

**Dysregulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  
nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Christoph Friedrich Schorn**  
geboren am 18.12.1976 in Köln

3. September 2004

Erster Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Redecker  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Bernhard Blanz  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2005

**Abkürzungsverzeichnis**

A1: Auditorischer Kortex

AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-1,4-Isloxazol-Propionsäure

CA: Cornu ammonis

DAB: 3,3-Diaminobenzidin

EcoG: Elektrokortikographie

EEG: Elektroenzephalographie

FL: Vorderpfote

GABA:  $\gamma$ -Amino-Buttersäure

HL: Hinterpfote

LJ: Unterkiefer

MK-801: ((+)-5-Methyl-10, 11-Dihydro-5HDibenzo(a,d) Cyclohepten-5, 10-Imin)

mm: Millimeter

mRNA: messenger-Ribonukleinsäure

MRT: Magnet-Resonanztomographie

MW: Mittelwert

$\mu$ m: Mikrometer

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

NGS: Normales Ziegenserum

PAR: parietaler Kortex

PET: Positronen-Emissions-Tomographie

P: Postnataltag

PB: Phosphatpuffer

PBS: Phosphat gepufferte Normalsalzlösung

PMBSF: Posteromediales Barrel-Subfield

PO: Nukleus posterior des Thalamus

RSA: Retrosplenialer Kortex

S1: Somatosensorischer Kortex

SN: Schnauze

V1: Visueller Kortex

**Inhaltsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	5
<b>2. Einleitung</b>	7
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	11
<b>4. Material und Methoden</b>	12
4.1 Versuchstiere	12
4.2 Induktion fokaler kortikaler Dysplasien	12
4.3 Transkardiale Perfusion	13
4.4 Gewebegewinnung	14
4.5 Anfertigung der Gehirnschnitte	14
4.6 Immunhistochemische Färbung	14
4.7 Verwendete Antikörper	15
4.8 Histologie	16
4.9 Auswertung der gefärbten Gehirnschnitte	16
4.10 Rekonstruktion und morphometrische Analyse des Barreelfields	17
4.11 Statistik	17
4.12 Verwendete Lösungen	17
<b>5. Ergebnisse</b>	19
5.1 Morphologie der fokalen kortikalen Dysplasien	19
5.2 Entwicklung des Hirn- und Körpergewichts nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien	22
5.3 Veränderung der Verteilung von GABA <sub>A</sub> -Rezeptoruntereinheiten nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien	24
5.3.1 GABA <sub>A</sub> -Rezeptoruntereinheit $\alpha_1$	24
5.3.2 GABA <sub>A</sub> -Rezeptoruntereinheit $\alpha_3$	29
5.3.3 GABA <sub>A</sub> -Rezeptoruntereinheit $\alpha_5$	34
5.4 Veränderungen des Barreelfields	39
5.4.1 Morphologie der Hemisphären von Kontrolltieren	39
5.4.2 Morphologie der ipsi- und kontralateralen Hemisphären von Läsionstieren	43

	<b>Seite</b>
5.4.3 Morphometrie des Barreelfields nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien	46
<b>6. Diskussion</b>	<b>48</b>
6.1 Gestörte Expression verschiedener GABA <sub>A</sub> -Rezeptoruntereinheiten	49
6.2 Verkleinerung der Fläche des posteromedialen Barrel-Subfields und der Septen	53
6.3 Initialer Gewichtsverlust nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie	55
6.4 Klinische Bedeutung	56
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>58</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>67</b>
9.1 Lebenslauf	67
9.2 Danksagung	68
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	69

## **1. Zusammenfassung**

Fokale kortikale Dysplasien umfassen eine heterogene Gruppe meist angeborener kortikaler Entwicklungsstörungen, die häufig mit therapierefraktären Epilepsien und/ oder neuropsychologischen Defiziten assoziiert sind. Beim Menschen und in einem Kälteläsionsmodell der Ratte sind diese histologisch als vierschichtiger Kortex mit einer Einfaltung im Sinne eines Mikrosulkus charakterisiert. In elektrophysiologischen Untersuchungen wurden bei Menschen und Nagetieren eine intrinsische Hyperexzitabilität ab dem 12. postnatalen Tag sowohl der Malformation als auch der morphologisch intakten paramikrogyralen Zone festgestellt, die auf ein Ungleichgewicht zwischen GABA-erger Inhibition und Glutamat vermittelter Exzitation zurückgeführt wird.

Ziel dieser Studie war die Analyse der zeitlichen Dynamik der Regulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie an Ratten während der ersten 21 Lebenstage. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer Kälteläsion auf die Struktur des somatosensorischen Kortex untersucht.

Fokale kortikale Dysplasien wurden nach der von Dvorak und Feit beschriebenen Methode durch Aufbringen einer Gefrierläsion an neugeborenen Ratten induziert. Durch immunhistochemische Färbungen wurden die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  nachgewiesen. Anschließend wurde die Verteilung der optischen Dichte der Rezeptoruntereinheiten farbkodiert dargestellt und mit den Kontrolltieren verglichen. Die Rekonstruktion und morphometrische Analyse des Barreelfields erfolgte durch eine spezielle Software in Verbindung mit einer CCD-Farbkamera und einem Mikroskop.

Die vorliegende Arbeit belegt eine modulierte Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten in den ersten 21 Lebenstagen nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie. Das gestörte Verteilungsmuster der Untereinheiten als morphologisches Korrelat der Hyperexzitabilität war nicht nur auf den Bereich der Dysplasie beschränkt, sondern betraf bihemisphärisch sowohl benachbarte als auch entfernte neokortikale Areale und den Hippokampus. Diese Studie befindet sich in Einklang mit vorangegangenen Arbeiten in denen eine verminderte Expression dieser Rezeptoruntereinheiten bei adulten Ratten beobachtet wurde. Die ausgedehnte Modulation der Verteilung der Rezeptoruntereinheiten während der ersten 3 Wochen weist auf eine möglicherweise verzögerte Hirnentwicklung hin, da die physiologischen

Expressionsveränderungen nicht oder zum Teil verlangsamt ablaufen. Trotz dieser weitreichenden Veränderungen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten blieb die typische Struktur des somatosensorischen Kortex in der Umgebung der Malformation weitgehend erhalten. Lediglich die Flächen des posteriomedialen Barrel-Subfields und der Septen waren bilateral im Areal der Repräsentation der Vorder- bzw. Hinterpfote nach 1 und 2 Wochen vermindert. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Befunde geht von verminderten Projektionen thalamokortikaler Neurone und kallosalen Faserverbindungen aus.

Es ist festzuhalten, dass sich die Expressionsmuster der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten vor einer in elektrophysiologischen Studien nachweisbaren Hyperexzitabilität ändern und die Flächen des Barrellfields bilateral bei erhaltener somatotoper Organisation kleiner werden.

## **2. Einleitung**

Kortikale Dysgenesien stellen eine heterogene Gruppe angeborener oder erworbener Störungen der kortikalen Entwicklung dar, die sowohl mit generalisierten Veränderungen der Laminierung und Gyrierung als auch fokalen Texturstörungen einhergehen.

Das Spektrum der funktionellen Auswirkungen dieser Hirnläsionen ist weitläufig und umfasst häufig medikamentös therapierefraktäre Epilepsien im Kindes- und Erwachsenenalter, schwerwiegende motorische Defizite, neuropsychologische Auffälligkeiten, wie Dyslexien und mentale Retardierungen (Galaburda 1993, Gressens 1998, Guerrini et al. 1999, Lawrie et al. 1999). Für einen Teil dieser mit kortikalen Malformationen assoziierten Erkrankungen sind zum einen Mutationen bestimmter Gene (Crino und Eberwine 1997, Guerrini und Carrozzo 2002, Chang et al. 2003) und zum anderen umweltbedingte Einflüsse nachgewiesen (Gressens 1998), jedoch ist die Ätiologie und Pathogenese weitestgehend unbekannt. Nicht alle kortikalen Malformationen sind symptomatisch und mit einem neuropsychologischen Defizit oder einer Epilepsie assoziiert (Kaufmann und Galaburda 1989, Kasper et al. 1999). Untersuchungen zur Prävalenz fokaler kortikaler Dysplasien stehen bisher noch aus.

Die Manifestation der mit Malformationen einhergehenden Anfallsleiden ist vielgestaltig und umfasst sowohl fokale als auch generalisierte Epilepsien. In Elektroenzephalographien (EEG) und während intraoperativer Elektrokortikographien (ECoG) konnte eine intrinsische Epileptogenität der Malformation nachgewiesen werden. Dabei war die ictale oder kontinuierliche epileptische Aktivität nicht ausschließlich auf die fokale kortikale Dysplasie beschränkt, sondern betraf teilweise auch entfernte kortikale Areale wie den Rolandischen Kortex (Palmini et al. 1994 und 1995).

Bevor die Magnetresonanztomographie (MRT) weitläufig verfügbar war, wurden kortikale Malformationen in der Regel ausschließlich post mortem neuropathologisch diagnostiziert. Moderne bildgebende Verfahren erlauben daher heute in zunehmenden Maße eine frühzeitige Diagnose-Stellung und Einschätzung der Prognose der fokalen kortikalen Dysgenesien. In einer Studie zeigten MRT-Untersuchungen in 84 % der Fälle eine Übereinstimmung mit dem elektroenzephalographischen Befund (Kuzniecky et al. 1993). Durch den Nachweis einer veränderten Durchblutung oder Stoffwechselstörung kann eine Positronen-Emissions-Tomographie von zusätzlichem Nutzen sein, falls eine in

der Magnetresonanztomographie auffallende Malformation nicht identisch mit dem epileptogenen Fokus ist (Fedi et al. 2001, Madakasira et al. 2002). Die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten gestatten darüber hinaus die Planung epilepsiechirurgischer Eingriffe, sofern die Anfälle nicht durch eine medikamentöse Therapie zu beherrschen sind (Barkovich 1996, Hagemann et al. 2000 a, Barkovich et al. 2001).

Kortikale Dysplasien sind häufig auf eine Störung der kortikalen Entwicklung zurückzuführen. Das zentrale Nervensystem entwickelt sich aus dem Neuralrohr, aus dessen kaudalen Anteil das Rückenmark und aus dessen rostralen Abschnitt das Gehirn entsteht. Aus der Gehirnanlage gehen das Rhombenzephalon, Mesenzephalon und Prosenzephalon hervor, das sich nach kurzer Zeit in zwei telencephale Bläschen und das Diencephalon aufgliedert. Der Kortex entwickelt sich physiologischerweise aus diesen telencephalen Bläschen in drei Phasen: Proliferations-, Migrations- und Organisationsphase. In der Proliferationsphase bildet sich die Ventrikulärzone aus undifferenzierten Neuroepithelzellen. Durch Migration von Neuronen aus der Ventrikulärzone ab der 5. Schwangerschaftswoche entstehen in der zellreichen kortikalen Platte entlang eines radiär von innen nach außen gerichteten Reifungsgradienten zuerst die Lamina V und zum Schluss die Lamina II („inside-out-layering“). Die späteren Laminae I und VI leiten sich aus der Marginalzone ab, die sich in einen inneren und äußeren Anteil untergliedern lässt, und die kortikale Platte einfasst. Ab der 15. Schwangerschaftswoche beginnt die Organisationsphase, in der sich die eingewanderten Zellen weiter differenzieren (Redecker et al. 2000 b).

Störungen der kortikalen Entwicklung lassen sich diesen drei Phasen entsprechend zuordnen und manifestieren sich in der Proliferationsphase als Läsionen mit abnormaler Zellgröße und -struktur, wohingegen in der Migrationsphase Heterotopien mit Inseln grauer Substanz in subkortikalen Schichten und während der Organisationsphase typischerweise Aberrationen der kortikalen Laminierung vorkommen (Barkovich 1996, Hagemann et al. 2000 a, Redecker et al. 2000 b). Eine neuere Klassifikation kortikaler Malformationen berücksichtigt darüber hinaus genetische, histopathologische und neuroradiologische Befunde (Barkovich et al. 2001).

Die häufigste Variante der kortikalen Entwicklungsstörung während der Organisationsphase ist die fokale Mikrogyrie mit den zuvor beschriebenen Charakteristika. Als zugrunde liegender pathogenetischer Mechanismus wird eine zerebrale

Perfusionsstörung mit konsekutiver Hypoxie zwischen der 20. und 30. Schwangerschaftswoche vermutet. Mikrogyrien sind histologisch als vierschichtiger Kortex mit einer Einfaltung im Sinne eines Mikrosulkus charakterisiert (McBride und Kemper 1982). Im Zusammenhang mit dem Auftreten fetaler Zytomegalie-Virus-Infektionen sind ebenfalls zerebrale Mikrogyrien beschrieben, die allerdings nicht auf eine viral bedingte Störung der Histogenese hinweisen, sondern auf eine Perfusionsstörung (Marques Dias et al. 1984, Iannetti et al. 1998).

Durch Entwicklung tierexperimenteller Dysplasie-Modelle sind systematische Untersuchungen der pathophysiologischen Auswirkungen kortikaler Malformationen aufgrund der guten Reproduzierbarkeit ermöglicht worden. Die am weitesten verbreiteten Methoden zur Induktion fokaler kortikaler Dysplasien sind Gefrierläsionen und Injektionen von Ibotensäure. In mehreren Studien an Nagetieren konnten nach Aufbringen einer Gefrierläsion am Tag der Geburt ebenfalls Mikrogyrien mit der zuvor beschriebenen Morphologie induziert werden (Dvorak und Feit 1977, Jacobs et al. 1996, Redecker et al. 2000 a, Rosen et al. 2001). Die Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie am Tag der Geburt einer Ratte entspricht etwa dem 4. bis 5. Schwangerschaftsmonat des Menschen, also einem Zeitpunkt an dem die kortikale Entwicklung noch nicht abgeschlossen ist (Rosen und Galaburda, 2000). Die Kälteläsion führt insbesondere zu einem fokalem Untergang der Laminae IV bis VIb, die zu diesem Zeitpunkt der kortikalen Entwicklung bereits angelegt und an der kortikalen Oberfläche vorhanden sind. In den folgenden Tagen wandern Neurone der Laminae II - III (IV) aus der morphologisch intakten paramikrogyralen Zone in das nekrotische Areal ein und bilden die Lamina 2. Diese tangentielle Expansion führt zu einer Reorganisation des nekrotischen Areals durch die angrenzenden Laminae II – III (IV) und einem Ersatz der Molekularschicht und der Pia mater. Die Zerstörung der Laminae V und VIb kann nicht kompensiert werden, da die Läsion nach Formation dieser Schichten aufgebracht wurde (Zilles et al. 1998).

Elektrophysiologische Untersuchungen an diesen Modellen haben eine Übererregbarkeit in der Umgebung der Läsion gezeigt. Diese lang anhaltenden multiphasischen Feldpotenzialen entsprechen der epileptiformen Aktivität in chronischen Epilepsie-Modellen (Prince und Tseng 1993, Hoffman et al. 1994). Eine Hypothese zum Verständnis der nach Induktion kortikaler Dysplasien beobachteten Hyperexzitabilität beruht auf der Annahme eines Ungleichgewichts zwischen GABA-erger Inhibition und Glutamat

vermittelter Exzitation (Jacobs et al. 1996 und 1999 b, Hablitz und de Fazio 1998, Luhmann et al. 1998 a und b, Redecker et al. 1998 a, Quill et al. 2002), sowie einer aberranten Konnektivität thalamischer Afferenzen (Jacobs et al. 1996 und 2000, Zilles et al. 1998, Rosen et al. 2001).

In rezeptor-autoradiographischen und immunhistochemischen Studien dieses Läsionsmodells wurde eine Verminderung des Bindungsverhaltens bzw. der Expression des GABA-ergen Systems nachgewiesen (Zilles et al. 1998, Redecker et al. 2000 a). Redecker und Kollegen konnten eine differenzielle Verminderung der Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten bei adulten Ratten nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie belegen. Eine Veränderung des Verteilungsmusters der Rezeptoruntereinheiten beschränkte sich nicht ausschließlich auf die Umgebung der Läsion, sondern ließ sich auch in entfernten kortikalen Arealen und der kontralateralen Hemisphäre nachweisen (Redecker et al. 2000 a).

GABA als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter wirkt sowohl über ionotrope GABA<sub>A</sub>- als auch metabotrope GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, und eventuell über einen ionotropen aber Bicullin- und Baclofen-insensitiven (GABA<sub>C</sub>-) Rezeptor. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist ein pentameres Makromolekül, dessen 5 pseudosymmetrisch angeordneten Untereinheiten einen Chlorid-selektiven Ionenkanal bilden (Bormann 2000, Baumann et al. 2003). Bisher konnten 19 Untereinheiten ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\pi$ ) sequenziert werden (Barnard et al. 1998, Whiting et al. 1999). Diese weisen jeweils ein heterogenes regionales Verteilungsmuster im Sinne definierter zyto-architektonischer Grenzen auf. In Abhängigkeit von der Entwicklungsphase zeigen die Rezeptoruntereinheiten ein unterschiedliches Expressionsmuster (Laurie et al. 1992, Fritschy et al. 1994, Paysan et al. 1994, Fritschy und Möhler 1995). Die funktionellen Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten sind teilweise bekannt: über die Untereinheit  $\alpha_1$  werden durch selektiv wirkende Pharmaka Sedation, anterograde Amnesie und antikonvulsive Effekte vermittelt, wohingegen über  $\alpha_2$  eine Anxiolysis erreicht wird (Möhler et al. 2002). Jedoch ist gesichert, dass die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften durch die Kombination verschiedener Rezeptoruntereinheiten determiniert werden (Wisden und Seeburg 1992, Barnard et al. 1998) und sich diese während der juvenilen Entwicklung in einer charakteristischen Abfolge ändern (Ben-Ari et al. 1997).

### **3. Ziele der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, inwieweit sich die Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  bereits während der ersten 21 Lebenstage nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie am Tag der Geburt verändert.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Analyse der zeitlichen Dynamik der Regulation der Untereinheiten bei juvenilen Tieren, da vorausgehende Arbeiten lediglich bei adulten Tieren ein gestörtes Verteilungsmuster der Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten zeigten. Insbesondere wurde das morphologische Korrelat der Hyperexzitabilität auf Ebene der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten untersucht. In diesem Zusammenhang war von zentralem Interesse, ob eine Modulation der Expression der Rezeptoruntereinheiten der erst ab dem 12. postnatalen Tag nachweisbaren Hyperexzitabilität vorangeht (Jacobs et al. 1999 b).

Darüber hinaus wurde dem Einfluss einer fokalen kortikalen Dysplasie im Bereich der Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation auf die Struktur und Veränderung der Fläche des somatosensorischen Kortex nachgegangen. In den bisherigen Studien wurden nahezu ausschließlich adulte Tiere nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie im Barreelfeld - mit konsekutiver völliger Zerstörung - berücksichtigt (Jacobs et al. 1999 a, Rosen et al. 2001).

## **4. Material und Methoden**

### 4.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an neugeborenen Wistar-Ratten ( $n = 45$ ), die aus der Zucht der Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf stammten, durchgeführt.

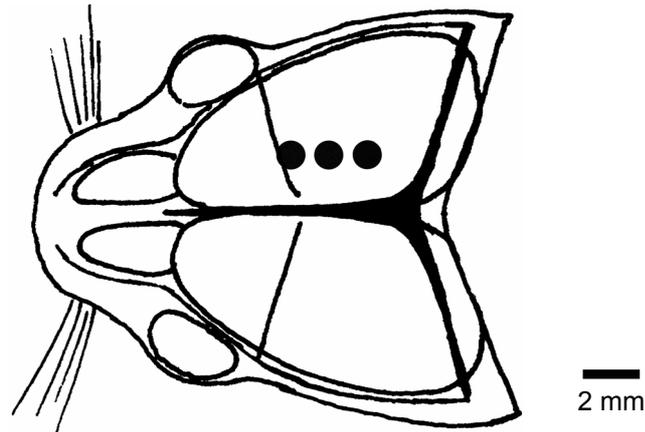
Das Muttertier und der Nachwuchs wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen, bei einer Temperatur von 22-24° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-80 % sowie freiem Zugang zu pelletiertem Trockenfutter und angesäuertem Wasser (pH 2) gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug jeweils 12 h.

Alle Versuche wurden nach erfolgter Genehmigung durch die Bezirksregierung Düsseldorf durchgeführt.

### 4.2 Induktion fokaler kortikaler Dysplasien

Fokale kortikale Dysplasien wurden gemäß der von Dvorak und Feit 1977 entwickelten Methode, leicht modifiziert nach Luhmann und Raabe (1996), durch frühe postnatale Gefrierläsionen an neugeborenen Ratten (P0) bzw. am 1. postnatalen Tag (P1) induziert. An P1 aufgebrachte Läsionen zeigten histologisch keine Unterschiede im Vergleich zu P0 (Jacobs et al. 1999 a).

Die Anästhesie der neugeborenen Ratten erfolgte durch Hypothermie, wobei diese für etwa 2 min vorsichtig von zerstoßenem Eis umgeben wurden. Nach Erreichen eines tiefen Narkosestadiums wurde die Kopfhaut einschließlich der Galea aponeurotica über dem rechten frontoparietalen Kortex, ca. 2 mm lateral der Sagittalnaht, über eine Strecke von etwa 5 mm eingeschnitten. Ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter Kupferzylinder mit einem Durchmesser von 1 mm wurde 10 s an aufeinanderfolgenden Stellen auf das Kalvarium aufgesetzt. Dies erfolgte in Form von 3 Läsionen in rostrokaudaler Achse in einem Abstand von 1,5 mm, woraus eine ca. 4 mm lange Läsion entstand. Anschließend wurde die Wunde mit Histoacryl-Gewebekleber (Braun, Melsungen) geschlossen. Die Neugeborenen wurden auf einer Heizdecke aufgewärmt und zurück in die Obhut des Muttertieres gegeben.



**Abb. 1** Skizze eines Schädels mit 3 in rostrokaudaler Achse auf die rechte Hemisphäre aufgetragenen Läsionen (Ansicht von kranial).

Als Kontrollgruppe dienten scheinoperierte Tiere mit denen in der gleichen Weise verfahren wurde, wobei der Kupferzylinder jedoch nicht gekühlt wurde (Dvorak und Feit 1977, Luhmann und Raabe 1996).

#### 4.3 Transkardiale Perfusion

Zur Gewinnung des Hirngewebes wurden die Ratten nach 7 (P7), 14 (P14) und 21 (P21) Tagen transkardial perfundiert. Zuerst wurden sie in einem Äther (Chinosolfabrik, Seelze) enthaltenden Glaszylinder tief narkotisiert, danach auf dem Rücken in einer Wanne liegend an den Extremitäten fixiert, und zur Aufrechterhaltung der Anästhesie während der Präparation mit einer Äthermaske versehen. Nach medianer Inzision des oberen Abdomens bis zum Sternum, erfolgte die laterale Durchtrennung der Rippen beidseits. Der Thorax einschließlich Mediastinum konnte nach Durchtrennung des Diaphragmas eröffnet werden. Nach stumpfer Resektion des Thymus wurden rechter und linker Ventrikel durch eine Klemme fixiert, um nach Einschnitt der Apex cordis einen Katheter unter Sichtkontrolle bis in die Aorta ascendens vorzuschieben. Vor Einschalten der Perfusionspumpe (505S, Watson-Marlow, England) wurde das rechte Atrium punktiert, um einen Abfluss des Blutes und der Perfusionslösungen zu gewährleisten. Zunächst wurden 54 ml PBS (Phosphat gepufferte Normalsalzlösung) und anschließend 180 ml Fixativ nach Zamboni in den Kreislauf des Versuchstieres eingeleitet (P14 und P21) (Fritschy und Mohler 1995). Zur Perfusion der 7 Tage alten Tiere wurden ein Veneninfusionsbesteck und 20-ml-Spritzen benutzt (10 ml PBS und 30 ml Fixativ nach Zamboni).

#### 4.4 Gewebegewinnung

Die Schädel wurden unmittelbar nach der Perfusion trepaniert und die Dura mater vorsichtig entfernt, um das Gehirn entnehmen zu können. Die Hirne wurden aufgrund der altersabhängigen unterschiedlichen Gewebekonsistenz nach folgendem Schema postfixiert: P7: 48 h, P14: 24 h und P21: 6 h. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne 6 h in 50 ml 10 % Saccharose enthaltendem PBS aufbewahrt, dann in 30 % Saccharose enthaltendes PBS überführt, wo sie zunächst aufschwammen und nach 24-60 h absanken. Danach wurden diese zuerst bei ca.  $-35^{\circ}\text{C}$  1 min in Methylbutan eingefroren und kurz darauf in einen Gefrierschrank ( $-75^{\circ}\text{C}$ ) gebracht.

#### 4.5 Anfertigung der Gehirnschnitte

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Gehirne über Nacht in 0,1 M Zitrat-Puffer bei Raumtemperatur gelegt. Am nächsten Morgen wurden diese in 80 ml 0,1 M Zitrat-Puffer in der Mikrowelle bei 650 W für 135 s (P14 und P21) bzw. 90 s (P7) erhitzt. Dieses Verfahren diente der Demaskierung der Epitope, Neutralisation unspezifischer Bindungsstellen und Ausschaltung der Aktivität endogener Peroxidasen (Fritschy et al. 1998).

Die Hirne wurden entweder koronar oder tangential auf einem Gefrierschlittenmikrotom (HM 400, Microm, Heidelberg) 70  $\mu\text{m}$  dick geschnitten und in PBS aufgefangen. Bei der koronaren Schnittführung war es notwendig, vor der Mikrowellenbehandlung das Ventrikelsystem zu eröffnen, um Artefakte durch sich ausdehnenden kochenden Zitrat-Puffer zu verhindern, indem ein Teil des frontalen und okzipitalen Hirnpols reseziert wurde. Nach vorsichtiger stumpfer Präparation der subkortikalen Strukturen mit einer Pinzette wurde das Gehirn flach auf das Mikrotom aufgefroren und tangential geschnitten.

#### 4.6 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an frei flottierenden Gehirnschnitten vorgenommen. Dazu wurden diese aus PBS in Tris-Triton (pH 7,4) überführt, dreimal in dieser Lösung gewaschen und im Anschluss mit dem primären Antikörper über Nacht

unter kontinuierlichen Schüttelbewegungen bei 4° C im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Präparate erneut dreimal in Tris-Triton (pH 7,4) gewaschen, dann mit dem sekundären biotinylierten Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, und nachfolgend in Tris-Triton (pH 7,4) gewaschen. Danach wurden diese 30 min bei Raumtemperatur mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (Vectastain Elite kit, Vectastain Laboratories, Burlingame, CA, USA), der 30 min vor Gebrauch angesetzt wurde, inkubiert. Das tetramere Glykoprotein Avidin bindet während dieser Zeit mit jeder Untereinheit ein Biotin-Molekül, so dass ein immunhistochemisch besser nachweisbarer Komplex entsteht. Die Bindung ist aufgrund der Dissoziationskonstante von  $10^{-5}$  mol/l sehr stabil. Nach dreimaligem Waschen in Tris-Triton (pH 7,4) wurden die Schnitte in Zellkulturplatten mit 2 ml 0,05%-iges DAB (3,3 -Diaminobenzidin; Sigma, St. Louis, MO) enthaltendem Tris-Triton (pH 7,7) überführt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 2 ml derselben Lösung, die zusätzlich 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthielt. Währenddessen wurden die Schnitte mit einem Pinsel vorsichtig bewegt, um Färbeartefakte durch gegenseitige Überlagerung und Faltenbildung zu vermeiden. Je nach Antikörper wurden die Schnitte nach 5 bis 15 min in PBS, das die Reaktion stoppte, umgesetzt. Ein weiterer Waschvorgang in PBS ging dem Aufziehen der Präparate auf Objektträger mit Gelatinelösung voraus. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 %, je zweimal) entwässert. Im Anschluss wurden sie zweimal (je 1 min) in Rotihistol (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) eingetaucht und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Nach einer Trockenzeit von 12 h konnten die Präparate mikroskopisch ausgewertet werden.

#### 4.7 Verwendete Antikörper

Die Antikörper zur Darstellung der  $\alpha_1$ -,  $\alpha_3$ -,  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten bei Ratten wurden aus Antiseren von Meerschweinchen gewonnen (Fritschy und Mohler 1995). Diese polyklonalen Antikörper wurden folgendermaßen verdünnt:  $\alpha_1$ : 1 : 20.000,  $\alpha_3$ : 1 : 2.000 und  $\alpha_5$ : 1 : 4.000. Der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Meerschweinchen IgG; Dianova, Hamburg) wurde 1:300 verdünnt. Beide wurden in Tris-Triton (pH 7,4), das 2 %iges NGS (normales Ziegenserum, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) enthielt,

gelöst. Zur immunhistochemischen Markierung der Neurone wurde ein monoklonaler Antikörper (NeuN, Chemicon MAB377) verwendet, der 1:500 in Tris-Triton (pH 7,4) verdünnt wurde. Daran wurde ein sekundärer Antikörper (Ziege-Anti-Maus-IgG; Dianova, Hamburg) gebunden (Verdünnung wie oben beschrieben). In den tangentialen Kortexschnitten wurden lediglich die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_5$ -Untereinheiten an P7 und P14 untersucht.

#### 4.8 Histologie

Zur morphologischen Beurteilung wurden die Schnitte mit Kresylviolett nach Nissl gefärbt, das durch seine basischen Komponenten vor allem das raue endoplasmatische Retikulum darstellt. Die Präparate wurden, wie unter 2.6 beschrieben, auf Objektträger aufgezogen.

#### 4.9 Auswertung der gefärbten Gehirnschnitte

Die Übersichtsaufnahmen wurden auf einem Beleuchtungstisch (LP 500 K, Hama, Monheim) mit einer Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Jena), die durch ein Imaging-Programm (AxioVision 2.05, Zeiss, Jena) nachbearbeitet wurden, angefertigt. Die Detailaufnahmen wurden an einem Mikroskop bei 2,5-facher Vergrößerung (Axioplan 2, Zeiss, Jena) und mit der Digitalkamera angefertigt.

Zur Messung der regionalen Verteilung der optischen Dichte der Rezeptoruntereinheiten wurden die Koronarschnitte in folgende Areale eingeteilt: gesamter Neokortex, parietaler Kortex (Par1) und Hippokampus (Anschnitt CA 1-3) (Paxinos und Fritschle 1991). Die Rezeptordichte wurde ermittelt, indem Graustufen, die von der Dichte der Antikörper abhängig sind, in Farbsignale transformiert wurden. Dazu wurden die Schnitte auf einem helligkeitsstabilisierten Beleuchtungstisch (Model B 90, Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Kanada) mit einer CCD-Kamera (Mandi, Y 9220) aufgenommen. Das durch einen Videoprozessor (DVS-3000, Hamamatsu, Herrsching) nachverstärkte analoge Videosignal wurde digitalisiert und anschließend auf einem Apple Macintosh II fx durch Imaging-Software (NIH-Image, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) farbkodiert wiedergegeben. Dieses Verfahren ermöglichte eine Hintergrundsubtraktion und die präzise Darstellung geringer Unterschiede der Rezeptorexpression, die lichtmikroskopisch kaum zu registrieren waren.

#### 4.10 Rekonstruktion und morphometrische Analyse des Barreelfields

Bei allen Tieren war das Barreelfield in mehr als einem Tangentialschnitt zumindest partiell zu erkennen. Die Rekonstruktion des Barreelfields anhand von 2-3 Schnitten erfolgte durch ein Computersystem (NeuroLucida; MicroBrightfield Europe, Magdeburg), das an eine 3-Chip CCD-Farbkamera (Hitachi, Rodgau) und ein Mikroskop (Eclipse 800, Nikon, Ratingen) angeschlossen war. Das Barreelfield konnte durch immunhistochemische Darstellung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  bei 4-facher Vergrößerung kartiert werden, indem alle Barrels in den aufeinanderfolgenden Schnitten markiert wurden. Anschließend konnten die einzelnen Barrels durch das Computersystem zum PMBSF ergänzt werden. Die morphometrische Analyse des Barreelfields bzw. der Septen wurde durch die Neuroexplorer-Software (Version 3.03a; MicroBrightfield Europe, Magdeburg) vorgenommen

#### 4.11 Statistik

Alle in den Diagrammen verwendeten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardmessfehler bzw.  $\pm$  Standardmessfehler in % angegeben. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte durch den student-t Test. Ein signifikanter Unterschied wurde für  $p < 0,05$  bzw. ein hochsignifikanter für  $p < 0,01$  angenommen.

#### 4.12 Verwendete Lösungen

- 1) 0,1 M Phosphat gepufferte Normalsalzlösung (PBS): a) 28,392 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydr., 158,95 g NaCl in 2000 ml Aqua bidest., b) 13,799 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O, 79,478 g NaCl in 1000 ml Aqua bidest., 35 ml der Lösung b) in 1500 ml Aqua bidest. verdünnt und mit Lösung a) auf pH 7,4 titriert.
- 2) 0,2 M Phosphatpuffer (PB): a) 28,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O in 800 ml Aqua bidest., b) 8,3 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O in 300 ml Aqua bidest., Titration der basischen Komponente (a) mit der sauren Komponente (b) auf pH 7,4.

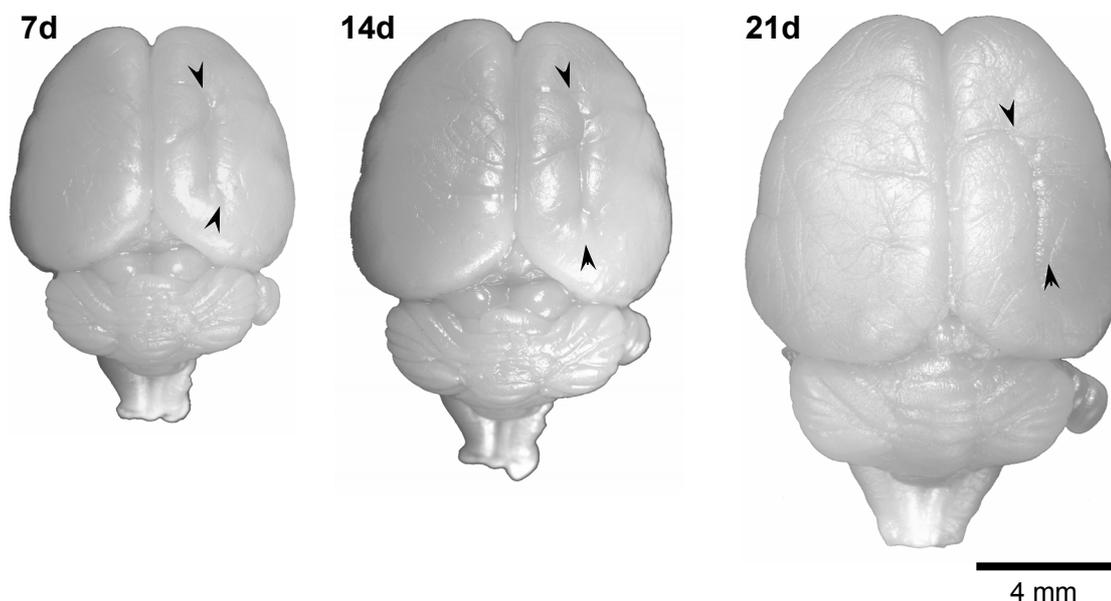
- 3) Fixativ nach Zamboni: 500 ml 0,2 M PB, 150 ml Pikrinsäure (gesättigte Lösung), 40 g Paraformaldehyd (in 200 ml Aqua bidest. bei 60° C, mit 6 bis 8 Tropfen 10 M NaOH abgeklärt). Auffüllung des restlichen Volumens auf 1000 ml mit Aqua bidest., Filtration, Abkühlung auf ca. 15° C vor Gebrauch, mit folgenden Endkonzentrationen: 0,1 mol/l PB, 15% (v/v) Pikrinsäure, 4% (w/v) Paraformaldehyd.
- 4) Tris-Puffer-Stock: 60,55 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (ICN) und 73,8 g NaCl in 1 l Aqua bidest. gelöst.
- 5) Tris-Triton: Tris-Puffer-Stock 1:10 in Aqua bidest. verdünnt und mit HCl auf pH 7,4 bzw. pH 7,7 titriert und mit 0,05% Triton X-100 (Merck, Darmstadt) versetzt.
- 6) Kresylviolett-Lösung nach Nissl: 1,6326 g Natriumacetat (wasserfrei), 2,88 ml Eisessig und 100 mg Kresylviolett wurden 15 min bei 60°C in 300 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend filtriert.
- 7) Gelatinelösung (0,5%): 1 g Gelatine und 0,1 g Chrom-(III)-Kaliumsulfat in 200 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend auf 37 - 42° C erhitzt.
- 8) 0,1 M Zitrat-Puffer: a) 35,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 1 l Aqua bidest., b) 21 g Zitronensäure in 1 l Aqua bidest., Titration der Zitronensäure mit Lösung a) auf pH 4,5.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Morphologie der fokalen kortikalen Dysplasien

Alle Tiere, die eine Gefrierläsion erhielten, wiesen charakteristische kortikale Dysgenesien parallel zum Interhemisphärenspalt in Form eines Mikrogyrus auf (Rosen et al. 1992 und 1998, Jacobs et al. 1996, Luhmann et al. 1998 a und b, Zilles et al. 1998, Redecker et al. 2000 a). Die an P1 erfolgten Gefrierläsionen unterschieden sich nicht von denen, die an P0 induziert wurden (vgl. Jacobs et al. 1999 a).

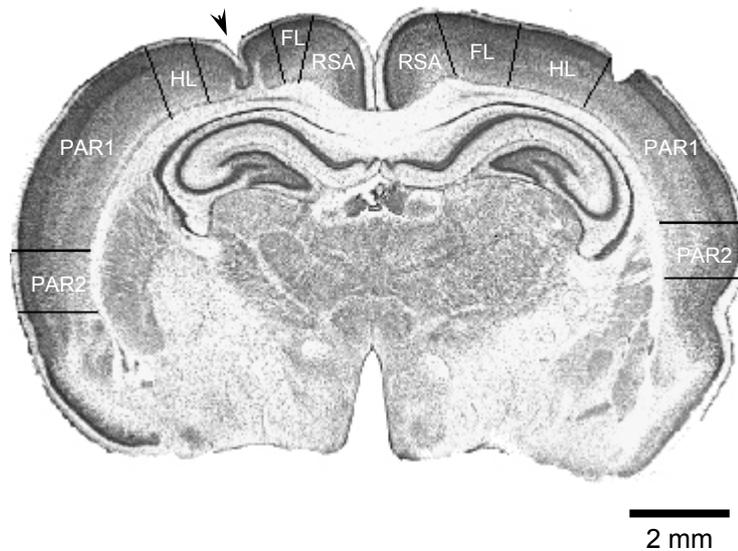
Die Malformation erstreckte sich in rostrokaudaler Achse über eine Distanz von 3-5 mm und betraf Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation, sowie den sekundären okzipitalen Kortex und war ca. 0,5 mm breit (Abb. 3.1, 3.2 und 3.4).



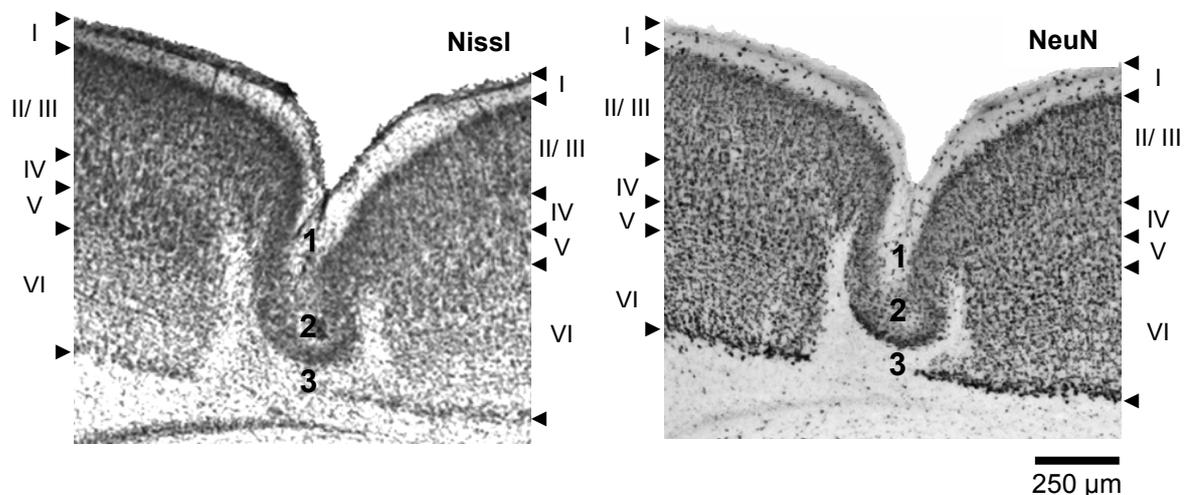
**Abb. 3.1** Morphologie dysplastischer Hirne an P7, P14 und P21. Der Mikrogyrus (2 Pfeilspitzen) ist makroskopisch durch eine Einfaltung der Oberfläche charakterisiert.

Histologisch konnte mit Kresylviolett bei Läsionstieren ein Mikrogyrus, der sich teilweise bis auf Lamina V erstreckte, und ein umgebender bzw. unterhalb der Läsion liegender 3-4 schichtiger Kortex gezeigt werden (Abb. 3.3). Die Histologie der zellarmen oberflächlichen Lamina 1 des Mikrogyrus wies große Ähnlichkeit mit der Lamina I des Neokortex auf. In der Nissl-Färbung fand sich in Lamina 2 eine den neokortikalen Laminae II und III vergleichbare Verteilung der Neurone. Die nahezu zellfreie Lamina 3 grenzte an die paramikrogyrale Zone, die aus einem histologisch

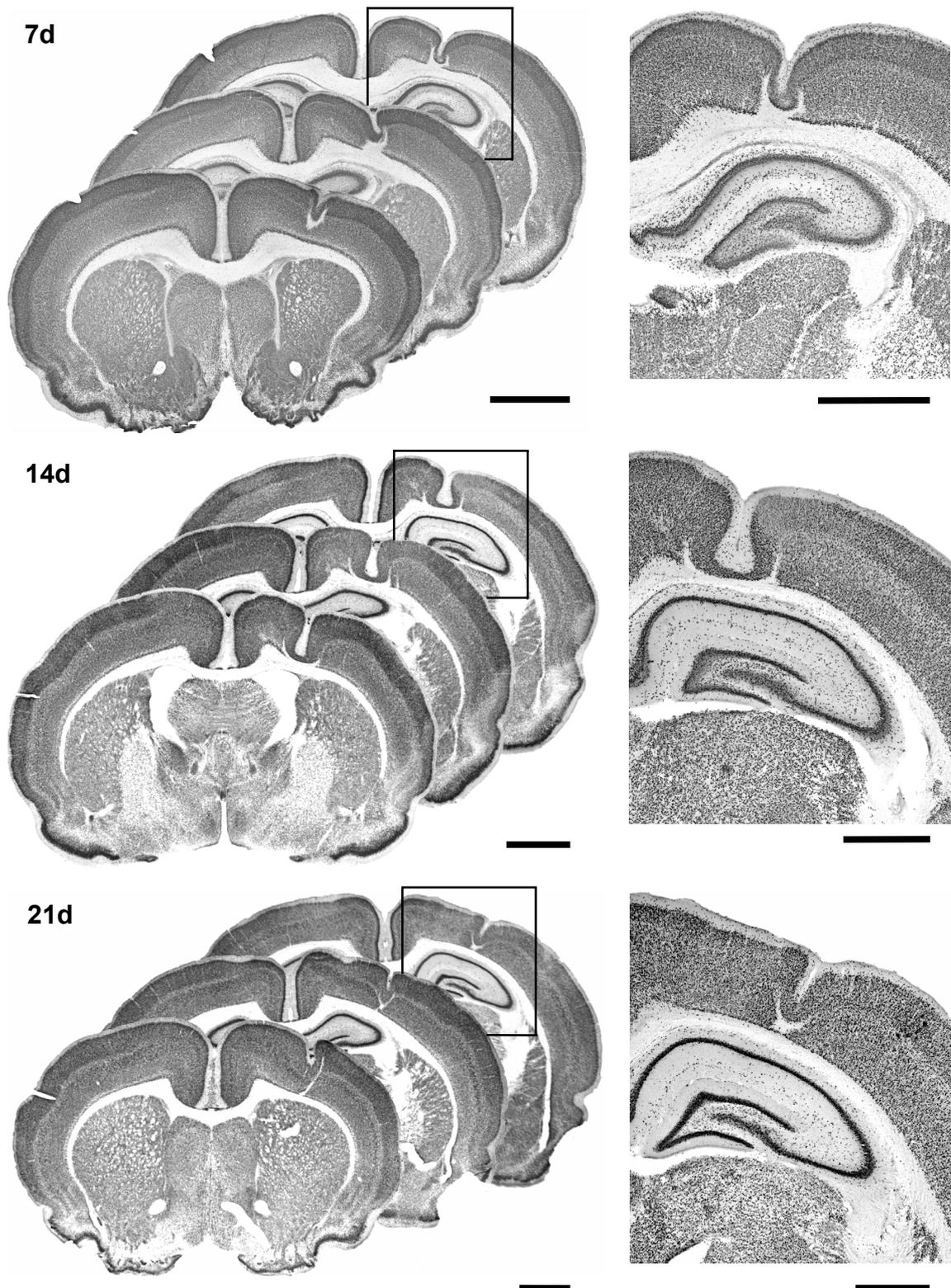
normalen 6-schichtigen Kortex besteht (Dvorak et al., 1977; Redecker et al. 2000 a). Durch den monoklonalen Antikörper NeuN, der selektiv Neurone färbt, gelang es, die Laminierung besonders deutlich darzustellen. Es wurden keine morphologischen Veränderungen in kontralateralen Hirnregionen und im Hippokampus beobachtet. Die Kontrollgruppe ließ keine Auffälligkeiten des Kortex und subkortikaler Strukturen erkennen.



**Abb. 3.2** Schematische Einteilung der kortikalen Areale in einem Koronarschnitt eines Läsionstieres in der Nissl-Färbung. Die Dysplasie (Pfeilspitze) liegt zwischen der Repräsentation der Vorder- (FL) und Hinterpote (HL). Darüber hinaus sind parietaler (Par1 und 2) und retrosplenialer (RSA) Kortex abgebildet.



**Abb. 3.3** Laminierung des Mikrogyrus und des umgebenden normalen 6-schichtigen Kortex. Vergleichende Darstellung der Malformation in Nissl-Färbung (links) und immunhistochemische Markierung durch den Antikörper NeuN (rechts) in einem koronaren Hirnschnitt bei 2,5-facher Vergrößerung.



**Abb. 3.4** Morphologie der fokalen kortikalen Dysplasien an P7, P14 und P21. Die Abbildung zeigt links die Montage koronarer Hirnschnitte und rechts eine Ausschnittsvergrößerung der kortikalen Malformation in immunohistochemischer Darstellung durch den Antikörper NeuN. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

Die Läsions- und Kontrollgruppen bestanden zu Beginn aus je 6 Tieren. Die transkardiale Perfusion der Ratten, v.a. an P7, war bedingt durch die engen anatomischen Verhältnisse kompliziert. Die galertartige Konsistenz der juvenilen Hirne erschwerte die Gewebeaufbereitung und das Schneiden auf dem Mikrotom. Die immunhistochemische Färbung im Free-Floating Verfahren gestaltete sich aufgrund der fragilen Hirnschnitte schwierig, so dass sich die Gruppenstärke reduzierte.

## 5.2 Entwicklung des Hirn- und Körpergewichts nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien

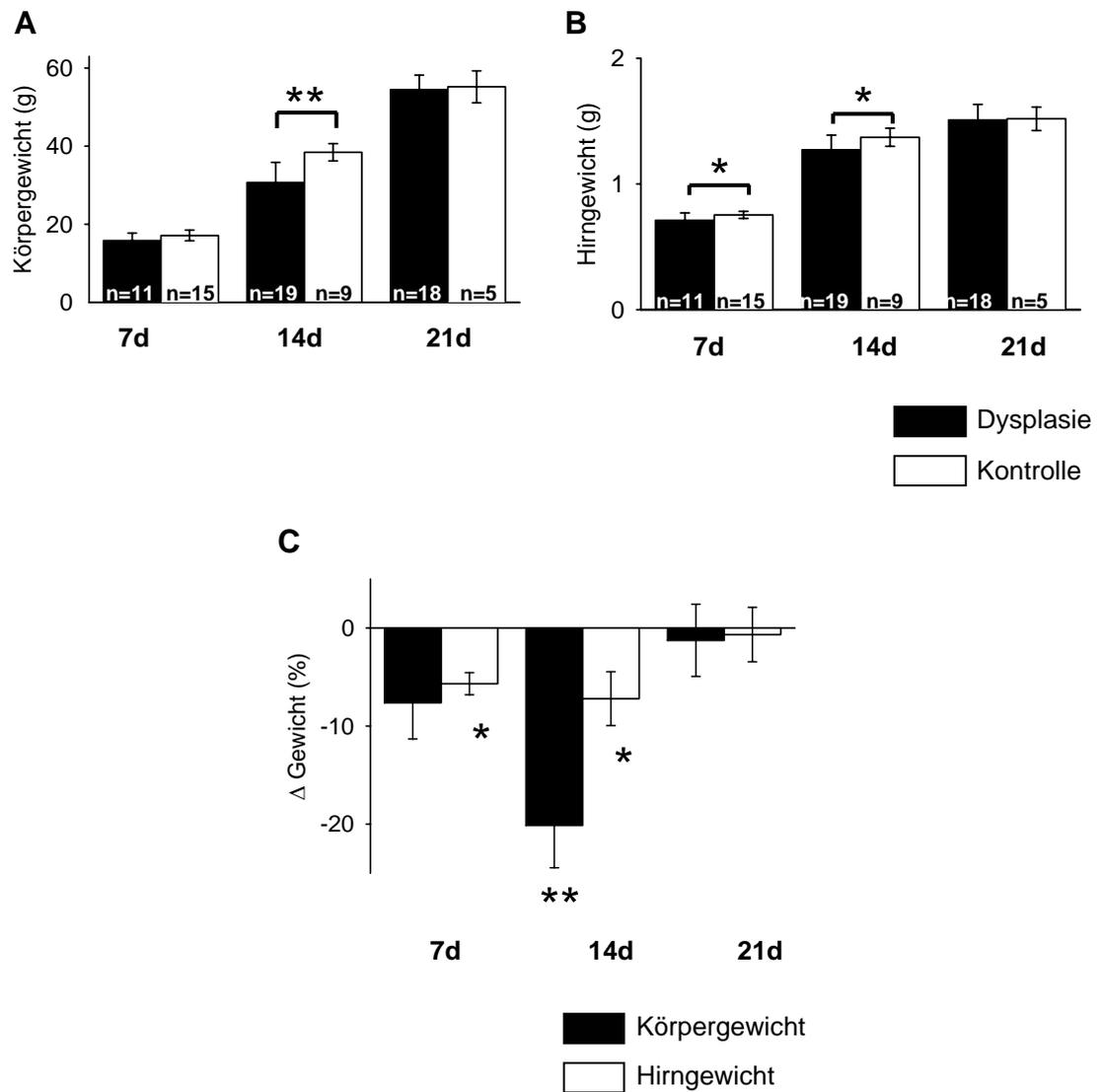
Bei allen Tieren, die eine Gefrierläsion erhielten, konnte eine Verminderung des Körper- und Hirngewichts festgestellt werden (Abb. 3.5). Bei Auswertung der Entwicklung des Hirn- und Körpergewichts nach fokalen kortikalen Dysplasien stand eine größere Anzahl Ratten zur Verfügung, die teilweise in anderen Projekten untersucht wurden.

Zum Zeitpunkt P7 betrug das Körpergewicht der Ratten, die eine kortikale Dysplasie aufwiesen (n = 11), im Mittel 15,8 g. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 15, MW 17,1 g) bedeutet dies einen Verlust des Körpergewichts von 7,6 %. In der gleichen Gruppe verringerte sich das Hirngewicht gegenüber der Kontrollgruppe signifikant um 5,7 % (MW 0,75 g,  $p < 0,05$ ) auf durchschnittlich 0,71 g.

Bei den 14 Tage alten Läsionstieren (n = 19) konnte eine hochsignifikante Reduktion des Körpergewichts von 30,7 g um 20,1 % ( $p < 0,01$ ) gemessen werden. Es konnte ebenfalls eine signifikante Verminderung des Hirngewichts um 7,2 % (MW 1,27 g,  $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (n = 9, MW 1,37 g) festgestellt werden.

21 Tage nach Induktion der Läsion ließen sich bei 18 Tieren eine diskrete Verringerung des Körper- und Hirngewichts von 1,2 % bzw. 0,7 % , verglichen mit den Kontrolltieren (n = 5, MW 55,2 g bzw. 1,51 g), nachweisen. Die Ratten mit dysplastischem Kortex wogen durchschnittlich 54,5 g und das Gehirn 1,51 g.

Die prozentuale Streuung des Körpergewichts war zu allen Zeitpunkten größer als die des Hirngewichts. Eine Verringerung des Körper- und Hirngewichts war nur bis zum 14. Tag nach Aufbringen der Läsion nachweisbar. Nach 21 Tagen bestand im Vergleich zu den scheinoperierten Ratten kein wesentlicher Unterschied zwischen Hirn- bzw. Körpergewicht.



**Abb. 3.5** Änderung des Körper- (A) und Hirngewichts (B) bzw. deren Differenz bezogen auf die Kontrollgruppe (C) nach fokalen kortikalen Dysplasien an P7, P14 und P21. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied (1 Sternchen) des Hirngewichts an P7 und P14, sowie ein hochsignifikante Verringerung (2 Sternchen) des Körpergewichts an P14.

### 5.3 Veränderung der Verteilung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien

Das Verteilungsmuster der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  änderte sich nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien, wobei sich die Expressionsmuster bihemisphärisch von denen der Kontrolltieren unterschieden. Die Immunreaktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  wandelte sich in beiden Gruppen altersabhängig (vgl. Paysan et al., 1994; Fritschy et al. 1994).

#### 5.3.1 GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit $\alpha_1$

Die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten bei Läsions- und Kontrolltieren ein  $\alpha_5$  komplementäres Verteilungsmuster.

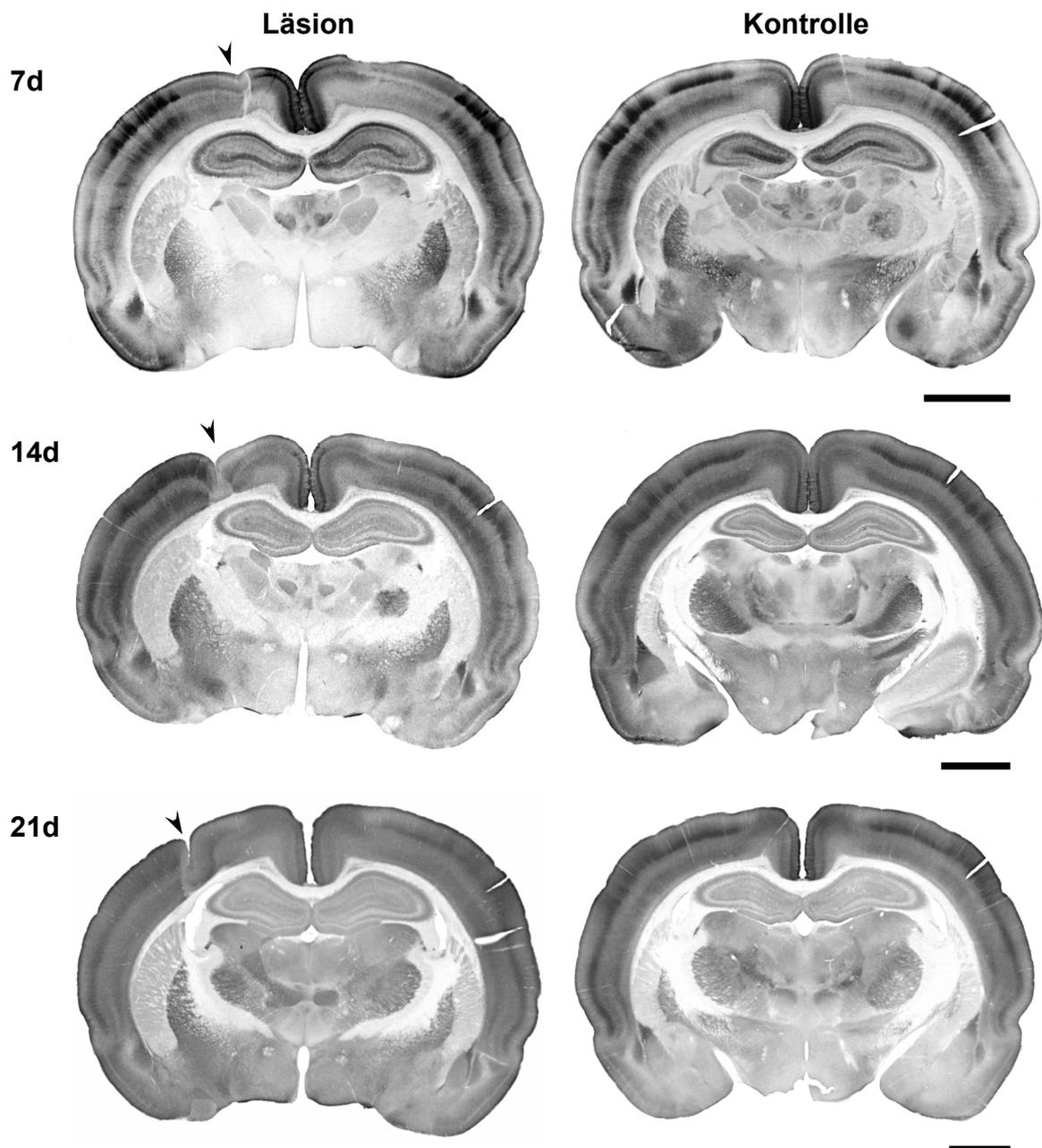
#### **Expressionsmuster an P7**

Die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  wurde bei P7-Kontrolltieren (n = 5) überwiegend in den Laminae III-IV des somatosensorischen Kortex (Par1), im retrosplenialen Kortex (RSA) und im Hippokampus exprimiert (vgl. Abb. 3.6 und 3.7).

Areale mit hoher Immunreaktivität in Par1 repräsentierten das Barrelfield. Die Laminae V/VI wiesen ebenfalls eine hohe Immunreaktivität auf und erstreckten sich von Par1 bis kurz vor den Sulcus entorhinalis. Alle subkortikalen Strukturen offenbarten eine geringe optische Dichte der  $\alpha_1$ -Rezeptoruntereinheit. Das Verteilungsmuster der Untereinheit  $\alpha_1$  war ipsi- und kontralateral nahezu identisch. Der Gyrus dentatus des Hippokampus zeigte eine der Region Par1 vergleichbar hohe Immunreaktivität, wobei die Expression im Ammonhorn (CA1 - CA3) insgesamt schwächer war. Alle anderen hippokampalen Strukturen ließen eine niedrige Dichte der Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  erkennen.

Nach einer Gefrierläsion nahm die Rezeptordichte insgesamt ab, wobei die Immunreaktivität der Malformation minimal war. Das ipsilaterale Barrelfield der Läsionstiere (n = 2) war von anderen kortikalen Arealen abgrenzbar, reichte aber im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger weit nach medial. Das Areal medial der Dysplasie ließ keine für das Barrelfield kennzeichnende Verteilung der Untereinheit  $\alpha_1$  erkennen. Die semiquantitative Auswertung der optischen Dichte zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe in Par1 eine Verminderung der Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  ipsi- um 13,1 % und kontralateral

um 34,8 % (Abb.3.8). Bei Betrachtung des gesamten Neokortex fiel eine Abnahme um 21,2 % bzw. 37,6 % und eine niedrigere Expression von  $\alpha_1$  in den Laminae V/ VI auf. Im Hippokampus ließ sich eine geringere Expression ipsi- und kontralateral um 34,1 % bzw. 30,9 % nachweisen. Die optische Dichte war im retrosplenialen Kortex im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger.

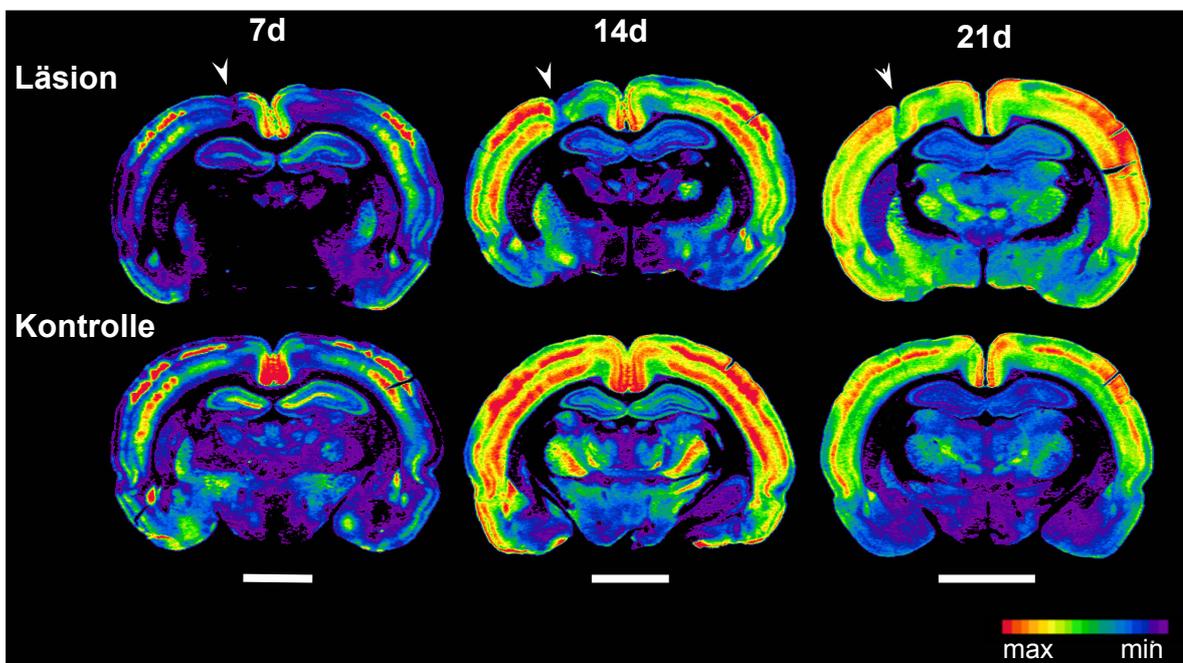


**Abb. 3.6** Die Abbildung zeigt die immunohistochemische Darstellung durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  in Koronarschnitten. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der Anfärbbarkeit an P7 und P14 bei Läsionstieren, wohingegen diese an P21 im Vergleich zu den Kontrollen ausgeprägter war. Die Dysplasie ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

### Expressionsmuster an P14

Das Verteilungsmuster der P7-Kontrolltiere fand sich bei den P14-Kontrolltieren ( $n = 4$ ) wieder. Die Immunreaktivität in Par1 und in den Laminae V/ VI war nach 2 Wochen ausgeprägter, wobei diese im Ammonhorn des Hippokampus annähernd unverändert und im Gyrus dentatus vermindert war. Des weiteren war die Expression dieser GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit in der Capsula interna höher (vgl. Abb. 3.6 und 3.7).

Die neokortikale, hippocampale und subkortikale Rezeptordichte war bei allen Läsionstieren ( $n = 3$ ) niedriger. Die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  war in der Dysplasie nur gering exprimiert. Das ipsilaterale Barrelfield (Par1) unterschied sich weiterhin deutlich von anderen kortikalen Arealen und erstreckte sich bis an die paramikrogyrale Zone nach medial. Dort war die Immunreaktivität hochsignifikant um 13,6 % ( $p < 0,01$ ) und kontralateral um 11,6 % vermindert (Abb. 3.8). Medial der paramikrogyralen Zone wies das Verteilungsmuster der GABA<sub>A</sub>  $\alpha_1$  positiven Neurone keine Ähnlichkeit mit dem Barrelfield auf. Zugleich fiel eine deutlich verminderte Rezeptordichte auf. Die Expression der Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  war, bezogen auf den gesamten Neokortex, ipsilateral signifikant um 15,8 % ( $p < 0,05$ ) bzw. kontralateral 18,3 % niedriger.



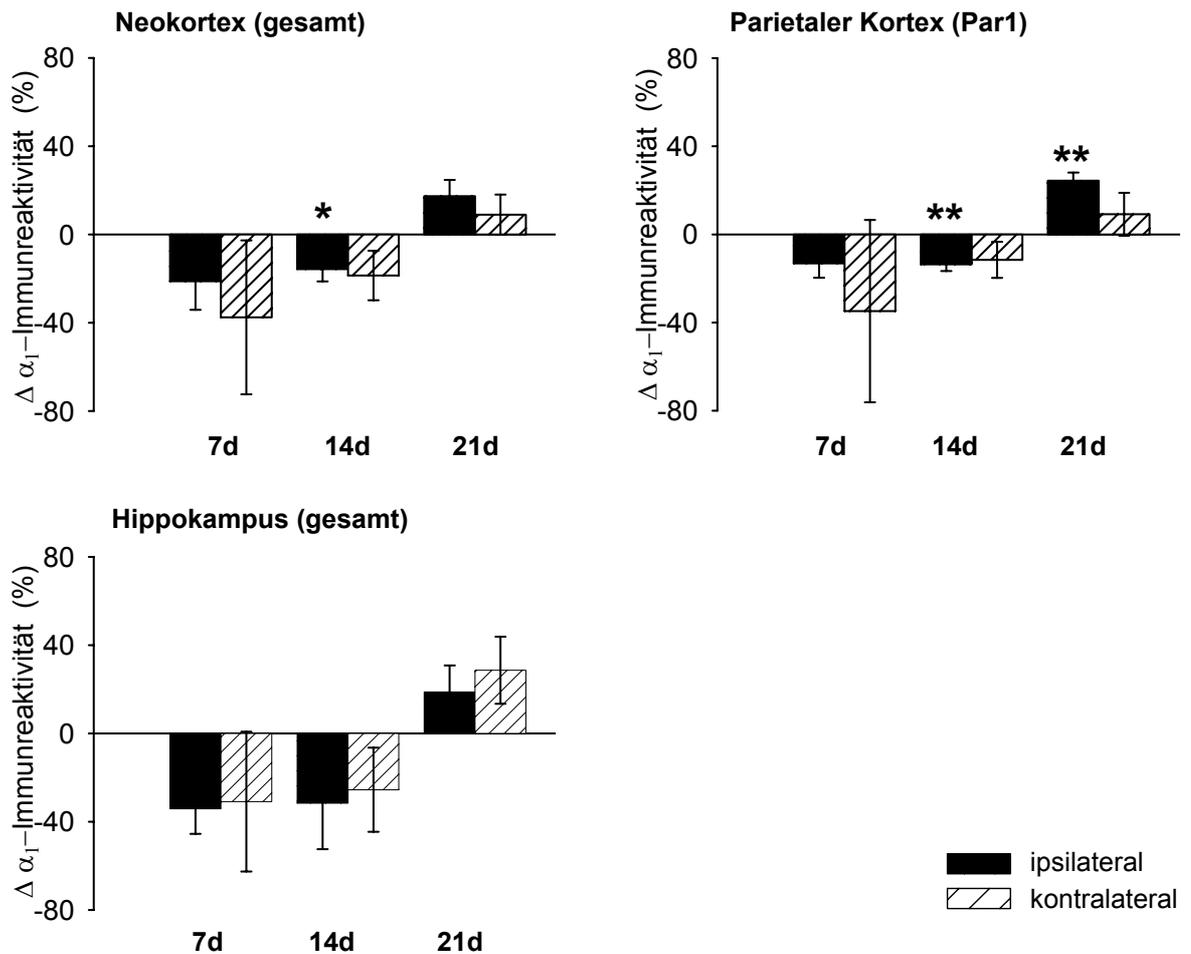
**Abb. 3.7** Die Abbildung zeigt die farbkodierte Darstellung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  bei Läsions- und Kontrolltieren in Koronarschnitten. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der  $\alpha_1$ -Expression an P7 und P14 bei Läsionstieren, wohingegen die optische Dichte an P21 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war. Die Dysplasie ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

Die Immunreaktivität nahm im Hippokampus um 20,8 % bzw. 19,1 % ab. Im retrosplenialen Kortex und der Capsula interna war die GABA<sub>A</sub> Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  ebenfalls weniger exprimiert.

### **Expressionsmuster an P21**

Die P21-Kontrolltiere (n = 4) wiesen die typische Struktur des Barrelfields der jüngeren Kontrolltiere auf. Die Immunreaktivität des gesamten Neokortex war geringer, wobei sich das Barrelfield schärfer von seiner unmittelbaren Umgebung abgrenzte. Die semiquantitativ bestimmte optische Dichte war im Vergleich zu den beiden jüngeren Kontrolltiergruppen in den Laminae V/ VI niedriger. Die  $\alpha_1$ -Rezeptordichte der subkortikalen und hippocampalen Strukturen war im Vergleich zu den 7 und 14 Tage alten Ratten vermindert (vgl. Abb. 3.6 und 3.7).

Im Vergleich zu den Kontrollen war nach 21 Tagen bei allen Ratten mit einer kortikalen Malformation (n = 3) die Expression der GABA<sub>A</sub> Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  ipsi- und kontralateral in den untersuchten Arealen gesteigert, wobei sich das Barrelfield bilateral weniger deutlich demarkierte. Medial der Dysplasie des Barrelfields war das charakteristische Muster nicht mehr ersichtlich. Die Läsionstiere ließen in Par1 ipsilateral eine um 24,4 % ( $p < 0,01$ ) hochsignifikant erhöhte Immunreaktivität erkennen, bzw. war diese im Vergleich zur Kontrollgruppe im gesamten ipsilateralen Neokortex um 17,3 % höher (Abb.3.8). Die  $\alpha_1$ -Immunreaktivität der kortikalen Malformation war gering. Kontralateral war in Par1 und im Neokortex die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  um 9,1 % bzw. 9,0 % stärker exprimiert. Die Rezeptordichte war bei den Läsionstieren in Laminae V/ VI höher. Im Hippokampus war bilateral das Ammonhorn (CA1 - CA3) deutlicher als bei den Kontrolltieren von der Umgebung abzugrenzen, im Gegensatz zum Gyrus dentatus, der fast nicht zu erkennen war. Die Immunreaktivität war ipsi- und kontralateral um 18,8 % und 28,6 % im Vergleich zu den Tieren mit normal konfiguriertem Kortex erhöht. Die Expression von  $\alpha_1$  war im retrosplenialen Kortex nahezu unverändert und in den Basalganglien im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.



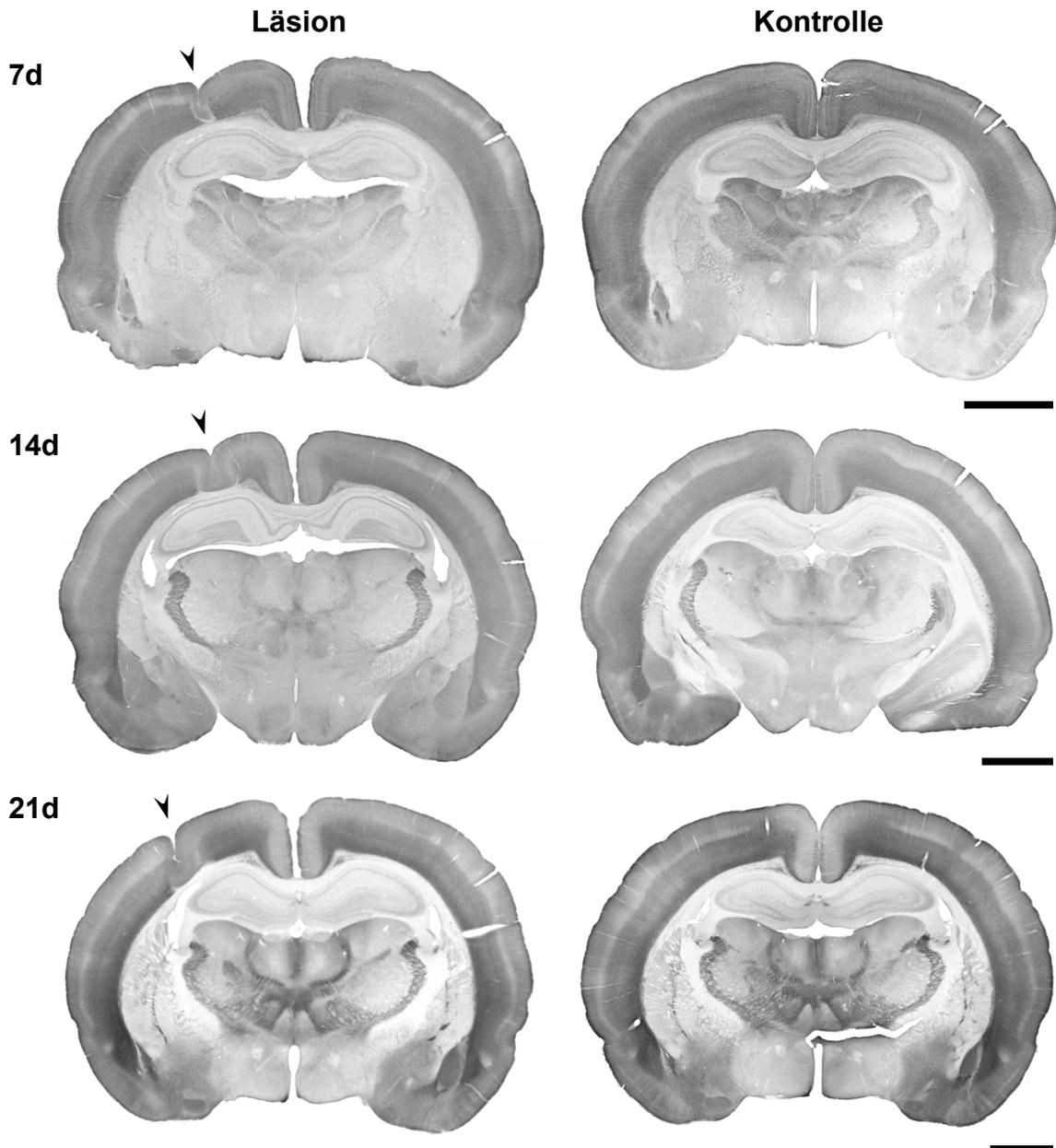
**Abb. 3.8** Veränderung der Immunreaktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  in Neokortex, Par1 und Hippokampus im Vergleich zur Kontrolle nach fokalen kortikalen Dysplasien. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der semiquantitativ bestimmten optischen Dichte an P7 und P14 bei den Läsionstieren, wohingegen die optische Dichte an P21 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war.

### 5.3.2 GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit $\alpha_3$

#### **Expressionsmuster an P7**

Die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  wurde bei P7-Kontrolltieren ( $n = 2$ ) vor allem in den Laminae V/ VI des Neokortex und teilweise in den Basalganglien exprimiert. Der Hippokampus ließ sich durch  $\alpha_3$  kaum darstellen (vgl. Abb. 3.9 und 3.10).

Nach einer Gefrierläsion nahm die Rezeptordichte insgesamt ab. Die optische Dichte eines jeden untersuchten Areals der Läsionstiere ( $n = 2$ ) war bilateral um einen fast identischen Wert vermindert. Die Immunreaktivität des parietalen Kortex verringerte sich ipsi- und kontralateral um 18,0 % bzw. 20,8 % (vgl. Abb. 3.11). Im gesamten Neokortex wurde im Vergleich zu den scheinoperierten Ratten ipsilateral eine um 19,3 % und kontralateral eine hoch signifikant um 19,9 % ( $p < 0,01$ ) verminderte Expression festgestellt. Die meisten  $\alpha_3$ -positiven Neurone konnten in den Laminae V/ VI nachgewiesen werden. Die Dysplasie wies eine geringe Immunreaktivität auf, die sich deutlich von den Laminae V/ VI demarkierte. Unmittelbar medial und lateral der paramikrogyralen Zone fiel eine im Vergleich zur Umgebung erhöhte Expression der Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  in den Laminae V/ VI auf. Die für  $\alpha_3$  bei den Kontrollen typische höhere Immunreaktivität in den Laminae V/ VI setzte sich etwas weiter medial der paramikrogyralen Zone fort. Die relative Dichte von  $\alpha_3$  im Hippokampus war ipsi- und kontralateral um 48,9 % bzw. 52,0 %, sowie in den Basalganglien und im retrosplenialen Kortex, vermindert.



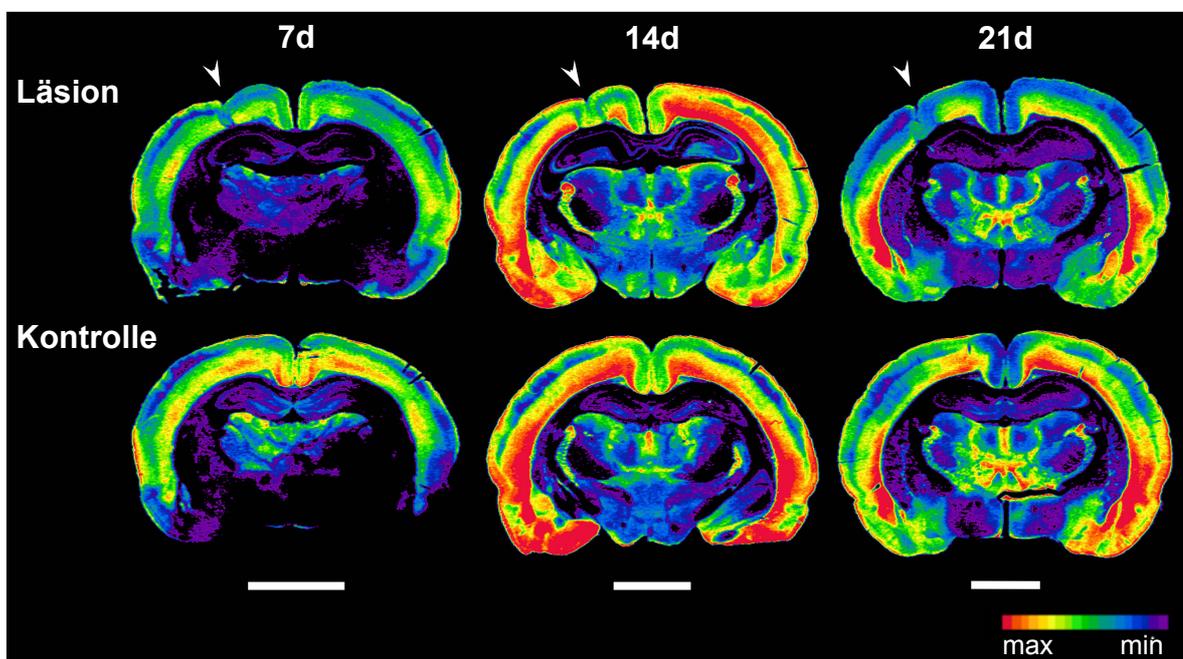
**Abb. 3.9** Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Darstellung durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  in Koronarschnitten. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der  $\alpha_3$ -Expression an P7 und P21 bei Läsionstieren, wohingegen die Anfärbarkeit an P14 kontralateral im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war. Die Dysplasie ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

### Expressionsmuster an P14

Das grundsätzliche Verteilungsmuster der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  fand sich bei den P14-Kontrolltieren (n = 4) wieder. Die Expression der  $\alpha_3$ -Rezeptoruntereinheit war im Vergleich zu den eine Woche alten Kontrolltieren vor allem in den Laminae V/VI, den

Basalganglien und im retrosplenialen Kortex gesteigert. Tendenziell war die Rezeptordichte in den Laminae V/VI von Par1 etwas niedriger als im restlichen Neokortex. Der Hippokampus ließ sich auch zu diesem Zeitpunkt kaum darstellen (vgl. Abb. 3.9 und 3.10).

Die Läsionstiere (n=2) ließen im Vergleich zur Kontrollgruppe ipsilateral keine wesentlichen Änderungen der optischen Dichte im parietalen Kortex ( $\Delta 0,6\%$ ) und der Hemisphäre ( $\Delta 0,1\%$ ) erkennen (vgl. Abb. 3.11). Die  $\alpha_3$ -Expression des ipsilateralen Hippokampus war um 24,4% niedriger. Die Rezeptordichte war im Vergleich zu den Kontrolltieren auf der kontralateralen Seite in Par1 und im neokortikalen Anteil der Hemisphäre um 42,7% bzw. 37,1% erhöht. Die Immunreaktivität des Hippokampus nahm um 98,3% zu. Die kaum  $\alpha_3$  exprimierende Dysplasie begrenzte die Laminae V/VI, in denen wie in der Kontrollgruppe die Untereinheit  $\alpha_3$  hauptsächlich nachgewiesen wurde, nach lateral. Die optische Dichte medial der Malformation und im retrosplenialen Kortex war ebenfalls vermindert. Eine reduzierte  $\alpha_3$ -Rezeptordichte in Par1 war bei den Läsionstieren im Gegensatz zu den scheinoperierten Ratten nicht zu erkennen. Die Expression der Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  war in den Basalganglien ungefähr gleich.

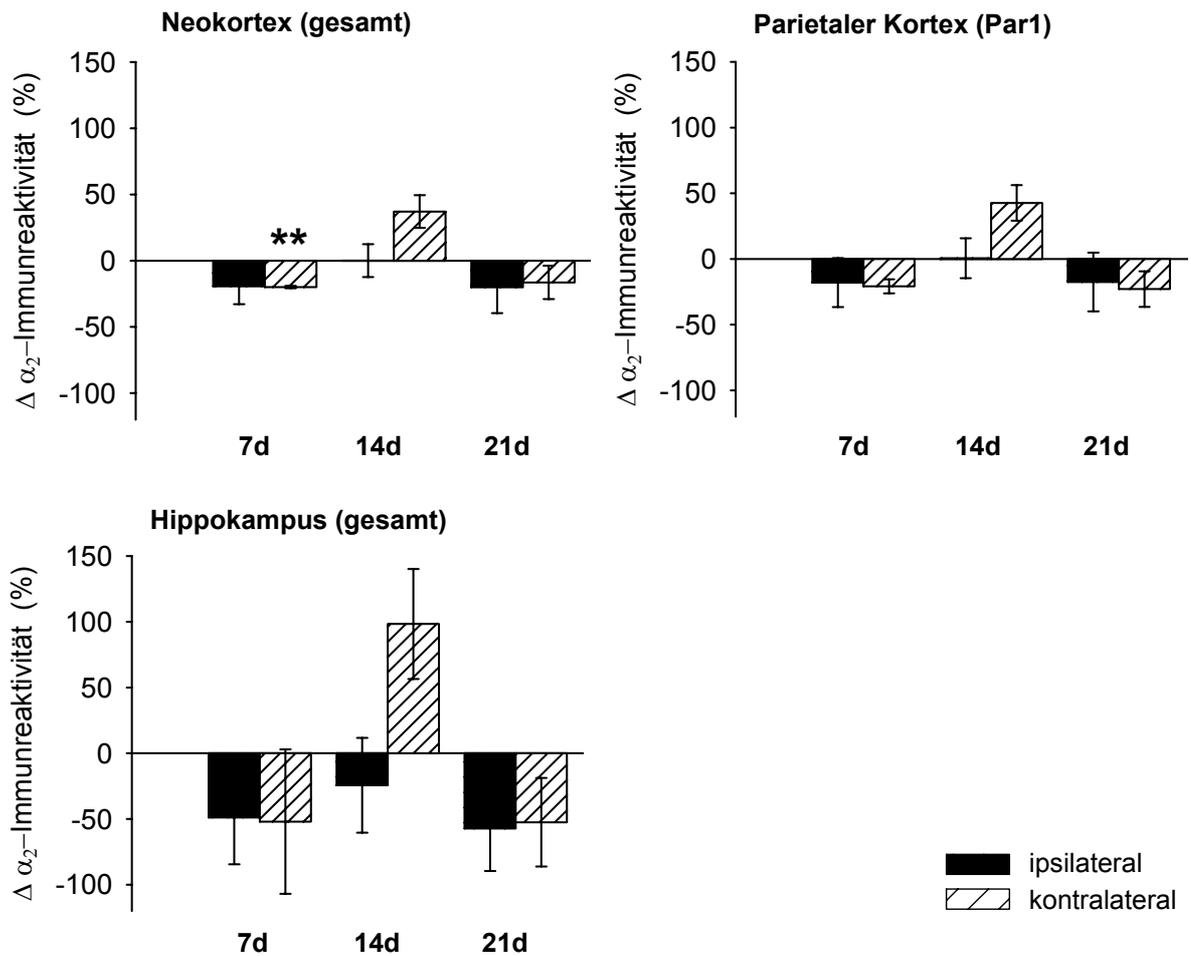


**Abb. 3.10** Die Abbildung zeigt die farbkodierte Darstellung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  bei Läsions- und Kontrolltieren in Koronarschnitten. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der  $\alpha_3$ -Expression an P7 und P21 bei Läsionstieren, wohingegen die optische Dichte an P14 kontralateral im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war. Die Dysplasie ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

### Expressionsmuster an P21

Das Verteilungsmuster der Untereinheit  $\alpha_3$  der P21-Kontrolltiere ( $n = 4$ ) unterschied sich geringfügig von dem der jüngeren Kontrollgruppen. In den neokortikalen Laminae V/ VI war die  $\alpha_3$ -Expression zwar höher als in den darüber liegenden Schichten, jedoch war die optische Dichte im parietalen Kortex etwas niedriger als in den umsäumenden Laminae V/ VI. Die Immunreaktivität der Basalganglien und des Hippokampus war im Vergleich zum 14. postnatalen Tag im Wesentlichen gleich geblieben (vgl. Abb. 3.9 und 3.10).

Bei allen Tieren mit einer kortikalen Malformation ( $n = 4$ ) konnte in den untersuchten Arealen bilateral eine geringere Expression von  $\alpha_3$  nachgewiesen werden. Im gesamten Neokortex verringerte sich die Immunreaktivität ipsi- und kontralateral um 20,1 % bzw. 16,4 % (vgl. Abb. 3.11). Die semiquantitative Messung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  ergab im parietalen Kortex eine Verminderung von 17,5 % ipsi- und 22,9 % kontralateral. Bei schwacher Expression im Hippokampus konnte dort im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion ipsi- und kontralateral um 57,2 % bzw. 52,5 % ermittelt werden. Lateral der schwach immunreaktiven Dysplasie ließ sich eine verminderte Rezeptordichte im parietalen Kortex, wie sie bei den Kontrollen bei insgesamt niedriger  $\alpha_3$ -Expression in den Laminae V/ VI beschrieben wurde, nicht beobachten. Die Immunreaktivität und das Verteilungsmuster medial der Malformation entsprachen dem kontralateralen Neokortex. Kontralateral war in den Laminae V/ VI der parietale Kortex nicht von anderen neokortikalen Arealen abzugrenzen. Die optische Dichte war in den Basalganglien im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert.



**Abb. 3.11** Veränderung der Immunreaktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_3$  in Neokortex, Par1 und Hippokampus im Vergleich zur Kontrolle nach fokalen kortikalen Dysplasien. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der semiquantitativ bestimmten optischen Dichte an P7 und P21 bei den Läsionstieren, wohingegen die optische Dichte an P14 kontralateral im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war.

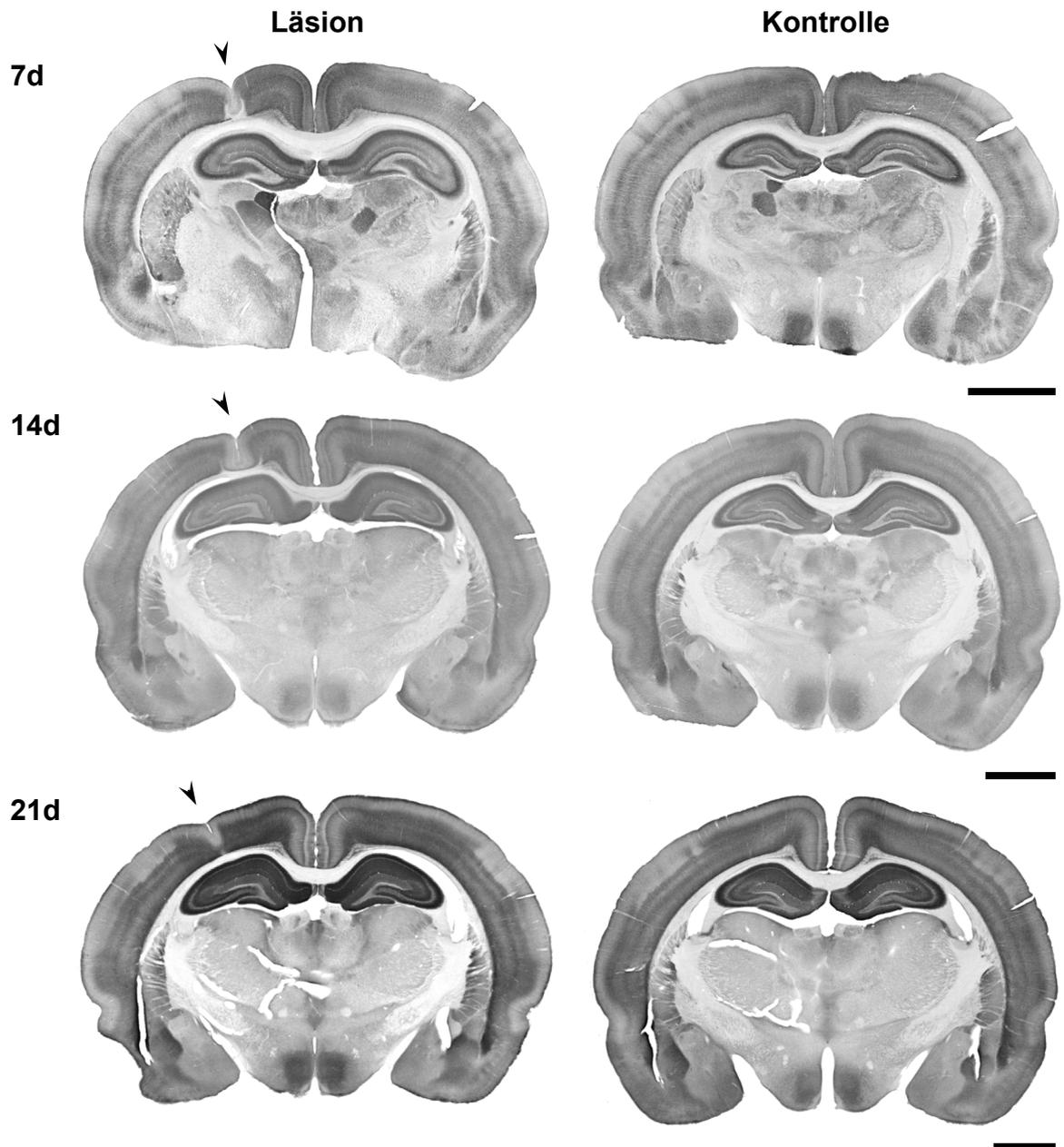
### 5.3.3 GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit $\alpha_5$

Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl bei Läsions- als auch Kontrolltieren ein der Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  komplementäres Verteilungsmuster.

#### **Expressionsmuster an P7**

Die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  wurde bei P7-Kontrolltieren (n = 4) in den Laminae III, V und VI des Neokortex und teilweise in den Basalganglien exprimiert. Vor allem im Bereich des retrosplenialen Kortex und der Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation war die Immunreaktivität im Vergleich zum lateral davon gelegenen Neokortex höher. Die optische Dichte dieser Untereinheit war in den oberen kortikalen Schichten und der Lamina IV sehr gering. Das Ammonhorn und der Gyrus dentatus des Hippokampus ließen sich durch  $\alpha_5$  sehr gut anfärben (vgl. Abb. 3.12 und 3.13).

Alle Läsionstiere (n = 2) wiesen im Vergleich zu den Kontrollen eine geringere Immunreaktivität auf. Im parietalen Kortex reduzierte sich die  $\alpha_5$ -Expression um 9,9 % ipsi- und 14,5 % kontralateral (vgl. Abb. 3.14). Die neokortikale Rezeptordichte war ipsilateral um 5,3 % vermindert, wobei sich lateral der schwach immunreaktiven Dysplasie noch weniger  $\alpha_5$ -positive Neurone nachweisen ließen als bei den scheinoperierten Ratten. Die Areale medial der Malformation waren etwas schwächer als bei den Kontrollen anzufärben. Im gesamten kontralateralen Neokortex war die Expression dieser Rezeptoruntereinheit um 11,3 % niedriger. Die kontralaterale Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation, sowie der retrospleniale Kortex der Läsionstiere zeigten eine höhere  $\alpha_5$ -Immunreaktivität als der parietale Kortex. Die kortikale Laminierung der Kontrolltiere blieb ipsi- und kontralateral erhalten. Im Hippokampus verringerte sich die Rezeptordichte hochsignifikant ipsi- und kontralateral um 12,1 % bzw. 21,3 % ( $p < 0,01$ ), wobei das Ammonhorn und der Gyrus dentatus weiterhin gut von anderen hippocampalen Strukturen abzugrenzen waren.

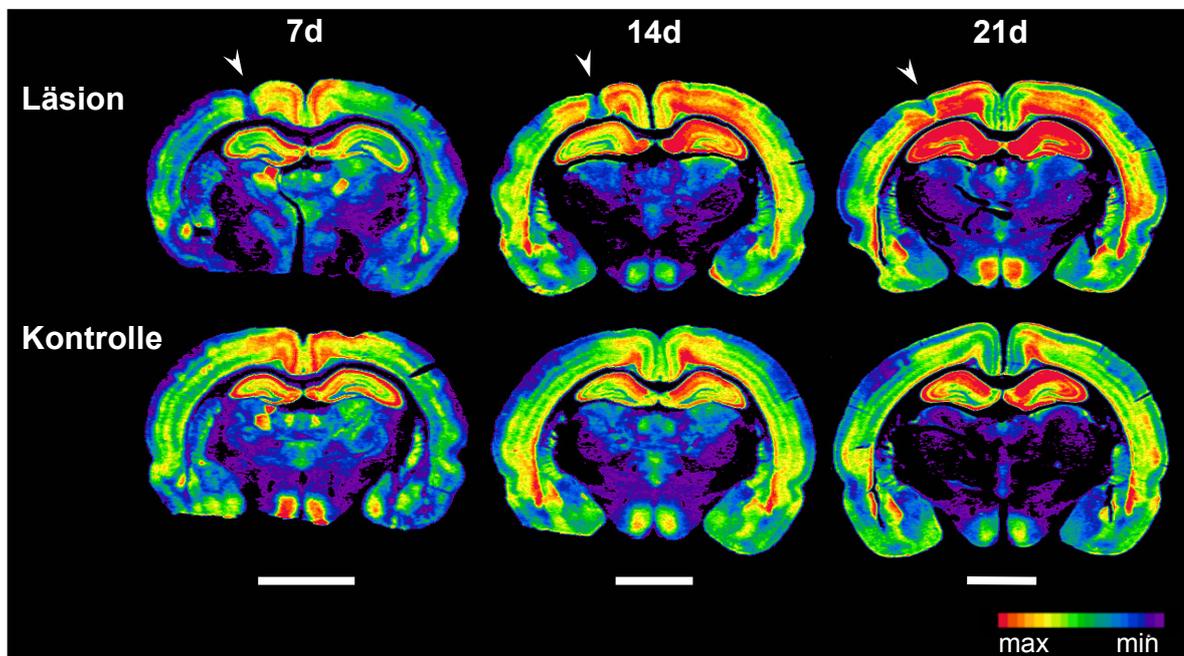


**Abb. 3.12** Die Abbildung zeigt die immunohistochemische Darstellung durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  in Koronarschnitten. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der  $\alpha_5$ -Expression an P7 im Gegensatz zu einer vermehrten an P14. Nach 21 Tagen zeigte sich in allen Arealen ipsilateral eine ausgeprägtere Anfärbbarkeit und kontralateral eine geringere. Die Dysplasie ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

### Expressionsmuster an P14

Das typische Verteilungsmuster der P7-Kontrolltiere fand sich bei den P14-Kontrolltieren ( $n = 3$ ) wieder. In den Laminae III, V und VI des Neokortex war die Immunreaktivität im Vergleich zu anderen Laminae ausgeprägter. Die Lamina IV des parietalen Kortex ließ weiterhin eine minimale Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  erkennen. Das Ammonhorn und der Gyrus dentatus, sowie der retrospleniale Kortex wiesen die höchste optische Dichte auf (vgl. Abb. 3.12 und 3.13).

Die neokorticale Expression der Untereinheit  $\alpha_5$  war bilateral bei allen Läsionstieren ( $n = 3$ ) gesteigert, wohingegen sich diese im Hippokampus nicht änderte. Im parietalen Kortex erhöhte sich die Immunreaktivität ipsi- und kontralateral um 21,1 % bzw. 22,5 % (vgl. Abb. 3.14). Dies hatte zur Folge, dass sich vor allem ipsilateral die Lamina IV weniger scharf von den umgebenden Laminae demarkierte. Die optische Dichte GABA<sub>A</sub>  $\alpha_5$  positiver Neurone war im gesamten Neokortex ipsi- um 10,9 % und kontralateral um 19,7 % höher als in der Kontrollgruppe. Medial und lateral der in geringem Maße  $\alpha_5$ -exprimierenden Dysplasie zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollen gesteigerte Rezeptordichte, die bis zum parietalen Kortex heranreichte.



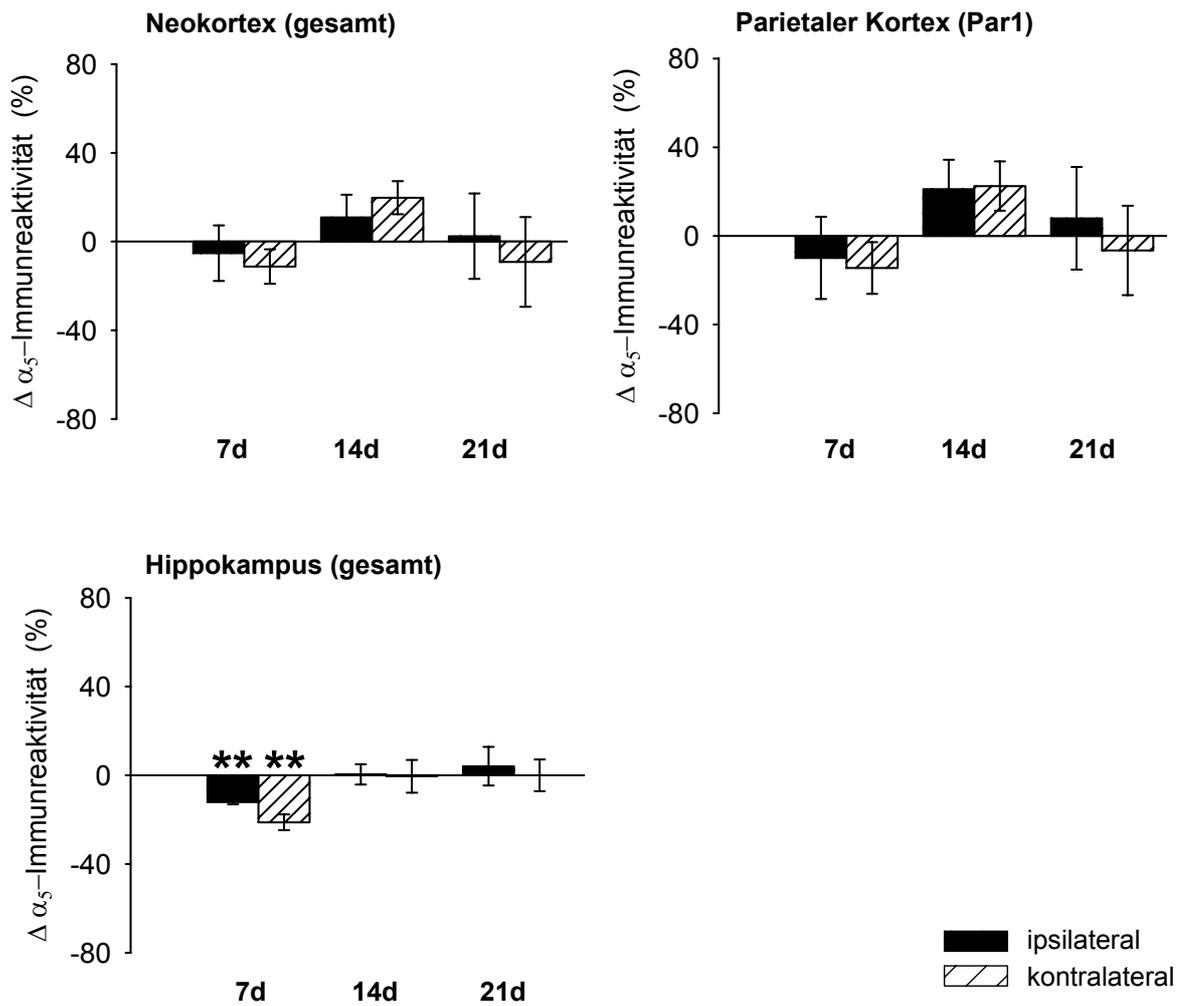
**Abb. 3.13** Die Abbildung zeigt die farbkodierte Darstellung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  bei Läsions- und Kontrolltieren in Koronarschnitten. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der  $\alpha_5$ -Expression an P7 im Gegensatz zu einer vermehrten an P14. Nach 21 Tagen zeigte sich in allen Arealen ipsilateral eine erhöhte optische Dichte und kontralateral eine geringere. Die Dysplasie ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2 mm.

Eine höhere  $\alpha_5$ -Immunreaktivität der kontralateralen Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation, sowie des retrosplenialen Kortex der Läsionstiere im Vergleich zum parietalen Kortex konnte beobachtet werden. Die Verteilung und Expression dieser Rezeptoruntereinheit blieb nach einer Gefrierläsion im Hippokampus bei einer Änderung der Immunreaktivität von + 0,4 % ipsi- und – 0,5% kontralateral im Wesentlichen gleich.

### **Expressionsmuster an P21**

Die P21-Kontrolltiere (n = 5) wiesen das typische Verteilungsmuster der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  der jüngeren Kontrolltiere auf. In den Laminae III, V und VI war diese Untereinheit vorwiegend exprimiert, im Gegensatz zur Lamina IV des parietalen Kortex und den oberen kortikalen Schichten, in denen  $\alpha_5$  eine geringe Immunreaktivität zeigte. Die immunhistochemische Färbung des Ammonhorns war intensiver als zu den anderen untersuchten Zeitpunkten (vgl. Abb. 3.12 und 3.13).

Im Vergleich zu den Kontrollen war nach 3 Wochen bei allen Ratten mit einer kortikalen Malformation (n = 4) die Expression der  $\alpha_5$ -Rezeptoruntereinheit ipsilateral in den untersuchten Arealen gesteigert, wohingegen die kontralaterale Hemisphäre eine verminderte optische Dichte und der kontralaterale Hippokampus keine Änderung zeigte. Die Immunreaktivität des parietalen Kortex war ipsilateral um 7,9 % erhöht und kontralateral um 6,6 % reduziert (vgl. Abb. 3.14). Die neokortikale Expression von  $\alpha_5$  war ipsi- um 2,4 % gesteigert und kontralateral um 9,2 % vermindert. Medial und lateral der kaum immunreaktiven Dysplasie konnte eine im Vergleich zu den Kontrollen höhere, sich bis an den parietalen Kortex erstreckende Rezeptordichte, belegt werden. Durch semiquantitative Bestimmung der optischen Dichte konnte wie bei den Läsionstieren an P7 und P14 eine vermehrte  $\alpha_5$ -Immunreaktivität der kontralateralen Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation, sowie des retrosplenialen Kortex, nachgewiesen werden. Die  $\alpha_5$ -Expression des ipsilateralen Hippokampus war um 4,1 % gesteigert, wohingegen diese kontralateral gleich blieb. Die Rezeptoruntereinheit war vorwiegend, wie bei den Kontrollen und zu früheren Zeitpunkten, im Ammonhorn und Gyrus dentatus vertreten.



**Abb. 3.14** Veränderung der Immunreaktivität der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  in Neokortex, Par1 und Hippokampus im Vergleich zur Kontrolle nach fokalen kortikalen Dysplasien. Ipsi- und kontralaterale Verminderung der  $\alpha_5$ -Expression an P7 im Gegensatz zu einer vermehrten an P14. Nach 21 Tagen zeigte sich in allen Arealen ipsilateral eine erhöhte Immunreaktivität und kontralateral eine geringere.

#### 5.4 Veränderungen des Barrelfields

Der gesamte somatosensorische Kortex der Ratte ist somatotop organisiert (Killackey und Belford 1979). Aufgrund dieser kortikalen Organisation sind die Vibrissen ihrer Lokalisation entsprechend durch je ein Barrel repräsentiert, das seine Afferenzen aus dem ebenfalls somatotop organisierten Thalamus erhält. Ein Barrel ist definiert als eine Aggregation von Neuronen in der Lamina IV. Die kortikale Repräsentation der 36 Vibrissen ist in ihrer Gesamtheit im PMBSF (Posteromedialen Barrel-Subfield) zusammengefasst.

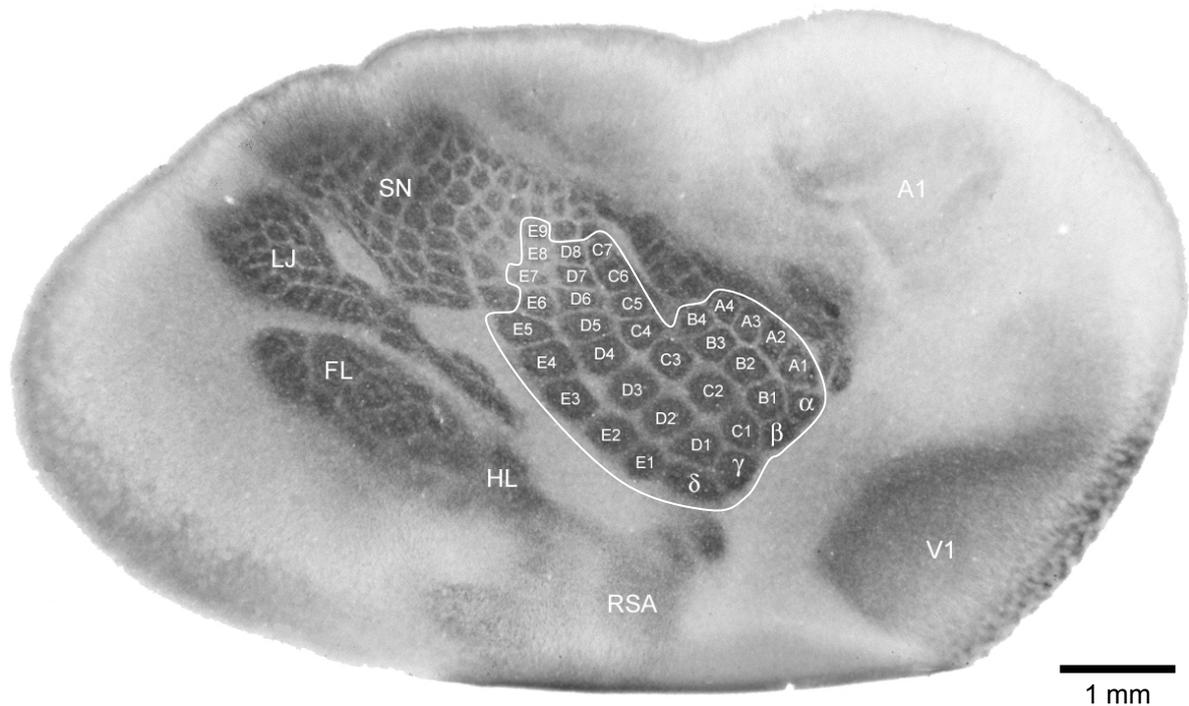
Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Veränderungen des PMBSF nach Gefrierläsionen, da sich die Funktions-Strukturbeziehungen des Gehirns anhand dessen sehr gut charakterisieren lassen (Jacobs et al. 1999 a, Rosen et al. 2001).

##### 5.4.1 Morphologie der Hemisphäre von Kontrolltieren

Insgesamt wurden von acht Hirnen (P7, n = 5; P14, n = 3) scheinoperierter Ratten Tangentialschnitte angefertigt. Durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  konnte der somatosensorische Kortex (S1) bestehend aus PMBSF, Repräsentation der Hinter- und Vorderpfote, Unterkiefer und Schnauze in Lamina IV dargestellt werden. Darüber hinaus konnte der visuelle, auditorische und retrospleniale Kortex nachgewiesen werden (Abb. 3.15).

Eine immunhistochemische Markierung kortikaler Areale durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  gelang nur zu den Zeitpunkten P7 und P14. Derselbe Nachweis war bei 21 Tage alten Tieren nicht zu erbringen, weil die oben beschriebenen Areale nicht mehr eindeutig von ihrer Umgebung abzugrenzen waren. Eine tendenziell homogenere Färbung der Schnitte durch eine ubiquitäre Expression dieser Untereinheit war schon nach dem 14. Tag zu beobachten, wobei sich das Barrelfield noch ausreichend demarkierte (Fritschy et al. 1994).

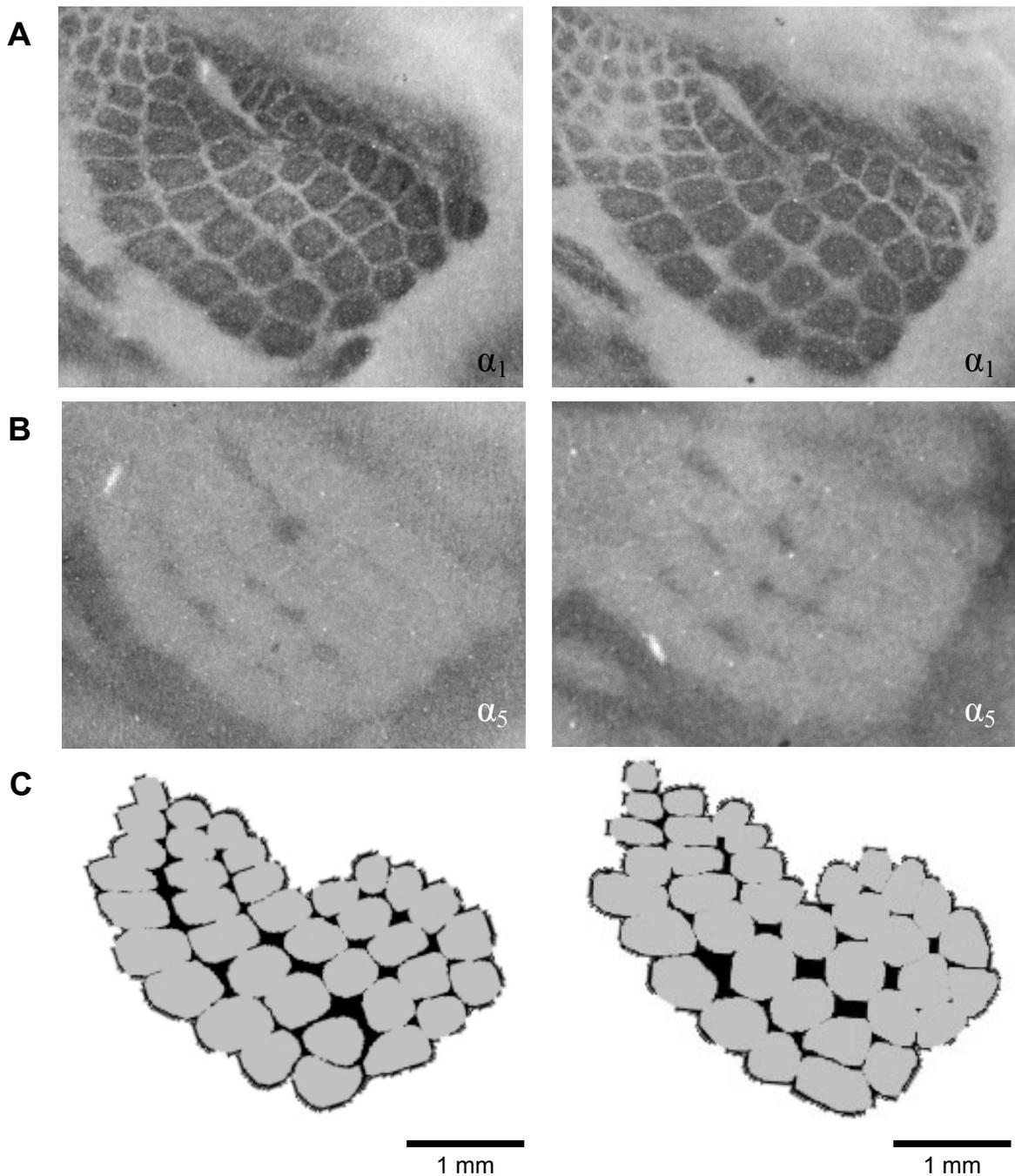
Es bestanden keine morphologischen Unterschiede zwischen den ipsi- und kontralateralen Hemisphären der Kontrolltiere (Abb. 3.16A, 3.17A). Diese Hemisphären wiesen an P7 und P14 36 Barrels auf, mit Ausnahme von zwei 14 Tage alten Kontrolltieren, bei denen nur 35 Barrels nachzuweisen waren. Geringe Abweichungen der Anzahl der Barrels bei Kontrolltieren sind beschrieben (Jacobs et al. 1999 a, Rosen et al. 2001).



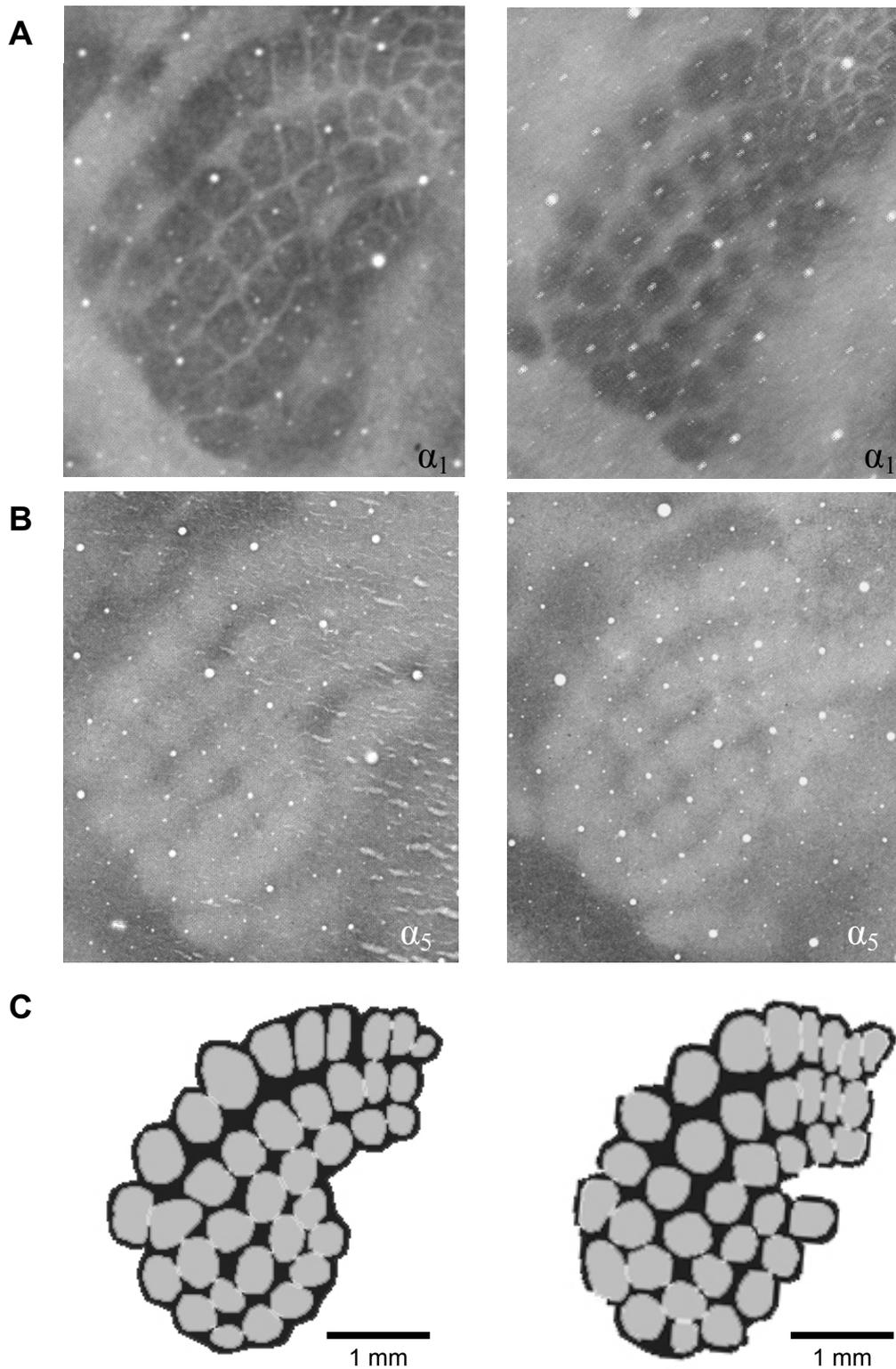
**Abb. 3.15** Somatotopie des Barrellfields. Durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  wurden PMBSF (umrandet), Hinter- (HL) und Vorderpfote (FL), Unterkiefer (LJ) und Schnauze (SN) sowie visueller (V1), auditorischer (A1), retrosplenialer (RSA) in der Hemisphäre eines Kontrolltieres (P7) dargestellt.

Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$  und  $\alpha_5$  zeigten ein komplementäres Verteilungsmuster. Die Untereinheit  $\alpha_5$  markierte selektiv die Septen des PMBSF in einem folgenden Tangentialschnitt des gleichen Hirns (Abb. 3.16B, 3.17B). In Arealen hoher  $\alpha_1$ -Expression war  $\alpha_5$  fast vollständig supprimiert, im Gegensatz hierzu konnte in Regionen hoher  $\alpha_5$ -Immunreaktivität die Untereinheit  $\alpha_1$  kaum nachgewiesen werden (vgl. Paysan et. al. 1997).

Die durch das Neurolucida-System erfolgte Rekonstruktion des PMBSF in Abb. 3.16C bzw. 3.17C entsprach der Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  in Abb. 3.16A bzw. 3.17A und erlaubte die morphometrische Vermessung des Flächeninhalts der Barrels bzw. des Barrellfields und der Septen. Bei den 14 Tage alten Tieren wurde darüber hinaus, im Vergleich zu den eine Woche alten Tieren, eine prominentere Vaskularisierung des Gehirns und eine bilaterale Vergrößerung Fläche des PMBSF ersichtlich (vgl. Abb. 3.17).



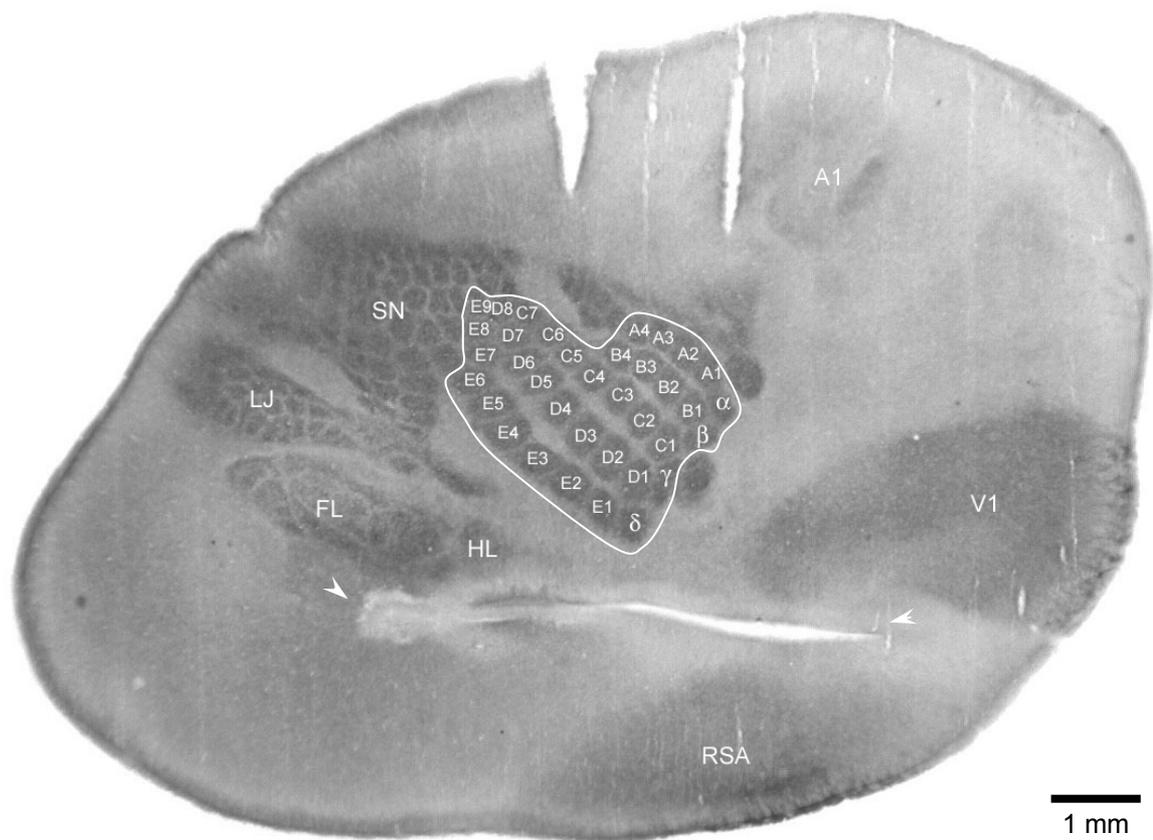
**Abb. 3.16** Komplementäre Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$  (A) und  $\alpha_5$  (B) und Rekonstruktion (C) des PMBSF bei einem P7 Kontrolltier in Tangentialschnitten (links ipsi- und rechts kontralateral gespiegelt).



**Abb. 3.17** Komplementäre Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$  (A) und  $\alpha_5$  (B) und Rekonstruktion (C) des PMBSF bei einem P14 Kontrolltier in Tangentialschnitten (links ipsi- und rechts kontralateral gespiegelt).

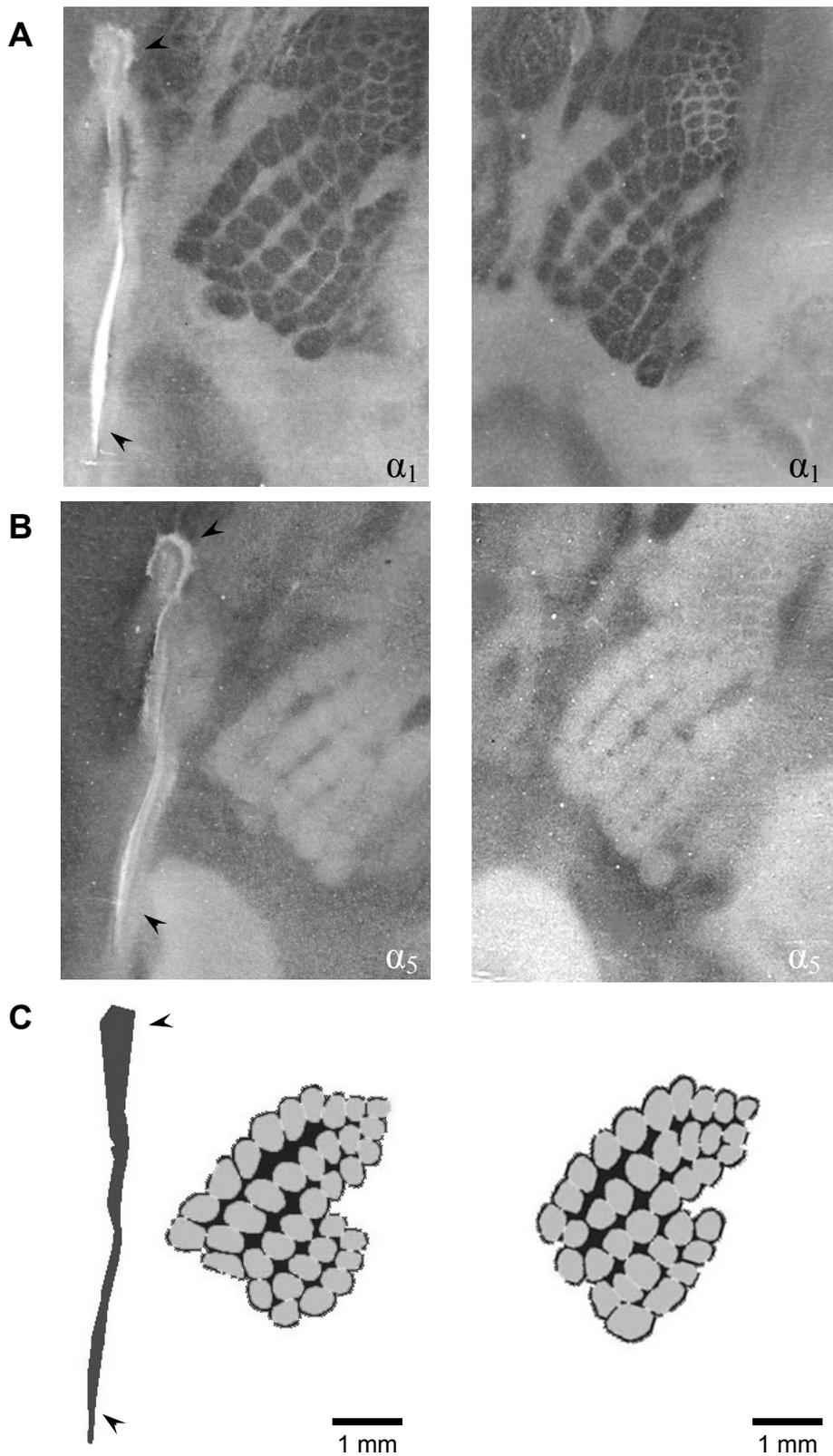
### 5.4.2 Morphologie der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre von Läsionstieren

Bei neun (P7, n = 5; P14, n = 4) Läsionstieren wurden die Hirne tangential geschnitten. In der dysplastischen Hemisphäre konnte ebenfalls durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  der somatosensorische Kortex (S1) bestehend aus PMBSF, Repräsentation der Hinter- und Vorderpfote, Unterkiefer, Schnauze in Lamina IV, sowie visueller, auditorischer und retrosplenialer Kortex dargestellt werden. Die Malformation demarkierte sich durch geringe Immunreaktivität von der Umgebung (Abb. 3.18).

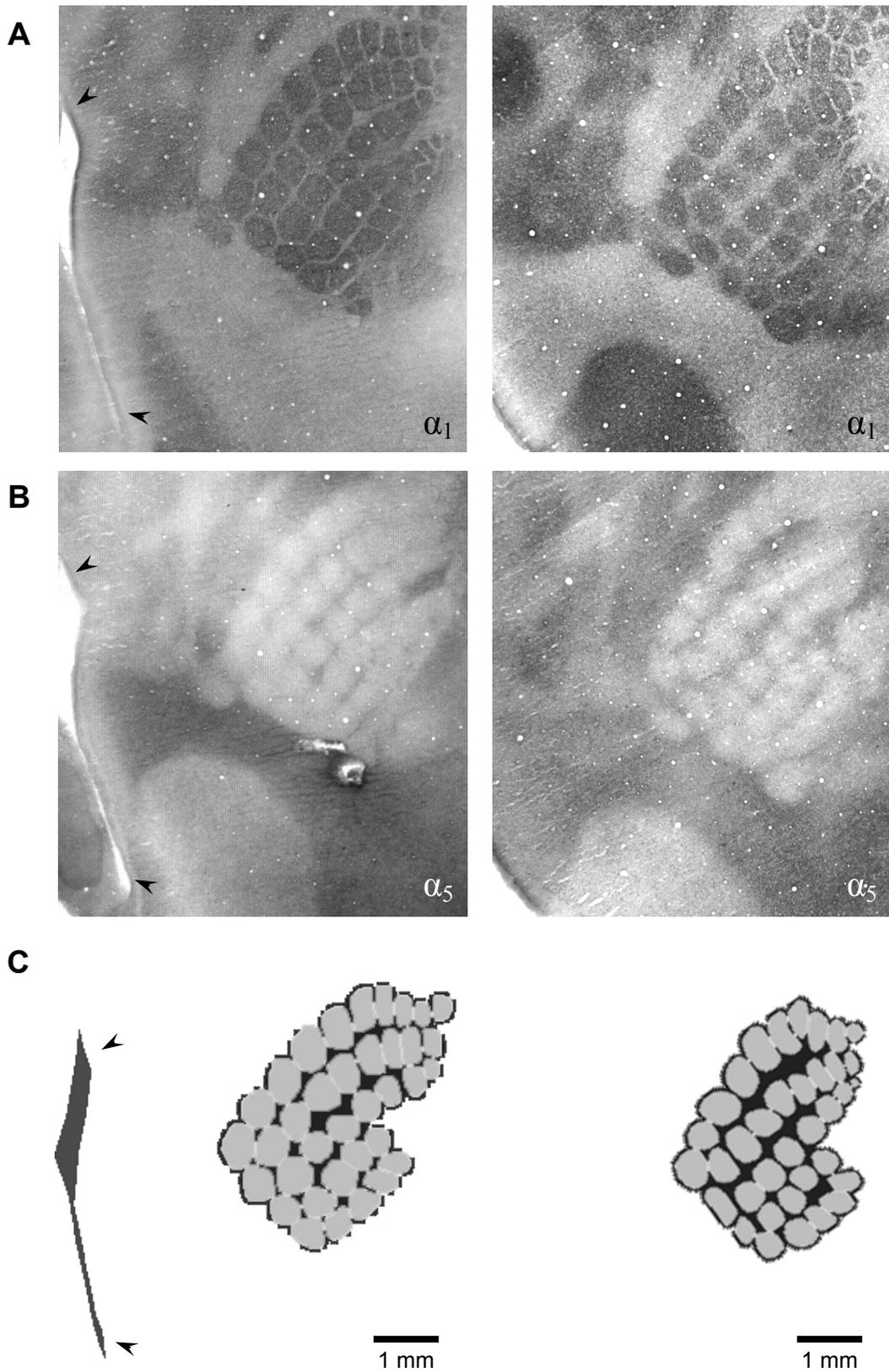


**Abb. 3.18** Somatotopie des Barrefields einer dysplastischen Hemisphäre (P7). Durch die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  wurden PMBSF (umrandet), Hinter- (HL) und Vorderpfote (FL), Unterkiefer (LJ) und Schnauze (SN) sowie visueller (V1), auditorischer (A1), retrosplenialer (RSA) dargestellt. Die Dysplasie (Pfeilspitzen) weist minimale Immunreaktivität auf.

Die 3-5 mm lange und ca. 1 mm breite Dysplasie, die durch Gefrierläsion induziert wurde, betraf Vorder- und Hinterpfotenrepräsentation sowie den sekundären okzipitalen Kortex.



**Abb. 3.20** Darstellung des PMBSF durch die komplementäre Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$  (A) und  $\alpha_5$  (B) und Rekonstruktion (C) bei einem P7 Läsionstier in Tangentialschnitten (links ipsi- und rechts kontralateral gespiegelt). Die Dysplasie ist durch zwei Pfeilspitzen gekennzeichnet.



**Abb. 3.19** Darstellung des PMBSF durch die komplementäre Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$  (A) und  $\alpha_5$  (B) und Rekonstruktion (C) bei einem P14 Läsionstier (links ipsi- und rechts kontralateral gespiegelt). Die Dysplasie ist durch zwei Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Der Barrel-Kortex und andere kortikale Areale konnten bei Läsionstieren durch die Untereinheit  $\alpha_1$  aus o.g. Gründen nur zu den Zeitpunkten P7 und P14 dargestellt werden. Es zeigte sich, wie in der Kontrollgruppe, eine komplementäre Verteilung der Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$  und  $\alpha_5$  (Abb. 3.19, 3.20 A u. B).

Nach 2 Wochen war auch bei Ratten mit einer dysplastischen Hemisphäre eine deutlichere Gefäßzeichnung und eine bilaterale Vergrößerung der Fläche des PMBSF im Vergleich zu den jüngeren Tieren zu erkennen.

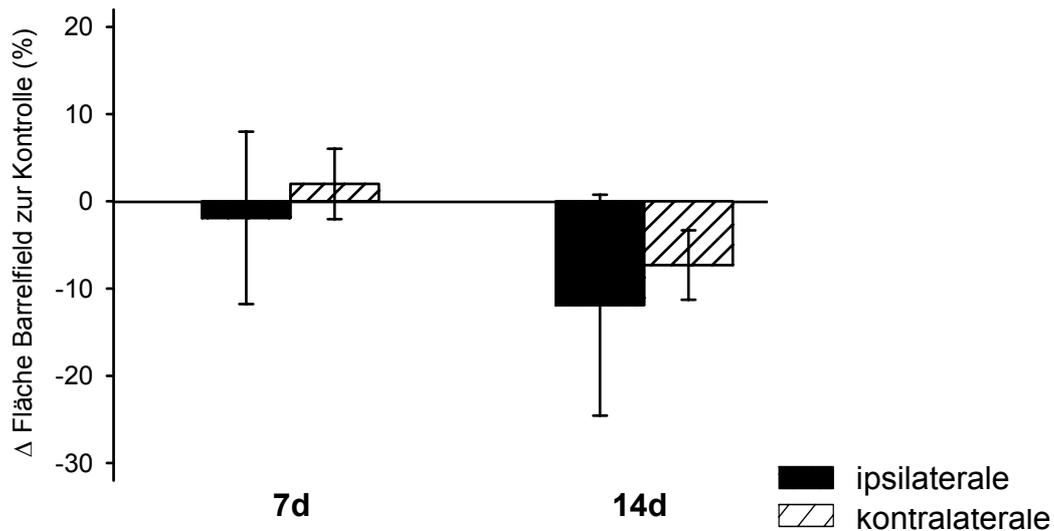
Die kontralateralen Hemisphären der Läsionstiere unterschieden sich morphologisch nicht von denen der scheinoperierten Ratten.

#### 5.4.3 Morphometrie des Barreelfields nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien

Der Fläche des PMBSF entspricht dem Flächeninhalt aller Barrels und wurde, wie die Septen, durch die Neuroexplorer-Software errechnet.

#### **Veränderung des Barreelfields an P7**

Die dysplastischen Hemisphären wiesen weniger Barrels (MW 34,8) im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre und der Kontrollgruppe auf, bei denen jeweils 36 Barrels gezählt wurden. Bei zwei Ratten wurden 32 bzw. 34 Barrels gefunden. Die ipsi- und kontralateralen Flächen des Barreelfields blieben im wesentlichen unverändert, da lediglich minimale Änderungen mit uneinheitlicher Tendenz festgestellt wurden. Die Fläche des Barreelfields der dysplastischen Hemisphäre an P7 verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle ( $2,07 \text{ mm}^2$ ) um 1,9 %. Das Barreelfield der kontralateralen Hemisphäre der Läsionstiere war 2,0 % größer als das kontralaterale PMBSF ( $2,18 \text{ mm}^2$ ) der scheinoperierten Ratten (vgl. Abb 3.21). Die Septen des Barreelfields verringerten sich im Vergleich zu den Hemisphären der Kontrolltiere ipsi- und kontralateral um 4,4 % (MW  $1,04 \text{ mm}^2$ ) bzw. 6,0 % (MW  $1,13 \text{ mm}^2$ ).



**Abb. 3.21** Veränderung der Fläche des Barrefields der ipsi- und kontralateralen Hemisphären an P7 und P14. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardmeßfehler angegeben.

### Veränderung des Barrefields an P14

Bei den P14-Läsionstieren fiel wie an P7 eine Verringerung der Anzahl der Barrels der dysplastischen Hemisphäre (MW 35,25) auf, wobei ähnliches auch für die ipsilaterale Hemisphäre der Kontrollgruppe (MW 35,3) nachzuweisen war. An P14 war die Fläche des ipsilateralen Barrefields im Vergleich zu den Kontrolltieren bei einem Grossteil der Ratten reduziert. Die Fläche war um 11,9 % kleiner als die der Kontrolltiere (MW 3,06 mm<sup>2</sup>). Das kontralaterale PMBSF maß 2,9 mm<sup>2</sup>, was einer Verminderung von 7,3 % entsprach. Der Flächeninhalt der Septen betrug ipsi- und kontralateral 1,26 mm<sup>2</sup> bzw. 1,46 mm<sup>2</sup>, d.h. die Septen verkleinerten sich im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren um 18,6 % bzw. 7,7 %. Allerdings konnte in beiden Fällen kein Signifikanzniveau (student t-test) erreicht werden.

Erst nach 14 Tagen wurde dem Trend nach eine Verkleinerung des Barrefields von Läsionstieren ersichtlich, wohingegen sich eine Verringerung der Fläche der Septen schon nach 7 Tagen zeigte. Diese Tendenz war an P14 deutlich ausgeprägter.

## **6. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde nach experimenteller Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie eine gestörte Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten während der ersten 21 Lebenstage beobachtet.

Bei den Kontrolltieren zeigte sich ein altersabhängiges Verteilungsmuster der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$ . Die Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  wurde mit dem Alter zunehmend neokortikal und besonders im Barreldfeld der Lamina IV exprimiert. Ab der 2. Woche konnte ein vermehrtes Vorkommen der Untereinheit  $\alpha_3$  vor allem in den Laminae V und VI gezeigt werden. Die zu  $\alpha_1$  komplementäre Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  wies zu allen untersuchten Zeitpunkten eine unveränderte Expression besonders in den Laminae III, V und VI auf.

Nach Induktion einer Gefrierläsion war das typische Verteilungsmuster nicht nur im Bereich der Dysplasie verändert, sondern das gestörte Verteilungsmuster betraf bihemisphärisch sowohl benachbarte als auch entfernte neokortikale Areale und den Hippokampus. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  war bis zum 14. Tag bilateral neokortikal und im Hippokampus herunterreguliert, wohingegen sie nach 3 Wochen in allen Arealen stärker exprimiert wurde. Die Untereinheit  $\alpha_3$  zeigte am 7. und 21. Tag bihemisphärisch ein schwächeres Expressionsmuster. Jedoch wurde diese nach 2 Wochen kontralateral in allen Regionen vermehrt nachgewiesen. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_5$  war nach 7 Tagen bihemisphärisch reduziert, während der Neokortex nach 14 Tagen bilateral eine vermehrte Expression erkennen ließ. Nach 21 Tagen wies  $\alpha_5$  ipsilateral eine vermehrtes und kontralateral ein verringertes Vorkommen in neokortikalen Arealen auf.

Trotz dieser weitreichenden Veränderungen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten blieb die typische Struktur des somatosensorischen Kortex in der Umgebung der Malformation weitgehend erhalten. Lediglich die Flächen des posteriomedialen Barrel-Subfields und der Septen waren nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie bilateral im Areal der Repräsentation der Vorder- bzw. Hinterpfote nach 1 und 2 Wochen vermindert. Die Anzahl der Barrels war zu beiden untersuchten Zeitpunkten leicht reduziert. Nebenbefundlich zu diesen spezifischen Veränderungen zeigte sich eine Verminderung des Körper- und Hirngewicht der Läsionstiere bis zum 14. postnatalen Tag, wohingegen diese nach 3 Wochen nicht mehr nachzuweisen war.

### 6.1 Gestörte Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten

Als Folge einer Störung der kortikalen Organisation nach Induktion einer fokalen Dysplasie wurden immunhistochemisch weitreichende Veränderungen der Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten beobachtet. Das gestörte Verteilungsmuster der Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  ließ sich bihemisphärisch in benachbarten und entfernten neokortikalen Arealen sowie im Hippokampus nach Induktion einer kortikalen fokalen Dysplasie belegen. Redecker und Kollegen beschrieben bei adulten Ratten eine verminderte Expression fünf verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten, die nicht nur auf den ipsilateralen Neokortex beschränkt war. Ein gestörtes Verteilungsmuster war außerdem im ipsilateralen Hippokampus und in den kontralateralen frontalen und parietalen Kortex immunhistochemisch nachzuweisen (Redecker et al. 2000 a).

Immunhistochemisch wurde eine lokal im Bereich des Mikrogyrus gestörte Verteilung verschiedener NMDA-, AMPA- und Kainatrezeptoruntereinheiten des Glutamatrezeptors nachgewiesen. In entfernten kortikalen Arealen wurden keine Veränderungen der Expression dieser Untereinheiten festgestellt (Hagemann et al. 2003).

Ein anderes Modell neuronaler Migrationstörungen zeigte nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien durch Ibotensäure einen Mikrosulkus, ektopische Neurone in oberflächlichen Schichten und einen Verlust von Neuronen v.a. in den Laminae V und VIa bei gleichzeitiger Verbreiterung der Laminae II und III. Im Gegensatz zum Gefrierläsionsmodell wurden immunhistochemisch eine Modulation der Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten der ipsilateralen Hemisphäre, aber keine weitreichenden Veränderungen in entfernten Arealen festgestellt (Redecker et al. 1998 a und b, Hagemann et al. 2001).

Dysplastische Kortex zeigen ein Ungleichgewicht zwischen GABA-erger Inhibition und Glutamat vermittelter Exzitation, was in autoradiographischen Untersuchungen durch verminderte Bindung von Muscimol und Baclofen an GABA<sub>A</sub> bzw. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren und vermehrte Bindung spezifischer Liganden an exzitatorischen AMPA- und Kainat-Rezeptoren in der ipsilateralen Hemisphäre nachgewiesen wurde. Darüber hinaus war die Bindung von MK-801 an exzitatorischen NMDA-Rezeptoren lediglich im dysplastischen Areal erhöht (Zilles et al. 1998). Darüber hinaus belegten Krämer und Mitarbeiter in autoradiographischen Messungen einen signifikant reduzierten Glucose-Metabolismus bis zu 1 mm lateral der Dysplasie (Krämer et al. 2001).

Weitreichende Veränderungen der GABA-Rezeptoren bzw. deren Untereinheiten sind nicht nur nach Induktion einer fokalen Dysplasie nachweisbar, sondern wurden rezeptorautoradiographisch ebenfalls für akute fokale kortikale Läsionen bei adulten Ratten gezeigt (Witte et al. 1997, Que et al. 1999).

Bei autoradiographischen Verfahren ist jedoch unklar, inwieweit eine vermehrte bzw. verminderte Bindungsdichte des spezifischen Liganden, auf eine veränderte Anzahl der Rezeptoren und/ oder auf eine durch die Läsion veränderte Affinität zurückzuführen ist (Zilles et al. 1998, Hagemann et al. 2003). Das Bindungsverhalten des Liganden an den Rezeptor ist u.a. abhängig von der Zusammensetzung (Barnard et al. 1998, Narahashi 1999) und posttranslationalen Modifikationen der einzelnen Untereinheiten (Unnerstall et al. 1981). Immunhistochemische Studien erlauben im Gegensatz dazu Rückschlüsse über die Expression von Proteinen der Zellmembran, wie einzelnen Rezeptoruntereinheiten, unabhängig von den funktionellen Eigenschaften eines Rezeptors (Hagemann et al. 2003).

Die Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors sind zwar weitgehend unbekannt, jedoch ist gesichert, dass die verschiedenen Untereinheiten die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors beeinflussen (Wisden und Seeburg 1992, Barnard et al. 1998). In pharmakologischen Studien ergaben sich Hinweise auf eine reduzierte Affinität des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors für den Benzodiazepin-Rezeptoragonisten Zolpidem nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie, die auf Veränderungen der Zusammensetzung der  $\alpha$ -Untereinheiten in der paramikrogyralen Zone zurückgeführt werden (de Fazio und Hablitz 1999), sowie auf eine gesteigerte Sensitivität des NMDA-Rezeptorsubtyps NR2B für den Antagonisten Ifenprodil (Hablitz und de Fazio 2000). Die verminderte Expression von  $\alpha_1$ , was in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde, könnte die reduzierte Affinität des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors für Zolpidem erklären, da  $\alpha_1$  im Vergleich zu den Untereinheiten  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  eine höhere Affinität besitzt (Lüddens et al. 1995).

Die in dieser Studie beschriebene ausgedehnte Modulation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ist ein Hinweis auf eine möglicherweise verzögerte Entwicklung des Hirns. Die bei Kontrolltieren unmittelbar nach der Geburt kaum nachweisbare Untereinheit  $\alpha_1$  wird im Lauf der ersten Lebenswochen verstärkt exprimiert, wohingegen die unmittelbar postnatal auf hohem Niveau exprimierte Untereinheit  $\alpha_2$  nach 14 Tagen nahezu verschwunden ist (Fritschy et al. 1994). Jedoch wurde nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie in den ersten 2 Wochen ein bihemisphärisch vermindertes Vorkommen und nach 21 Tagen eine

vermehrte, eventuell kompensatorisch gesteigerte Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  beobachtet. Die bei Kontrolltieren zu erwartende vorübergehende Hyperexpression der Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  während der ersten Tage blieb aus (Paysan et al. 1994). Jedoch wurde mit 2-wöchiger Verzögerung ein vermehrtes Vorkommen dieser Untereinheiten in neokortikalen Arealen gezeigt, was die These einer verzögerten Hirnentwicklung unterstützt.

Nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien wurde immunhistochemisch ein transient reduziertes Vorkommen des spezifisch Calcium bindenden Proteins Parvalbumin im Mikrogryrus und in der paramikrogyralen Zone nachgewiesen. Die zeitweilige Verminderung Parvalbumin-positiver Interneurone, die zu fast 100 % den Neurotransmitter GABA ko-exprimieren (Ren et al. 1992), war nach 21 Tagen nicht mehr zu belegen. Überraschenderweise zeigten diese Ratten ein normalisiertes adultes Verteilungsmuster, das von diesem Zeitpunkt an auch bei Kontrolltieren zu beobachten war (Jacobs et al. 1996). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Modulation und der Entwicklungsverzögerung präsynaptischer und postsynaptischer GABA-erger Mechanismen, indem präsynaptische inhibitorische Interneurone verzögert exprimiert werden und derart postsynaptisch die Zusammensetzung der Untereinheiten der Rezeptoren beeinflussen.

Autoradiographische Studien der mRNA-Transkription bei Kontrolltieren ergaben eine Expression von  $\alpha_3$  auf hohem Niveau während der prä- und frühen postnatalen Entwicklung, die allerdings nach 12 Tagen vermindert war und anschließend in wenigen Tagen ein niedriges adultes Niveau erreichte (Laurie et al. 1992). Eine mögliche Retardierung der Hirnentwicklung lässt sich in der vorliegenden Arbeit auch an dieser Untereinheit belegen, da  $\alpha_3$  während der ersten Woche im Neokortex bilateral reduziert war, nach einer weiteren Woche in der kontralateralen Hemisphäre vermehrt vorkam und nach 21 Tagen bihemisphärisch geringer exprimiert wurde.

Unter Annahme einer verzögerten Hirnentwicklung ist zu berücksichtigen, dass GABA in der Embryonal- und frühen Postnatalphase bei Säugetieren kein inhibitorischer, sondern ein exzitatorischer Neurotransmitter ist, was möglicherweise ein Grund für das Auftreten von Hyperexzitabilität ist (Ben-Ari et al. 1997, Barnard et al. 1998). Nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien wurde eine ausgeprägte Hyperexzitabilität in den Laminae II/III der paramikrogyralen Zone beobachtet (Jacobs et al. 1996 und 1999 a, Hablitz und de

Fazio 1998, Luhmann et al. 1998 a und b, Redecker et al. 1998, Quill et al. 2002). Verschiedene Studien belegen, dass sich diese von der mikroskopisch intakten paramikrogyralen Zone mit der typischen Schichtung ausbreitet (Luhmann und Raabe 1996, Luhmann et al. 1998 b, Jacobs et al. 1999 a). Ein Erklärungsansatz dieses Befundes liegt in der aberranten Konnektivität thalamischer Afferenzen, da diese aufgrund der Läsion nicht in den Mikrogyrus, sondern in die anliegende paramikrogyrale Zone einsprossen (Jacobs et al. 1996 und 2000, Zilles et al., 1998). In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde bestätigt, dass diese lang anhaltenden multiphasischen Feldpotentiale der interiktalen epileptiformen Aktivität in chronischen Epilepsie-Modellen sehr ähnlich sind (Prince und Tseng 1993, Hoffman et al. 1994). Eine persistierende epileptiforme Aktivität war erst nach 12 Tagen durch Stimulation in Lamina VI zu evozieren (Jacobs et al. 1996), obwohl ein vollständig ausgeprägter Mikrogyrus bereits nach einer Woche nachzuweisen war. Als grundlegender pathogenetischer Faktor der Hyperexzitabilität ist das in dysplastischen Kortizes nachgewiesene Ungleichgewicht zwischen GABA-erger Inhibition und Glutamat vermittelter Exzitation bekannt (Luhmann et al. 1998 a und b). In-vitro-Untersuchungen zeigten in Kontrollpräparaten synchronisierten Entladungen ähnlich einer fokalen Epilepsie nach gestörter Inhibition durch Applikation des GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Bicullin (Chagnac-Amitai und Connors 1989).

Die Propagation epileptiformer Potenziale über den Kortex bis zu 3,5 mm in mediolateraler Richtung wird durch AMPA-Rezeptoren ermöglicht, was durch Blockade dieser Rezeptoren in extrazellulären elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigt wurde (Luhmann und Raabe 1996, Luhmann et al. 1998 a). Weiterhin wurde in intrazellulären Ableitungen nachgewiesen, dass die über NMDA-Rezeptoren vermittelte Exzitation gesteigert ist (Luhmann et al. 1998 b). In extrazellulären Ableitungen wurde nach Induktion fokaler kortikaler Dysplasien durch Ibotensäure eine NMDA-abhängige Hyperexzitabilität auch in entfernten kortikalen Arealen beobachtet (Redecker et al. 1998 a und b). Im Gegensatz zum Gefrierläsionsmodell scheint das inhibitorische Netzwerk in der Umgebung der Dysplasie nach Injektion von Ibotensäure funktionell intakt (Hagemann et al. 2000 b).

Darüber hinaus ist eine Dysfunktion der GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren anzunehmen, die in intrazellulären elektrophysiologischen Studien aufgrund einer reduzierten

glutamatergen Exzitation schwächere oder sogar fehlende inhibitorische postsynaptische Potentiale zeigten (Luhmann et al. 1998 b). Diese Disinhibition könnte aus einer Veränderung des Chloridgradienten über der Membran, einer Dephosphorylierung oder einer modulierten Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten (Stelzer et al. 1988, Chen et al. 1990, Barnard et al. 1998), sowie einem Verlust des GABA-Rezeptors resultieren (Zilles et al. 1998). Eine veränderte Komposition der Rezeptoruntereinheiten beeinflusst die elektrophysiologischen Eigenschaften des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (Barnard et al. 1998, Crino et al. 2001) und könnte somit durch eine modulierte Inhibition eine Hyperexzitabilität bedingen. Die Ausbreitung epileptiformer Aktivität wird möglicherweise durch ein in entfernten kortikalen Arealen verändertes Verteilungsmuster der Rezeptoruntereinheiten zusätzlich begünstigt.

### 6.2 Verkleinerung der Fläche des posteromedialen Barrel-Subfields und der Septen

Nach 7 und 14 Tagen wurde bilateral eine tendenzielle Verminderung der Flächen des posteromedialen Barrel-Subfields und der Septen der dysplastischen Hemisphäre in Tangentialschnitten festgestellt. Die typische Struktur des Barreelfields in der Umgebung der Malformation blieb mit Ausnahme weniger fehlender Barrels in der ipsilateralen Hemisphäre erhalten, da die Gefrierläsion nicht im somatosensorischen Kortex, sondern lateral davon überwiegend im Areal der Repräsentation der Vorder- bzw. Hinterpfote aufgebracht wurde. Geringe Abweichungen der Anzahl der Barrels auch bei Kontrolltieren sind beschrieben (Jacobs et al. 1999, Rosen et al. 2001). Das kontralaterale Barreelfield ließ im Vergleich zu den Kontrollen keine qualitativen Unterschiede erkennen.

Zur Entwicklung und Differenzierung kortikaler Areale und speziell des Barreelfields werden zwei sich ergänzende Theorien diskutiert, die sich einerseits auf genetische und andererseits auf epigenetische Faktoren stützen. Das Protomap-Modell beruht auf einer Vorherbestimmung neokortikaler Areale aufgrund eines immanenten genetischen Programms, obwohl die aus dem Neuroepithel hervorgehende unreife neokortikale Platte keine kortikale Organisation erkennen lässt (Rakic 1988). Die Existenz eines genetischen Programms ist ab dem 14. Embryonaltag durch heterotope Transplantationen sensomotorischer bzw. perirhinaler Kortizes belegt (Barbe und Levitt 1991 und 1992). Das Protokortex-Modell postuliert eine neokortikale Differenzierung ausschließlich durch extrinsische Faktoren, wie thalamokortikalen Afferenzen (O'Leary 1989), die sich bereits

am 16. Embryonaltag, 6 Tage vor Geburt, nachweisen lassen (Catalano et al. 1996). Die Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie am Tag der Geburt veränderte die pränatal vorbestimmte Entwicklung und neokortikale Differenzierung des Barrelfields. Die Plastizität des Kortex im Sinne einer strukturellen Reorganisation ist während der 1. Lebenswoche am ausgeprägtesten (Fox 2002). Für kallosale Projektionen ist die Penetration des Kortex zwischen den Postnataltagen 3 bis 6 und die Ausbildung des adulten Verteilungsmusters in der 2. bis 4. Woche belegt (Wise und Jones 1976, Miller und Vogt 1984). Am 17. Embryonaltag erreichen thalamokortikale Efferenzen die Lamina VIb, zum Zeitpunkt der Geburt verzweigen sich wenige Axone in den Laminae VIa und V und ab dem ersten Postnataltag erreichen diese Projektionen die sich entwickelnde Lamina IV. Nach einer Woche spannen sich die ersten Verzweigungen über die gesamte Ausdehnung eines Barrels (Catalano et al. 1996).

Die in dieser Studie beobachtete bilaterale Verkleinerung der Fläche des Barrelfields könnte durch eine verminderte Projektion thalamokortikaler Axone in die Barrels der Lamina IV durch die räumliche Nähe zur Malformation bedingt sein (vgl. Jacobs et al. 1999 a und 2000). Eine Verminderung der Fläche der Septen ist möglicherweise auf eine geringere Anzahl kallosaler Faserverbindungen und Projektionen des Nukleus posterior zurückzuführen, die ihrerseits in den Septen verlaufen. Ratten mit einer kortikalen Malformation ließen im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger kallosale Neurone in den Laminae II und III und mehr in Lamina VI bei insgesamt verminderter Anzahl erkennen (Gianetti et al. 1999). Eine Beeinträchtigung dieser Bahnen könnte die Verkleinerung der Flächen des kontralateralen Barrelfields und der Septen erklären, da kallosale Fasern in das homotope kontralaterale Kortexareal projizieren (Akers und Killackey 1978, Hayama und Ogawa 1997).

Nach Induktion der Dysplasie im somatosensorischen Kortex wurde ipsilateral ein in seiner typischen Struktur zerstörtes Barrelfield bzw. ein Verlust von Barrels nachgewiesen, so dass Aussagen über die somatotope Organisation des ipsilateralen Barrelfields kaum zu treffen sind (Jacobs et al. 1999 a, Rosen et al. 2001). Der Verlust des regulären kortikalen Ziels bzw. Barrels in der Lamina IV, kann während der Synaptogenese zu einem Einsprossen thalamokortikaler Axone in die hyperexzitatorische paramikrogyrale Zone führen (Jacobs et al. 1999 a und 2000), da die Anzahl der sich verzweigenden Axone trotz einer Läsion konstant bleibt („Principle of conservation of total axonal arborizations“,

Sabel und Schneider 1988). Durch Injektion der neuroanatomischen Tracer-Substanz Dextran in den ventrobasalen Thalamus konnte belegt werden, dass thalamische Axone nicht den Mikrogyrus, sondern die paramikrogyrale Zone, penetrieren (Jacobs et al. 1999 b, Rosen et al. 2000). Diese Hyperinnervation der paramikrogyralen Zone lässt sich mit der in elektrophysiologischen Untersuchungen beobachteten Hyperexzitabilität, die dort ihren Ursprung hat, in Einklang bringen (Jacobs et al. 1996 und 1999 a, Hablitz und de Fazio 1998, Luhmann et al. 1998 a und b, Quill et al. 2002). Darüber hinaus wurden nach Injektion von Dextran in den Mikrogyrus weniger afferente und efferente kallosale Fasern im homologem Kortexareal, sowie einige heterotope Projektionen nachgewiesen (Rosen et al. 2000). Bei über 60 Tage alten Ratten war eine Vergrößerung des kontralateralen Barrelfields der Läsionstiere nachzuweisen, wobei ausschließlich Hemisphären mit einem vollständigen Barrelfield ausgemessen wurden. Die Zunahme der Fläche des Barrelfields wurde auf eine Vergrößerung der Septen zurückgeführt, da die Flächen individueller Barrels im Vergleich zu den Kontrollen konstant blieben. Rosen und Mitarbeiter vermuten als mögliche Ursache eine veränderte Konnektivität, v.a. eine Vermehrung thalamokortikaler Projektionen des ipsilateralen Nukleus posterior (PO) und kallosaler Faserverbindungen, die zwar keinen Anschluss an die Barrels haben, aber zu einem Großteil in den Septen verlaufen. Allerdings wurden in dieser Arbeit die Septen im Gegensatz zu den einzelnen Barrels nicht ausgemessen (Rosen et al. 2001).

In weiteren Studien sollte untersucht werden, ob die Flächen des posteriomedialen Barrel-Subfields und der Septen auch hinsichtlich einer Entwicklungsretardierung über den Zeitraum von 2 Wochen hinaus reduziert bleiben, da eine Untersuchung der Fläche des posteriomedialen Barrel-Subfields und der Septen nach 21 Tagen aufgrund der ubiquitär gesteigerten Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit  $\alpha_1$  unmöglich war (Paysan et al. 1994).

### 6.3 Initialer Gewichtsverlust nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie

Ein transienter Verlust des Hirn- und Körpergewichts nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie wurde bis zum 14. Tag nachgewiesen. Dieser Sachverhalt wurde ebenfalls bei Ratten verschiedener Altersgruppen mit bilateralen Gefrier- (Peiffer et al. 2003) und parietalen Saugläsionen (Kolb und Wishaw 1985 a) beschrieben und jeweils durch volumetrische Messungen bestätigt.

Diese Befunde deuten wie auch die teilweise verzögerte Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten auf eine allgemeine Entwicklungsretardierung hin. Gefrierläsionen am Tag der Geburt führten zu einem nekrotischen Untergang des Hirnparenchyms und einem konsekutiv verminderten Hirngewicht. Die einwandernden bzw. an der kortikalen Oberfläche vorhandenen Neurone, v.a. der zukünftigen Laminae VI bis IV, wurden durch die Gefrierläsion abgetötet (Rosen et al. 1996, Zilles et al. 1998). Demnach stören Gefrierläsionen die physiologische Kortexentwicklung und führen zu einer in den ersten Tagen nach der Läsion erfolgenden strukturellen Reorganisation des Kortex. Dabei wanderten Neurone der Lamina II und III aus der paramikrogyralen Zone in den Mikrogyrus, um die Lamina 2 zu bilden (Zilles et al. 1998, Redecker et al. 2000 a). Diese ausgeprägte strukturelle Reorganisation des Neokortex ist bei einem adulten Tier nach Abschluss der neuronalen Entwicklung nicht mehr zu beobachten. Kolb und Mitarbeiter zeigten, dass eine sich über Monate entwickelnde permanente generalisierte Atrophie des Hirnparenchyms Folge einer Saugläsion bei Ratten im Erwachsenenalter ist (Kolb et al. 1998). Sogar Läsionen im frontalen und parietalen Kortex während der 1. Lebenswoche bei Hamstern konnten nur schlecht kompensiert werden und beeinträchtigten diese bei der Körperpflege, der Orientierung, dem Schwimmen, dem Balancieren sowie der Nahrungsaufnahme (Kolb und Whishaw 1985 b). Im Gegensatz zu diesem Substanzverlust wurde durch eine Gefrierläsion während der neuronalen Migration und Differenzierung ein Einwandern von Neuronen aus der paramikrogyralen Zone in die fokale Nekrose induziert. Die Veränderungen des Gehirns während der Reorganisationsphase waren derart gravierend, dass diese zu einer Verringerung des Körpergewichts führten.

Da nach 21 Tagen kein wesentlicher Unterschied des Körper- und Hirngewichtes im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen war, ist von einer Kompensation des initialen Gewichtsverlusts auszugehen. Peiffer und Kollegen beschrieben eine Reduktion des Hirngewichts nach bilateralen Gefrierläsionen bei 2 Monate alten Ratten (Peiffer et al. 2003), was möglicherweise als ein Hinweis auf eine vorübergehende Gewichtsnormalisierung zu sehen ist, die 3 Wochen anhält.

#### 6.4 Klinische Bedeutung

Weitreichende Veränderungen des GABA-ergen Systems wurden bei Epilepsie-Patienten mit fokalen kortikalen Dysgenesien beschrieben.

Diese Veränderungen zeigten in Positronen-Emissions-Tomographien (PET) aufgrund eines modulierten Expressionsmusters der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten ein gestörtes Bindungsverhalten der Tracer-Substanz <sup>11</sup>C-Flumazenil nicht nur im Bereich der Malformation, sondern auch in der scheinbar intakten Umgebung (Richardson et al. 1996, Hammers et al. 2001). Darüber hinaus wurde in zahlreichen PET-Untersuchungen ein Glucose-Hypometabolismus beschrieben (Chugani et al. 1990, Schlaug et al. 1997, Wunderlich et al. 2000)

In humanen dysplastischen Präparaten wurde durch mRNA-Amplifizierung eine differenzielle Expression verschiedener Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-, Glutamat- und NMDA-Rezeptors einzelner Neurone belegt. Der Nachweis einer veränderten Transkription, die aber nicht zwangsläufig zu einer modulierten Proteinbildung führen muss, deutet auf veränderte pharmakologische und elektrophysiologische Eigenschaften des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors hin. Weitere Faktoren wie die funktionelle Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten zu einem vollständigen pentameren Rezeptor und post-translationale Modifikationen, z.B. durch Phosphorylierung sind bei der Epileptogenese zu berücksichtigen (Crino et al. 2001). Weiterhin belegen immunhistochemische Studien eine Verringerung Parvalbumin positiver Interneurone (Spreafico et al. 1998).

Die Abwesenheit spontan auftretender Krampfanfälle trotz der histopathologisch großen Ähnlichkeit mit humanen Dysgenesien bei tierexperimentell induzierten kortikalen Dysplasien lässt vermuten, dass zusätzliche Faktoren oder eine genetische Disposition für die bei Menschen beobachteten Epilepsien von Bedeutung sind (Redecker et al. 2000 b). Veränderungen der Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten haben möglicherweise eine Bedeutung für die pharmakologische Therapie der vielfach therapierefraktären Epilepsien bei fokalen kortikalen Dysgenesien. Über die Untereinheit  $\alpha_1$  wird durch selektive Pharmaka neben Sedation und anterograder Amnesie auch ein antikonvulsiver Effekt vermittelt, wohingegen über  $\alpha_2$  v.a. eine anxiolytische Wirkung erzielt wird. Angesichts dessen versprechen Bestrebungen in der pharmakologischen Forschung, einzelne Untereinheiten selektiv zu beeinflussen, eine spezifischere Therapie (Möhler et al. 2002, Whiting 2003).

## **7. Schlussfolgerungen**

Dysplastische Kortizes zeigen ein Ungleichgewicht zwischen GABA-erger und Glutamat vermittelter Exzitation, das mit dem Auftreten von Hyperexzitabilität bzw. beim Menschen mit therapierefraktären Epilepsien und/ oder neuropsychologischen Defiziten assoziiert ist. Die vorliegende Arbeit belegt eine modulierte Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  in den ersten 21 Lebenstagen nach Induktion einer fokalen kortikalen Dysplasie. Diese Studie befindet sich somit in Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen in denen eine verminderte Expression dieser Rezeptoruntereinheiten bei adulten Ratten beobachtet wurde. Obwohl die Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten weitgehend unbekannt sind, ist gesichert, dass die veränderte Komposition die Funktion des Rezeptors beeinflusst. In mehreren Untersuchungen wurde eine ausgeprägte Hyperexzitabilität beobachtet, wobei die Laminae II/ III der morphologisch intakten paramikrogyralen Zone als epileptogener Fokus identifiziert wurden. Auffällig ist hierbei, dass der erst ab dem 12. postnatalen Tag nachweisbaren Hyperexzitabilität ein ab dem 7. postnatalen Tag gestörtes Verteilungsmuster der Untereinheiten vorausgeht. Das gestörte Verteilungsmuster als morphologisches Korrelat der Hyperexzitabilität war nicht nur auf den Bereich der Dysplasie beschränkt, sondern betraf bihemisphärisch sowohl benachbarte als auch entfernte neokortikale Areale und den Hippokampus. Die in dieser Studie belegte ubiquitär modulierte Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten könnte die Epileptogenese und Propagation epileptiformer Aktivität beeinflussen.

Die ausgedehnte Modulation der Verteilung der Rezeptoruntereinheiten während der ersten 3 Wochen weist auf eine möglicherweise verzögerte Hirnentwicklung hin, da die physiologischen Expressionsveränderungen nicht oder zum Teil verzögert eintreten. Nebenbefundlich zeigte sich eine transiente Verminderung des Körper- und Hirngewichtes der Läsionstiere bis zum 14. postnatalen Tag, wohingegen diese nach 3 Wochen nicht mehr nachzuweisen war.

Trotz dieser weitreichenden Veränderungen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten blieb die typische Struktur des somatosensorischen Kortex in der Umgebung der Malformation weitgehend erhalten. Lediglich die Flächen des posteriomedialen Barrel-Subfields und der Septen waren bilateral im Areal der Repräsentation der Vorder- bzw. Hinterpfote nach 1

und 2 Wochen vermindert. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Befunde geht von einer durch die räumliche Nähe zur Malformation bedingten verminderten Projektion thalamokortikaler Axone und einer reduzierten Anzahl in den Septen verlaufender kallosaler Faserverbindungen aus. Die Beeinträchtigung kallosaler Fasern könnte die Verkleinerung des kontralateralen Barreelfields und der Septen erklären, da kallosale Fasern in das homotope kontralaterale Kortexareal projizieren.

Die modulierte Expression verschiedener GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten geht einer elektrophysiologisch nachweisbaren Hyperexzitabilität voraus und leistet wahrscheinlich einen Beitrag zur Epileptogenese. Veränderungen der Verteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten haben möglicherweise eine Bedeutung für die pharmakologische Therapie von Epilepsien, da verschiedene Antiepileptika über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wirken.

## **8. Literaturverzeichnis**

- Akers,R.M. and Killackey,H.P. (1978) Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. *J.Comp Neurol.* 181:513-537.
- Barbe,M.F. and Levitt,P. (1991) The early commitment of fetal neurons to the limbic cortex. *J.Neurosci.* 11:519-533.
- Barbe,M.F. and Levitt,P. (1992) Attraction of specific thalamic input by cerebral grafts depends on the molecular identity of the implant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:3706-3710.
- Barkovich,A.J. (1996) Malformations of neocortical development: magnetic resonance imaging correlates. *Curr.Opin.Neurol.* 9:118-121.
- Barkovich,A.J., Kuzniecky,R.I., Jackson,G.D., Guerrini,R., and Dobyns,W.B. (2001) Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology* 57:2168-2178.
- Barnard,E.A., Skolnick,P., Olsen,R.W., Mohler,H., Sieghart,W., Biggio,G., Braestrup,C., Bateson,A.N., and Langer,S.Z. (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol.Rev.* 50:291-313.
- Baumann,S.W., Baur,R., and Sigel,E. (2003) Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J.Neurosci.* 23:11158-11166.
- Ben Ari,Y., Khazipov,R., Leinekugel,X., Caillard,O., and Gaiarsa,J.L. (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci.* 20:523-529.
- Bormann,J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 21:16-19.
- Catalano,S.M., Robertson,R.T., and Killackey,H.P. (1996) Individual axon morphology and thalamocortical topography in developing rat somatosensory cortex. *J.Comp Neurol.* 367:36-53.
- Chagnac-Amitai,Y. and Connors,B.W. (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J.Neurophysiol.* 61:747-758.
- Chang,B.S., Piao,X., Bodell,A., Basel-Vanagaite,L., Straussberg,R., Dobyns,W.B., Qasrawi,B., Winter,R.M., Innes,A.M., Voit,T., Grant,P.E., Barkovich,A.J., and Walsh,C.A. (2003) Bilateral frontoparietal polymicrogyria: clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann.Neurol.* 53:596-606.
- Chen,Q.X., Stelzer,A., Kay,A.R., and Wong,R.K. (1990) GABAA receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurones. *J.Physiol* 420:207-221.

- Chugani,H.T., Shields,W.D., Shewmon,D.A., Olson,D.M., Phelps,M.E., and Peacock,W.J. (1990) Infantile spasms: I. PET identifies focal cortical dysgenesis in cryptogenic cases for surgical treatment. *Ann.Neurol.* 27:406-413.
- Crino,P.B. and Eberwine,J. (1997) Cellular and molecular basis of cerebral dysgenesis. *J.Neurosci.Res.* 50:907-916.
- Crino,P.B., Duhaime,A.C., Baltuch,G., and White,R. (2001) Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology* 56:906-913.
- DeFazio,R.A. and Hablitz,J.J. (1999) Reduction of zolpidem sensitivity in a freeze lesion model of neocortical dysgenesis. *J.Neurophysiol.* 81:404-407.
- Dvorak,K. and Feit,J. (1977) Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria. *Histological and autoradiographical study. Acta Neuropathol.(Berl)* 38:203-212.
- Fedi,M., Reutens,D., Okazawa,H., Andermann,F., Boling,W., Dubeau,F., White,C., Nakai,A., Gross,D.W., Andermann,E., and Diksic,M. (2001) Localizing value of alpha-methyl-L-tryptophan PET in intractable epilepsy of neocortical origin. *Neurology* 57:1629-1636.
- Fox,K. (2002) Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* 111:799-814.
- Fritschy,J.M., Paysan,J., Enna,A., and Mohler,H. (1994) Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J.Neurosci.* 14:5302-5324.
- Fritschy,J.M. and Mohler,H. (1995) GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J.Comp Neurol.* 359:154-194.
- Fritschy,J.M., Weinmann,O., Wenzel,A., and Benke,D. (1998) Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J.Comp Neurol.* 390:194-210.
- Galaburda,A.M. (1993) Neuroanatomic basis of developmental dyslexia. *Neurol.Clin.* 11:161-173.
- Giannetti,S., Gaglini,P., Granato,A., and Di Rocco,C. (1999) Organization of callosal connections in rats with experimentally induced microgyria. *Childs Nerv.Syst.* 15:444-448.
- Gressens,P. (1998) Mechanisms of cerebral dysgenesis. *Curr.Opin.Pediatr.* 10:556-560.
- Guerrini,R., Andermann,E., Avoli,M., and Dobyns,W.B. (1999) Cortical dysplasias, genetics, and epileptogenesis. *Adv.Neurol.* 79:95-121.

- Guerrini,R. and Carrozzo,R. (2002) Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure. 11 Suppl A*:532-543.
- Hablitz,J.J. and DeFazio,T. (1998) Excitability changes in freeze-induced neocortical microgyria. *Epilepsy Res. 32*:75-82.
- Hablitz,J.J. and DeFazio,R.A. (2000) Altered receptor subunit expression in rat neocortical malformations. *Epilepsia 41 Suppl 6*:S82-S85.
- Hagemann,G., Redecker,C., and Witte,O.W. (2000 a) [Cortical dysgenesis: current classification, MRI diagnosis, and clinical review]. *Nervenarzt 71*:616-628.
- Hagemann,G., Redecker,C., and Witte,O.W. (2000 b) Intact functional inhibition in the surround of experimentally induced focal cortical dysplasias in rats. *J.Neurophysiol. 84*:600-603.
- Hagemann,G., Fritschy,J.M., Witte,O.W., and Redecker,C. (2001) Differentiation of GABA(A) receptors in subcortical heterotopias: subunit distribution of displaced cortex reflects original commitment. *Neuroreport 12*:3413-3417.
- Hagemann,G., Kluska,M.M., Redecker,C., Luhmann,H.J., and Witte,O.W. (2003) Distribution of glutamate receptor subunits in experimentally induced cortical malformations. *Neuroscience 117*:991-1002.
- Hammers,A., Koepp,M.J., Labbe,C., Brooks,D.J., Thom,M., Cunningham,V.J., and Duncan,J.S. (2001) Neocortical abnormalities of [11C]-flumazenil PET in mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology 56*:897-906.
- Hayama,T. and Ogawa,H. (1997) Regional differences of callosal connections in the granular zones of the primary somatosensory cortex in rats. *Brain Res.Bull. 43*:341-347.
- Hoffman,S.N., Salin,P.A., and Prince,D.A. (1994) Chronic neocortical epileptogenesis in vitro. *J.Neurophysiol. 71*:1762-1773.
- Iannetti,P., Nigro,G., Spalice,A., Faiella,A., and Boncinelli,E. (1998) Cytomegalovirus infection and schizencephaly: case reports. *Ann.Neurol. 43*:123-127.
- Jacobs,K.M., Gutnick,M.J., and Prince,D.A. (1996) Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cereb.Cortex 6*:514-523.
- Jacobs,K.M., Mogensen,M., Warren,E., and Prince,D.A. (1999 a) Experimental microgyri disrupt the barrel field pattern in rat somatosensory cortex. *Cereb.Cortex 9*:733-744.
- Jacobs,K.M., Hwang,B.J., and Prince,D.A. (1999 b) Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *J.Neurophysiol. 81*:159-173.
- Jacobs,K.M., Graber,K.D., Kharazia,V.N., Parada,I., and Prince,D.A. (2000) Postlesional epilepsy: the ultimate brain plasticity. *Epilepsia 41 Suppl 6*:S153-S161.

- Kasper,B.S., Stefan,H., Buchfelder,M., and Paulus,W. (1999) Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58:22-28.
- Kaufmann,W.E. and Galaburda,A.M. (1989) Cerebrocortical microdysgenesis in neurologically normal subjects: a histopathologic study. *Neurology* 39:238-244.
- Killackey,H.P. and Belford,G.R. (1979) The formation of afferent patterns in the somatosensory cortex of the neonatal rat. *J.Comp Neurol.* 183:285-303.
- Kolb,B. and Wishaw,I.Q. (1985 a) Earlier is not always better: behavioral dysfunction and abnormal cerebral morphogenesis following neonatal cortical lesions in the rat. *Behav.Brain Res.* 17:25-43.
- Kolb,B. and Wishaw,I.Q. (1985 b) Neonatal frontal lesions in hamsters impair species-typical behaviors and reduce brain weight and neocortical thickness. *Behav.Neurosci.* 99:691-706.
- Kolb,B., Forgie,M., Gibb,R., Gorny,G., and Rowntree,S. (1998) Age, experience and the changing brain. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 22:143-159.
- Kraemer,M., Roth-Haerer,A., Bruehl,C., Luhmann,H.J., and Witte,O.W. (2001) Metabolic and electrophysiological alterations in an animal model of neocortical neuronal migration disorder. *Neuroreport* 12:2001-2006.
- Kuzniecky,R., Murro,A., King,D., Morawetz,R., Smith,J., Powers,R., Yaghmai,F., Faught,E., Gallagher,B., and Snead,O.C. (1993) Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology* 43:681-687.
- Laurie,D.J., Wisden,W., and Seeburg,P.H. (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J.Neurosci.* 12:4151-4172.
- Lawrie,S.M., Whalley,H., Kestelman,J.N., Abukmeil,S.S., Byrne,M., Hodges,A., Rimmington,J.E., Best,J.J., Owens,D.G., and Johnstone,E.C. (1999) Magnetic resonance imaging of brain in people at high risk of developing schizophrenia. *Lancet* 353:30-33.
- Lüddens,H., Korpi,E.R., and Seeburg,P.H. (1995) GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. *Neuropharmacology* 34:245-254.
- Luhmann,H.J. and Raabe,K. (1996) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. *Epilepsy Res.* 26:67-74.
- Luhmann,H.J., Raabe,K., Qu,M., and Zilles,K. (1998 a) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. *Eur.J.Neurosci.* 10:3085-3094.
- Luhmann,H.J., Karpuk,N., Qu,M., and Zilles,K. (1998 b) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. *J.Neurophysiol.* 80:92-102.

- Madakasira,P.V., Simkins,R., Narayanan,T., Dunigan,K., Poelstra,R.J., and Mantil,J. (2002) Cortical dysplasia localized by [11C]methionine positron emission tomography: case report. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 23:844-846.
- Marques Dias,M.J., Harmant-van Rijckevorsel,G., Landrieu,P., and Lyon,G. (1984) Prenatal cytomegalovirus disease and cerebral microgyria: evidence for perfusion failure, not disturbance of histogenesis, as the major cause of fetal cytomegalovirus encephalopathy. *Neuropediatrics* 15:18-24.
- McBride,M.C. and Kemper,T.L. (1982) Pathogenesis of four-layered microgyric cortex in man. *Acta Neuropathol.(Berl)* 57:93-98.
- Miller,M.W. and Vogt,B.A. (1984) The postnatal growth of the callosal connections of primary and secondary visual cortex in the rat. *Brain Res.* 316:304-309.
- Mohler,H., Fritschy,J.M., and Rudolph,U. (2002) A new benzodiazepine pharmacology. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 300:2-8.
- Narahashi,T. (1999) Chemical modulation of sodium channels and GABAA receptor channel. *Adv.Neurol.* 79:457-480.
- O'Leary,D.D. (1989) Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci.* 12:400-406.
- Palmini,A., Gambardella,A., Andermann,F., Dubeau,F., da Costa,J.C., Olivier,A., Tampieri,D., Robitaille,Y., Paglioli,E., Paglioli,N.E., and . (1994) Operative strategies for patients with cortical dysplastic lesions and intractable epilepsy. *Epilepsia* 35 *Suppl* 6:S57-S71.
- Palmini,A., Gambardella,A., Andermann,F., Dubeau,F., da Costa,J.C., Olivier,A., Tampieri,D., Gloor,P., Quesney,F., Andermann,E., and . (1995) Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann.Neurol.* 37:476-487.
- Paysan,J., Bolz,J., Mohler,H., and Fritschy,J.M. (1994) GABAA receptor alpha 1 subunit, an early marker for area specification in developing rat cerebral cortex. *J.Comp Neurol.* 350:133-149.
- Paysan,J., Kossel,A., Bolz,J., and Fritschy,J.M. (1997) Area-specific regulation of gamma-aminobutyric acid type A receptor subtypes by thalamic afferents in developing rat neocortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:6995-7000.
- Paxinos,G., Fritchle,A.L. (1991) Atlas of the developing rat brain. Academic Press, Inc., San Diego
- Peiffer,A.M., Fitch,R.H., Thomas,J.J., Yurkovic,A.N., and Rosen,G.D. (2003) Brain weight differences associated with induced focal microgyria. *BMC.Neurosci.* 4:12.
- Prince,D.A. and Tseng,G.F. (1993) Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. *J.Neurophysiol.* 69:1276-1291.

- Que, M., Witte, O.W., Neumann-Haefelin, T., Schiene, K., Schroeter, M., and Zilles, K. (1999) Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience* 93:1233-1240.
- Quill, S., Redecker, C., Hagemann, G., Köhling, R., Straub, H., Witte, O.W., Speckmann, E.J. (2002) Excitability changes in the surround of experimentally induced cortical malformations: an optical imaging study. *Soc. Neurosci. Abstr.*
- Rakic, P. (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170-176.
- Redecker, C., Lutzenburg, M., Gressens, P., Evrard, P., Witte, O.W., and Hagemann, G. (1998 a) Excitability changes and glucose metabolism in experimentally induced focal cortical dysplasias. *Cereb. Cortex* 8:623-634.
- Redecker, C., Hagemann, G., Witte, O.W., Marret, S., Evrard, P., and Gressens, P. (1998 b) Long-term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 109:109-113.
- Redecker, C., Luhmann, H.J., Hagemann, G., Fritschy, J.M., and Witte, O.W. (2000 a) Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J. Neurosci.* 20:5045-5053.
- Redecker, C., Hagemann, G., Gressens, P., Evrard, P., and Witte, O.W. (2000 b) [Cortical dysgenesis. Current views on pathogenesis and pathophysiology]. *Nervenarzt* 71:238-248.
- Ren, J.Q., Aika, Y., Heizmann, C.W., and Kosaka, T. (1992) Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp. Brain Res.* 92:1-14.
- Richardson, M.P., Koepp, M.J., Brooks, D.J., Fish, D.R., and Duncan, J.S. (1996) Benzodiazepine receptors in focal epilepsy with cortical dysgenesis: an 11C-flumazenil PET study. *Ann. Neurol.* 40:188-198.
- Rosen, G.D., Press, D.M., Sherman, G.F., and Galaburda, A.M. (1992) The development of induced cerebrocortical microgyria in the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51:601-611.
- Rosen, G.D., Sherman, G.F., and Galaburda, A.M. (1996) Birthdates of neurons in induced microgyria. *Brain Res.* 727:71-78.
- Rosen, G.D., Jacobs, K.M., and Prince, D.A. (1998) Effects of neonatal freeze lesions on expression of parvalbumin in rat neocortex. *Cereb. Cortex* 8:753-761.
- Rosen, G.D., Burstein, D., and Galaburda, A.M. (2000) Changes in efferent and afferent connectivity in rats with induced cerebrocortical microgyria. *J. Comp. Neurol.* 418:423-440.
- Rosen, G.D. and Galaburda, A.M. (2000) Single cause, polymorphic neuronal migration disorders: an animal model. *Dev. Med. Child Neurol.* 42:652-662.

- Rosen,G.D., Windzio,H., and Galaburda,A.M. (2001) Unilateral induced neocortical malformation and the formation of ipsilateral and contralateral barrel fields. *Neuroscience* 103:931-939.
- Sabel,B.A. and Schneider,G.E. (1988) The principle of "conservation of total axonal arborizations": massive compensatory sprouting in the hamster subcortical visual system after early tectal lesions. *Exp.Brain Res.* 73:505-518.
- Schlaug,G., Antke,C., Holthausen,H., Arnold,S., Ebner,A., Tuxhorn,I., Jancke,L., Luders,H., Witte,O.W., and Seitz,R.J. (1997) Ictal motor signs and interictal regional cerebral hypometabolism. *Neurology* 49:341-350.
- Spreafico,R., Battaglia,G., Arcelli,P., Andermann,F., Dubeau,F., Palmini,A., Olivier,A., Villemure,J.G., Tampieri,D., Avanzini,G., and Avoli,M. (1998) Cortical dysplasia: an immunocytochemical study of three patients. *Neurology* 50:27-36.
- Stelzer,A., Slater,N.T., and ten Bruggencate,G. (1987) Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. *Nature* 326:698-701.
- Unnerstall,J.R., Kuhar,M.J., Niehoff,D.L., and Palacios,J.M. (1981) Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors: evidence from a quantitative autoradiographic study. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 218:797-804.
- Whiting,P.J., Bonnert,T.P., McKernan,R.M., Farrar,S., Le Bourdelles,B., Heavens,R.P., Smith,D.W., Hewson,L., Rigby,M.R., Sirinathsingji,D.J., Thompson,S.A., and Wafford,K.A. (1999) Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 868 :645-653.
- Whiting,P.J. (2003) GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov.Today* 8:445-450.
- Wisden,W. and Seeburg,P.H. (1992) GABAA receptor channels: from subunits to functional entities. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2:263-269.
- Wise,S.P. and Jones,E.G. (1976) The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J.Comp Neurol.* 168:313-343.
- Witte,O.W., Buchkremer-Ratzmann,I., Schiene,K., Neumann-Haefelin,T., Hagemann,G., Kraemer,M., Zilles,K., and Freund,H.J. (1997) Lesion-induced network plasticity in remote brain areas. *Trends Neurosci.* 20 :348-349.
- Wunderlich,G., Schuller,M.F., Ebner,A., Holthausen,H., Tuxhorn,I., Witte,O.W., and Seitz,R.J. (2000) Temporal lobe epilepsy with sensory aura: interictal glucose hypometabolism. *Epilepsy Res.* 38:139-149.
- Zilles,K., Qu,M., Schleicher,A., and Luhmann,H.J. (1998) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA(A) and GABA(B)

**9. Anhang****9.1 Lebenslauf***Persönliche Daten:*

Christoph Friedrich Schorn  
geb. am 18.12.1976 in Köln  
ledig

*Schulbildung:*

08/1983 bis 07/1987      Katholische Grundschule Langenfeld  
08/1987 bis 06/1996      Marienschule Leverkusen-Opladen  
06/1996                      Allgemeine Hochschulreife

*Wehrdienst:*

09/1996 bis 06/1997      Sanitätsdienst in Hamm und Düsseldorf

*Medizinstudium:*

WS 1997/98 – WS 2003/04      Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
11/2000                      United States Medical Licensing Examination Step 1

*Promotion:*

10/2000 bis 07/2001      Experimentelle Neurologie (Leiter: Prof. Dr. O.W. Witte)  
unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Redecker  
Neurologische Klinik (Direktor: Prof. Dr. H.J. Freund),  
Universitätsklinikum Düsseldorf

seit 08/2001

Experimentelle Neurologie unter Leitung von  
Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Redecker  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
(Direktor: Prof. Dr. O.W. Witte),  
Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

*Famulatur:*

09/2002 bis 10/2002      Department of Neurology, Cleveland Clinic Foundation  
Cleveland, Ohio (USA)

*Beruf:*

seit 09/2004

Arzt im Praktikum  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
(Direktor: Prof. Dr. H. C. Diener),  
Universitätsklinikum Essen

Langenfeld, den 03.09.2004

## 9.2 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Otto W. Witte für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik, die fachliche sowie finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Redecker, der mich nicht nur fachlich hervorragend betreute, möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen für die freundliche Überlassung des Themas, für ein immer offenes Ohr, für seine aufmunternden Worte in verzweifelten Augenblicken, so dass meine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten erhalten blieb.

Alten und neuen Mitarbeitern der Experimentellen Neurologie danke ich sehr für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit, so dass ich nach dem Wegzug des Labors aus Düsseldorf, immer gerne nach Jena gekommen bin.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jochen F. Staiger (C. u. O. Vogt-Institut für Hirnforschung, Universitätsklinikum Düsseldorf) möchte ich für die Einweisung in das Neurolucida-System und die Neuroexplorer-Software danken.

Auch meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir in schwierigen Zeiten eine Stütze waren, möchte ich danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Mareike Prescher, die in allen Phasen dieser Arbeit für mich da war.

### 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Redecker,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Langenfeld, den 03.09.2004