits in die kortikale Platte eingewandert waren (Velmans, 2010). Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass am Tag E12,5 ein durch LPA-Rezeptoren vermittelter Calciumeinstrom in neuronalen Vorläuferzellen stattfindet und zum gleichen Zeitpunkt ausdifferenzierte Neurone einen verringerten Calciumeinstrom nach LPA-Stimulus zeigten (Dubin et al., 2010). Für die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass der frühe *knock-down* mit LPP1/1a-shRNA wahrscheinlich neuronale Vorläuferzellen trifft und in diesen z.B. ein Calciumeinstrom durch erhöhte LPA-Niveaus bzw. Aktivierung von LPA-Rezeptoren erfolgt (Dubin et al., 2010). Im Anschluss an eine Ausdifferenzierung migrieren die betroffenen Neurone langsamer und die Fähigkeit mit somatischen Calciumerhöhung auf LPA in der extrazellulären Umgebung zu reagieren kann verringert sein. In der vorliegenden Arbeit wird dargestellt, dass auch im adulten Tier Neurone auf LPA-Stimuli reagieren, hingegen verändert sich die Art und Lokalisation der Antwort. Weiterhin verringert sich das Expressionsniveau des LPA produzierenden Enzyms ATX in den Zellschichten des Kortex und Hippocampus (Savaskan et al., 2007). Mit dieser Reduktion könnte die LPA-Signalveränderung von einem unspezifischen Modulator, der in Zellverbänden einen Calciumeinstrom induziert, zu einem spezifisch neuronal wirkenden Modulator einhergehen.

### 6.2.2 Intrinsische Ströme

Elektrische Aktivität ist für die Funktion von Neuronen essentiell und für die Entwicklung des Nervensystems mitverantwortlich (Spitzer, 2006). Hat die elektrische neuronale Aktivität einen Einfluss auf die Migrationssphase von Neuronen oder wird die elektrische Aktivität als Folge der Migration verändert? Mögliche Optionen wären, dass entweder die Stromentwicklung als eine Folge der neokortikalen Migration auftritt und abhängig von der Genexpression ist oder die neokortikale Migration eine Folge der Stromentwicklung ist und auch durch diese reguliert wird (García et al., 2011). Ein dritter viel komplexerer Aspekt ist, dass ein Zusammenspiel zwischen elektrischer Aktivität als Folge der Genexpression und eine dadurch ausgelöste Veränderung der Genexpression besteht und dies die Migration kontrolliert und zusätzlich durch externe Faktoren (hier: LPA) beeinflusst wird (Spitzer, 2006).

Für tangential wandernde Interneurone ist die Bedeutung von intrinsischen Strömen für die richtige Wanderung und aktivitätsabhängige regulierte Genexpression beschrieben (García et al., 2011). Im untersuchten LPP1/1a-*knock-down*-Modell habe ich gezeigt, dass die intrinsische Erregbarkeit von LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen reduziert ist, was eine mögliche Verbindung zwischen Migration und Stromentwicklung auch in pyramidalen Neuronen interessant macht. Mögliche intrinsische neuronale Mechanismen, die sich auf die elektrische Aktivität bzw. Erregbarkeit auswirken können, sind eine Veränderung der Expression von Ionenkanälen, eine Veränderung der subzellulären Verteilung von Ionenkanälen oder eine direkte Modulation der Ionenkanäle.

#### 6.2.2.1 Spannungsabhängige einwärtsgerichtete Ströme

In dieser Arbeit stelle ich dar, dass der spannungsabhängig aktivierte Einwärtsstrom am Tag E18 in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen sowohl in der Amplitude als auch der berechneten Leitfähigkeitsdichte gegenüber den Neuronen der Kontrolle verringert war. Um einzuordnen, welchen

Einfluss LPA auf die Stromreduktion haben kann, ist der zu Grunde liegende Strom von Bedeutung.

Mit dem von mir verwendeten Spannungsprotokoll können unterschiedliche spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert werden. In Frage kommen spannungsabhängige Natriumkanäle und spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ. Für den Tag E19 ist die Expression vom L-Typ-Calciumkanal in kortikalen Neuronen beschrieben, jedoch zeigen diese fast keine Deaktivierung des Stroms (Hamill et al., 1991). Dies steht im Gegensatz zu der gemessenen schnellen Deaktivierung des einwärtsgerichteten Stroms. Natriumkanäle aktivieren spannungsabhängig und deaktivieren innerhalb weniger Millisekunden (Yu und Catterall, 2003), was mit den gemessenen Eigenschaften des einwärtsgerichteten Stroms übereinstimmt (siehe Abbildung 12B und 13B). Dieses Ergebnis wird durch die bekannte Expression der spannungsabhängigen Natrium  $\alpha$ -Untereinheiten 1.2, 1.3, und 1.6 im pränatalen Nagerhirn (Shah et al., 2001) und dem bekannten Vorkommen von Natriumströmen am Tag E18 unterstützt (Bahrey und Moody, 2003). Aus den vorliegenden Hinweisen ist abschließend zu konstatieren, dass die gemessenen Ströme mit großer Wahrscheinlichkeit Natriumströme waren. Eine definitive Aussage über die Identität der Ströme wurde in diesem Rahmen jedoch nicht angestrebt.

Aus den durchgeführten Experimenten ist nicht ersichtlich, ob eine direkte Modulation der einwärtsgerichteten Ströme durch LPA stattfindet, ob die Veränderung des Einwärtsstroms einem LPA-Rezeptor vermittelten Regulationsmechanismus unterliegt oder ob die Stromreduktion ein sekundärer Effekt (z.B. Änderung des Zytoskelettes) als Folge der Fehlmigration ist. In neuronalen Progenitorzellen werden fast alle LPA vermittelten intrazellulären Calciumerhöhungen durch LPA-Rezeptoren ausgelöst (Dubin et al., 2010), wobei unterschiedliche Zellen jedoch verschiedene LPA-Rezeptorkombination exprimieren. Dadurch entstehen interzelluläre Unterschiede in der LPA-Rezeptor vermittelten Calciumdynamik (Dubin et al., 2010). Außerdem führt LPA-Applikation in mikrovaskulären Endothelzellen über einen L-Typ-Calciumkanal zu einem Calciumeinstrom (Yakubu und Leffler, 2002). In Neuronen könnte eine mögliche Konsequenz eine Veränderung der Genexpression sein, da der L-Typ vermittelte Calciumeinstrom als ein wichtiger Regulator der Genexpression gilt (Catterall, 2000). Die vorliegenden Messungen der Einwärtsströme zeigten, dass keine L-Typ-Calciumkanäle aktiviert wurden, was aber nicht ausschließt, dass diese exprimiert werden bzw. vorhanden sind. Die Studie von Dubin et al. (2010) deutet auf eine Veränderung der Genexpression, vermittelt durch LPA-Rezeptoren und Calciumeinstrom, als Ursache des gemessenen reduzierten Einwärtsstroms hin.

In der vorliegenden Arbeit ist dargestellt, dass am embryonalen Tag 18 LPP1/1a-shRNA exprimierende Neurone reduzierte Einwärtsströme im Vergleich zu den Strömen der Kontrollexperimente besaßen. Die Amplitude von  $I_{Na}$  ist durch die Entwicklungsstufe, z.B. Migrationsstadium oder die Zeit seit dem Ende der letzten Zellteilung des individuellen Neurons bestimmt und nicht durch das chronologische Alter (Bahrey und Moody, 2003). Dies könnte ein Hinweis auf einen zeitlich veränderten Austritt aus dem Zellzyklus sein. Ein experimenteller Hinweis auf einen Unterschied des Zellzyklus wurde hingegen nicht gefunden (Velmans, 2010). Während der Migration von Neuronen sind die Natriumströme entweder kleiner oder es werden andere Natriumkanaluntereinheiten exprimiert (Bahrey und Moody, 2003). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone noch in einem intrinsischen Migrationsstadium bzw. -programm befanden. Dieses Argument wird dadurch bekräftigt, dass sich am Tag P5 die Einwärtsströme von LPP1/1a-shRNA oder Kontroll-shRNA exprimierenden Neuronen nicht mehr unterscheiden.

Während der neuronalen Migration ist die strikte Regulation des Cytoskeletts notwendig (Ayala et al., 2007). LPA induziert F-Aktin-Retraktionsfasern in jungen postmitotischen Neuronen (Fukushima et al., 2002) und Natriumkanäle interagieren mit dem Aktinzytoskelett (Cantiello, 1995). Daher ist denkbar, dass ein verändertes Aktinzytoskelett in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen negativ auf die Membraninsertion oder Membrandistribution der Natriumkanäle wirkt.

### 6.2.2.2 Spannungsabhängige auswärtsgerichtete Ströme

Wie für die Einwärtsströme ist auch für die Auswärtsströme eine Kenntnis der zu Grunde liegenden Ionenkanäle von Bedeutung. Die mit dem benutzten Spannungsprotokoll aktivierten und gemessenen Ströme (siehe 12B und 13B) waren vermutlich *delayed-rectifier*-Kaliumkanäle, da diese bereits in frühen Stadien der Entwicklung in Zellen der Intermediärzone exprimiert werden (Bahrey und Moody, 2003) und auch in Neuronen der kortikalen Platte zu finden sind (Noctor et al., 2001). *Delayed-rectifier* Kaliumkanäle werden bereits exprimiert, bevor postmitotische Neurone in die kortikale Platte einwandern (Bahrey und Moody, 2003). Mit der Wanderung in die kortikale Platte verändert sich dieser Strom kaum und erst nachdem die postmitotischen Neurone wachsen, findet eine Vergrößerung des Auswärtsstroms statt (Bahrey und Moody, 2003). Die geringe Veränderung dieses Stroms während der Migration ist eine mögliche Erklärung, warum sich die LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neurone nicht von den entsprechenden Kontrollen unterscheiden. Dennoch zeige ich in dieser Arbeit, dass am Tag P5 eine Vergrößerung der Stromamplitude auftrat, hingegen blieb die berechnete Leitfähigkeit, normiert auf die Zellgröße, unverändert. Weiterhin erschienen am Tag P5 neben den *delayed-rectifier*-Strömen mit großer Wahrscheinlichkeit Kaliumströme vom A-Typ. Dies war daran zu erkennen, dass nach Aktivierung durch Depolarisation ein Peak in der Amplitude zu messen war, der sich mit verlängerter Aktivierungsdauer verringerte. Der A-Typ-Kaliumstrom wurde nicht pharmakologisch durch Block von *delayed-rectifier*-Strömen mit TEA isoliert (siehe z.B. Bordey und Sontheimer, 1997), daher wurde diese Stromkomponente nicht näher analysiert, sondern es erfolgte ausschließlich eine Analyse des auswärtsgerichteten Stroms im *steady-state*.

In der verfügbaren Literatur ist bisher keine Modulation von spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch LPA beschrieben und auch in den Experimenten wurde keine Veränderung des Stroms gefunden. Für die Erregbarkeit der Neurone war der unveränderte Auswärtsstrom trotzdem von Bedeutung. Durch den gleichen Einwärts- und Auswärtsstrom verringerte sich die intrinsische Erregbarkeit in LPP1/1a-shRNA-Neuronen am Tag E18.

### 6.2.2.3 Der hyperpolarisations-aktivierte Einwärtsstrom

HCN-Kanäle sind wichtige Regulatoren der dendritischen Integration (Magee, 1999) und des Ruhemembranpotenzials von Neuronen (Wahl-Schott und Biel, 2009). Eine LPA vermittelte Modulation von HCN-Kanälen wurde aus folgenden Gründen vermutet: 1. LPA-Rezeptoren aktivieren Signalwege, die den klassischen HCN-Kanalmodulator cAMP durch Aktivierung von  $G_i$  oder  $G_s$  verändern können. 2. Über eine  $G_{q/11}$ -Aktivierung kann der PLC-Signalweg angestoßen werden (Noguchi et al., 2009). Die Aktivierung der PLC kann eine Vergrößerung von  $I_h$  zur Folge haben (Pian et al., 2007) und cAMP kann mit der cAMP-Bindedomäne von HCN-Kanälen interagieren. Weiterhin reicht eine Veränderung von  $I_h$  aus, um die in dieser Arbeit beschriebenen LPA induzierten Veränderungen

der exzitatorischen synaptischen Transmission von einem postsynaptischen Standpunkt zu erklären. Eine Reduktion von  $I_h$  führt zu einer Verkleinerung der elektrotonischen Distanz, wodurch die zeitliche Summierung von exzitatorischen Strömen am Soma steigt. Dies wäre ein Mechanismus, um eine Übererregbarkeit auszulösen (Strauss et al., 2004).

In den durchgeführten Experimenten habe ich keine Veränderung des HCN vermittelten Stroms nach LPA-Applikation gemessen. Mögliche Gründe kommen in Betracht. Die dominierende HCN-Untereinheit in CA1-Neuronen des Hippocampus ist HCN1 (Brewster et al., 2007), die nur sehr gering durch cAMP moduliert wird (Wahl-Schott und Biel, 2009). Jedoch ist ein cAMP-Anstieg durch  $G_s$  unwahrscheinlich, da bisher nur für den LPA<sub>4</sub>-Rezeptor eine Aktivierung gezeigt wurde (Noguchi et al., 2009) und dieser nicht in Neuronen dieses Alters exprimiert wird (Kieselmann, 2010). Eine Inhibierung der Adenylatcyclase durch  $G_i$  wäre denkbar, aber die Auswirkungen wären möglicherweise gering, da durch die Eigenschaft von cAMP als *second messenger* eine strenge Regulation des freien cAMPs stattfindet (Alberts et al., 2002). Die Modulation durch PLC wurde bisher ausschließlich im Expressionssystem gezeigt (Pian et al., 2007), daher ist es denkbar, dass eine andere Regulation im akuten Gehirnschnitt vorliegt.

#### 6.2.2.4 Zusammenfassung von 6.2.2

Eine Regulation der Einwärtsströme wurde in LPP1/1a-shRNA-Neuronen nachgewiesen, jedoch wurde nicht geklärt, ob die Ströme aufgrund der verlangsamten Wanderung (ausgelöst durch LPA) verringert waren oder ob die Verringerung der Ströme durch LPA ausgelöst und damit die kortikale Wanderung verändert wurde. Diese Arbeit zeigt als erste die Deregulierung von intrinsischen Strömen von fehlmigrierten Neuronen während der kortikalen Migration. Daher ist es sehr schwierig zu beurteilen, ob eine Stromveränderung ein generelles Attribut von falsch migrierenden Neuronen ist oder nur in diesem Modell auftritt. Die Funktion von LPA in diesem Modell der Fehlmigration lässt sich anhand der durchgeführten Experimente nicht feststellen.

#### 6.2.3 Synaptische Transmission

Spezifische Signallipide werden im Gehirn nach Neurotransmitterstimulation, Aktivierung von Ionenkanälen oder Membrandepolarisierung produziert (Davletov und Montecucco, 2010). Synaptisch vorkommenden Lipide sind mobil und werden dynamisch reguliert, was durch die Wirkung von synaptischen oder extrazellulären Proteinen unterstützt wird (Davletov und Montecucco, 2010). Eine bekannte Gruppe dieser Signallipide sind die Endocannabinoide, für die gezeigt wurde, dass sie über einen retrograden rezeptorvermittelten Mechanismus die synaptische Transmission modulieren (Wilson und Nicoll, 2001). Neben Signallipiden sind Interaktionen von Lipiden mit vesikulären und synaptischen Proteinen wichtig, womit sie auch eine funktionelle Rolle bei der Exozytose und der Endozytose von Vesikeln besitzen (Bankaitis und Morris, 2003). Eine Bedeutung von LPA bei Exo- oder Endozytosevorgängen ist denkbar. Es wurde die Konversion von LPA zu PA durch Endophilin I beschrieben, was mit einer anschließenden Veränderung der Membrankrümmung und Vesikelinternalisierung einhergeht (Schmidt et al., 1999).

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass LPA selektiv die spontane exzitatorische synaptische Trans-

mission über eine Aktivierung des LPA<sub>2</sub>-Rezeptors moduliert. Unterstützt wird dieses Ergebnis von dem Befund, dass der LPA<sub>2</sub>-Rezeptor sowohl im Gehirnschnitt (Trimbuch et al., 2009) als auch in der primären neuronalen Zellkultur (Kieselmann, 2010) an exzitatorischen Präsynapsen lokalisiert ist. Zusätzlich wurde die Anwesenheit von extrazellulärem Calcium benötigt, da ansonsten eine LPA-Applikation keinen Effekt hatte. In weiteren Experimenten konnte ich zeigen, dass die Pufferung von postsynaptisch lokalisiertem Calcium durch BAPTA eine LPA-Wirkung nicht verhindert. Dies deutet daraufhin, dass ein präsynaptischer Calciumeinstrom vermittelt durch den LPA<sub>2</sub>-Rezeptor für die LPA-Wirkung benötigt wird. Tatsächlich wurde in der Arbeit von Kieselmann (2010) gezeigt, dass Applikation von  $\omega$ -Agatoxin, welches präsynaptische P/Q-Typ-Calciumkanäle blockt (Catterall, 2000), den LPA-vermittelten Calciumeinstrom reduziert. P/Q-Typ-Calciumkanäle werden durch verschiedene G-Protein gekoppelte Signalwege reguliert (Catterall, 2000). Diese genannten Arbeiten unterstützen die These, dass LPA die Aktivierung von LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren induziert, welche im Anschluss eine präsynaptischen Calciumerhöhung hervorrufen, wodurch die Vesikelausschüttung verändert wird. Da LPA<sub>2</sub>-Rezeptor defiziente Mäuse keine offensichtlichen phänotypischen und morphologischen Veränderungen zeigen, trägt dieser vorgestellte Mechanismus wahrscheinlich zu einer Feinregulierung der Präsynapse bei.

Ein ähnlicher präsynaptischer Mechanismus, der sich auf die exzitatorische synaptische Transmission beschränkt, wurde für Neurone der Schicht III des entorhinalen Kortex beschrieben. Präsynaptisch lokalisierte HCN-Kanäle kolokalisieren mit Ca<sub>v</sub>3.2-Kanälen und Veränderungen von HCN-Kanälen führen zu einer spezifischen Modulation der Exzitation (Huang et al., 2011). Diese Modulation ist altersabhängig, da die Expression von präsynaptischen HCN-Kanälen im entorhinalen Kortex mit dem Alter abnimmt (Bender et al., 2007). In dieser Arbeit habe ich die Modulation von HCN-Kanälen durch LPA untersucht, aber keine Veränderung dieses Stroms nachgewiesen. Synaptische HCN-Ströme sind nicht durch somatische Ableitungen messbar, womit Veränderungen nicht registrierbar sind. Durch den aufgezeigten Mechanismus von Huang et al. (2011) ist eine weiterführende Untersuchung der HCN-LPA-Interaktion weiterhin interessant.

### 6.2.3.1 Unterschiede zwischen akutem Gehirnschnitt und neuronaler Zellkultur

Warum löst extrazelluläre LPA-Applikation die hier beschriebene Steigerung der Exzitation in Gehirnschnitten und eine Verringerung der Exzitation in der primären neuronalen Zellkultur aus? Einerseits ist der Differenzierungszustand von Neuronen für LPA vermittelte Wirkungen von Bedeutung (Dubin et al., 2010), andererseits werden durch das Modellsystem primäre neuronale Zellkultur Neurone aus ihrer nativen Umgebung entfernt und unter nachgeahmten Bedingungen kultiviert.

Experimente, welche in dieser Arbeit im akuten Gehirnschnitt durchgeführt wurden, erfolgten in Mäusen des Alters P21-P30. Im Gegensatz dazu wurden Experimente mit primär kultivierten Neuronen, die zwischen 10-15 Tagen in Kultur waren, durchgeführt. Die Wahl eines jüngeren Alters der kultivierten Neurone erfolgte aus verschiedenen Beweggründen. Die Kultivierung fand in Abwesenheit von Antibiotika statt und ab 14 Tagen in Kultur stieg die Kontaminationsrate an. Des Weiteren wurde angenommen, dass nach 10 Tagen in Kultur die Synaptogenese abgeschlossen ist (Grabrucker et al., 2009). Außerdem wurden die Neurone mit einer relativ hohen Dichte kultiviert, wodurch mit Anstieg der Kulturdauer die Analyse der sPSC-Frequenz unzulänglich war. Obwohl ein Unterschied

im untersuchten Alter der Neurone vorhanden war, wurde durch das Ende der Synaptogenese eine gleiche Funktionalität der Synapsen vermutet. An diese Überlegungen schließt sich an, dass während der *in vitro*-Entwicklung von Neuronen eine Veränderung der Lipidzusammensetzung von neuronalen Membranen stattfindet und der Anteil von u.a. Glycerophospholipiden mit dem Alter ansteigt (Pirnetti et al., 2001). Glycerophospholipide sind wichtige Bestandteile von präsynaptischen Membranen (Davletov und Montecucco, 2010), an denen Vesikel exozytiert werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Unterschiede auf zellulärer neuronaler Ebene zwischen der primären neuronalen Kultur und dem akuten Gehirnschnitt bestanden, welche ein möglicher Grund für die gegenläufigen Ergebnisse sein könnten.

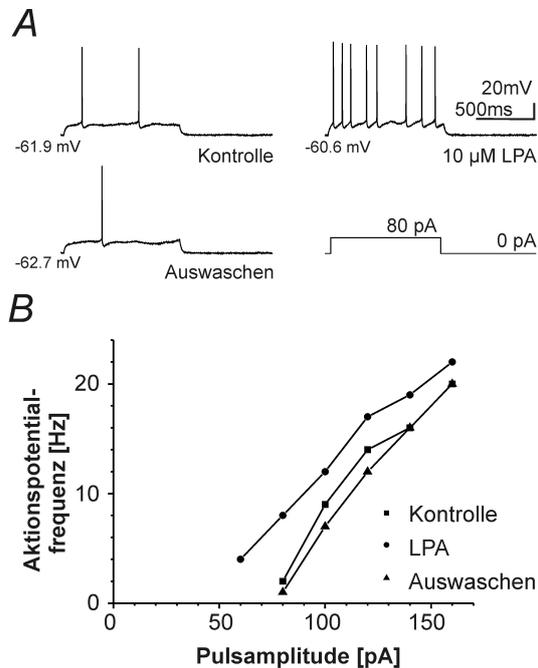
Weiterhin wurden die Neurone in der primären hippocampalen Zellkultur in Abwesenheit von Gliazellen kultiviert. Die Abnahme der mEPSCs in der primären neuronalen Zellkultur kann auch auf die Abwesenheit von Gliazellen zurückzuführen sein. Gliazellen sind in Prozessen wie Glutamataufnahme (Kanai et al., 1993), Kontrolle und Stabilisierung von Synapsen (Ullian et al., 2001) und der Versorgung mit Nährstoffen involviert (Tsacopoulos et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass LPA die Vesikelanzahl in der glutamatergen Präsynapse von kultivierten hippocampalen Neuronen um ca. 30% reduziert (Kieselmann, 2010). Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Vesikelrecycling während der LPA-Applikation nicht aufrechterhalten werden kann, weil die Unterstützung von Gliazellen hinsichtlich Nährstoffversorgung und Synapsenstabilisierung fehlt. Eine denkbare Konsequenz ist, dass mehr Vesikel exozytiert als endozytiert werden, was die gemessene Reduktion der mEPSC-Frequenz zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit habe ich kontinuierliche Aufnahmen der mEPSCs durchgeführt, aber ein, eventuell auch nur kurzfristiger, Anstieg von mEPSCs wurde in den Zellkulturexperimenten nicht beobachtet. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass in dieser Art der neuronalen Zellkultur die Vesikelendozytose verändert ist. Es bietet sich daher an, dass eine Experimentreihe mit Neuronen, die auf Gliazellen kokultiviert werden, wiederholt wird.

### 6.3 Funktionelle Konsequenzen

Die zeitliche Begrenzung einer LPA induzierten Wirkung (Dubin et al., 2010) lässt darauf schließen, dass die in dieser Arbeit dargestellten unterschiedlichen Ergebnisse der LPA-Modulation wahrscheinlich durch den Entwicklungszustand oder Reifegrad des Neurons determiniert werden.

Eine funktionelle Konsequenz von LPA als positiven Regulator der exzitatorischen synaptischen Transmission wurde von mir in weiteren Experimenten untersucht. Von diesen Experimenten liegen jedoch bisher nur vorläufige experimentelle Daten vor. In drei Neuronen wurden im *current-clamp* Strom injiziert und die Aktionspotenziale gemessen. LPA-Applikation führte in diesen Experimenten zu einer Verschiebung der Frequenz-Strom-Kurve (F-I-Kurve) zu kleineren Stromstärken. Der Anstieg der F-I-Kurve veränderte sich nicht (siehe Abbildung 30). In einem anderen untersuchten CA1-Neuron kam es hingegen zu einer Verringerung der Erregbarkeit, womit deutlich wird, dass die Qualität des *patches* bzw. des Neurons eine wichtige Rolle spielt. Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass eine weitere experimentelle Abklärung aussichtsreich erscheint. Denkbar ist außerdem, dass weiterführende Experimente in Gegenwart von pharmakologischen synaptischen Blockern

durchgeführt werden. Mit den Ergebnissen dieser Experimente kann eine Aussage getroffen werden, ob dieser Effekt durch erhöhte synaptische Aktivität entsteht (wie beschrieben) oder ob auch intrinsische Ströme beteiligt sind.



### Abbildung 30: Extrazelluläres LPA erhöht die Aktionspotenzialfrequenz.

**A.** Als eine mögliche weitere Konsequenz der LPA-Erhöhung ist das Beispiel eines Neurons im *current-clamp* gezeigt. Nach 10 µM LPA-Applikation kommt es zu einem Anstieg der Aktionspotenzialfrequenz sowie einer Membrandepolarisation. Auswaschen von LPA führte zu einer Hyperpolarisation und einer Verringerung der Aktionspotenzialfrequenz, die mit der Kontrollsituation vergleichbar war. Die Stimulationsintensität wurde nicht verändert und war jeweils 80 pA.

**B.** Graph, der die Aktionspotenzialfrequenz in Abhängigkeit der injizierten Stromstärke (F-I-Kurve) vor, während und nach der Applikation von LPA für das Neuron in A darstellt.

Für ektoische Neurone wurde gezeigt, dass diese in ihrer neuen Umgebung überleben können, jedoch wurde nicht untersucht, ob diese Neurone auch ins neuronale Netz integriert sind (Rouaux und Arlotta, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten fehlmigrierten Neurone besaßen funktionelle synaptische Kontakte (siehe Abbildung 17). Interessanterweise wird vermutet, dass sich postsynaptische exzitatorische Neurone aktiv an der Ausbildung synaptischer exzitatorischer Kontakte beteiligen (Bannister, 2005). Die vorliegenden experimentellen Daten lassen den Schluss zu, dass die Synaptogenese von neokortikalen Neuronen einem intrinsisch ablaufenden Programm unterliegt und unabhängig von der Lokalisation der Neurone ist.

Weiterhin ist im Neokortex eine hohe spezifische Interkonnektivität der Neurone vorhanden (Bannister, 2005). Neurone der Schichten II/III projizieren intrakortikal (ausschließlich ipsilateral), wohingegen die Mehrheit der Neurone der Schicht V zu Zielen im Thalamus projizieren und Subpopulationen auch auf die contralaterale Seite des Kortex (Bannister, 2005). Die beobachtete Anpassung der intrinsischen elektrischen Eigenschaften (diese Arbeit) und der Morphologie (Velmans, 2010) könnte eine Veränderung der axonalen Projektionen induzieren. Eine Störung von intrakortikalen Verknüpfungen könnte z.B. Verhaltens- oder Bewegungsänderungen hervorrufen. In dem vorliegenden Tiermodell der *in utero*-shRNA-Elektroporation sind die zu erwartenden Auswirkungen gering, da nur eine Subpopulation von Neuronen in einem kleinen Gehirnnareal von der Migrationsstörung betroffen war (siehe Abbildung 6). Außerdem ist für den Motorkortex bekannt, dass es in der Folge von pathologischen oder traumatischen Veränderungen zu Reorganisationen der betroffenen Regionen kommt, welche die weitere, eventuell eingeschränkte Funktion erlauben (Sanes und Donoghue, 2000).

### 6.3.1 Klinische Implikationen

Durch die Vulnerabilität des embryonalen Gehirns (Rice und Barone, 2000) führen Störungen während der Gehirnentwicklung zu geistiger Retardierung, Epilepsie und schwerwiegenden Lernschwierigkeiten (Marín und Rubenstein, 2003). Die hier auf zellulärer Ebene vermutete Veränderung im Lipidstoffwechsel durch *knock-down* von LPP1/1a verringerte die Erregbarkeit der betroffenen Neurone (siehe Abbildung 12) und führte zu einem postnatalen Migrationsstopp (Velmans, 2010). Migrationsstörungen können im Menschen unter anderem zu Lissenzephalie (glattes Gehirn) oder Heterotopien führen (Marín und Rubenstein, 2003). Klinisch manifestiert sich eine Epilepsie, die häufig von anderen neurologischen Symptomen begleitet wird (Spalice et al., 2009).

Interessanterweise sind krankhafte Veränderungen des Lipidstoffwechsels beschrieben, die sich in Form von fortschreitender Epilepsie mit mentaler Retardierung äußern können (Hermansson et al., 2005). Erwähnenswert sind die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen, ein Spektrum von vererbaren neurodegenerativen Erkrankungen (Hermansson et al., 2005), für die eine Erhöhung von Phosphatidylcholin im Gehirn beschrieben ist (Käkelä et al., 2003). Phosphatidylcholin wird zu anderen Phospholipiden verstoffwechselt (Brindley und Pilquill, 2009), wodurch eine neuromodulatorische Wirkung herbeigeführt werden kann. Weiterhin führte der *knock-out* von PRG-1 zu epileptischen Anfällen und einer erhöhten exzitatorischen synaptischen Transmission von CA1-Neuronen des Hippocampus (Trimbuch et al., 2009). Eine zentrale Rolle vom bioaktiven Phospholipid LPA an diesen Vorgängen wurde vermutet (Trimbuch et al., 2009), da es selektiv die exzitatorische synaptische Transmission moduliert. Weiterhin wurde gezeigt, dass nach einer entorhinalen Kortexläsion (Neurotrauma) ATX hochreguliert wird (Savaskan et al., 2007), was möglicherweise zu einer Erhöhung des LPA-Niveaus im Gehirn führen kann. Diese Arbeit zeigt, dass LPA-Applikation im Gehirnschnitt zu einer erhöhten Ausschüttung von Glutamat führt, was als Folge die Erregbarkeit erhöht. Dies wäre ein denkbarer Mechanismus, der eine Epilepsie nach Neurotrauma auslösen könnte.

Diese aufgezeigten klinischen Ausprägungen einer Veränderung des Phospholipidstoffwechsels weisen darauf hin, dass Phospholipide an physiologischen Vorgängen des ZNS beteiligt sind. Interessanterweise treten Fettleibigkeit, gemessen am *body-mass-index*, und Epilepsie häufig zusammen auf (Daniels et al., 2009), was auf einen weiteren Zusammenhang zwischen Lipidstoffwechsel und ZNS-Funktion hindeuten könnte.

## 6.4 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die Richtung von weiteren möglichen Experimenten auf. Eine Messung der tatsächlich vorkommenden LPA-Konzentration in den untersuchten Gehirnregionen könnte erfolgen. Ein Ansatz wäre, die extrazelluläre LPA-Konzentration im Gehirngewebe, in definierten Gehirnarealen oder im akuten Gehirnschnitt zu bestimmen. Zu bedenken ist, dass LPA sowohl extra- als auch intrazellulär lokalisiert ist (Moolenaar et al., 2004), wodurch die Messung erschwert ist. Ebenfalls kann das LPA-Niveau von primär kultivierten Neuronen gemessen werden. Einen Rückschluss auf den akuten Gehirnschnitt würde diese Methode auf Grund ihres modellhaften Charakters jedoch nur eingeschränkt zulassen. Im Gehirnschnitt wiederum wäre eine Bestimmung der

Gesamtkonzentration von LPA möglich ohne die Lokalisation zu unterscheiden. Die Messung der LPA-Konzentration im Gewebe ist für die durchgeführten LPP1/1a *knock-down*-Experimente von Bedeutung. Die Entwicklung einer LPA-Messmethode von Kryostatschnitten des Gehirns wurde für adulte Ratten beschrieben (Aaltonen et al., 2010), eine Übertragung auf embryonale Mausschnitte und die Bestimmung in definierten Arealen ist auf Grund der reduzierten Gewebemenge durch das geringe Alter schwierig.

Ein anderer experimenteller Ansatz, der für elektrophysiologische Experimente die Anwendung erleichtert, wäre die Benutzung von Mausmodellen, in denen der LPA-Spiegel verändert ist. Da eine Überexpression von LPP1/1a nicht das Plasmalevel von LPA verändert (Yue et al., 2004), wäre eine Benutzung einer Autotaxin-*knock-out*-Maus (Autotaxin<sup>-/-</sup>, van Meeteren et al., 2006) denkbar. Autotaxin<sup>-/-</sup>-Mäuse sind nicht lebensfähig, aber bereits Autotaxin<sup>+/-</sup>-Mäuse (heterozygot) zeigen eine Reduktion des LPA-Plasmalevels. Die Annahme, dass ein erhöhter LPA-Gradient für eine verlangsamte Migration verantwortlich ist, könnte in Autotaxin heterozygoten Mäusen zu einer Abschwächung des Migrationsphänotyps führen, da die Gesamt-LPA-Konzentration verringert ist. Falls eine Abschwächung des Migrationsphänotypen zu beobachten wäre, sollte bei einem kausalen Zusammenhang auch die Verzögerung der Stromentwicklung abgeschwächt sein.

Um eine Aufklärung der Mechanismen der synaptischen Transmission durch LPA zu erzielen, könnte eine Aufzeichnungen von evozierten postsynaptischen Strömen erfolgen. Über diese könnte das AMPA / NMDA-Verhältnis sowie eine Beteiligung von NMDA untersucht werden. Weiterhin könnte eine Untersuchung des Gesamtvesikelpools durch tetanische Stimulation oder die Applikation von hyperosmolarer Lösungen erfolgen. Diese Experimente könnten sowohl zu einem Verständnis der postsynaptischen Mechanismen (AMPA / NMDA) als auch der präsynaptischen Mechanismen (Vesikelpool) beitragen.

Unabhängig von physiologischen Untersuchungen wäre eine Aufklärung der genaueren Signalwege des LPA-Metabolismus in Neuronen von Bedeutung. Dies könnte dazu beitragen, dass zukünftig untersuchte LPA-Wirkungen besser verstanden werden.

## Literaturverzeichnis

- Aaltonen, N., Laitinen, J. T., und Lehtonen, M. (2010). Quantification of lysophosphatidic acids in rat brain tissue by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(15-16):1145–52.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- An, S., Bleu, T., Hallmark, O. G., und Goetzl, E. J. (1998). Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 273(14):7906–10.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., und Rubenstein, J. L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*, 278(5337):474–6.
- Angevine, J. B. und Sidman, R. L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192:766–8.
- Anitei, M., Ifrim, M., Ewart, M.-A., Cowan, A. E., Carson, J. H., Bansal, R., und Pfeiffer, S. E. (2006). A role for Sec8 in oligodendrocyte morphological differentiation. *J Cell Sci*, 119(Pt 5):807–18.
- Aoki, J., Inoue, A., und Okudaira, S. (2008). Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta*, 1781(9):513–8.
- Araque, A. und Perea, G. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*, 47(3):241–8.
- Ayala, R., Shu, T., und Tsai, L.-H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 128(1):29–43.
- Bahrey, H. L. P. und Moody, W. J. (2003). Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, 89(4):1761–73.
- Bai, J., Ramos, R. L., Ackman, J. B., Thomas, A. M., Lee, R. V., und LoTurco, J. J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci*, 6(12):1277–83.
- Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H., und Inoue, K. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 274(39):27776–85.
- Bankaitis, V. A. und Morris, A. J. (2003). Lipids and the exocytotic machinery of eukaryotic cells. *Curr Opin Cell Biol*, 15(4):389–95.
- Bannister, A. P. (2005). Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res*, 53(2):95–103.
- Behar, T. N., Schaffner, A. E., Scott, C. A., Greene, C. L., und Barker, J. L. (2000). GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex*, 10(9):899–909.

- Bender, R. A., Kirschstein, T., Kretz, O., Brewster, A. L., Richichi, C., Rüschemschmidt, C., Shigemoto, R., Beck, H., Frotscher, M., und Baram, T. Z. (2007). Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *Journal of Neuroscience*, 27(17):4697–706.
- Bernhart, E., Kollrosner, M., Rechberger, G., Reicher, H., Heinemann, A., Schratl, P., Hallström, S., Wintersperger, A., Nussold, C., Devaney, T., Zorn-Pauly, K., Malli, R., Graier, W., Malle, E., und Sattler, W. (2010). Lysophosphatidic acid receptor activation affects the C13NJ microglia cell line proteome leading to alterations in glycolysis, motility, and cytoskeletal architecture. *Proteomics*, 10(1):141–58.
- Bordey, A. und Sontheimer, H. (1997). Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *Journal of Neurophysiology*, 78(1):461–77.
- Borell, V., Yoshimura, Y., und Callaway, E. M. (2005). Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional *in utero* electroporation. *Journal of Neuroscience Methods*, 143:151–158.
- Bräuer, A. U. und Nitsch, R. (2008). Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1781(9):595–600.
- Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Kühn, H., Prehn, S., Ninnemann, O., und Nitsch, R. (2003). A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nat. Neurosci.*, 6:572–578.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., und Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal™, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.*, 35:567–576.
- Brewster, A. L., Chen, Y., Bender, R. A., Yeh, A., Shigemoto, R., und Baram, T. Z. (2007). Quantitative analysis and subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex*, 17(3):702–12.
- Brindley, D. N. (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J. Cell. Biochem.*, 92(5):900–912.
- Brindley, D. N. und Pilquill, C. (2009). Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res*, 50 Suppl:S225–30.
- Cantiello, H. F. (1995). Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na<sup>+</sup> channel regulation. *Kidney Int*, 48(4):970–84.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:521–55.

- Chemin, J., Patel, A., Duprat, F., Zanzouri, M., Lazdunski, M., und Honoré, E. (2005). Lysophosphatidic acid-operated  $K^+$  channels. *J Biol Chem*, 280(6):4415–21.
- Chen, J.-G., Rašin, M.-R., Kwan, K. Y., und Šestan, N. (2005). Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49):17792–17797.
- Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C.-W., Mutoh, T., Lin, M.-E., Teo, S. T., Park, K. E., Mosley, A. N., und Chun, J. (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50:157–86.
- Cohen, A., Sagron, R., Somech, E., Segal-Hayoun, Y., und Zilberberg, N. (2009). Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal  $K_{2P2.1}$  channel. *Mol Cell Neurosci*, 40(3):382–9.
- Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., und Chun, J. (2000). Requirement for the  $lp_{A1}$  lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(24):13384–9.
- Contos, J. J. A., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M. A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J. H., und Chun, J. (2002). Characterization of  $lp_{a2}$  (Edg4) and  $lp_{a1}/lp_{a2}$  (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: Signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to  $lp_{a2}$ . *Molecular and Cellular Biology*, 22(19):5921–6929.
- Corlew, R., Bosma, M. M., und Moody, W. J. (2004). Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *The Journal of Physiology*, 560(Pt 2):377–90.
- Daniels, Z. S., Nick, T. G., Liu, C., Cassidy, A., und Glauser, T. A. (2009). Obesity is a common comorbidity for pediatric patients with untreated, newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, 73(9):658–64.
- Davletov, B., Connell, E., und Darios, F. (2007). Regulation of snare fusion machinery by fatty acids. *Cell Mol Life Sci*, 64(13):1597–608.
- Davletov, B. und Montecucco, C. (2010). Lipid function at synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(5):543–9.
- Dehay, C. und Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci*, 8(6):438–50.
- Dubin, A. E., Bahnson, T., Weiner, J. A., Fukushima, N., und Chun, J. (1999). Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *J. Neurosci.*, 19(4):1371–1381.
- Dubin, A. E., Herr, D. R., und Chun, J. (2010). Diversity of lysophosphatidic acid receptor-mediated intracellular calcium signaling in early cortical neurogenesis. *J Neurosci*, 30(21):7300–9.

- Elmes, S. J., Millns, P. J., Smart, D., Kendall, D. A., und Chapman, V. (2004). Evidence for biological effects of exogenous LPA on rat primary afferent and spinal cord neurons. *Brain Research*, 1022(1-2):205 – 213.
- Estivill-Torrús, G., Llebreg-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santín, L., Pedraza, C., Diego, I. D., Arco, I. D., Fernández-Llebreg, P., Chun, J., und Fonseca, F. R. D. (2008). Absence of LPA<sub>1</sub> signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex*, 18(4):938–50.
- Fan, Y., Fricker, D., Brager, D. H., Chen, X., Lu, H.-C., Chitwood, R. A., und Johnston, D. (2005). Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in  $I_h$ . *Nat Neurosci*, 8(11):1542–51.
- Feil, R. und Kleppisch, T. (2008). NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol*, 184:529–60.
- Fellin, T., Halassa, M. M., Terunuma, M., Succol, F., Takano, H., Frank, M., Moss, S. J., und Haydon, P. G. (2009). Endogenous nonneuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(35):15037–42.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in g protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53(1):1–24.
- Fredj, N. B. und Burrone, J. (2009). A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nat Neurosci*, 12(6):751–8.
- Fukushima, N., Weiner, J. A., und Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Developmental Biology*, 228(1):6–18.
- Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., Contos, J. J. A., Rehen, S. K., Kingsbury, M. A., Kim, K. Y., und Chun, J. (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Molecular and cellular neurosciences*, 20(2):271–82.
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T., und Poo, M. (2001). GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, 105(4):521–32.
- García, N. V. D. M., Karayannis, T., und Fishell, G. (2011). Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature*, 472(7343):351–5.
- Geiger, J. R. P., Bischofsberger, J., Vida, I., Fröbe, U., Pfitzinger, S., Weber, H. J., Haverkamp, K., und Jonas, P. (2002). Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. *Pflügers Arch.*, 443:491–501.
- Gleeson, J. G. (2000). Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin. *Curr Opin Neurol*, 13(2):121–5.
- Goetzl, E. J. und An, S. (1998). Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J*, 12(15):1589–98.

- Goldshmit, Y., Munro, K., Leong, S. Y., Pébay, A., und Turnley, A. M. (2010). LPA receptor expression in the central nervous system in health and following injury. *Cell Tissue Res*, 341(1):23–32.
- Grabrucker, A., Vaida, B., Bockmann, J., und Boeckers, T. M. (2009). Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res*, 338(3):333–41.
- Gupta, A., Tsai, L.-H., und Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet*, 3(5):342–55.
- Hains, M. D., Wing, M. R., Maddileti, S., Siderovski, D. P., und Harden, T. K. (2006).  $G_{\alpha_{12/13}}$ - and Rho-dependent activation of phospholipase C- $\epsilon$  by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol Pharmacol*, 69(6):2068–75.
- Hama, K. und Aoki, J. (2010). LPA<sub>3</sub>, a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 49(4):335–42.
- Hamill, O. P., Huguenard, J. R., und Prince, D. A. (1991). Patch-clamp studies of voltage-gated currents in identified neurons of the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 1(1):48–61.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F. J. (1981). Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 391:85–100.
- Hebb, D. O. (1949). *Organization of Behavior*. Science Editions John Wiley & Sons, Inc.
- Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R., und Chun, J. (1996). *Ventricular zone gene-1 (vzg-1)* encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*, 135(4):1071–83.
- Heck, N., Kilb, W., Reiprich, P., Kubota, H., Furukawa, T., Fukuda, A., und Luhmann, H. J. (2007). GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. *Cereb Cortex*, 17(1):138–48.
- Henze, D. A. und Buzsáki, G. (2001). Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells *in vivo* is increased by recent spiking activity. *Neuroscience*, 105(1):121–130.
- Hermansson, M., Käkelä, R., Berghäll, M., Lehesjoki, A.-E., Somerharju, P., und Lahtinen, U. (2005). Mass spectrometric analysis reveals changes in phospholipid, neutral sphingolipid and sulfatide molecular species in progressive epilepsy with mental retardation, EPMR, brain: a case study. *Journal of Neurochemistry*, 95(3):609–17.
- Holtsberg, F. W., Steiner, M. R., Furukawa, K., Keller, J. N., Mattson, M. P., und Steiner, S. M. (1997). Lysophosphatidic acid induces a sustained elevation of neuronal intracellular calcium. *J. Neurochem.*, 69(1):68–75.
- Hooks, S. B., Santos, W. L., Im, D. S., Heise, C. E., Macdonald, T. L., und Lynch, K. R. (2001). Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent. *J Biol Chem*, 276(7):4611–21.

- Horrigan, D. J., Horwitz, B. A., und Horowitz, J. M. (1997). Serotonergic modulation of hippocampal pyramidal cells in euthermic, cold-acclimated, and hibernating hamsters. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 2):R1291–8.
- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V. N., Renger, J. J., Dolphin, A. C., und Shah, M. M. (2011). Presynaptic HCN1 channels regulate  $\text{Ca}_v3.2$  activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci*, 14(4):478–86.
- Huguenard, J. R., Hamill, O. P., und Prince, D. A. (1988). Developmental changes in  $\text{Na}^+$  conductances in rat neocortical neurons: appearance of a slowly inactivating component. *Journal of Neurophysiology*, 59(3):778–95.
- Iftinca, M., Hamid, J., Chen, L., Varela, D., Tadayonnejad, R., Altier, C., Turner, R. W., und Zamponi, G. W. (2007). Regulation of T-type calcium channels by Rho-associated kinase. *Nature Neuroscience*, 10(7):854–60.
- Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N., und Chun, J. (2000). Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors,  $\text{lp}_{A1}/\text{VZG-1}/\text{EDG-2}$ ,  $\text{lp}_{A2}/\text{EDG-4}$ , and  $\text{lp}_{A3}/\text{EDG-7}$  in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Molecular Pharmacology*, 58(5):895–902.
- Kai, M., Wada, I., Imai, S.-i., Sakane, F., und Kanoh, H. (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of  $\text{Mg}^{2+}$ -independent phosphatidic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 272(39):24572–24578.
- Käkelä, R., Somerharju, P., und Tyynelä, J. (2003). Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*, 84(5):1051–1065.
- Kanai, Y., Smith, C. P., und Hediger, M. A. (1993). A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *FASEB J*, 7(15):1450–9.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., und Jessell, T. M., editors (2000). *Principles of neural science*. McGraw-Hill, 4th edition.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Ichi Nabeshima, Y., und Hoshino, M. (2003). The *in vivo* roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J*, 22(16):4190–201.
- Kieselmann, O. (2010). *Einfluss von Lysophosphatidsäure auf synaptische Transmission und Expressionsanalysen von Plasticity related gene 1 und LPA-Rezeptoren während der Gehirnentwicklung*. Dissertation, FU Berlin.
- Kingsbury, M. A., Rehen, S. K., Contos, J. J. A., Higgins, C. M., und Chun, J. (2003). Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci*, 6(12):1292–9.

- Kleim, J. A., Freeman, J. H., Bruneau, R., Nolan, B. C., Cooper, N. R., Zook, A., und Walters, D. (2002). Synapse formation is associated with memory storage in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(20):13228–31.
- Klugbauer, N., Marais, E., Lacinová, L., und Hofmann, F. (1999). A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch*, 437(5):710–5.
- Kole, M. H. P. und Stuart, G. J. (2008). Is action potential threshold lowest in the axon? *Nature Neuroscience*, 11(11):1253–1255.
- Komuro, H. und Rakic, P. (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science*, 257(5071):806–9.
- Komuro, H. und Rakic, P. (1996). Intracellular  $Ca^{2+}$  fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, 17(2):275–85.
- Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, K. W., und Konnerth, A. (2002). Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation. *Science (New York, NY)*, 295(5560):1729–34.
- Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F. P., Drechsel, D., Hall, A., und Moolenaar, W. H. (1999). Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and  $G\alpha_{12/13}$  subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell*, 10(6):1851–7.
- Kriegstein, A. R. und Noctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci*, 27(7):392–9.
- Lee, C.-W., Rivera, R., Dubin, A. E., und Chun, J. (2007). LPA<sub>4</sub>/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing  $G_s$ -,  $G_q/G_i$ -mediated calcium signaling and  $G_{12/13}$ -mediated rho activation. *J Biol Chem*, 282(7):4310–7.
- Lee, C.-W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E., und Chun, J. (2006). GPR92 as a new  $G_{12/13}$ - and  $G_q$ -coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA<sub>5</sub>. *J Biol Chem*, 281(33):23589–97.
- Lee, W. S., Hong, M.-P., Kim, T. H., Shin, Y. K., Lee, C. S., Park, M., und Song, J.-H. (2005). Effects of lysophosphatidic acid on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, 1035(1):100–4.
- Liao, D., Zhang, X., O'Brien, R., Ehlers, M. D., und Huganir, R. L. (1999). Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 2(1):37–43.
- Lisman, J., Schulman, H., und Cline, H. (2002). The molecular basis of camkii function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*, 3(3):175–90.
- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F. A., Blayney, L. M., Tan, Y. P., und Marty, A. (2000). Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature ipscs and spontaneous calcium transients. *Nat Neurosci*, 3(12):1256–65.

- Long, J. S., Yokoyama, K., Tigyi, G., Pyne, N. J., und Pyne, S. (2006). Lipid phosphate phosphatase-1 regulates lysophosphatidic acid- and platelet-derived-growth-factor-induced cell migration. *Biochem J*, 394(Pt 2):495–500.
- LoTurco, J. J. und Kriegstein, A. R. (1991). Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science*, 252(5005):563–6.
- Magee, J. C. (1999). Dendritic  $I_h$  normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci*, 2(6):508–14.
- Magee, J. C. und Johnston, D. (1995). Characterization of single voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)*, 487 ( Pt 1):67–90.
- Marder, E. und Goaillard, J.-M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci*, 7(7):563–74.
- Marín, O. und Rubenstein, J. L. R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 26:441–83.
- Matas-Rico, E., García-Díaz, B., Llebreg-Zayas, P., López-Barroso, D., Santín, L., Pedraza, C., Smith-Fernández, A., Fernández-Llebreg, P., Tellez, T., Redondo, M., Chun, J., Fonseca, F. R. D., und Estivill-Torrús, G. (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci*, 39(3):342–55.
- McIntyre, T. M., Pontsler, A. V., Silva, A. R., Hilaire, A. S., Xu, Y., Hinshaw, J. C., Zimmerman, G. A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H., und Prestwich, G. D. (2003). Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR $\gamma$  agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(1):131–6.
- Mochida, G. H. und Walsh, C. A. (2004). Genetic basis of developmental malformations of the cerebral cortex. *Arch Neurol*, 61(5):637–40.
- Moody, W. J. und Bosma, M. M. (2005). Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiological Reviews*, 85(3):883–941.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., und Giepmans, B. N. G. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, 26(8):870–81.
- Müller, F., Scholten, A., Ivanova, E., Haverkamp, S., Kremmer, E., und Kaupp, U. B. (2003). HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.*, 17(10):2084–2096.
- Munsch, T. und Pape, H. C. (1999). Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *The Journal of Physiology*, 519 Pt 2:493–504.
- Murakami, M., Shiraishi, A., Tabata, K., und Fujita, N. (2008). Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4):707–12.

- Murph, M. M., Scaccia, L. A., Volpicelli, L. A., und Radhakrishna, H. (2003). Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 10):1969–80.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802.
- Neves, S., Ram, P., und Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*, 296(5573):1636.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., und Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821):714–20.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., und Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7(2):136–44.
- Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T., und Chun, J. (2009). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 9(1):15–23.
- Ohuchi, H., Hamada, A., Matsuda, H., Takagi, A., Tanaka, M., Aoki, J., Arai, H., und Noji, S. (2008). Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev Dyn*, 237(11):3280–94.
- Pagès, C., Simon, M., Valet, P., und Saulnier-Blache, J. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins*, 64(1-4):1–10.
- Pian, P., Bucchi, A., Decostanzo, A., Robinson, R. B., und Siegelbaum, S. A. (2007). Modulation of cyclic nucleotide-regulated HCN channels by PIP<sub>2</sub> and receptors coupled to phospholipase C. *Pflugers Arch*, 455(1):125–45.
- Pian, P., Bucchi, A., Robinson, R. B., und Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of gating and run-down of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP<sub>2</sub>. *J Gen Physiol*, 128(5):593–604.
- Piomelli, D., Astarita, G., und Rapaka, R. (2007). A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci*, 8(10):743–54.
- Poolos, N. P., Bullis, J. B., und Roth, M. K. (2006). Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Neuroscience*, 26(30):7995–8003.
- Postma, F. R., Jalink, K., Hengeveld, T., Offermanns, S., und Moolenaar, W. H. (2001). G $\alpha_{(13)}$  mediates activation of a depolarizing chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells. *Curr Biol*, 11(2):121–4.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Prioni, S., Loberto, N., Marano, N., Tettamanti, G., und Sonnino, S. (2001). Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing *in vitro*. *J Biol Chem*, 276(24):21136–45.

- Pyne, S., Long, J. S., Ktistakis, N. T., und Pyne, N. J. (2005). Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem. Soc. Trans.*, 33:1370–1374.
- Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci*, 10(10):724–35.
- Reyes, A. (2001). Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci*, 24:653–75.
- Ricci, A., Wu, Y.-C., und Fettiplace, R. (1998). The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory hair cells. *Journal of Neuroscience*, 18(20):8261.
- Rice, D. und Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 3:511–33.
- Roberts, R., Sciorra, V. A., und Morris, A. J. (1998). Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem*, 273(34):22059–67.
- Rouaux, C. und Arlotta, P. (2010). Fezf2 directs the differentiation of corticofugal neurons from striatal progenitors *in vivo*. *Nat Neurosci*, 13(11):1345–7.
- Saba, J. D. (2004). Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *J Cell Biochem*, 92(5):967–92.
- Saito, T. und Nakatsuji, N. (2001). Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using *in vivo* electroporation. *Developmental Biology*, 240:237–246.
- Sanes, J. N. und Donoghue, J. P. (2000). Plasticity and primary motor cortex. *Annu Rev Neurosci*, 23:393–415.
- Santoro, B., Wainger, B. J., und Siegelbaum, S. A. (2004). Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *Journal of Neuroscience*, 24(47):10750–62.
- Savaskan, N. E., Rocha, L., Kotter, M. R., Baer, A., Lubec, G., van Meeteren, L. A., Kishi, Y., Aoki, J., Moolenaar, W. H., Nitsch, R., und Brauer, A. U. (2007). Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci*, 64(2):230–243.
- Schilling, T., Repp, H., Richter, H., Koschinski, A., Heinemann, U., Dreyer, F., und Eder, C. (2002). Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCA1 Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *Neuroscience*, 109(4):827–835.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B., und Söling, H. D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, 401(6749):133–41.

- Shah, B. S., Stevens, E. B., Pinnock, R. D., Dixon, A. K., und Lee, K. (2001). Developmental expression of the novel voltage-gated sodium channel auxiliary subunit  $\beta 3$ , in rat CNS. *The Journal of Physiology*, 534(Pt 3):763–76.
- Sigal, Y. J., McDermott, M. I., und Morris, A. J. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem. J.*, 387:281–293.
- Soriano, J., Martínez, M. R., Tlustý, T., und Moses, E. (2008). Development of input connections in neural cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(37):13758–63.
- Spalice, A., Parisi, P., Nicita, F., Pizzardi, G., Balzo, F. D., und Iannetti, P. (2009). Neuronal migration disorders: clinical, neuroradiologic and genetics aspects. *Acta Paediatr*, 98(3):421–33.
- Spitzer, N. C. (1991). A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *J Neurobiol*, 22(7):659–73.
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120):707–712.
- Starz-Gaiano, M., Cho, N. K., Forbes, A., und Lehmann, R. (2001). Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells. *Development*, 128(6):983–91.
- Stevens, D. R., Seifert, R., Bufe, B., Müller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U. B., und Lindemann, B. (2001). Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, 413(6856):631–5.
- Stieber, J., Stöckl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., und Hoffmann, F. (2005). Functional expression of the human HCN3 channel. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41):34635–34643.
- Strauss, U., Kole, M. H. P., Bräuer, A. U., Pahnke, J., Bajorat, R., Rolfs, A., Nitsch, R., und Deisz, R. A. (2004). An impaired neocortical  $I_h$  is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci*, 19(11):3048–58.
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 27:509–47.
- Sutor, B. und Hagerly, T. (2005). Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochim Biophys Acta*, 1719(1-2):59–68.
- Suzuki, S., Numakawa, T., Shimazu, K., Koshimizu, H., Hara, T., Hatanaka, H., Mei, L., Lu, B., und Kojima, M. (2004). BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *The Journal of Cell Biology*, 167(6):1205–15.
- Tabata, K., Baba, K., Shiraishi, A., Ito, M., und Fujita, N. (2007). The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3):861–6.
- Tanaka, T. und Gleeson, J. G. (2000). Genetics of brain development and malformation syndromes. *Curr Opin Pediatr*, 12(6):523–8.

- Todorova, M. G., Fuentes, E., Soria, B., Nadal, A., und Quesada, I. (2009). Lysophosphatidic acid induces  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and c-Myc expression in mouse embryonic stem cells via the phospholipase C pathway. *Cellular Signalling*, 21(4):523–8.
- Trimbuch, T., Beed, P., Vogt, J., Schuchmann, S., Maier, N., Kintscher, M., Breustedt, J., Schuelke, M., Streu, N., Kieselmann, O., Brunk, I., Laube, G., Strauss, U., Battefeld, A., Wende, H., Birchmeier, C., Wiese, S., Sendtner, M., Kawabe, H., Kishimoto-Suga, M., Brose, N., Baumgart, J., Geist, B., Aoki, J., Savaskan, N. E., Bräuer, A. U., Chun, J., Ninnemann, O., Schmitz, D., und Nitsch, R. (2009). Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell*, 138:1222–1235.
- Tsacopoulos, M., Poitry-Yamate, C. L., Poitry, S., Perrottet, P., und Veuthey, A. L. (1997). The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia*, 21(1):84–91.
- Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C. A., Represa, A., Ben-Ari, Y., und Khazipov, R. (2006). Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science*, 314(5806):1788–92.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., und Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504):657–61.
- van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Christodoulou, E., Goding, J. W., Takakusa, H., Kikuchi, K., Perrakis, A., Nagano, T., und Moolenaar, W. H. (2005). Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*, 280(22):21155–61.
- van Meeteren, L. A., Ruurs, P., Stortelers, C., Bouwman, P., van Rooijen, M. A., Pradère, J. P., Pettit, T. R., Wakelam, M. J. O., Saulnier-Blache, J. S., Mummery, C. L., Moolenaar, W. H., und Jonkers, J. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*, 26(13):5015–22.
- Velmans, T. (2010). *Funktion und Expression von Plasticity Related Gene 3 und Lipid Phosphat Phosphatase 1 und -1a während der Gehirnentwicklung*. Dissertation, FU Berlin.
- Vieira, C., Pombero, A., García-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., und Martínez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.*, 54(1):7–20.
- Wahl-Schott, C. und Biel, M. (2009). HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(3):470–94.
- Wang, D. D. und Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, 86(4):342–67.
- Weston, M. C., Nehring, R. B., Wojcik, S. M., und Rosenmund, C. (2011). Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity. *Neuron*, 69(6):1147–59.

- Wilson, R. I. und Nicoll, R. A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410(6828):588–592.
- Wilson, R. I. und Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296(5568):678–82.
- Wolpert, L., Jessell, T. M., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., und Smith, J. (2007). *Principles of Development*. Oxford University Press, 2nd edition.
- Yakubu, M. A. und Leffler, C. W. (2002). L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cerebral microvascular endothelial cells and ET-1 biosynthesis. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 283(6):C1687–95.
- Yanagida, K., Masago, K., Nakanishi, H., Kihara, Y., Hamano, F., Tajima, Y., Taguchi, R., Shimizu, T., und Ishii, S. (2009). Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem*, 284(26):17731–41.
- Yu, F. H. und Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*, 4(3):207.
- Yue, J., Yokoyama, K., Balazs, L., Baker, D. L., Smalley, D., Pilquill, C., Brindley, D. N., und Tigyi, G. (2004). Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell Signal*, 16(3):385–99.
- Zhang, N., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., und Gridley, T. (2000). Cloning, expression, and chromosomal localization of a mouse gene homologous to the germ cell migration regulator *wunen* and to type 2 phosphatidic acid phosphatases. *Genomics*, 63(1):142–4.
- Zhang, N., Zhang, J., Cheng, Y., und Howard, K. (1996). Identification and genetic analysis of *wunen*, a gene guiding *Drosophila melanogaster* germ cell migration. *Genetics*, 143(3):1231–41.
- Zhang, N., Zhang, J., Purcell, K. J., Cheng, Y., und Howard, K. (1997). The *Drosophila* protein *Wunen* repels migrating germ cells. *Nature*, 385(6611):64–7.
- Zhang, W. und Linden, D. J. (2003). The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci*, 4(11):885–900.
- Zhao, S. und Frotscher, M. (2010). Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration. *The Neuroscientist*, 16(4):421–34.
- Zhu, J. J. (2000). Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by  $\text{Ca}^{2+}$  action potentials in adult rat tuft dendrites. *The Journal of Physiology*, 526 Pt 3:571–87.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzen

#### shRNA LPP1/1a 230

```

1 GATCTCGGAA TCTCTGTCTG TTTACTTTCA AGAGAAGTAA ACAGACAGAG ATTCTTTTTT
61 GGAAC

```

#### Kontroll shRNA (Luziferase)

```

1 GATCTCGCGT ACGCGGAATA CTTCGATTCA AGAGATCGAA GTATTCCGCG TACGTTTTTT
61 GGAAC

```

### 7.2 Proteindomänenhomologie von LPP1



Abbildung 31: Vorhergesagte Domänen von LPP1

Ein InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/>) von LPP1 (*Mus musculus* - GenBank Ascession # AAP04434.1) ergab, dass ausschließlich Sequenzähnlichkeiten zu Phosphatasedomänen vorhanden sind.

### 7.3 Klonierung, Expression und Charakterisierung von rHCN1

Zu Beginn der Promotion war die Applikation von LPA auf den hyperpolarisationsaktivierten zyklisch Nukleotid modulierten Kationenstrom HCN geplant. Dieser Strom wird durch eine Ionenkanalfamilie vermittelt, die aus 4 Mitgliedern (HCN1-HCN4) besteht. Der durch HCN Kanäle vermittelte Strom  $I_h$  wird durch die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP moduliert, aber auch andere

Modulatoren wie Phospholipase C, PIP<sub>2</sub> (Pian et al., 2006, 2007) und eine pH Sensitivität (Munsch und Pape, 1999; Stevens et al., 2001) sind bekannt. Eine Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch LPA löst Signalkaskaden aus, die als *downstream*-Ziel Phospholipase C aktivieren als auch das cAMP-Niveau regulieren können. Als Kandidat wurde HCN1 gewählt, da diese Untereinheit sowohl im Dendriten von pyramidalen Neuronen der CA1-Region als auch von pyramidalen Neuronen der Schicht V im Neocortex prominent exprimiert wird. Außerdem wurde eine Modulation von HCN1 durch Phospholipase C beschrieben. Eine Modulation durch cAMP ist im Vergleich mit den anderen HCN-Untereinheiten gering, aber vorhanden. Es wurde HCN1 aus der Ratte parallel zu den anderen Experimenten kloniert. Ein weiterer Vorteil war, dass der durch diesen Kanal vermittelte Strom dieser Spezies bisher nicht vollständig beschrieben wurde und sich nur in wenigen Aminosäuren vom HCN1-Protein der Maus unterscheidet.

### Strategie und Klonierung von HCN1

Die Amplifizierung des HCN1-Gens (NM.053375.1), dessen offener Leserahmen ca. 2.8 kb groß war, konnte nicht mit einer einzelnen PCR durchgeführt werden (Ergebnisse nicht gezeigt), daher wurde eine andere Strategie gewählt. Für die Klonierung wurden 2 Primerpaare designt, die an einer einzelnen BamH1-Schnittstelle überlappten (siehe Abbildung 32A). Durch diese Wahl hatten die Fragmente eine Länge von ca. 1,5 kb und 1,3 kb und konnten durch Restriktion mit BamH1 in der richtigen Richtung zusammengefügt werden. Die Amplifikation (35 Zyklen mit 20 s bei 95°C; 20 s bei 65°C; 3 min bei 72°C) erfolgte mit den Primerpaaren *HCN1 FW* (GTC CTT CGG GCA TGG AAG GCG G) und *HCN1 middleRV* (CCG TCA CGA AAT TGG GAT CCG CG) sowie *HCN1 middleFW* (ACG CGG ATC CCA ATT TCG TGA CGG) und *HCN1 RV* (CAA TCA GCA AGA ATC ATA AAT TCG AAG C) aus Gesamthirn cDNA, die mit oligo-dT-Primern nach dem Protokoll des Herstellers hergestellt wurde (SmartII-Kit, Clontech). Die fertigen PCR-Produkte (siehe Abbildung 32B) wurden in den Vektor pCR2.1 inseriert. Kontrollrestriktionen bestätigten die Anwesenheit und Länge der PCR-Produkte, eine Sequenzierung bestätigte die Richtigkeit der DNA-Sequenzen. Im Anschluss wurden die zwei Fragmente mit EcoR1 und BamH1 geschnitten, der Zielvektor (pIRES-dsRed-Express) wurde ausschließlich mit EcoR1 geschnitten, und in einem Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 32C). Nach Aufreinigung der Fragmente wurden diese ligiert und in *E. coli* transformiert. Der *full-length*-Klon wurde pIRES-dsRed-Express-HCN1 (siehe Abbildung 32D) genannt und durch eine erneute Sequenzierung und Kontrollrestriktion überprüft. Durch Expression in HEK293 Zellen sollte der Klon auf Funktionalität überprüft werden.

### Expression und Charakterisierung von HCN1 in HEK293 Zellen

Der erfolgreichen Klonierung folgte eine Expression in HEK293 Zellen, um die Funktionalität des Konstrukts zu verifizieren. Die Möglichkeit der Expression von HCN1 in HEK293 Zellen war für andere Spezies bekannt (Stieber et al., 2005) und auch HCN1 der Ratte wurde bereits in HEK293 Zellen exprimiert (Müller et al., 2003). In der Arbeit von Müller et al. (2003) wurde eine ausreichende Charakterisierung von HCN1 aus Ratte nicht vorgenommen.

Das Ziel der Klonierung von HCN1 war, die direkte Modulation durch LPA zu untersuchen. Durch den negativen Ausgang der Experimente in Abschnitt 5.4 wurde beschlossen keine LPA-Applikationsexperimente im Expressionssystem durchzuführen.

Für die experimentelle Charakterisierung des HCN1 medierten Stroms sowie weiterführende Untersuchungen verweise ich auf die Publikation Battefeld, A., Bierwirth, C., Li, Y.C., Barthel, L., Velmans, T., Strauss, U. (2010). *I<sub>h</sub>* “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat and human HCN1-expressing HEK293 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 88:3067-3078. Mein Beitrag zu dieser Publikation liegt bei 70%.

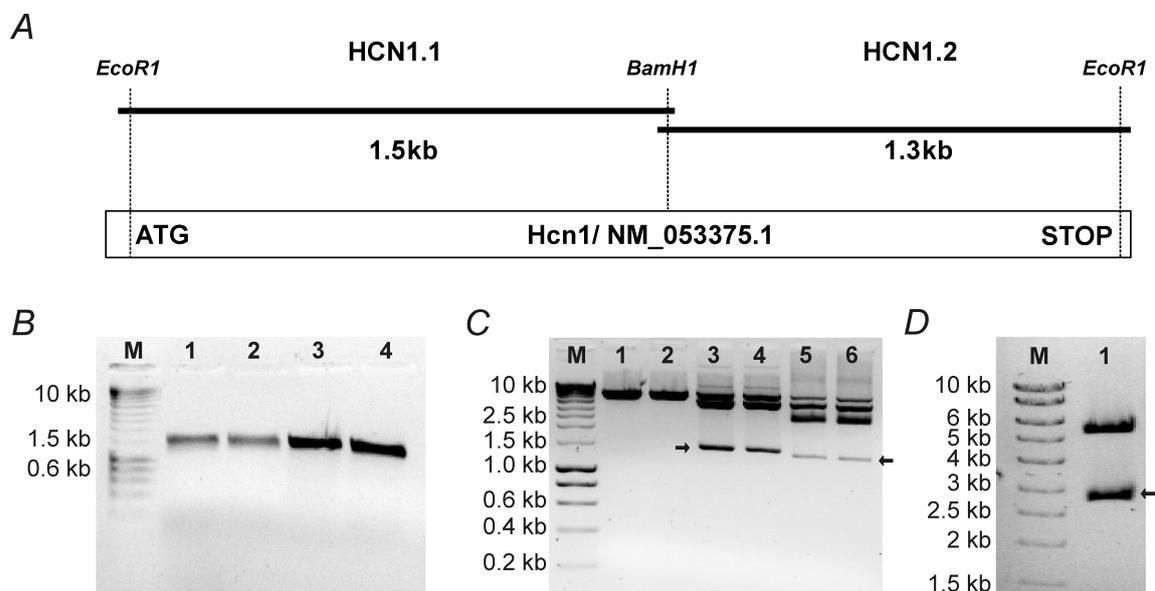


Abbildung 32: **Klonierungsdesign und Amplifikation von HCN1**

**A.** Die beiden Fragmente HCN1.1 und HCN1.2 überlappen an einer einzigen BamH1-Schnittstelle. Das Startcodon ist mit ATG und das Stoppcodon mit TGA gekennzeichnet.

**B.** Amplifikation von HCN1 aus Gesamthirn cDNA. Die Spuren 1 und 2 wurden mit dem Produkt der Primerkombination *HCN1 FW* und *HCN1 middleRV* beladen, die Spuren 3 und 4 mit dem Produkt der Primer *HCN1 middleFW* und *HCN1 RV*.

**C.** Aufgetragen sind Restriktionsverdauung des Leervektors pIRES-dsRed-Express (Spur 1 und 2 mit EcoR1), des Vektors pCR2.1-HCN1.1 (Spur 3 und 4 mit EcoR1 und BamH1) und des Vektors pCR2.1-HCN1.2 (Spur 5 und 6 mit EcoR1 und BamH1). Mit einem Pfeil in den Spuren 3-6 sind die Fragmente von HCN1 markiert.

**D.** Nach einem Restriktionsverdauung von pIRES-dsRed-Express-HCN1 mit EcoR1 zeigt das Gel zwei Fragmente. *Full-length* HCN1 ungefähr 2.8 kb läuft in entsprechender Höhe (Pfeil) und der Vektorbackbone mit einer Größe von 5.2 kb läuft auch auf der richtigen Höhe. Die mit M gekennzeichnete Spur wurde in **B**, **C** und **D** mit dem Marker Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) beladen. Es wurden 1% TBE Agarose-Gele benutzt.

## Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Artifizielle cerebrospinal Flüssigkeit
sACSF	sukrosehaltige artifizielle cerebrospinal Flüssigkeit
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionic Säure
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> / Varianzanalyse
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ATX	Autotaxin
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
C	Ceramid
C1P	Ceramid-1-Phosphat
CA1	Cornu Ammonis Feld 1
CA3	Cornu Ammonis Feld 3
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CNQX	6-Cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline
CP	Kortikale Platte
CTZ	Cyclothiazid
DAG	Diacylglycerol
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid
DCS	Divalente Kationenlösung
DCX	<i>Doublecortin</i>
DG	Gyrus Dentatus (dentate gyrus)
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfat
eGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)tetra-Acetat
E18	Embryonaler Tag 18
FBS	Fetales Bovines Serum
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCN	Hyperpolarisationsaktivierter zyklisch-Nukleotid modulierter Kanal
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IR	Infrarot
IZ	Intermediäre Zone
kb	Kilobasen
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPP	Phospholipidphosphatasen

LTD	<i>long-term depression</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
LPC	Lysophosphatidylcholine
MAG	Monoacylglycerol
mEPSC	miniatur-exitatorisch-postsynaptisches Potential
mIPSC	miniatur-inhibitorisches-postsynaptisches Potential
mPSC	miniatur postsynaptisches Potential
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MZ	Marginalezone
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NO	Stickstoffmonoxyd
P5	Postnataler Tag 5
PA	<i>Phosphatidic acid</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PRG	Plasticity-Related-Gene
S	Sphingosin
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
shRNA	<i>short-hairpin-RNA</i>
SP	Subplatte
TTX	Tetrodotoxin
WM	Weißer Substanz
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

1	Synthese, Rezeptoren und Abbau von LPA . . . . .	2
2	Abfolge der Zellentwicklung im ZNS von Nagern . . . . .	7
3	Entwicklung des Neokortex . . . . .	8
4	<i>Developmental Handshake</i> . . . . .	9
5	LPA-Applikation erhöht die Erregbarkeit im Hippocampus . . . . .	12
6	Schematische Darstellung der <i>in utero</i> -Elektroporation . . . . .	21
7	Slicesetup mit Vorverstärker (rechts), Stimulationselektrode (links), Brücke, Kamera und aufrechtem Mikroskop . . . . .	23
8	Kultursetup mit Kammer, Vorverstärker und inversem Mikroskop . . . . .	23
9	Darstellung der Analyse von $R_{in}$ und $V_m$ . . . . .	26
10	Pharmakologische Isolation von mPSCs in pyramidalen hippocampalen Neuronen bei einer Spannung von -70 mV . . . . .	27
11	Identifizierung von Neuronen im akuten Gehirnschnitt . . . . .	31
12	Verringerte Einwärtsströme in LPP1/1a-shRNA exprimierenden Neuronen der unteren kortikalen Platte. . . . .	33
13	E18 Analyse von Neuronen der oberen kortikalen Schicht . . . . .	35
14	Eigenschaften von Neuronen am Tag P5 . . . . .	38
15	Kompensation des seriellen Widerstands . . . . .	39
16	Analyse von Aktionspotenzialen. . . . .	42
17	Entwicklung von spontanen postsynaptischen Strömen (sPSCs) . . . . .	43
18	Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung von pyramidalen CA1-Neuronen . . . . .	46
19	10 $\mu$ M LPA erhöht die mEPSC-Frequenz in CA1-Neuronen. . . . .	47
20	mIPSCs in CA1-Neuronen wurden nicht durch 10 $\mu$ M LPA moduliert. . . . .	49
21	Modulation von mEPSCs in LPA <sub>2</sub> -KO-Neuronen . . . . .	50
22	LPA Wirkung auf mEPSCs in CA1-Neuronen des Mausstamms BALB/c . . . . .	51
23	Extrazellulär appliziertes LPA erhöhte mEPSCs in hippocampalen PRG1-KO-Neuronen . . . . .	53
24	Membraneigenschaften von primär kultivierten hippocampalen Neuronen . . . . .	56
25	Wirkung von LPA auf pharmakologisch isolierte mIPSCs in der neuronalen Zellkultur . . . . .	57
26	Wirkung von LPA auf mEPSCs in der primären neuronalen hippocampalen Kultur . . . . .	58
27	Änderung von prä- und postsynaptischem Calciumkonzentrationen . . . . .	60
28	Neuronen, denen der LPA <sub>2</sub> -Rezeptor fehlte, zeigten keine LPA induzierte Reduktion der mEPSCs . . . . .	62
29	Einfluss von LPA auf $I_{hyp}$ . . . . .	65
30	Extrazelluläres LPA erhöht die Aktionspotenzialfrequenz. . . . .	76
31	Vorhergesagte Domänen von LPP1 . . . . .	92

32	<b>Klonierungsdesign und Amplifikation von HCN1 . . . . .</b>	94
----	---	----

## **Tabellenverzeichnis**

1	<b>LPA-Rezeptoren, ihre G-Protein Kopplung und die aktivierbaren Signalwege. . . . .</b>	4
2	<b>Membraneigenschaften von Neuronen am embryonalen Tag 18 (E18). . . . .</b>	37
3	<b>Membraneigenschaften von pyramidalen Neuronen an Tag P5. . . . .</b>	40
4	<b>Aktionspotenzialeigenschaften von Neuronen der unteren kortikalen Platte an E18. . . . .</b>	41
5	<b>Aktionspotenzialeigenschaften von Neuronen der oberen kortikalen Platte an E18. . . . .</b>	41
6	<b>Aktionspotenzialeigenschaften von Neuronen der Schicht V am Tag P5. . . . .</b>	42
7	<b>Intrinsische Eigenschaften von pyramidalen CA1-Neuronen (P21-P30). . . . .</b>	45

## Publikationen

### *Peer-reviewed Journals*

1. Trimbuch, T., Beed, P., Vogt, J., Schuchmann, S., Maier, N., Kintscher, M., Breustedt, J., Schuelke, M., Streu, N., Kieselmann, O., Brunk, I., Laube, G., Strauss, U., **Battfeld, A.**, Wende, H., Birchmeier, C., Wiese, S., Sendtner, M., Kawabe, H., Kishimoto-Suga, M., Brose, N., Baumgart, J., Geist, B., Aoki, J., Savaskan, N. E., Bräuer, A. U., Chun, J., Ninnemann, O., Schmitz, D., und Nitsch, R. (2009). Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell*, 138:1222-1235.
2. **Battfeld, A.**, Bierwirth, C., Li, Y.C., Barthel, L., Velmans, T., Strauss, U. (2010).  $I_h$  “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat and human HCN1-expressing HEK293 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 88:3067-3078.

### *In preparation*

3. Velmans, T., Baumgart, J., **Battfeld, A.**, Savaskan N.E., Moolenaar, W.H., Brindley, D.N., Strauss, U., Bräuer, A.U. Cortical layer organization is dependent on lipid phosphate phosphatases 1 and -1a. *In preparation*.
4. Kieselmann, O.\*, **Battfeld, A.\***, Stadler, K., Singh, B., Henneberger, C., Aoki, J., Chun, J., Grantyn, R., Nitsch, R., Strauss, U., Bräuer, A.U. Central glutamatergic transmission can be modulated by lysophosphatidic acid. *in preparation* - \* equally contributing.
5. **Battfeld, A.\***, Rocha, N.\*, Stadler, K., Bräuer, A.U., Strauss, U. Distinct perinatal features of the hyperpolarization-activated non-selective cation current  $I_h$  in rat neocortex. *in submission* - \* equally contributing.

### **Abstracts auf Konferenzen**

1. **Battfeld, A.**, Velmans, T., Baumgart, J., Strauss, U., Bräuer, A. U. (2010). Delayed maturation of intrinsic electrical properties of neocortical neurons misplaced due to a lack of lipid phosphate phosphatase 1/1a. *FENS Abstr.*, vol.5, 073.2, 2010.
2. Velmans, T., **Battfeld, A.**, Baumgart, J., Savaskan, N.E., Brindley, D.N., Moolenaar, W.H., Nitsch, R., Strauss, U. and Bräuer, A.U. (2009). Lipid phosphate phosphatases control cortical layering during embryonic development. 8th Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen.
3. Kieselmann, O., **Battfeld, A.**, Stadler, K., Singh, B., Henneberger, C., Aoki, J., Chun, J., Grantyn, R., Nitsch, R., Strauss, U., Bräuer, A.U. (2010). Central glutamatergic transmission is controlled by lysophosphatidic acid. 5th Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde.

## **Curriculum Vitae**

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht verfügbar.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei folgenden Personen: Ulf Strauss, Konstantin Stadler, Beate Geist, Robert Nitsch, Anja Bräuer, Nicola Brandt, Tanja Velmans, Rike Dannenberg, Julia König, Christian Huth, Alexander Wozniak, allen anderen nicht namentlich genannten Kollegen des Centrums für Anatomie, Mirko Rössel, Hans-Joachim Pflüger, den Mitgliedern der Promotionskommission, meiner Familie und meinen Freunden.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Arne Battefeld