

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Oliver Hantschel

des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchung der Funktion des Aktin-bindenden
Proteins Profilin1 in der zerebralen
Kortexentwicklung der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sophie Kügler (geb. Meyer)

aus Magdeburg

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 17.12.2021

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Referent: Prof. Dr. Marco B. Rust
1. Korreferent: Prof. Dr. Sven Bogdan

Die vorliegende Arbeit widme ich meiner Mama Karin Meyer,
die meinen Brüdern und mir stets vorlebt, dass man mit harter Arbeit und guter
Organisation alles erreichen kann.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....VIII

Abbildungsverzeichnis.....XII

Tabellenverzeichnis.....XIV

1. Einleitung.....15

 1.1. Aufbau des zerebralen Kortex höherer Wirbeltiere.....15

 1.2. Vergleichende Betrachtung lissencephaler und gyrencephaler Säugetier-
 gehirne.....16

 1.3. Embryonalentwicklung des zerebralen Kortex der Maus.....16

 1.3.1. Gliogenese und die Reaktivierung von Astrozyten.....19

 1.4. Embryonalentwicklung des zerebralen Kortex gyrencephaler Gehirne.....20

 1.5. Neurale Vorläuferzellen.....21

 1.5.1. Neurale Epithelzellen.....22

 1.5.2. Apikale Radialgliazellen.....22

 1.5.3. Apikale intermediäre Vorläuferzellen.....24

 1.5.4. Subapikale Vorläuferzellen.....24

 1.5.5. Basale intermediäre Vorläuferzellen.....24

 1.5.6. Basale Radialgliazellen.....25

 1.6. Neuronale Entwicklungsdefekte.....26

 1.7. Profilin und der Aktin-Tretmühlenmechanismus.....27

 1.8. Die gehirnspezifische Profilin1 Knock-out Maus.....30

 1.9. Zielsetzung der Arbeit.....31

2. Material und Methoden.....32

 2.1. Puffer und Lösungen.....32

 2.2. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....34

 2.3. Sekundäre Antikörper.....37

 2.4. Fluoreszenzfarbstoffe.....39

 2.5. Primer.....39

 2.6. Versuchstiere.....39

 2.7. Genotypisierung der Versuchstiere.....40

 2.7.1. DNS-Aufreinigung.....40

2.7.2. Qualitative PCR.....	40
2.7.3. Gelelektrophorese.....	42
2.8. Plug Verpaarung.....	42
2.9. Versuchsdurchführungen mittels BrdU.....	43
2.9.1. Untersuchung der reaktiven Gliose adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	43
2.9.2. Intraperitoneale Injektion von BrdU in tragende Weibchen.....	43
2.10. Histologie.....	44
2.10.1. Transkardiale Perfusion.....	44
2.10.2. Embryopräparation.....	44
2.10.3. Probenaufbereitung für Schnitte am Gefriermikrotom.....	45
2.10.4. Schnitte am Gefriermikrotom.....	45
2.10.5. Probenaufbereitung für Vibratomschnitte.....	46
2.10.6. Schnitte am Vibratom.....	46
2.11. Immunhistochemische Färbungen.....	47
2.11.1. „on-slide“ Färbungen an Gefriermikrotomschnitten.....	47
2.11.2. „Free-floating“ Färbung an Vibratomschnitten.....	48
2.12. Bildaufnahme.....	48
2.12.1. Makroskopische Untersuchung des cerebralen Kortex adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	49
2.12.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	49
2.13. Bildanalysen.....	49
2.13.1. Unterteilung des cerebralen Kortex der E14,5 Embryos.....	49
2.13.2. Analyse der Mitoserate basaler neuraler Vorläuferzellen.....	50
2.13.3. Analyse der IZM.....	50
2.13.4. Analyse der Signalintensität von Par3, αPKC, pan-Cadherin und Phalloidin an der Ventrikeloberfläche.....	51
2.13.5. Primäre Zilien.....	52
2.13.6. Teilungsebene mitotischer aRG.....	52
2.14. Statistische Analyse.....	53
3. Ergebnisse.....	54
3.1. Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse...	54
3.1.1. Die Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse sind durch die Basallamia ausgekleidet.....	56

3.1.2. Im Bereich der Invaginationen ist die superfiziellen Grenze der zerebralen Kortexschicht II/III teilweise in inferiorer Richtung verschoben.....	57
3.1.3. Die Deletion von Profilin1 ist ursächlich für die Ausbildung der Invaginationen innerhalb des zerebralen Kortex der adulten Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	59
3.2. Reaktive Gliose im zerebralen Kortex adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	61
3.3. Embryonalentwicklung der Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	64
3.3.1. Erhöhte Anzahl mitotischer und neu gebildeter Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	65
3.3.2. Deutlich erhöhte Anzahl bRG-Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	68
3.3.3. Fehllokalisierte IP im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	72
3.3.4. Basale Vorläuferzellen weisen in den E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} Embryos eine erhöhte Mitoserate auf.....	75
3.3.5. Verdickte Schicht unausgereifter Neurone in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	77
3.3.6. Verringerte Signalintensität der apikalen Polaritätsproteine Par3 und αPKC in E12,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	79
3.3.7. Veränderungen der IZM an E12,5 weisen in Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-Cre} -Embryos auf eine Verkürzung der G1-Phase der aRG hin	82
3.3.8. Erhöhte Anzahl primärer Zilien im Bereich der VZ, basal der VO von E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	86
3.3.9. Vermehrt horizontale Teilungen mitotischer aRG innerhalb der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	89
3.3.10. Vereinzelttes Auftreten von multipolaren Teilungsspindeln in mitotischen aRG der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	93
3.3.11. Keine Veränderungen im Aufbau der Teilungsspindel mitotischer aRG von E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} Embryos.....	94
3.3.12. Keine Veränderungen im Expressionsmuster von β-, acetyliertem- oder tyrosiniertem-Tubulin im zerebralen Kortex von E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	95
3.3.13. Verringerter Anteil an subkortikalem F-Aktin in mitotischen aRG der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	98

4. Diskussion	100
4.1. Der gehirnspezifische Knock-out von Profilin1 führt embryonal zu einer transienten Expansion der bRG Population und einer Fehllokalisierung von bIP.....	100
4.2. Die gehirnspezifische Deletion von Profilin1 führt im zerebralen Kortex von Mäusen zur Ausbildung von Invaginationen.....	105
4.3. Profilin1-defiziente Mäuse bilden eine „vollständige“ reaktive Astrogliose aus.....	107
Zusammenfassung.....	111
Summary.....	113
Literaturverzeichnis.....	115
Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen.....	133
Danksagung.....	134

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABP	Aktin-bindendes-Protein
ADF	Aktin-Depolymerisationsfaktor
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-G-Aktin	ADP-gebundenes G-Aktin
aIP	Apikale intermediäre Vorläuferzellen
AJ	Adhäsionskontakte
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
aNSC	Apikale neurale Stammzellen
aP	Apikale neurale Vorläuferzellen
α PKC	Atypische Proteinkinase C
Arl13b	ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 13b
aRG	Apikale Radialgliazelle
Arp2/3	Aktin-ähnlicher Protein 2/3 Komplex
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-G-Aktin	ATP-gebundenes G-Aktin
bIP	Basale intermediäre Vorläuferzellen
BLBP	Gehirn Lipid-bindendes Protein
bP	Basale neurale Vorläuferzellen
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
bRG	Basale Radialgliazelle
CA1	Cornu Ammonis Region 1
CA2	Cornu Ammonis Region 2
CA3	Cornu Ammonis Region 3
CC	Corpus Callosum
CP	Kortikale Platte
Dcx	Doublecortin
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

F-Aktin	Aktin Filament
G-Aktin	Globuläres-Aktinmonomer
GFAP	Saures fibrilläres Glia-Protein
GLAST	Astrozyten spezifischer Glutamat-Aspartat-Transporter
GM	Graue Substanz
G1-Phase	Postmitotische Phase des Zellzyklus
G2-Phase	Postsynthetische Phase des Zellzyklus
Hz	Herz
Iba1	Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül 1)
iFL	Innere Faserschicht
ip.	intraperitoneal
IP	Intermediäre Vorläuferzellen
iSVZ	Innere Subventrikularzone
IUE	<i>In utero</i> Elektroporation
IZ	Intermediärzone
IZM	Interkinetische Zellkernmigration
KO	Versuchsmäuse mit einem gehirnspezifischen Knock-out des <i>Pfn1</i> -Gens
Ktr	Versuchsmäuse mit gefloxtem <i>Pfn1</i> -Gen
LGN	Leucin-Glyzin-Asparagin-Komplex
MENA	Maus Homolog von <i>Drosophila</i> „enabled“
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MST	Mitotische Somatranslokation
MT	Mikrotubuli
MTOZ	Mikrotubuli-Organisationszentren
MZ	Marginalzone
n= 9 / 3	9 untersuchte Hemisphären von je 3 Ktr- und KO-Mäusen

nbIP	Neurogene basale intermediäre Vorläuferzellen
NEZ	Neuronale Epithelzellen
NG2-Zellen	Oligodendrozyten Vorläuferzellen
n.s.	nicht signifikant
oFL	Äußere Faserschicht
oRG	Äußere Radialgliazellen
oSVZ	Äußere Subventrikularzone
PAP	Perisynaptische Astrozyten-Fortsätze
Par3	Protease-aktivierter Rezeptor 3
Pax6	Paired-box Transkriptionsfaktor 6
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pbIP	Proliferative basale intermediäre Vorläuferzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR α	von Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktorrezeptor α
PFA	Paraformaldehyd
Pfn1	Profilin1
Pfn1 ^{flx/flx}	Profilin1 gefloخته Mauslinie
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-Cre}	Gehirnspezifische Profilin1 Knockout- Mauslinie
pH3	Phosphoryliertes Histon H3
phospho-Vimentin	Phosphoryliertes-Vimentin
PI	Propidiumiodid
PIP	Phosphatidylinositol
PP	Präplatte
RG	Radiale Gliazellen
SA	Standartabweichung
S	Sekunde
Satb2	Spezielles AT-reiche Sequenzen bindendes Protein 2
SP	Subplatte
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus

Std.	Stunde
SVZ	Subventrikularzone
Tab.	Tabelle
Tbr2	T-Box Gehirnprotein 2
Trnp1	TMF-reguliertes Kernprotein 1
V	Lateraler Ventrikel
VO	Ventrikelloberfläche
VZ	Ventrikularzone
WM	Weißer Substanz

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Schichtung des adulten zerebralen Kortex einer Maus anhand eines Golgi-gefärbten Hirnschnittes.....	15
Abb. 2: Schematische Darstellung der Morphologie und Lokalisation neuraler Vorläuferzellen und Neuronen während der murinen Neurogenese.....	17
Abb. 3: Zytoarchitektur des embryonalen zerebralen Kortex einer Maus.....	18
Abb. 4: Schematische Darstellung der Morphologie und Lokalisation von neuralen Vorläuferzellen und Neuronen während der humanen Neurogenese.....	21
Abb. 5: „Interkinetische Zellkernmigration“ der aRG, in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase.....	23
Abb. 6: Schematische Darstellung des Aktin-Tretmühlenmechanismus und der Funktion der ABPs Profilin und ADF/Cofilin innerhalb dieses Mechanismus...	28
Abb. 7: Kristallstruktur von humanem Profilin1.....	29
Abb. 8: Hypoplasie des Cerebellums und des Neokortex in adulten Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäusen.....	31
Abb. 9: Beispielhafte Einteilung der je 20 µm dicken Areale für die Auswertung der IZM.....	51
Abb. 10: Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäuse.....	55
Abb. 11: Makroskopisch sind die Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche der adulten Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäuse nicht sichtbar.....	56
Abb. 12: Die Basallamina kleidet die lokal auftretenden Invaginationen der adulten Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäusen vollständig aus.....	57
Abb. 13: Im Bereich von Invaginationen kommt es in adulten Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäusen nicht immer zu einer Verformung der superfiziellen Grenze der zerebralen Kortexschichten II/III.....	58
Abb. 14: Keine Invaginationen in den superfiziellen zerebralen Kortexschichten adulter Pfn1 ^{flx/flx} , Pfn1 ^{flx/+,Nestin-cre-} und Pfn1 ^{+/+,Nestin-cre-} Mäuse nachweisbar.....	60
Abb. 15: Nachweis von proliferierenden reaktiven Astrozyten im zerebralen Kortex adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäuse.....	62
Abb. 16: Stark erhöhte Anzahl GFAP ⁺ -Astrozyten innerhalb der zerebralen Kortexschicht I der adulten Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre-} Mäusen, welche sich zudem um die Invaginationen akkumulieren.....	63

Abb. 17: Deutlich erhöhte Anzahl mitotischer Zellen in basalen Bereichen des zerebralen Kortex von E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	65
Abb. 18: Erhöhter Anteil mitotischer Zellen basal der Ventrikeloberfläche im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	66
Abb. 19: Erhöhte Anzahl neu gebildeter Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	67
Abb. 20: Erhöhte Anzahl Pax6 ⁺ -Zellen im Bereich der SVZ bis SP in E14,5 und E16,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} - Mäusen.....	69
Abb. 21: Verringerte Schichtdicke der VZ an E16,5 und erhöhte relative Anzahl RG an E12,5 in Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	71
Abb. 22: Fehllokalisierte IP bei gleichbleibender Gesamtzahl an IP im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	73
Abb. 23: Deutlich erhöhte Anzahl an IP im Bereich der SP und CP innerhalb der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	74
Abb. 24: Erhöhte Mitoserate von IP und bRG in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen.....	75
Abb. 25: Vergrößerte Schicht unausgereifter Neurone in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen.....	78
Abb. 26: Verringerte Signalintensität der apikalen Polaritätsproteine Par3 und αPKC an der VO der E12,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	80
Abb. 27: Vergleichbare Signalintensität von pan-Cadherin an der VO der E12,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos im Vergleich mit den E12,5 Pfn1 ^{flx/flx} -Embryos.....	81
Abb. 28: Keine offensichtlichen Veränderungen der IZM in den Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos an E12,5 oder E14,5.....	83
Abb. 29: Veränderte IZM innerhalb der Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos an E12,5.....	84
Abb. 30: Normale IZM der aRG in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	85
Abb. 31: Erhöhte Anzahl primärer Zilien in der VZ von E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen.....	88
Abb. 32: Darstellung mitotischer aRG in den drei Teilungsebenen vertikal, diagonal und horizontal sowie mit kondensierter und segregierter DNS.....	90

Abb. 33: Keine Unterschiede in der Verteilung der Teilungsebenen oder im Verhältnis von kondensierter zu segregierter DNS bei mitotischen aRG in E12,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen.....	91
Abb. 34: Vermehrt horizontale Teilungen mitotischer aRG in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen bei gleichbleibendem Verhältnis von kondensierter zu segregierter DNS.....	92
Abb. 35: Vermehrte horizontale Teilungen mitotischer aRG in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen.....	93
Abb. 36: Seltenes Auftreten von multipolaren Teilungsspindeln in mitotischen aRG der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäusen.....	94
Abb. 37: Keine offensichtlichen Veränderungen im Aufbau des Spindelapparates mitotischer aRG der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	95
Abb. 38: Keine Veränderungen in der Lokalisation von β -, acetyliertem- oder tyrosiniertem-Tubulin innerhalb der E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	97
Abb. 39: Verringerte subkortikale F-Aktin-Struktur innerhalb mitotischer aRG in E14,5 Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Embryos.....	99

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Quantitative Analyse der Anzahl an Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	54
Tab. 2: Durchschnittliche Tiefe der Einfaltungen im zerebralen Kortex adulter Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} -Mäuse.....	54
Tab. 3: Quantitative Analyse der Anzahl an Invaginationen an mid-parasagittalen Hirnschnitten adulter Pfn1 ^{flx/flx} -, Pfn1 ^{flx/+ ,Nestin-cre} - und Pfn1 ^{+/+ ,Nestin-cre} -Mäuse.....	60

1. Einleitung

1.1. Aufbau des zerebralen Kortex höherer Wirbeltiere

Der cerebrale Kortex höherer Wirbeltiere besteht in seiner radialen Dimension aus je sechs Schichten, meist glutamaterger Neuronen (Schicht I-VI), welche modular als funktionelle Mikrounheiten fungieren (Rakic, 2008). Innerhalb jeder Schicht besitzen die entsprechenden Neurone eine gleiche molekulare Identität und sind mit den gleichen Hirnregionen verschaltet (Rakic, 2008). Dabei ist Schicht I am weitesten superior und Schicht VI am weitesten inferior lokalisiert (Campbell, Reece and Markl, Biologie, 6., aktualisierte Auflage). An die cerebrale Kortexschicht I schließt sich superior die Basallamina an, welche von der weichen Hirnhaut („Pia mater encephalis“) überlagert wird (Dasgupta and Jeong, 2019). Inferior von Schicht VI befindet sich die weiße Substanz (WM), welche eine konzentrierte Ansammlung myelinisierter Axone darstellt und verschiedene Typen von Gliazellen beinhaltet (Bae *et al.*, 2020) (Abb. 1).

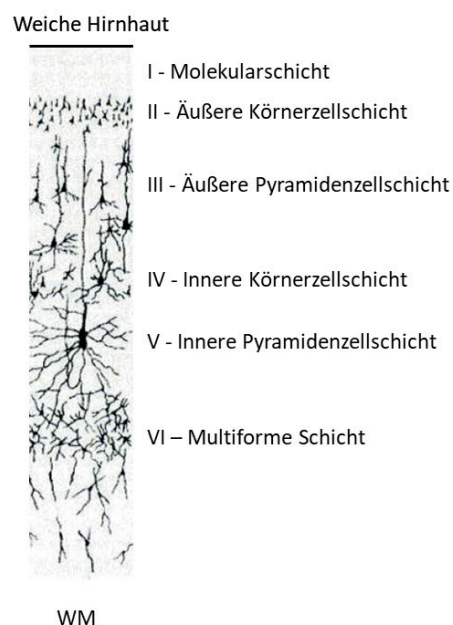


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Schichtung des adulten zerebralen Kortex einer Maus anhand eines Golgi-gefärbten Hirnschnittes.
WM: weiße Substanz. (Verändert nach: Bellenchi et al., 2007).

1.2. Vergleichende Betrachtung lissencephaler und gyrencephaler Säugetiergehirne

Das Großhirn ist ein paariger Auswuchs des Vorderhirns und umfasst die Großhirnrinde (graue Substanz (GM)), die WM und verschiedene Basalkerne (Campbell, Reece and Markl, Biologie, 6., aktualisierte Auflage). Anhand der Auffaltungen der Großhirnrinde können die Säugetiere in zwei verschiedenen Gruppen unterteilt werden. Zum einen in die lissencephalen Spezies, zu denen unter anderem die Nagetiere wie Mäuse und Ratten gehören und in die gyrencephalen Spezies, welche z. B. Rinder, Affen, Elefanten, Wale und auch den Menschen umfassen (Borrell, 2018). Lissencephale Arten weisen eine ebene Hirnoberfläche auf, während sich die Großhirnrinde von gyrencephalen Spezies durch artspezifisch unterschiedlich tiefe Hirnwindungen auszeichnet (Namba and Huttner, 2017). Diese Hirnwindungen werden auch als „Gyri“ (Einzahl: Gyrus) und die Furchen zwischen den Gyri als „Sulci“ (Einzahl: Sulcus) bezeichnet (Namba and Huttner, 2017) zusammenfassend spricht man von kortikalen Einfaltungen (Borrell, 2018). „Echte“ kortikale Einfaltungen, wie sie in gyrencephalen Gehirnen auftreten, charakterisieren sich dabei durch das Auffalten der pialen-Oberfläche und der sich darunter befindlichen sechs neuronalen Zellschichten, wobei diese im Bereich der Gyri dicker und im Bereich der Sulci dünner sind (Borrell, 2018). Die Ventrikeloberfläche (VO) bleibt in „echten“ kortikalen Einfaltungen („Bona fide“ kortikale Einfaltungen) linear (Borrell, 2018). Während der Evolution haben die kortikalen Einfaltungen es dem gyrencephalen Gehirn erlaubt, seine Kortexoberfläche stark zu vergrößern, ohne eine ebenso große Expansion des Schädels nach sich zu ziehen (Florio and Huttner, 2014).

1.3. Embryonalentwicklung des zerebralen Kortex der Maus

Die Grundlage der spezifischen Zytoarchitektur des embryonalen zerebralen Kortex der Maus bildet das „pseudogeschichtete“ Neuroepithelium des Neuralrohrs (Florio and Huttner, 2014). Das Neuroepithelium besteht aus neuronalen Epithelzellen (NEZ), welche sich vor Beginn der Neurogenese symmetrisch-proliferativ teilen und damit sowohl zur flächenmäßigen Expansion (in radialer und lateraler Dimension) des

Neuroepithels sowie zur Vergrößerung der Population an NEZ beitragen (Cadwell *et al.*, 2019).

Mit Beginn der Neurogenese bei Mäusen ab dem zehnten Embryonaltag (E10) (Agirman, Broix and Nguyen, 2017) wechseln die NEZ zu einer asymmetrisch, differenzierenden Teilung und beginnen damit apikale Radialgliazellen (aRG) und erste Neurone zu bilden (Götz and Huttner, 2005; Florio and Huttner, 2014). Die aRG lokalisieren sich in einer Zellschicht, welche als Ventrikularzone (VZ) bezeichnet wird und die sich direkt basal an die VO anschließt (Molyneaux *et al.*, 2007). aRG können sich wie NEZ entweder symmetrisch-proliferativ oder symmetrisch- bzw. asymmetrisch-differenzierend teilen (Florio and Huttner, 2014; Namba and Huttner, 2017). Mit Fortschreiten der Neurogenese treten symmetrisch- bzw. asymmetrisch-differenzierende Teilungen unter den aRG immer häufiger auf, wodurch sie in der Lage sind, radiale Gliazellen (RG), intermediärer Vorläuferzellen (IP) und Neurone zu produzieren (Florio and Huttner, 2014; Namba and Huttner, 2017).

Basal der VZ bildet sich im Laufe der weiteren Entwicklung (ab E13,5) eine zusätzliche proliferative Schicht, die sogenannte Subventrikularzone (SVZ) aus. (Molyneaux *et al.*, 2007). Die SVZ beinhaltet den größten Teil der sogenannten basalen neuralen Vorläuferzellen (bP), zu denen die basalen radialen Gliazellen (bRG) und die basalen intermediären Vorläuferzellen (bIP) gehören (Wong *et al.*, 2015). Innerhalb der VZ lokalisieren sich mit Fortschreiten der Neurogenese neben den aRG auch die apikalen intermediären Vorläuferzellen (aIP). Beide neuralen Vorläuferzelltypen (aRG und aIP) fasst man als apikale neurale Vorläuferzellen zusammen (aP) (Wong *et al.*, 2015) (Abb. 2).

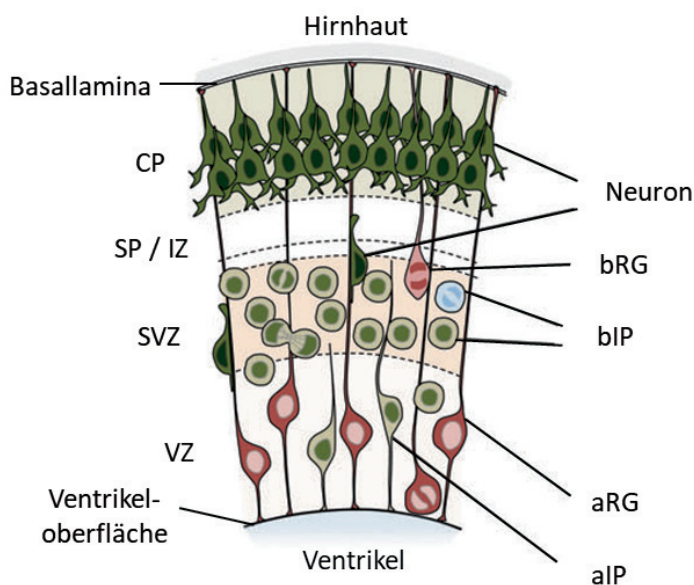


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Morphologie und Lokalisation neuraler Vorläuferzellen und Neuronen während der murinen Neurogenese. aIP: apikale intermediäre Vorläuferzellen; aRG: apikale Radialgliazellen; bIP: basale intermediäre Vorläuferzellen; bRG: basale Radialglia; CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; VZ: Ventrikularzone. (Verändert nach Florio and Huttner, 2014).

Die neuronalen Vorläuferzellen beider Keimzonen (VZ und SVZ) produzieren in einer genau festgelegten zeitlichen Abfolge (Neurogenese Maus: E10,5 bis E18,5) (Agirman, Broix and Nguyen, 2017) alle pyramidalen Neurone sowie einen kleinen Teil der inhibitorischen Neurone des zerebralen Kortex (Dehay, Kennedy and Kosik, 2015). Die ersten Neurone werden circa an E11 gebildet und ordnen sich in einer Schicht an, welche als Präplatte (PP) bezeichnet wird und zwischen der VZ und der Basallamina lokalisiert ist (Molyneaux *et al.*, 2007). Die PP teilt sich etwas später in zwei Schichten auf (Molyneaux *et al.*, 2007). Die obere der beiden Schichten wird als Marginalzone (MZ) und die untere als Subplatte (SP) bezeichnet (Molyneaux *et al.*, 2007). Der Bereich zwischen der SVZ und der SP wird Intermediärzone (IZ) oder Faserschicht genannt, aus der im späteren Verlauf der Hirnentwicklung die WM hervorgeht (Molyneaux *et al.*, 2007). Zwischen der MZ und der SP lagern sich die von den RG und IP gebildeten Neurone an, wobei die später entstandenen Neurone die Schichten der früher entstandenen Neurone durchwandern (Molyneaux *et al.*, 2007) (eine Entwicklung von innen nach außen). Die Neurone, welche im Zuge der Neurogenese als Erstes gebildet werden (~ E11 – E14), bilden die inferioren Hirnschichten des postnatalen zerebralen Kortex (Schicht V-VI) und die später geborenen (~ E14 - E17) die superfiziellen Hirnschichten (Schicht II-IV) (Toma and Hanashima, 2015). Diese schnell wachsende Schicht an Neuronen wird innerhalb der Embryonalentwicklung als kortikale Platte (CP) bezeichnet (Molyneaux *et al.*, 2007). (Abb. 3).

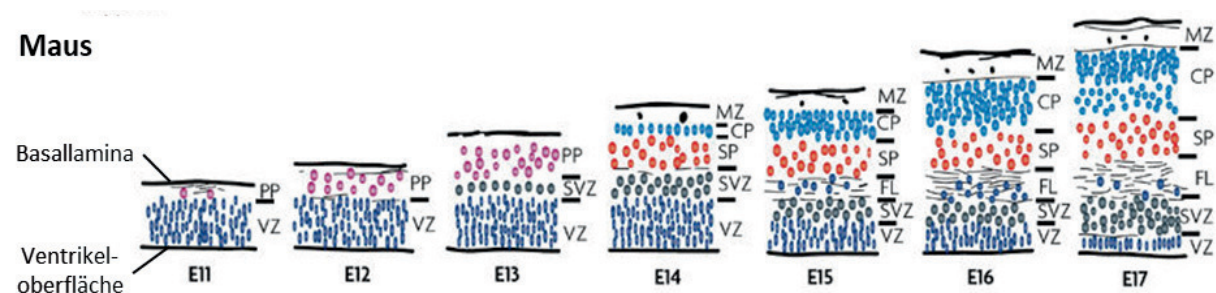


Abbildung 3: Zytoarchitektur des embryonalen zerebralen Kortex einer Maus. Die Tragzeit bei Mäusen beträgt im Schnitt 19 Tage, wovon die kortikale Neurogenese 8 Tage einnimmt (E10,5 bis E18,5) (Agirman, Broix and Nguyen, 2017). Zu Beginn der Neurogenese bildet sich die apikal gelegene Ventrikularzone (VZ) und die basal davon angelegte Präplatte (PP). Im weiteren Verlauf entsteht zwischen der PP und der VZ die Subventrikularzone (SVZ), und aus der PP bildet sich die Marginalzone (MZ) sowie die Subplatte (SP), welche die kortikale Platte (CP) flankieren. Mit dem Hochpunkt der Neurogenese (Maus: zwischen E13,5 und E14,5 (Tang *et al.*, 2019)) bildet sich zwischen der SVZ und der SP eine weitere Schicht, welche als Faserschicht (FL) oder intermediäre Zone (IZ) bezeichnet wird. (Verändert nach: Dehay and Kennedy, 2007).

Zum Ende der Neurogenese startet im zerebralen Kortex daraufhin die Gliogenese (bei Mäusen um E16,5 - E18,5 (Verkhatsky and Nedergaard, 2018)), welche ihren Hochpunkt in der 1-2 postnatal Woche aufweist (Reemst *et al.*, 2016).

1.3.1. Gliogenese und die Reaktivierung von Astrozyten

Mit Beginn der Gliogenese schalten die RG vermehrt von der Produktion von Neuronen zur Produktion von Gliazellen um und bilden Astrozyten sowie Oligodendrozyten (Ge and Jia, 2016). Für die Produktion von Astrozyten migrieren sie in die IZ, verlieren ihren basalen Ausläufer und wandeln sich zu unausgereiften Astrozyten um (Tabata, 2015). Unausgereifte Astrozyten können ebenfalls migrieren, proliferieren und differenzieren sich je nach Lokalisation in protoplasmische (GM) oder fibröse (WM) Astrozyten (Tabata, 2015). Innerhalb der zerebralen Kortexschicht I lokalisiert sich bereits mit Beginn der Neurogenese ein besonderer Typ von Astrozyten, die sogenannten Schicht-1 Astrozyten (Tabata, 2015). Ihre Ausläufer bilden die „Membrana limitans gliae superficialis“ (oberflächliche Gliagrenzmembran) welche an die Basalmembran angrenzt und selektiv permeable ist (Tabata, 2015). Sie besitzen ähnlich den protoplasmischen Astrozyten der GM eine buschige Morphologie und exprimieren ähnlich den fibrösen Astrozyten der WM sehr stark das Typ III Intermediärfilament-Protein GFAP (saures fibrilläres Glia-Protein) (Tabata, 2015). Astrozyten und Oligodendrozyten werden zudem durch Oligodendrozyten Vorläuferzellen (NG2-Zellen) und Glia-Vorläuferzellen der SVZ gebildet (Ge and Jia, 2016). Mikroglia sind nicht wie Makroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten und NG2-Zellen) neuralen Ursprungs, sondern werden von primitiven myeloiden Vorläuferzellen des Dottersacks gebildet und wandern nach ihrer Bildung in das Gehirn ein (Reemst *et al.*, 2016). Mikroglia und Astrozyten spielen im Gehirn in diversen neurologischen Entwicklungsprozessen, wie der Neurogenese, Gliogenese, Angiogenese, dem Auswachsen von Axonen, der Synaptogenese und dem Abbau von Synapsen eine wichtige Rolle. (Jha *et al.*, 2019). Oligodendrozyten sind vor allem für die Myelinisierung von Axonen von essentieller Bedeutung (Budday, Steinmann and Kuhl, 2015).

Auf Verletzungen des Zentralnervensystems reagieren Mikroglia, Astrozyten und NG2-Zellen indem sie sich aktivieren bzw. reaktivieren. Dieser Prozess wird als reaktive Gliose bezeichnet (Robel *et al.*, 2009) und kann durch mechanische Verletzungen,

Zelltod, Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke oder Entzündungen ausgelöst werden (Pekny and Nilsson, 2005). Protoplasmische Astrozyten regulieren dabei unter anderem das Typ III intermediär Filament Protein GFAP sehr stark hoch, verändern sichtbar ihre Form und proliferieren erneut (Robel, Berninger and Götz, 2011). Mikroglia reagieren auf Verletzungen des Zentralnervensystems mit einer gesteigerten Proliferation, der Migration hin zu einem Chemoattractanten (z. B. einer Läsion), der Reduzierung ihrer zellulären Komplexität sowie mit der Phagozytose von beschädigtem Gewebe (Kettenmann *et al.*, 2011; Jäkel and Dimou, 2017).

1.4. Embryonalentwicklung des zerebralen Kortex gyrencephaler Gehirne

Die Entwicklung des zerebralen Kortex beginnt auch bei gyrencephalen Spezies wie den Rhesusaffen mit dem Neuroepithel des Neuralrohres, wobei die kortikale Neurogenese 60 Tage (E40 bis E100) (Rakic, 1974) der 165 Tage langen Embryonalentwicklung der Rhesusaffen einnimmt (Dehay and Kennedy, 2007). Aus dem Neuroepithel entwickelt sich dabei auch bei gyrencephalen Gehirnen zuerst die VZ und die PP. Die PP teilt sich im weiteren Verlauf der Neurogenese in die MZ und die SP auf, welche die stetig wachsende CP flankieren (Angevine *et al.*, 1969).

Einer der Hauptunterschiede in der embryonalen Zytoarchitektur von lissencephalen und gyrencephalen Gehirnen liegt in der Organisation und der Dicke der SVZ (Dehay and Kennedy, 2007). Sie unterteilt sich in gyrencephalen Spezies (z. B. Rhesusaffen), in die sogenannte „innere SVZ“ (iSVZ) und die „äußere SVZ“ (oSVZ) (Smart *et al.*, 2002). Die relative Dicke der VZ unterscheidet sich dabei nicht maßgeblich zwischen lissencephalen und gyrencephalen Spezies (Namba and Huttner, 2017). Die iSVZ ist in gyrencephalen Gehirnen direkt basal der VZ angeordnet und ähnelt in ihrer Zytoarchitektur stark der SVZ lissencephaler Spezies wie den Mäusen (Florio and Huttner, 2014). Die oSVZ ist wiederum basal der iSVZ lokalisiert und durch ihre spezifische Zytoarchitektur sowie eine Struktur, welche als „innere Faserschicht“ (iFL) bezeichnet wird, sichtbar von der iSVZ getrennt (Dehay and Kennedy, 2007). Wiederum basal wird die oSVZ von einer äußeren Faserschicht (oFL) begrenzt (Smart *et al.*, 2002; Dehay and Kennedy, 2007). Darüber befindet sich in aufsteigender superiorer Orientierung, wie auch bei Spezies mit lissencephalen Gehirnen, die SP, die CP und die MZ (Angevine *et al.*, 1969) (Abb. 4). Die Neurogenese läuft auch bei

gyrencephalen Spezies direkt in die Gliogenese über, wobei es vor allem bei den Astrozyten zu einer deutlich höheren Diversität als bei murinen Astrozyten kommt.

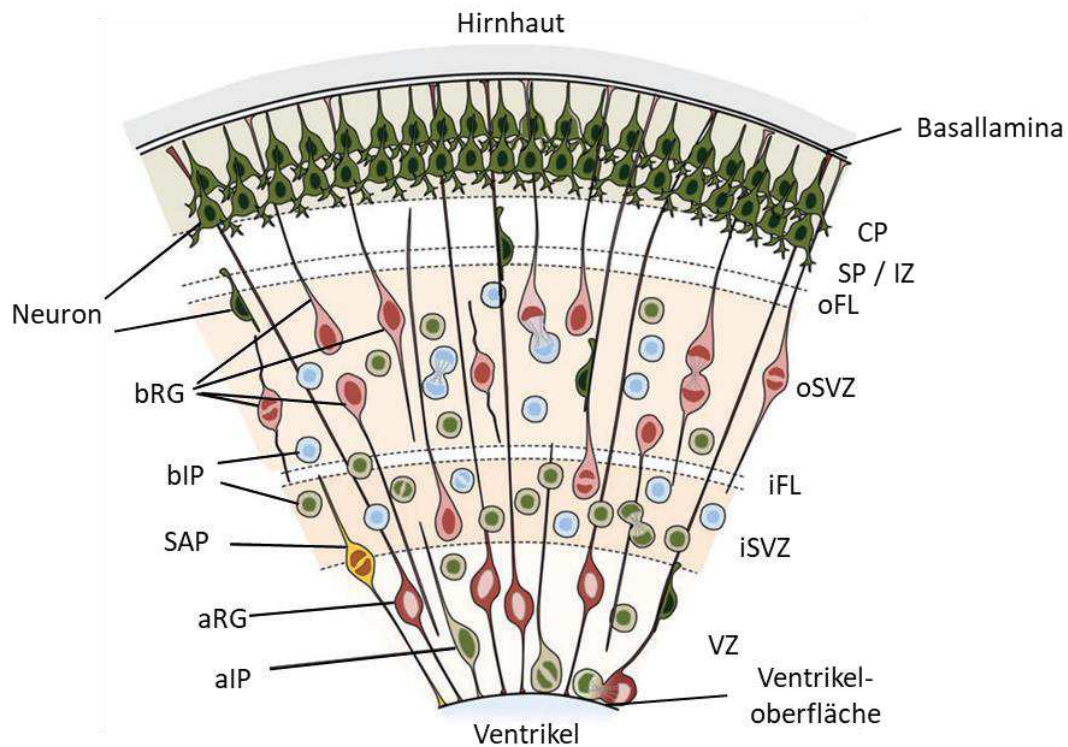


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Morphologie und Lokalisation von neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen während der humanen Neurogenese. aIP: apikale intermediäre Vorläuferzellen; aRG: apikale Radialgliazellen; bIP: basale intermediäre Vorläuferzellen; bRG: basale Radialgliazellen; CP: Korticale Platte; iFL: innere Faserschicht; iSVZ: innere Subventrikularzone; IZ: Intermediärzone; MZ: Maginalzone; oFL: äußere Faserschicht; oSVZ: äußere Subventrikularzone; SAP: Subapikale Vorläuferzellen; SP: Subplatte; VZ: Ventrikularzone. (Verändert nach Florio and Huttner, 2014).

1.5. Neurale Vorläuferzellen

Als Grundlage für die im Vorfeld erwähnte cerebrale Kortextentwicklung in lissencephalen wie auch gyrencephalen Spezies dienen drei Typen von neuronalen Vorläuferzellen: NEZ, RG und IP (Florio and Huttner, 2014), deren Charakteristika im weiteren Verlauf beschrieben werden.

Die Charakterisierung der verschiedenen Typen neuraler Vorläuferzellen bezieht sich generell auf murine Vorläuferzellen. Spezifische Unterschiede in Bezug auf gyrencephale neurale Vorläuferzellen stelle ich separat heraus, um im späteren Verlauf dieser Dissertation verständlichere Schlussfolgerungen zwischen dem

Phänotyp der Profilin1-defizienten Versuchsmäuse und gyrencephalen Spezies wie dem Menschen herstellen zu können.

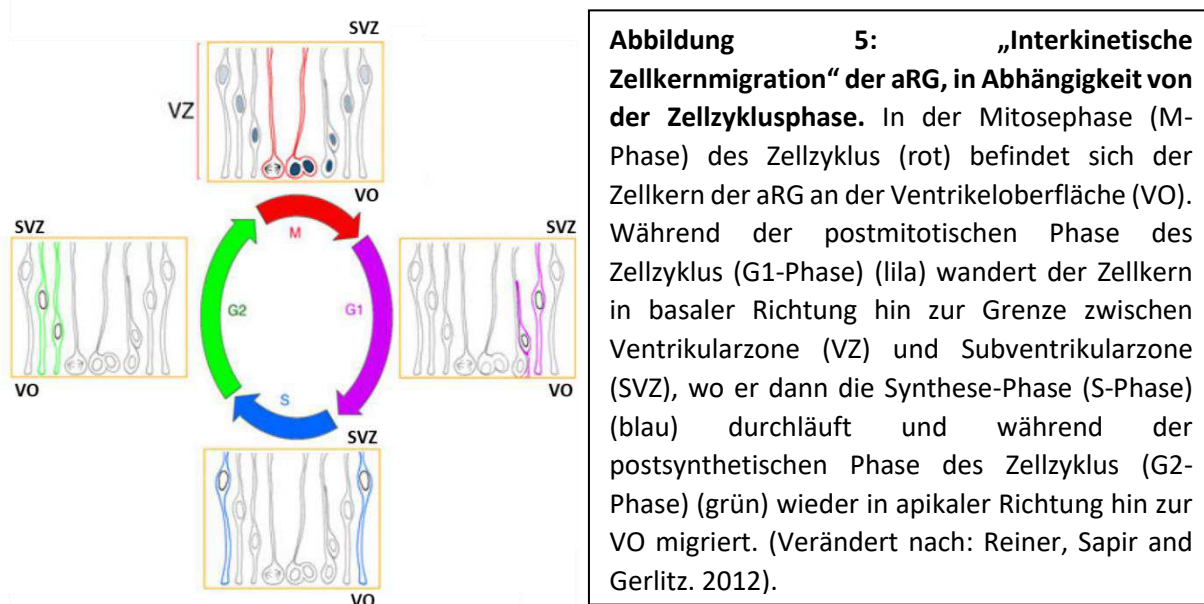
1.5.1. Neurale Epithelzellen

NEZ sind im Neuroepithelium des Neuralrohrs lokalisiert, besitzen eine apikal-basale Polarität und durchspannen die gesamte Dicke des Neuroepitheliums (Florio and Huttner, 2014). Dabei sind sie mittels eines basalen Ausläufers mit der Basallamina und über einen apikalen Ausläufer mit dem Lumen des Neuroalrohrs verbunden (Florio and Huttner, 2014). Der Zellkern der NEZ migriert in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase entlang der Apikal-basal-Achse der Zellen, was auch als interkinetische Zellkernmigration (IZM) bezeichnet wird (Taverna and Huttner, 2010). Die Mitosephase der NEZ findet dabei ausschließlich an der VO statt (Florio and Huttner, 2014).

1.5.2. Apikale Radialgliazellen

aRG sind mittels eines apikalen Ausläufers mit der VO und mittels eines basalen Ausläufers mit der Basallamina verbunden, ihr Soma ist in der VZ lokalisiert (Florio and Huttner, 2014). Sie besitzen eine apiko-basale Polarität (Florio and Huttner, 2014), welche sich beispielsweise durch die Anreicherung von apikalen Polaritätsproteinen wie Par3 (Protease-aktivierter Rezeptor 3) und α PKC (atypische Proteinkinase C) im apikalen Endfuß der aRG äußert (Costa *et al.*, 2008). Des Weiteren sind die aRG im Bereich des apikalen Endfußes mittels Adhäsionskontakten (AJ) mit der VO und untereinander verbunden, was auch als Adhäsionskontakt-Gürtel bezeichnet wird (Florio and Huttner, 2014; Paridaen and Huttner, 2014). Außerdem stehen sie über ein am apikalen Endfuß lokalisiertes primäres Zilium mit der Cerebrospinalflüssigkeit in Kontakt (Paridaen, Wilsch-Bräuninger and Huttner, 2013). Sie exprimieren sowohl verschiedene Astroglia-Marker wie GLAST (Astrozyten spezifischer Glutamat-Aspartat-Transporter) (Campbell and Götz, 2002) und BLBP (Gehirn Lipid-bindendes Protein) (Feng, Hatten and Heintz, 1994) sowie den Transkriptionsfaktor Pax6 („paired-box“ Transkriptionsfaktor 6) (Götz, Stoykova and Gruss, 1998) und das Intermediärfilament Nestin (Frederiksen and McKay, 1988).

Entlang des basalen und apikalen Ausläufers führen die aRG innerhalb der VZ eine von der Phase des Zellzyklus abhängige IZM durch und sind nur an der VO mitotisch (Taverna and Huttner, 2010). Dabei migriert der Zellkern in der postmitotischen Phase des Zellzyklus (G1-Phase) in basaler Richtung weg von der VO und hin zur Grenze zwischen VZ und SVZ (Taverna and Huttner, 2010). In diesem Grenzbereich findet dann die Synthese-Phase (S-Phase) statt (Taverna and Huttner, 2010). Nach deren Beendigung migriert der Zellkern in der postsynthetischen Phase des Zellzyklus (G2-Phase) wieder in apikaler Richtung hin zur VO und führt an der VO die Mitose-Phase (M-Phase) durch (Taverna and Huttner, 2010; Reiner, Sapir and Gerlitz, 2012) (Abb. 5).



Die mittels symmetrisch- bzw. asymmetrisch-differenzierender Teilung im Laufe der Neurogenese von den aRG erzeugten bP, beginnen direkt nach ihrer Bildung mit der Translokation ihres Somas in basaler Richtung (Tavano *et al.*, 2018). Dieser Migrationsprozess geht mit dem Austritt aus dem Adhäsionskontakt-Gürtel und dem Verlust des Kontaktes mit der VO einher und wird als Delaminierung bezeichnet (Tavano *et al.*, 2018).

Neben der Produktion von neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen besitzen die aRG noch eine weitere wichtige Funktion. Ihre Ausläufer dienen als „Stütze“ für die radiale Migration unausgereifter Neurone in die CP (Gal *et al.*, 2006).

Innerhalb des humanen zerebralen Kortex werden die aRG auch als ventrikuläre RG (vRG) bezeichnet (Chou, Li and Wang, 2018).

1.5.3. Apikale intermediäre Vorläuferzellen

Apikale IP werden von aRG gebildet, besitzen eine radial-bipolare („Stecknadel-ähnliche“) Morphologie, sind in der VZ lokalisiert und stehen zu einem geringen Anteil auch noch nach ihrer Bildung über einen apikalen Ausläufer mit der VO in Kontakt (Namba and Huttner, 2017; Hevner, 2019). Des Weiteren exprimieren aIP die Transkriptionsfaktoren Tbr2 (T-Box Gehirnpotein 2) und Pax6, und teilen sich im apikalen Bereich der VZ symmetrisch-neurogen (Gal *et al.*, 2006). Von den aRG unterscheiden sie sich deutlich, da sie keine Astroglia Marker wie z. B. GLAST oder BLBP exprimieren, ihr kurzer basaler Ausläufer nicht mit der Basallamina in Verbindung steht und sie keine selbsterneuernde Teilung durchführen können (Gal *et al.*, 2006; Howard, Chen and Zecevic, 2006).

1.5.4. Subapikale Vorläuferzellen

Subapikale Vorläuferzellen sind über einen apikalen Ausläufer mit der VO verbunden und vollziehen ihre Mitose in subapikalen Bereichen (Pilz *et al.*, 2013). Identifiziert wurden sie im ventralen Telencephalon von Mäusen und im dorsalen Telencephalon gyrencephaler Spezies (Arai and Taverna, 2017).

1.5.5. Basale intermediäre Vorläuferzellen

Basale IP sind in der SVZ lokalisiert und haben eine multipolare Morphologie, welche sich durch diverse kurze Ausläufer auszeichnet, die sich dynamisch verlängern und wieder verkürzen können (Nelson *et al.*, 2013). Nach der Bildung der bIP durch die aRG, delaminieren die bIP von der VO und verlieren ihre RG spezifischen basalen und apikalen Ausläufer sowie ihre apiko-basale Polarität (Haubensak *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2004). Im lissencephalen Gehirn wie dem der Maus regulieren die bIP, auf ihrem Weg zur SVZ, ihre Astroglia Marker (z. B. GLAST) sowie den Transkriptionsfaktor Pax6 herunter und beginnen mit der Expression des Transkriptionsfaktors Tbr2 (Englund *et al.*, 2005; Cappello *et al.*, 2006).

Anhand ihrer Teilungseigenschaften lassen sich zwei verschiedene Typen von bIP unterscheiden. Zum einen die sogenannten „neurogenen bIP“ (nbIP), welche sich

schon in ihrer ersten Mitose selbstverbrauchend, symmetrisch-neurogen teilen und zum anderen die sogenannten „proliferativen bIP“ (pbIP) oder „transient amplifying cell“ (Hansen *et al.*, 2010), die mehrere Mitosen durchlaufen können und sich dabei symmetrisch-proliferativ teilen, bevor sie eine selbstverbrauchende, symmetrisch-neurogene Teilung durchlaufen (Florio and Huttner, 2014). Innerhalb lissencephaler Spezies wie der Maus kommen fast ausschließlich nbIP vor (Miyata *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2004), wohingegen im gyrencephalen Gehirn von Primaten die Mehrzahl aller bIP den pbIP zugeordnet werden können (Fietz *et al.*, 2010). Allgemein sind die bIP in gyrencephalen Gehirnen in zwei Regionen lokalisiert, der iSVZ und der oSVZ, exprimieren neben Tbr2, zu einem großen Teil auch weiterhin den Transkriptionsfaktor Pax6 und sind unter anderem in der Lage, bRG zu generieren (Betizeau *et al.*, 2013; Turrero García *et al.*, 2015).

1.5.6. Basale Radialgliazellen

Im embryonalen Neokortex von Mäusen sind die bRG im Bereich der SVZ und zu einem geringen Anteil auch in der IZ lokalisiert (Wang *et al.*, 2011). Sie treten dort nur in sehr geringer Menge auf und machen etwa 7 % der Gesamtanzahl aller RG aus (Wang *et al.*, 2011). Murine bRG sind monopolar und besitzen einen basalen Ausläufer, welcher mit der Basallamina in Verbindung steht (Wang *et al.*, 2011). Ihr apikaler Ausläufer, sofern vorhanden, ist stark verkürzt und besitzt keinen Kontakt zur VO (Fietz *et al.*, 2010; Reillo *et al.*, 2011). Allgemein teilen sich die bRG der Mäuse hauptsächlich asymmetrisch-neurogen (Shitamukai, Konno and Matsuzaki, 2011; Wang *et al.*, 2011) und exprimieren, genau wie die aRG, verschiedene Astroglia Marker wie z. B. GLAST und BLBP, sowie die Transkriptionsfaktoren Pax6 und Sox2 („sex determining region Y (SRY)- box2“) (Namba and Huttner, 2017). Während der Interphase des Zellzyklus exprimieren murine bRG teilweise auch noch Tbr2 (Betizeau *et al.*, 2013). Basale RG sind zudem genau wie aRG, nicht immobil (Wang *et al.*, 2011). Sie betreiben eine sogenannte „mitotische Somatranslokation“ (MST), welche die radiale Bewegung des Somas entlang ihres basalen Ausläufers beschreibt und direkt vor der Zytokinese stattfindet (LaMonica *et al.*, 2012; Ostrem, Di Lullo and Kriegstein, 2017).

Basale RG wurden ursprünglich im embryonalen Gehirn von Menschen und Frettchen entdeckt und charakterisiert. Dort werden sie als äußere Radialgliazellen (oRG)

(Hansen *et al.*, 2010) oder intermediäre Radialgliazellen bezeichnet (Reillo *et al.*, 2011) haben ebenfalls eine apiko-basale Polarität und sind in der oSVZ lokalisiert. Während der Neurogenese stellen sie bei Primaten und Menschen 40 % bis 75 % aller proliferierenden Zellen (Wang *et al.*, 2011) und besitzen die Kapazität, sich zum einen selbsterneuernd und zum anderen symmetrisch-differenzierend zu teilen (Betizeau *et al.*, 2013). Dementsprechend sind sie in der Lage Neurone aber auch jeden anderen Typ von basalen Vorläuferzellen zu produzieren (Betizeau *et al.*, 2013).

Auch die bRG gyrencephaler Gehirne betreiben direkt vor der Zytokinese eine MST (Romero and Borrell, 2015). Des Weiteren exprimieren sie ebenfalls RG Marker wie z. B. Nestin, Vimentin und Pax6, produzieren aber zusätzlich noch spezifische oRG Marker wie HOPX („Homeodomain-only protein homeobox“), TNC (Tenascin C) und ITGB5 (Integrin beta-5), was die Differenzierung zwischen aRG und oRG erleichtert (Ostrem, Di Lullo and Kriegstein, 2017).

1.6. Neuronale Entwicklungsdefekte

Anomalien der Neurogenese, der Migration von Neuronen oder der Differenzierung von Neuronen bilden den Ursprung diverser neurodegenerativer Erkrankungen (Guarnieri *et al.*, 2018). Eine erhöhte Proliferation neuraler Vorläuferzellen beispielsweise kann einen direkten Einfluss auf die Anzahl an unausgereiften Neuronen haben und diese deutlich erhöhen (Guerrini and Dobyns, 2014). Daraus kann sich z. B. eine Megalenzephalie (deutlich vergrößertes Gehirn) oder eine fokal kortikale Dysplasie II (schwere Strukturstörung des Neokortex mit neuronaler Zytomegalie und Riesenzellen (Kirchhof *et al.*, 2003)) entwickeln (Guerrini and Dobyns, 2014). Intrinsisch basierte Defekte der Migration von Neuronen können z. B. zur Ausbildung einer subkortikalen Bandheterotopie (Band von Neuronen inferior der GM) oder einer Lissencephalie (charakterisiert durch einen abnormal dicken zerebralen Kortex mit reduzierten oder nicht vorhandenen Hirnwindungen (Di Donato *et al.*, 2017)) führen (Guarnieri *et al.*, 2018). Das Miller-Dieker-Syndrom ist eine seltene neurodegenerative Erkrankung, welche mit der Ausbildung einer Lissencephalie einhergeht (Alkam *et al.*, 2017). In den meisten Patienten wird es durch Mikrodeletionen im Chromosomenabschnitt 17p13.3 verursacht, welches neben anderen Genen auch die DNA-Sequenz des Profilin1-Gens beinhaltet (Alkam *et al.*, 2017). Profilin1 (Pfn1) wird ubiquitär im Körper exprimiert, mit Ausnahme der

Skelettmuskulatur (Witke, 2004; Jockusch, Murk and Rothkegel, 2007) (Jockusch, Murk and Rothkegel, 2007) und gehört zusammen mit drei weiteren Profilin-Isoformen zur Profilin Familie.

1.7. Profilin und der Aktin-Tretmühlenmechanismus

Neben Profilin1 beinhaltet die Familie der Profileine noch das hauptsächlich im Gehirn exprimierte Profilin2 (Witke *et al.*, 2001; Pilo Boyl *et al.*, 2007) sowie Profilin3, welches in Niere und Hoden vorzufinden ist (Hu *et al.*, 2001) und Profilin4, welches nur im Hoden exprimiert wird (Obermann *et al.*, 2005). Profilin1 wurde ursprünglich als ein 15-kDa großes Aktin-bindendes-Protein (ABP) charakterisiert (Carlsson *et al.*, 1977), was durch seine Regulation der Aktin-Dynamik im Zellzytoskelett (Davey and Moens, 2020) essenziell für das Überleben von Zellen ist (Witke *et al.*, 2001). Es katalysiert im Aktin-Tretmühlenmechanismus den Nukleotid-Austausch von Adenosin-5'-diphosphat-gebundenem-globulären-Aktin Monomeren (ADP-G-Aktin) zu Adenosin-5'-triphosphat-gebundenem-globulären-Aktin Monomeren (ATP-G-Aktin) und unterstützen ATP-G-Aktin dabei an das (+)-Ende eines Aktinfilaments (F-Aktin) zu binden (Pollard, 2016) (Abb. 6). Der Aktin-Tretmühlenmechanismus ist ein dynamischer Prozess bei dem am (+)-Ende des F-Aktins ATP-G-Aktin polymerisiert und am (-)-Ende ADP-G-Aktin depolymerisiert wird (Dominguez and Holmes, 2011). Bei der passiven Bewegung des G-Aktins durch das Filament wird ATP durch Abspalten eines Phosphatrestes (Hydrolyse) zu ADP umgewandelt, was die Affinität der einzelnen Aktin-Untereinheiten zueinander verringert, sodass ADP-G-Aktin am (-)-Ende des F-Aktins depolymerisiert werden kann (Witke, 2004; Baum *et al.*, 2006). Aktin Filamente sind hoch dynamisch und an diversen Prozessen wie der Mobilität von Zellen, der Phagozytose, dem Vesikeltransport und der Zellteilung beteiligt (Hurst, Shimada and Gasser, 2019). ABPs wirken dabei regulatorisch auf jeden Aspekt der Assemblierung von Aktinfilamenten ein (Pollard, 2016). Sie wirken auf die Verzweigung von Aktinfilamenten bzw. deren Nukleation (z. B. Arp2/3 (Aktin-ähnlicher Protein 2/3 Komplex)) und unterstützen die Verkürzung (z. B. ADF (Aktindepolymerisationsfaktor)/Cofilin) oder Verlängerung (z. B. Profilin, Formin) von F-Aktin. Des weiteren „deckeln“ sie das (+)- oder (-)-Ende des F-Aktin Stranges (z. B. Tropomodulin) und verbinden Aktinfilamente miteinander (z. B. Fimbrin) oder

beispielsweise mit der Plasmamembran (z. B. Mena (Maus Homolog von *Drosophila* „enabled“) (Pollard, 2016).

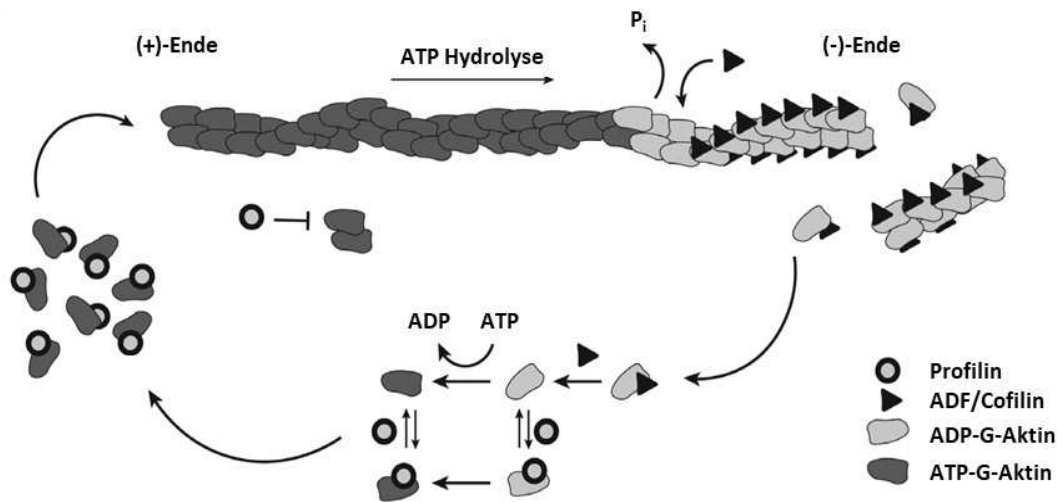


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aktin-Tretmühlenmechanismus und der Funktion der ABPs Profilin und ADF/Cofilin innerhalb dieses Mechanismus. Beim passiven Transport durch das Aktin Filament wird ATP-G-Aktin zu ADP-G-Aktin hydrolysiert (ein Phosphatrest (P_i) wird abgespalten). Die Bindung von ABPs wie ADF/Cofilin an ADP-G-Aktin führt zum Zerschneiden des F-Aktin-Strangs am

(-) -Ende und zur Depolymerisation von ADP-G-Aktin. Nach Auflösen der Bindung von ADF/Cofilin an ADP-G-Aktin fördert Profilin den Nucleotid-Austausch von ADP-G-Aktin zu ATP-G-Aktin und unterstützt ATP-G-Aktin bei der Polymerisation an den F-Aktin-Strang. ABP: Aktin-bindende-Proteine; ADF/Cofilin: Aktin-Depolymerisationsfaktor; ADP: Adenosin-5'-diphosphat; ADP-G-Aktin: ADP-gebundenes-globuläres-Aktin Monomer; ATP: Adenosin-5'-triphosphat; ATP-G-Aktin: ATP-gebundenes-globuläres-Aktin Monomer; F-Aktin: Aktin Filament. (Verändert nach: Pinto-Costa and Sousa, 2020).

Profiline können nicht nur mit Aktin interagieren, sondern besitzen zudem noch zwei weitere Bindedomänen: eine für Phosphatidylinositol (PIP), dabei hauptsächlich für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP_3) und eine für Poly-L-Prolin-reiche Proteine (Pinto-Costa and Sousa, 2020). Die Poly-L-Prolin Bindedomäne ist dabei räumlich deutlich von der Aktin-Bindedomäne separiert (Schutt *et al.*, 1993). Beide überlappen allerdings mit der PIP-Bindedomäne (Abb. 7), was zur Folge hat, dass die Bindung von Phosphatidylinositol eine weitere Interaktion mit anderen Liganden verhindert (Lassing and Lindberg, 1985; Lambrechts *et al.*, 1997).

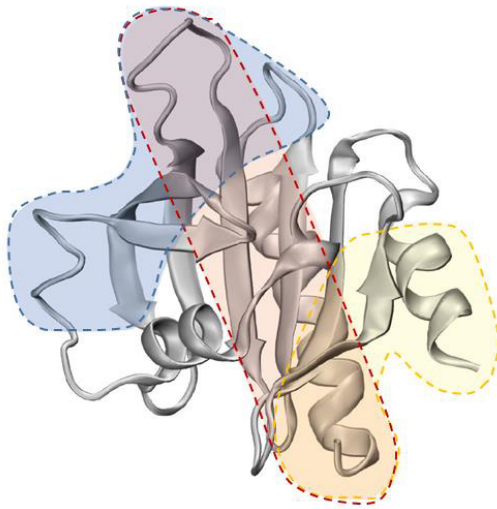


Abbildung 7: Kristallstruktur von humanem Profilin1. Die drei Bindedomänen von Profilin sind farblich hervorgehoben: Aktin-Bindedomäne (hellblau), PLP-Bindedomäne (hellgelb) und PIP₂-Bindedomäne (hellrot). PLP: Poly-L-Prolin-reiche Proteine; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Verändert nach: Pinto-Costa and Sousa, 2020).

Diverse Studien ergaben, dass Profilin mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann. Interaktionspartner sind beispielsweise Fokalkontakt-Proteinen (z. B. Mena), an der Endozytose beteiligte Proteine (z. B. Clathrin), Aktin-Nukleationsfaktoren (z. B. Arp2/3) oder wichtige Mitglieder der Rac/Rho oder cdc42 („Cell Division Cycle 42“) Signalkaskade (Davey and Moens, 2020). Des Weiteren beeinflusst Profilin über eine Interaktion mit Formin die Mikrotubuli-Dynamik und Stabilität in Zellen (Pinto-Costa *et al.*, 2020). Innerhalb der Zelle sind Mikrotubuli (MT) unter anderem für den Aufbau der Mitosespindel sowie für den intrazellulären Transport von essenzieller Bedeutung (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

Die große Bandbreite an Krankheiten, welche mit einer Fehlfunktion von Profilin in Verbindung gebracht werden, demonstriert die wichtige Rolle von Profilin in der Zelle. (Davey and Moens, 2020). Einige dieser Erkrankungen sind z. B. die spinale Muskelatrophie (Nölle *et al.*, 2011), Diabetes und Störungen des Glukosemetabolismus (Pae and Romeo, 2014) sowie vaskuläre Hypertrophie und Hypertension (Jin *et al.*, 2012). Des Weiteren unterstützt eine Fehlfunktion von Profilin das Wachstum von Krebszellen (Mouneimne *et al.*, 2012). Eine neurodegenerative Erkrankung, welche in einigen Patienten mit verschiedenen Mutationen im *Pfn1*-Gen einhergeht, ist die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Kiaei *et al.*, 2018). ALS charakterisiert sich durch eine fortschreitende Degeneration von Motorneuronen in der Wirbelsäule, dem Stammhirn und dem Motorkortex (Pehar *et al.*, 2017). Die Mutationen im *Pfn1*-Gen führen zu Veränderungen in der 3-D-Struktur des Profilin1 Proteins, was unter anderem zur Bildung von Aggregaten, mutierten Pfn1-Proteinen und daraus folgend zu Problemen bei der Aktin-Polymerisierung führt (Kiaei *et al.*,

2018). Außerdem wird vermutet, dass die Mutationen von *Pfn1* zu einer Verringerung der zellulären Mikrotubuli-Dynamik und / oder zu einer Verringerung des Wechselspiels zwischen dem Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett sowie zu Defekten im intrazellulären Transport der MT führt, was wiederum die Degeneration der Motorneuronen bedingt (Henty-Ridilla, Juanes and Goode, 2017). Eine weitere neurodegenerative Erkrankung, welche direkt mit einem deutlich reduzierten Anteil an Profilin1 in adulten Versuchsmäusen in Verbindung gebracht wird, ist das Fragile-X-Syndrom (Michaelsen-Preusse *et al.*, 2016). Das Fragile-X-Syndrom ist eine Erbkrankheit, welche mit einem essenziellen Defekt in der Bildung und Reifung von Synapsen einhergeht und den häufigsten monogenetischen Grund für Autismus darstellt (Michaelsen-Preusse *et al.*, 2016).

Diese Verbindungen zwischen Mutationen des *Pfn1* Gens und einigen teils sehr schweren neurodegenerativen Erkrankungen zeigen, dass es wichtig ist, nähere Einblicke in die spezifische Funktionsweise von Pfn1 im Gehirn zu erlangen.

1.8. Die gehirnspezifische Profilin1 Knock-out Maus

Vorangegangene Analysen bezüglich der Relevanz von Profilin1 in der Gehirnentwicklung nutzen eine gehirnspezifische Pfn1-Knock-out-Mauslinie (*Pfn1^{flx/flx},Nestin-cre*). Die adulten Profilin1-defizienten Mäuse zeigten verschiedene Anomalien im Bereich des Neokortex und Cerebellums. Festgestellt werden konnte eine Hypoplasie des Cerebellums, welche mit einer anormalen Schichtung des cerebellaren Kortex sowie mit ektopischen Körnerzellen einherging (Kullmann *et al.*, 2012). Weitere morphometrische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten zudem eine deutliche Verringerung der allgemeinen Größe des Neokortex um 25 % (Kullmann *et al.*, 2012) (Abb. 8), eine verkürzte rostro-caudale Ausbildung des Corpus Callosums (CC) (Minnerup, 2012) sowie eine „partielle“ reaktive Astroglieose innerhalb des zerebralen Kortex (Minnerup, 2014). Ob es sich bei der reaktiven Astroglieose tatsächlich um eine „partielle“ oder eine „vollständige“ reaktive Astroglieose handelt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Eine weitere Besonderheit, welche im zerebralen Kortex der adulten *Pfn1^{flx/flx},Nestin-cre*-Mäuse beobachtet werden konnte, waren Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche (Dr. Jan Kullmann und Dr. Silvia Cappello, nicht publiziert).

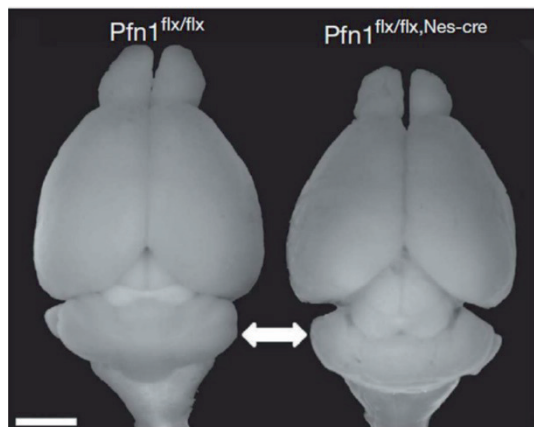


Abbildung 8: Hypoplasie des Cerebellums und des Neokortex in adulten Pfn1^{flx/flx, Nestin.Cre}-Mäusen. Dorsale Übersichtsaufnahme eines postnatal Tag 60 (P60) Mäusegehirns einer Pfn1^{flx/flx}- und Pfn1^{flx/flx, Nestin-Cre}-Maus. Der Doppelpfeil weist auf das stark verkleinerte Cerebellum hin. Maßstab: 3 mm. (Aus: Kullmann et al., 2012)

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Da Mäuse nativ ein lissencephales Gehirn aufweisen (Namba and Huttner, 2017) bildet die Charakterisierung und Analyse der Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche der Profilin1-defizienten Mäuse zusammen mit der Untersuchung möglicher Ursachen für die Ausbildung der Einfaltungen das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Eine mögliche Ursache für das Einfalten der zerebralen Kortexoberfläche bei Mäusen bildet ein erhöhter Anteil von bRG während der embryonalen Gehirnentwicklung (Stahl *et al.*, 2013). Um mögliche Anomalien in der Anzahl oder Lokalisation der verschiedenen Typen von neuronalen Vorläuferzellen innerhalb des Neokortex der gehirnspezifischen Profilin1 Knock-out Mäusen nachweisen zu können, kommen innerhalb dieser Arbeit Fluoreszenz-gekoppelte Antikörperfärbungen an unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Versuchstiere zum Einsatz.

Des Weiteren untersucht wird die Fragestellung, ob es sich bei der reaktiven Astrogliose innerhalb des adulten Neokortex der Profilin1-defizienten Mäuse um eine „partielle“ oder eine „vollständige“ reaktive Astrogliose handelt. Eine „vollständige“ reaktive Astrogliose charakterisiert sich dabei durch die Proliferation der reaktivierten Astrozyten, während bei einer „partiellen“ reaktiven Astrogliose keinerlei Proliferation der reaktiven Astrozyten nachgewiesen werden kann (Robel *et al.*, 2009). Untersucht wird diese Fragestellung mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörperfärbungen an adulten Gehirnschnitten der Profilin1-defizienten Mäuse.

2. Material und Methoden

2.1. Puffer und Lösungen:

Falls nicht anders angegeben, wurden die folgenden Lösungen in 1 x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) angesetzt.

Blocker nach Rust

2 % (w/v) Bovine Serum Albumin	(Carl Roth GmbH)
3 % (v/v) Ziegenserum (NGS)	(New England Biolabs)
0,5 % (v/v) Nonoxinol 40 (NP40)	(Merck (Sigma-Aldrich))

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (auf 1 ml 1x PBS)

10 mg BrdU	(Merck (Sigma-Aldrich))
------------	-------------------------

Carrier nach Cappello

10 % Ziegenserum (NGS)	(New England Biolabs)
0,5 % Triton X-100	(Carl Roth)

Carrier nach Rust

2 % (w/v) Bovine Serum Albumin	(Carl Roth GmbH)
0,5 % (v/v) Nonoxinol 40 (NP 40)	(Merck (Sigma-Aldrich))

4 M Salzsäure (HCl) (auf 100 ml 1x PBS)

33,11 ml 37 % Salzsäure (12,08 M)	(Carl Roth GmbH)
-----------------------------------	------------------

Höchst 33342 (in 1 ml doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O))

1 mg Höchst 33342	(Life Technologies)
-------------------	---------------------

Lösung 1 (DNS Aufreinigung) (in 500 ml ddH₂O)

0,5 g NaOH (25mM)	(Carl Roth GmbH)
0,037 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,2 mM, pH5)	(Carl Roth GmbH)

Lösung 2 (DNS Aufreinigung) (in 500 ml ddH₂O)

3,15 g Tris-HCl (40mM, pH5) (Carl Roth GmbH)

0,1 M Natriumtetraborat Decahydrat Lösung (pH 8,5) (in 100 ml 1x PBS)

3,81 g Na₂B₄O₇ x 10H₂O (Merck (Sigma-Aldrich))

4 % Paraformaldehyd (PFA)

4 % (w/v) PFA (Carl Roth GmbH)

10 x PBS (in ddH₂O angesetzt)

1,37 M NaCl (Carl Roth GmbH)

27 mM KCl (Carl Roth GmbH)

43 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Carl Roth GmbH)

14,7 mM KH₂PO₄ (Carl Roth GmbH)

Propidiumiodid (PI) (in 1 ml ddH₂O)

1 mg PI (Merck (Sigma-Aldrich))

15 % Saccharose-Lösung

15 % (w/v) Saccharose (Carl Roth GmbH)

30 % Saccharose-Lösung

30 % (w/v) Saccharose (Carl Roth GmbH)

Schnelleinbettmedium (Vibratom)

22,5 % Bovine Serum Albumin (Carl Roth GmbH)

0,375 % Gelatine (Merck (Millipore))

0,01 % Natriumazid (Carl Roth GmbH)

In 0,1 M Na₂HPO₄x2H₂O lösen (Carl Roth GmbH)

Selbsthärtendes Einbettmedium mit Dabco

30 g Glycerol (Merck (Sigma-Aldrich))

12 g Polyvinylalkohol (Merck (Sigma-Aldrich))

30 ml ddH₂O

0,5 mg Phenol	(Carl Roth GmbH)
60 ml Tris (0,1 M)	(Carl Roth GmbH)
2,5 % (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan (Dabco)	(Merck (Sigma-Aldrich))

50 x Tris-Acetat-EDTA- (TAE) Puffer (auf 1000 ml ddH₂O)

242 g Tris (2 M)	(Carl Roth GmbH)
57,1 ml Essigsäure (konzentriert)	(Carl Roth GmbH)
100 ml EDTA (0,5 M ; pH 8)	(Carl Roth GmbH)

2.2. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe:**Anti-acetyliertes-Tubulin** (Sigma Aldrich, #T7451)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus detektiert acetyliertes α -Tubulin und ist somit ein Marker für stabile Mikrotubuli. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Anti- α PKC (clone 41/PKC λ) (BD Biosciences, #610207)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus bindet an die λ Isoform aus der Subfamilie der atypischen Proteinkinasen C. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1: 200 eingesetzt.

Anti-Arl13b (Proteintech, #17711-1-AP)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bindet an das Arl13b Protein, welches zu den kleinen ziliaren G-Proteinen der Ras Subfamilie gehört und in Zilien exprimiert wird. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 200 verwendet.

Anti- β -Tubulin (Sigma Aldrich, #T5201)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus erkennt alle fünf Isoformen des β -Tubulins und kann somit als allgemeiner Mikrotubuli Marker verwendet werden. Er wurde in einer Verdünnung von 1: 200 verwendet.

Anti-BrdU (Abcam, #AB6326)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Ratte reagiert mit BrdU, welches als Thymidin-Analog in neusynthetisierte DNS (Desoxyribonukleinsäure) eingebaut wird. Er

fungierte in dieser Studie somit als Marker für neu synthetisierte Zellen und wurde in einer Verdünnung von 1: 500 verwendet.

Anti-Dcx (Abcam, #AB18725)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bindet an das Mikrotubuli-assoziierte Protein Doublecortin und markiert undifferenzierte Neurone. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 200 verwendet.

Anti- γ -Tubulin (Sigma Aldrich, #T5192)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen reagiert spezifisch mit γ -Tubulin. Er fand in dieser Studie als Marker für die Mikrotubuli-Organisationszentren mitotischer Zellen Verwendung und wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Anti-GFAP (Glia Fibrillary Acidic protein) (Dako, #Z0334)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bindet an das Typ III Intermediärfilament Protein GFAP und markiert im Zentralnervensystem Astrozyten und bestimmte ependymale Zellen. Der Antikörper wurde 1: 500 verdünnt eingesetzt.

Anti-Laminin (Merck Millipore, #AB2034)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bindet an das Protein Laminin der extrazellulären Matrix und zeigt in Mäusen eine geringe Kreuzreaktion mit dem Kollagentyp I, II und IV. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 40 verwendet.

Anti-Pan Cadherin (CH-19) (Sigma-Aldrich, #C1821)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus reagiert mit allen bekannten Mitgliedern der Cadherin Familie, dient als Marker für adhärente Zell-Zell Verbindungen und wurde in einer Konzentration von 1: 200 genutzt.

Anti-Par3 (Merck Millipore, #07-330)

Der polyklonale Anti-Partitioning-defective 3 Antikörper aus dem Kaninchen markiert das apikale Polaritätsprotein Par3 und wurde in einer Verdünnung von 1: 200 verwendet.

Anti-Pax6 (paired box gene 6 Protein) (Merck Millipore, #AB2237)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bindet an den C-Terminus des „paired-box transcription factor 6“ (PAX6) Proteins und markiert im embryonalen cerebralen Kortex radiale Gliazellen. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 200 bis 1: 500 verwendet.

Anti-phospho-Histon 3 (Ser10) (Merck Millipore, #06-570)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen detektiert das phosphorylierte Histon H3 und findet somit als Mitosemarker Verwendung. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 200 bis 1: 500 eingesetzt.

Anti-phosphoryliertes Vimentin (Ser55) (MBL International Corporation, #MBL-D076-3s)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus richtet sich gegen die Phosphorylierungsstelle des zu den Intermediärfilamenten gehörenden Proteins Vimentin und markiert Zellen, welche sich gerade in der Mitosephase bis hin zur frühen G1-Phase des Zellzyklus befinden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Anti-Satb2 (Santa Cruz, #SC-81376)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus bindet an den N-Terminus des AT-reiche Sequenzen bindenden Proteins 2 und fungiert als Marker für die höheren cerebralen Kortexschichten II und III. Er wurde in einer Konzentration von 1: 50 verwendet.

Anti-Tbr2 (Abcam, #AB23345)

Dieser polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen bindet spezifisch an den C-Terminus des Tbr2 Proteins, welches bei der Umwandlung von Radialglia zu intermediären Vorläuferzellen hochreguliert wird. Der Antikörper dient somit als Marker für intermediäre Vorläuferzellen und wurde in einer Verdünnung von 1: 200 eingesetzt.

Anti-tyrosiniertes-Tubulin (clone YL1/2) (Santa Cruz Biotechnology, #SC-53029)

Dieser monoklonale Antikörper aus der Ratte interagiert mit tyrosiniertem α -Tubulin und dient somit als Marker für dynamische Mikrotubuli. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

2.3. Sekundäre Antikörper

Donkey anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A11055)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Ziege hergestellten Antikörper und ist kovalent an das grün fluoreszierende Alexa Fluorophor 488 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Donkey anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 546 (Life Technologies, #A11056)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Ziege hergestellten Antikörper und ist kovalent an das rot fluoreszierende Alexa Fluorophor 546 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A21202)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Maus hergestellten Antikörper und ist kovalent an das grün fluoreszierende Alexa Fluorophor 488 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 546 (Life Technologies, #A10036)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Maus hergestellten Antikörper und ist kovalent an das rot fluoreszierende Alexa Fluorophor 546 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Goat anti-Mouse IgG1 (H+L), Alexa Fluor 546 (Life Technologies, #A21123)

Dieser in der Ziege produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Maus hergestellten Antikörper und ist kovalent an das rot fluoreszierende Alexa Fluorophor 546 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647 (Life Technologies, #A31571)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Maus hergestellten Antikörper und ist kovalent an das im Infrarotbereich fluoreszierende Alexa Fluorophor 647 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A11034)

Dieser in der Ziege produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche im Kaninchen hergestellten Antikörper und ist kovalent an das grün fluoreszierende Alexa Fluorophor 488 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 546 (Life Technologies, #A11035)

Dieser in der Ziege produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche im Kaninchen hergestellten Antikörper und ist kovalent an das rot fluoreszierende Alexa Fluorophor 546 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 647 (Life Technologies, #A31573)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche im Kaninchen hergestellten Antikörper und ist kovalent an das im Infrarotbereich fluoreszierende Alexa Fluorophor 647 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Donkey anti-Rat IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Life Technologies, #A21208)

Dieser im Esel produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Ratte hergestellten Antikörper und ist kovalent an das grün fluoreszierende Alexa Fluorophor 488 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

Goat anti-Rat IgG (H+L), Alexa Fluor 546 (Life Technologies, #A11081)

Dieser in der Ziege produzierte polyklonale Zweitantikörper richtet sich gegen sämtliche in der Ratte hergestellten Antikörper und ist kovalent an das rot fluoreszierende Alexa Fluorophor 546 gebunden. Er wurde in einer Konzentration von 1: 200 verwendet.

2.4. Fluoreszenzfarbstoffe

Höchst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate (Life Technologies, #H1399)

Dieser blau fluoreszierende Farbstoff bindet an doppelsträngige DNS und findet somit als Zellkernmarker Verwendung. Er wurde in einer Konzentration von 1: 2000 eingesetzt.

Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fischer Scientific, #A12379)

Dieser mit dem grün fluoreszierenden Alexa Fluorophor 488 gekoppelte Antikörper wurde für die Markierung von F-Aktin in einer Konzentration von 1: 500 eingesetzt.

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, #P4170)

3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridiniumdiiodid interkaliert mit der DNS und fluoresziert im roten Lichtspektrum. Dieser DNS Farbstoff wurde in einer Konzentration von 1: 200 eingesetzt.

2.5. Primer

Im Zusammenhang mit der Genotypisierung der Versuchstiere fanden folgende Primer der Firma Eurofins Scientific ihre Verwendung.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Cre1 (346)	GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC AAC GA
Cre2 (345)	CTG GCA GAT GGC GCG GCA ACA CCA TT
Pfn1.1 (546)	TCG AGC GGA TCC AGC GAA GG
Pfn1.2 (547)	GTC CCC AGC AGT CGG GAA G

2.6. Versuchstiere

Innerhalb dieser Versuchsreihe verwendete ich männliche sowie weibliche Mäuse mit einem gehirnspezifischen (konditionellen) Knock-out für das Aktin-bindende Protein Profilin1 (Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}). Der Knock-out entsteht mittels der Verpaarung von Profilin1 geflochten Mäusen (Pfn1^{flx/flx}) (Böttcher *et al.*, 2009) mit Mäusen, welche eine Cre-Rekombinase unter dem Nestin Promotor exprimieren (Tronche *et al.*, 1999). Die Expression von Nestin erfolgt ab dem zehnten Embryonaltag (Tronche *et al.*, 1999).

Die Tiere verfügten alle über ein C57BL/6 und BL6/SJF2 genetischen Hintergrund und wurden in der zum Biochemisch-Pharmakologischen-Zentrum der Philipps-Universität Marburg zugehörigen Tierzucht gezüchtet.

Unterteilt wurden die Versuchsmäuse anhand qualitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung in Pfn1^{flx/flx} (Ktr) und Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre} (KO) Tiere. Alle Mäuse wurden in einem 12-stündigen Tag-und-Nacht Zyklus mit Wasser und Futterzugang *ad libitum* gehalten. Das gesamte Versuchsvorhaben wurde seitens des Regierungspräsidiums Gießen geprüft und auf Grundlage des Tierversuchsantrages V 54 – 19 c 20 15 h 01 MR 20/30 Nr. 46/2015 genehmigt.

2.7. Genotypisierung der Versuchstiere

2.7.1 DNS-Aufreinigung

Für die qualitative PCR zur Bestimmung des Genotyps unserer Versuchstiere wurden Schwanzbiopsien von jedem einzelnen Embryo bzw. Versuchstier entnommen und in 1,5 ml Eppendorf-Tubes mit jeweils 200 µl basischem Extraktionspuffer (Lösung 1) überschichtet. Darauf folgte eine 90-minütige Inkubation bei 95 °C in einem Schüttelheizblock. Danach wurden weitere 200 µl saurer Extraktionspuffer (Lösung 2) der Lösung beigefügt, die gesamte Mischung kurz gevortext und direkt im Anschluss bei Raumtemperatur für 10 min bei 13000 Umdrehungen pro Minute (oder für 6 min bei 14000 U/min) zentrifugiert. Zum Abschluss wurden 200 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Tube überführt und die so extrahierte DNS bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.7.2. Qualitative PCR

Folgendes Pipettierschema wurde für die Teilamplifikation des Cre-Rekombinase-Gens mittels einer PCR für DNS Proben von juvenilen und adulten Tieren verwendet.

7,86 µl	Autoklaviertes H ₂ O
4,0 µl	5x PCR Puffer (Bioline)
2,0 µl	Primer Cre2 (345) (5 pmol/µl)
1,0 µl	Primer Cre1 (346) (5 pmol/µl)

0,14 µl	Taq Polymerase (Bioline)
5,0 µl	DNS

Für embryonale DNS Proben verwendete ich folgendes Pipettierschema zur Teilamplifikation des Cre-Rekombinase-Gens mittels PCR.

11,7 µl	Autoklaviertes H ₂ O
2,0 µl	10x PCR Puffer (incl MgCl ₂)
2,0 µl	2,5 mM dNTP
2,0 µl	Primer Cre2 (345) (5 pmol/µl)
1,0 µl	Primer Cre1 (346) (5 pmol/µl)
0,3 µl	Taq Polymerase (eigene Herstellung Kaiserslautern)
1,0 µl	DNS

Für beide Pipettiervarianten wurde dasselbe PCR-Protokoll verwendet.

94 °C	3 min	
94 °C	20 sec	
58 °C	20 sec	35 Zyklen
72 °C	20 sec	
72 °C	2 min	

Die Amplifizierung des geflochten Profilin1-Gens wurde mittels diesem PCR Pipettierschemas für alle Proben wie folgt realisiert.

8,86 µl	autoklaviertes H ₂ O
4,0 µl	5x PCR Puffer (Bioline)
1,0 µl	Primer 546 (20 pmol/µl)
1,0 µl	Primer 547 (20 pmol/µl)
0,14 µl	Taq Polymerase (Bioline)
5,0 µl	DNS

Das PCR-Protokoll für diese Amplifizierung sah wie folgt aus.

94 °C	2 min	
94 °C	30 sec	
58 °C	30 sec	35 Zyklen
72 °C	30 sec	

72 °C 5 min

2.7.3. Gelelektrophorese

Die so amplifizierten DNS Proben wurden im weiteren Verlauf jeweils mit 5 µl 5x Ladepuffer vermischt und je 10 µl dieser Lösung auf ein 1,5%iges Agarosegel, mit 0,0007 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 Stunde bei 110 V. Das fertige Gel, mit seinen durch Ethidiumbromid gefärbten Banden, wurde in einer Geldokumentationskammer aufgenommen und wie folgt interpretiert. Für den Nachweis des eingebrachten Cre-Rekombinase Gens musste in der entsprechenden PCR eine Bande auf der Höhe von 726 Basenpaaren nachgewiesen werden können. Tiere, bei denen sich das Cre-Gen nicht eingebaut hatte, wiesen keinerlei sichtbare Banden auf. Für den Nachweis des geflochtenen Profilin1 Genes musste durch die entsprechende PCR eine Bande bei 340 Basenpaaren sichtbar werden. Mäuse, bei denen dieses Gen nicht mittels „LoxP-Sides“ markiert wurde, zeigten eine Bande bei 240 bp.

2.8. Plug Verpaarung

Um relativ genau abschätzen zu können, in welchem Entwicklungsstadium sich die Embryos eines speziellen Muttertiers befanden, griffen wir auf die allseits anerkannte Methode der „Plug Verpaarung“ zurück. Dabei macht man sich zu nutzen, dass in dem Ejakulat männlicher Mäuse Stoffe enthalten sind, die im weiblichen Vaginaltrakt aushärten und die Vaginalöffnung mittels eines Pfropfens verschließen. Dieser sogenannte „Plug“ ist mit geschultem Auge noch 8-24 Stunden nach der eigentlichen Kopulation sichtbar und gibt einen Hinweis darauf, dass das entsprechende Weibchen befruchtet sein könnte. Ein Garant für ein befruchtetes Weibchen ist er aber nicht. Um einschätzen zu können, ob ein Zuchttier nach einem sichtbaren Plug auch wirklich tragend ist oder nicht, wurden die Versuchstiere deshalb engmaschig überwacht und regelmäßig gewogen.

Männliche und weibliche Zuchttiere wurden immer nur über Nacht zusammen gesetzt und die Weibchen am nächsten Morgen hingehend eines Plugs untersucht. Dabei wird der Tag, an dem der Plug entdeckt wurde, als E0,5 gezählt.

2.9. Versuchsdurchführungen mittels BrdU

BrdU ist ein Thymidin-Analog, wird als dieses in neusynthetisierte DNS eingebaut und liegt somit in neugebildeten Zellen vor (Gratzner, 1982). Innerhalb dieser Versuchsreihe fand es zur besseren Charakterisierung des bereits für die adulten Pfn1^{flx,flx,Nestin-cre}-Mäuse beschriebenen Phänotyps der reaktiven Gliose Verwendung. In verschiedenen Embryonalstadien wurde es genutzt, um unterschiedlichste Fragestellungen z. B. bezüglich der IZM von aRG oder der Anzahl neu gebildeter Zellen im embryonalen cerebralen Kortex auch in Verbindung mit spezifischen Markern für die unterschiedlichen Typen neuraler Vorläuferzellen beantworten zu können.

2.9.1. Untersuchung der reaktiven Gliose adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse

Für den Nachweis einer „partiellen“ oder „vollständigen“ reaktiven Gliose, wurde je vier adulten Ktr- und KO-Mäusen (ca. 2 Monate alt), 1 mg BrdU pro 1 ml H₂O, 14 Tage lang *ad libitum* über das Trinkwasser verabreicht. Im Anschluss an diese 14-tägige Inkubation wurden die Tiere mittels cervikaler Dislokation getötet und Antikörperfärbungen gegen BrdU und GFAP durchgeführt, um mögliche proliferierende reaktivierte Astrozyten sichtbar zu machen.

2.9.2. Intraperitoneale Injektion von BrdU in tragende Weibchen

Um verschiedene Fragestellungen, z. B. bezüglich der IZM der aRG oder der Anzahl neu gebildeter Zellen im embryonalen cerebralen Kortex der Ktr- und KO-Mäuse zu beantworten, wurde tragenden Weibchen an E12,5; E14,5 oder E16,5 je 50 mg BrdU (10 mg / 1 ml) pro 1 kg Körpergewicht injiziert. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal (ip.) und je nach Versuchskonzept wurden die Muttertiere 40 min, 120 min oder 480 min nach der Injektion mittels zervikaler Dislokation getötet und die Embryos entnommen.

2.10. Histologie

Zur Gewinnung entsprechend unterschiedlich weit entwickelter Gehirnpräparate fanden unterschiedliche Arten der Gewebefixierung und Präparation in dieser Studie ihre Verwendung. Vor der Entnahme adulter Mäusegehirne erfolgte eine Vorfixierung des Gewebes mittels transkardialer Perfusion mit 4 % PFA in PBS. Für die Untersuchungen der verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien wurden hingegen die Embryos den Muttertieren entnommen und die Köpfe der Embryos sofort für 2h in 4 % PFA fixiert.

2.10.1. Transkardiale Perfusion

Die Tiere wurden mittels einer letalen ip. Injektion von Ketamin (120 mg / 1 kg Körpergewicht) narkotisiert und nach nachweislichem Ausbleiben von Schmerzreflexen der Brustkorb eröffnet. Im Anschluss an die Freilegung des Herzens wurde eine 21 G starke Flügelkanüle (Butterfly) in die linke Herzkammer eingestochen und direkt im Anschluss der rechte Vorhof mit einer Pinzette eröffnet. Das gesamte Blutkreislaufsystem wurde daraufhin mittels einer hydraulischen Pumpe mit ca. 10 ml PBS-Puffer durchgespült, bis die Leberlappen komplett entblutet waren. Danach erfolgte die eigentliche Fixierung mittels 15 ml 4 % PFA in PBS. Im Anschluss wurde der Kopf vom Rumpf getrennt und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel präpariert. Die so gewonnenen Gehirne wurden daraufhin bei 4 °C über Nacht in 4 % PFA postfixiert und für eine langfristige Lagerung in PBS mit 0,02 % Natriumazid überführt.

2.10.2. Embryopräparation

Für die Gewinnung der embryonalen Hirnpräparate wurde das Muttertier mittels Genickbruch getötet, die Embryonen entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Daraufhin wurden die Embryos aus dem Uterusschlauch und ihrer entsprechenden Eihülle unter Verwendung eines Stereomikroskops (Leica M80) herauspräpariert, die Köpfe vom Torso getrennt und bei 4 °C für 2 Stunden in 4 % PFA überführt sowie eine Schwanzbiopsie zur Genotypisierung jedes einzelnen Embryos entnommen. Im Anschluss an die zweistündige Fixierung wurden die Köpfe zur längerfristigen

Lagerung in 15 ml Falcons mit PBS + 0,02 % Natriumazid überführt und bei 4 °C gelagert.

2.10.3. Probenaufbereitung für Schnitte am Gefriermikrotom

Um Schnitte am Gefriermikrotom durchführen zu können, wurden sowohl die Embryoköpfe, als auch die Gehirne der juvenilen und adulten Mäuse vor den Mikrotomschnitten über mehrere Tage entwässert. Dabei wurden die entsprechenden Gewebe jeweils zuerst dreimal kurz mit PBS gewaschen und dann mit 15 % Saccharose Lösung in PBS bis zum Rand des Falcons überschichtet. Die Lagerung der Proben erfolgte weiterhin bei 4 °C. Nach ein bis zwei Tagen, wenn das Gewebe bis zum Boden des Falcons abgesunken war, konnte die 15 % Saccharose Lösung durch eine 30 % Saccharose Lösung ersetzt werden. War das Gewebe daraufhin nach weiteren ein bis zwei Tagen wieder abgesunken, wurde es im Anschluss in selbstgeformten Aluminium-„Beuteln“ für 10 min in zerstoßenem Trockeneis eingefroren und bis zum Schneiden am Gefriermikrotom bei – 80 °C gelagert.

2.10.4. Schnitte am Gefriermikrotom

Die Gefrierschnitte für alle immunhistochemischen Versuche wurden an einem Gefriermikrotom der Firma Leica (CM3050S) durchgeführt. Als Grundeinstellung zum Schneiden wurde der Objektisch auf – 25 °C und die Kammer auf – 27 °C heruntergekühlt. Die jeweils zu schneidende Probe wurde mittels „Tissue Freezing Medium“ (Leica) auf einem Metallsockel fixiert und mit selbigem komplett überschichtet. Zum Schneiden wurden spezielle Gefriermikrotom-Klingen der Firma Leica (1172C5) verwendet. Die Schnitte selbst erfolgten unabhängig vom Altersstadium in einer Dicke von 25 µm, wobei von den Embryos medial-koronale Hirnschnitte und von den adulten Mäusen mid- bis leicht parasagittale Hirnschnitte angefertigt wurden. Die somit erzeugten Schnitte wurden mittels des geräteinternen Streckers am Aufrollen gehindert und auf Superfrost Plus Objektträger der Firma Thermo Scientific in Schnittserien aufgezogen. Nachdem alle Schnitte aufgenommen waren, wurden die Objektträger zum Trocknen für zwei Stunden auf eine 30 °C warme Heizplatte überführt und im Anschluss bei – 20 °C gelagert.

2.10.5. Probenaufbereitung für Vibratomschnitte

Die meisten perfundierten Gehirne der adulten Versuchstiere wurden innerhalb dieser Studie am Vibratom geschnitten, weshalb diese vor Beginn des eigentlichen Schneideprozesses zuerst mittels Schnelleinbettmedium in Blöcke gegossen werden mussten. Die Einbettung erfolgte in speziellen, von der Werkstatt des „Biochemisch Pharmakologischen Zentrums“ (BPC) hergestellten rechteckigen Kunststoffgießformen. Zu Beginn wurde ein Sockel aus 2,5 ml Schnelleinbettmedium und 130 µl 50 % Glutardialdehyd gegossen, das Gehirn darauf in der entsprechenden Orientierung ausgerichtet und im Anschluss mit 5 ml Schnelleinbettmedium + 260 µl 50 % Glutardialdehyd überschichtet. Die so eingebetteten Proben wurden bei 4 °C gelagert.

2.10.6. Schnitte am Vibratom

Für die Vibratomschnitte fand ein Gerät der Firma Leica (VT 1000 S) Verwendung. Die Blöcke der eingebetteten Gehirne wurden kurz vor dem Schneiden mittels eines Skalpells auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten und dann mit Sekundenkleber auf einer dem Vibratom eigenen Metallplatte aufgeklebt. Diese Metallplatte wurde in die Schnittwanne des Vibratoms eingebaut und die Wanne mit PBS gefüllt. Für die eigentlichen Schnitte fanden Rasierklingen der Firma Gillette (Super Silver, platinveredelt) Verwendung, welche in die entsprechende Vorrichtung des Vibratoms eingebaut wurden. Der Grobschnitt bis zur entsprechenden Hirnregion erfolgte in 100 µm Schritten bei einer Geschwindigkeit von 0,059 mm pro Sekunde (S) und einer Frequenz von 50 Hz (Herz). Die für den Versuch verwendeten Hirnschnitte wurden hingegen mit einer Dicke von 50 µm und einer Geschwindigkeit von 0,049 mm pro S bzw. einer Frequenz von 80 Hz geschnitten. Die so gewonnenen Schnitte wurden als Schnittserie geordnet, mittels eines Pinsels in eine mit PBS und 0,02 % Natriumazid gefüllte 12 „Kammernplatte“ („Well plate“) überführt und dann bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.11. Immunhistochemische Färbungen

Innerhalb dieser Studie wurden je nachdem, ob es sich um Schnitte des Gefriermikrotoms oder Vibratomschnitte handelte, zwei verschiedene immunhistochemische Färbeprotokolle verwendet. Für Gefriermikrotomschnitte wurde die „on-slide“ und für Vibratomschnitte die „Free-floating“ Technik benutzt.

2.11.1. „on-slide“ Färbungen an Gefriermikrotomschnitten

Für die sogenannte „on-slide“ Färbemethode wurden die entsprechenden Objektträger, welche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, für einige Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, beschriftet und die gesamte Schnittserie mit einem Fettstift (Pap Pen, Kisker Biotech GmbH & Co. KG) umfahren. Standardmäßig wurden die Objektträger daraufhin zwecks Rehydrierung für 5 min in ein Färbegefäß mit PBS und anschließend in eine Feuchtkammer überführt. Die Schnittserien wurden im Anschluss für 1 Std. mit je $300\text{ }\mu\text{l}$ Blocker nach Rust überschichtet und darauffolgend mit $200\text{ }\mu\text{l}$ des Primärantikörpers in Carrier nach Rust bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und anschließend wieder in die Feuchtkammer überführt, um dort für 1 Std. mit je $300\text{ }\mu\text{l}$ Blocker nach Rust unspezifische Bindestellen abzublocken. Darauf folgte für 2 Std. die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (1: 200) in Carrier nach Rust. Eine eventuelle Gegenfärbung mit einem DNS Marker (PI oder Höchst 33342) wurde für 15 min im Anschluss durchgeführt. PI wurde dabei in einer Konzentration von 1: 200 in PBS und Höchst 33342 in einer Konzentration von 1: 10000 in PBS verwendet. Darauffolgend wurden die Objektträger wieder je dreimal für 5 min in PBS gewaschen und dann mit selbsthärtendem Einbettmedium + Dabco (selbst hergestellt) eingedeckelt.

Für die Antikörperfärbung mit einem BrdU-Antikörper musste die DNS vor Beginn der eigentlichen Färbeschritte zuerst mittels 4 M HCl für 30 min denaturiert werden. Zur Neutralisierung der Säure fand im Anschluss für 10 min eine Behandlung mit $0,1\text{ M}$ Natriumtetraboratdecahydratlösung (pH 8,5) statt. Darauf folgten drei 5-minütige Waschschrte mit $1\times\text{ PBS}$ und im weiteren Verlauf die oben genannten Schritte einer „on-slide“ Färbung.

2.11.2. „Free-floating“ Färbung an Vibratomschnitten

Für die „Free-floating“ Färbung wurde eine Schnittserie aus der 12 „Well plate“ in eine Färbeschale mit PBS überführt und mittels eines Pinsels bezüglich der zu untersuchenden Region auseinander sortiert. Maximal 4 Schnitte mit der gewünschten Region wurden daraufhin in eine Kammer einer mit PBS gefüllten neuen „Well plate“ überführt und dann die Antikörper-Färbung durchgeführt. Die übrigen Schnitte der Schnittserie wurden zurück in die ursprüngliche „Well plate“ mit PBS und 0,02 % Natriumazid überführt und weiter bei 4 °C gelagert.

Die eigentliche Antikörperfärbung verlief nach dem gleichen Aufbau wie die „on-slide“ Färbung, nur verblieben die Schnitte die gesamte Zeit über in der „Well plate“, um ein Trockenfallen der Schnitte zu verhindern. Zu Beginn der Färbereihe mussten die Schnitten dreimal für 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen werden. Dabei fanden für jeden Waschschrift je 1 ml PBS Verwendung. Im Anschluss wurde das PBS für 1 Std. durch 500 µl Blocker nach Rust ersetzt und dann 500 µl des jeweiligen Primärantikörpers in der entsprechenden Konzentration in Carrier nach Rust auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte wieder dreimal mit PBS gewaschen, für 30 min mit Blocker nach Rust geblockt und dann für 2 Std. mit 500 µl des entsprechenden Alexa Sekundärantikörpers in einer Konzentration von 1: 500 inkubiert. Falls erforderlich, folgte daraufhin für 15 - 20 min eine Gegenfärbung der DNS mit PI in einer Konzentration von 1: 500 in PBS und dreimal für 5 min ein erneutes Waschen der Schnitte mit PBS. Im Anschluss wurden die Schnitte aus der „Well plate“ in eine mit PBS gefüllte Färbeschale überführt und dort mittels eines Pinsels auf selbst gelatinisierte Objektträger aufgezogen und direkt im Anschluss mithilfe von unserem selbsthärtenden Einbettmedium + Dabco eingedeckelt.

2.12. Bildaufnahme

Die immunhistochemischen Präparate wurden mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie an zwei verschiedenen konfokalen Laser Scanning Mikroskopen aufgenommen. Für den makroskopischen Nachweis der Invaginationen nutzte ich hingegen ein Stereomikroskop der Firma Leica (Leica M80) in Verbindung mit der Software LAS V4.5.

2.12.1. Makroskopische Untersuchung des cerebralen Kortex adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse

Die Untersuchung des cerebralen Kortex adulter KO-Mäuse hinsichtlich eines makroskopischen Nachweises von Invaginationen erfolgte an frisch entnommenen Gehirnen perfundierter Versuchstiere. Um die Basallamina besagter Gehirne direkt betrachten zu können, entfernt ich die Hirnhäute. Die darauf folgende Anfertigung dorsaler Übersichtsaufnahmen adulter Ktr- und KO-Gehirne erfolgte an einem M80 Stereomikroskop der Firma Leica.

2.12.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die immunhistochemischen Präparate wurden zum einen an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 200M) in Verbindung mit der Firmensoftware LSM5 Pascal und zum anderen mit einem TCS SP5 II der Firma Leica unter Verwendung der Software LAS AF aufgenommen. Der Gain befand sich bei allen Aufnahmen zwischen 500 und 800 und der Offset bei -1 %.

2.13. Bildanalysen

Die anschließende Auswertung, der an den konfokalen Laser Scanning Mikroskopen erzeugten Bilder (z. B. Flächenabmessung, Bestimmung von spezifischen Zellzahlen etc.), erfolgte mittels der ImageJ Software Fiji oder der Leica Software LAS X. Alle mit Fiji durchgeführten Analysen wurden automatisiert oder manuell, unter Zuhilfenahme verschiedener Tools (z. B. "Multi-point" Tool) und Plugins, durchgeführt.

2.13.1. Unterteilung des cerebralen Kortex der E14,5 Embryos

Um den cerebralen Kortex der E14,5 Embryos in Hinblick auf die Analyse der relativen Anzahl Tbr2⁺-Zellen genauer zu unterteilen, verwendete ich Antikörperfärbungen gegen Tbr2 (IP Marker) und Pax6 (RG Marker) sowie PI-Färbungen. Die mittels der Pax6-Färbung ermittelte mittlere Dicke der VZ, in den E14,5 Ktr- und KO-Embryos, nutzte ich weiterführend als standardmäßige Grenze zwischen VZ und SVZ. Die

superfizielle Grenze der SVZ bestimmte ich unter Zuhilfenahme der Tbr2-Färbung der E14,5 Ktr-Embryos. Die Abmessungen der CP ließen sich in allen E14,5 Embryos, mittels der PI-Färbung, anhand ihrer sehr zeldichten Struktur bestimmen. Eine zweifelsfreie Unterteilung der IZ-SP war mir nicht möglich, weshalb ich diese Region, in Bezug auf die detaillierte Analyse der Anzahl Tbr2⁺-Zellen in den verschiedenen cerebralen Kortexschichten, mittig aufteilte.

2.13.2. Analyse der Mitoserate basaler neuraler Vorläuferzellen

Die differenzierte Erhebung der Mitoserate von bRG und bIP wurde mittels einer Antikörperfärbung gegen Tbr2 und dem Fluoreszenzfarbstoff PI an Gefriermikrotomschnitten des Embryonalstadiums E14,5 durchgeführt. PI fungierte als Marker für Zellen mit segregierter oder kondensierter DNS, da mitotische Zellen mittels PI besonders deutlich hervorgehoben werden. Für die Datenerhebung wurden 12 µm bis 20 µm dicke z-Stacks von basal der VO lokalisierten, mitotischen Zellen angefertigt. Verwendet wurde dabei ein konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SP5 II der Firma Leica. Die Auswertung der z-Stacks erfolgte später mittels der ImageJ Software Fiji.

Die mittels PI hervorgehobenen, mitotischen Zellen wurden mithilfe der Antikörperfärbung gegen Tbr2 in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt. Alle basal der VO markierten Tbr2⁺-Zellen mit kondensierter oder segregierter DNS wurden den bIP zugeteilt, während alle Tbr2⁻-Zellen mit kondensierter oder segregierter DNS der Gruppe der bRG zugeordnet werden konnten. Anhand dieser Unterteilung wurden Aussagen bezüglich der unterschiedlichen Mitoseraten von bIP und bRG für die verschiedenen Genotypen getroffen. Mitotische Zellen im Bereich der VO wurden bei dieser Analyse nicht berücksichtigt.

2.13.3. Analyse der IZM

Um die IZM der aRG zu untersuchen und damit Aufschluss über beispielsweise eine veränderte Zell-Zyklus-Länge zu erhalten, wurde tragenden Weibchen an E12,5 und E14,5 BrdU (50 mg / 1 Kg Körpergewicht) ip. injiziert und die Embryos 40 min, 120 min oder 480 min nach der Injektion den Muttertieren entnommen. Die am Gefriermikrotom erzeugten Hirnschnitte der Ktr- und KO-Embryos wurden daraufhin mit Antikörpern

gegen BrdU und Pax6 gefärbt und die Anzahl BrdU⁺-Zellen in einem von sechs 20 µm breiten Arealen der VZ (ausgehend von der VO) bestimmt (Abb.9).

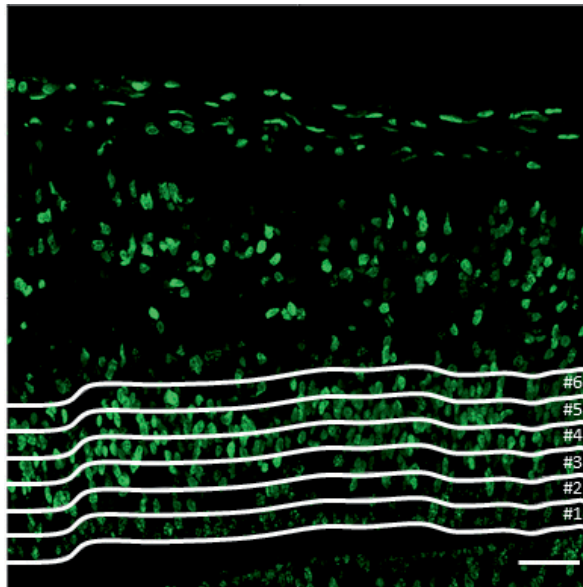


Abbildung 9: Beispielhafte Einteilung der je 20 µm dicken Areale für die Auswertung der IZM. Gezeigt an einem repräsentativen Schnitt eines *Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}*-Embryos an E14,5. Die Antikörperfärbung zeigt BrdU (grün) nach 40-minütiger Inkubationszeit im Muttertier. Maßstab: 50 µm. #1 - #6: Areal #1 bis Areal #6.

2.13.4. Analyse der Signalintensität von Par3, αPKC, pan-Cadherin und Phalloidin an der Ventrikeloberfläche

In Anlehnung an Analysen von Frau Dr. Silvia Cappello (Cappello *et al.*, 2006) untersuchte ich die Lokalisation der apikalen Polaritätsproteine Par3 und αPKC sowie des AJ Markers pan-Cadherin und des F-Aktin Markers Phalloidin an der VO der *Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}*-Embryos anhand der mittleren Signalintensität ihrer spezifischen Antikörperfärbungen. Die Signalintensität von Par3 und αPKC wurde für E12,5; E14,5 und E16,5 Ktr- und KO-Embryos erhoben, um neben eventuell vermehrten Delaminierung der bP ebenfalls die in der Literatur beschriebene (Costa *et al.*, 2008) Reduktion der Expression von Par3 und αPKC über die Entwicklung darstellen zu können. Die Analyse der pan-Cadherin und der Phalloidin-Färbung erfolgte hingegen jeweils nur an einem Entwicklungsstadium. Für die pan-Cadherin-Färbung handelte es sich dabei um E12,5 und bei Phalloidin um E14,5 Ktr- und KO-Embryos. Ermittelt wurde die Signalintensität für alle 4 Färbungen anhand einer 30 µm langen Strecke direkt an der VO unter Zuhilfenahme der Leica Software LAS X oder der ImageJ Software Fiji. Für die Darstellung des Verhältnisses der Signalintensitäten zwischen den entsprechenden Ktr- und KO-Embryos wurde die mittlere Signalintensität der Ktr-

Embryos auf 100 % gesetzt und die prozentuale Abweichung der entsprechenden KO-Embryos von den Ktr-Embryos rechnerisch ermittelt.

2.13.5. Primäre Zilien

Für die detaillierte Analyse der Anzahl und Verteilung primärer Zilien im cerebralen Kortex der $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos verwendete ich Antikörperfärbungen gegen das ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 13b (Arl13b) und BrdU an E12,5; E14,5 und E16,5 Ktr- und KO-Embryos, welche schon im Mutterleib für 40 min mit BrdU inkubiert worden waren. Arl13b ist eine kleine GTPase der Arf / Arl Familie, welche spezifisch in Zilien lokalisiert ist (Higginbotham *et al.*, 2013). Die Antikörperfärbung gegen BrdU nutze ich in diesem Fall, um die basale Grenze der VZ zu bestimmen. Für die Analyse der Anzahl primärer Zilien verwendete ich eine Zählmaske des Bildbearbeitungsprogrammes Fiji (ImageJ) und differenzierte dabei zwischen primären Zilien direkt an der VO und den übrigen Zilien im Bereich der VZ.

2.13.6. Teilungsebene mitotischer aRG

Zur Erhebung der prozentualen Verteilung der Teilungsebenen (vertikal (90° - 60°), diagonal (60° - 30°) und horizontal (30° - 0°)) mitotischer aRG an E14,5 wurden zwei verschiedene Färbungen durchgeführt und ausgewertet. Zum einen Antikörperfärbungen gegen phosphoryliertes-Histon 3 (pH3) in Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI und zum anderen Antikörperfärbungen gegen γ -Tubulin und phosphoryliertes-Vimentin (phospho-Vimentin) in Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff Höchst 33342. Innerhalb des ersten Versuchsansatzes diente pH3 als Marker für Zellen am Ende der G2-Phase bis zur späten M-Phase (Scott *et al.*, 2003) und PI wurde verwendet, um kondensierte bzw. segregierte DNS sichtbar zu machen. Im zweiten Versuchsansatz diente γ -Tubulin durch seine Lokalisation in den Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOZ), als Spindelpol-Marker (Maiato and Logarinho, 2014) und phospho-Vimentin als Marker für Zellen, welche sich in der mittleren bis späten Mitosephase bzw. frühen G1-Phase des Zellzyklus befanden (Kamei *et al.*, 1998). Höchst 33342 wurde in seiner Funktion als DNS-Farbstoff zur allgemeinen Darstellung der Zellkerne verwendet.

Am konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP5 II wurden für beide Färbeansätze z-Stacks von einer Dicke zwischen 12 μm bis 20 μm erzeugt und die Teilungsebene der mitotischen aRG unter Zuhilfenahme der Ausrichtung kondensierter DNS bzw. der zwei Zentrosomen einer Zelle in Bezug zur VO erhoben. In die Auswertungen flossen nur mitotische aRG mit deutlich segregierter DNS (Versuchsansatz mit pH3) oder mit zwei zweifelsfrei voneinander getrennte MTOZ's (Versuchsansatz mit γ -Tubulin) ein.

2.14. Statistische Analyse

Die mittels Fiji und LAS X erhobenen, empirischen Daten wurden über die Statistiksoftware R und den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Die eigentliche Analyse und grafische Darstellung der Daten erfolgte über Microsoft Excel. Getestet wurden Unterschiede zwischen den Ktr- und den KO-Tieren zu einem Signifikanzniveaus von $\alpha = 5\%$. Diesbezüglich wurde für normalverteilte Daten der t-Test und für nicht normalverteilte Daten der Man-Whitney-U Test (Wilcoxon Rangsummen Test) in „R“ bzw. Excel durchgeführt. Ein entsprechender p-Wert zwischen 0,05 und 0,01 wurde in dieser Studie grafisch mittels eines Sterns, ein p-Wert zwischen 0,01 und 0,001 mit zwei Sternen und ein Wert kleiner als 0,001 mit drei Sternen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse

Um die von Dr. Jan Kullmann und Dr. Silvia Cappello beobachteten Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche der adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse näher zu charakterisieren, wurde ihre relative Anzahl, Tiefe und Verteilung über die mediale rostro-caudal-Achse des Neokortex analysiert. Daraus ergab sich, dass pro KO-Hirnschnitt durchschnittlich $6,20 \pm 0,32$ Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche nachgewiesen werden konnten (Tab. 1), deren durchschnittliche Tiefe $91,41 \mu\text{m} \pm 7,17 \mu\text{m}$ betrug (Tab. 2).

Tabelle 1: Quantitative Analyse der Anzahl an Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl Sulci-artiger Strukturen pro mid- bis leicht parasagittalem Hirnschnitt adulter KO-Mäuse. SA: Standardabweichung.

Genotyp	Anzahl untersuchter Mäuse	Anzahl untersuchter Schnitte	Mittlere Anzahl an Einfaltungen \pm SA
Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}	5	25	6,20 (\pm 0,32)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #1	/	4	7,25 (\pm 0,75)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #2	/	7	6,29 (\pm 0,52)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #3	/	7	5,71 (\pm 0,47)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #4	/	3	5,00 (\pm 1,15)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #5	/	4	6,75 (\pm 1,03)

Tabelle 2: Durchschnittliche Tiefe der Einfaltungen im zerebralen Kortex adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse. SA: Standardabweichung.

Genotyp	Anzahl untersuchter Mäuse	Anzahl ausgewerteter Bilder	Anzahl an Einfaltungen	Mittlere Tiefe der Einfaltungen [μm] \pm SA
Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}	5	28	37	91,41 (\pm 7,17)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #1	/	7	10	113,80 (\pm 16,44)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #2	/	5	7	96,00 (\pm 19,42)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #3	/	8	9	89,78 (\pm 12,55)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #4	/	5	5	64,40 (\pm 12,42)
Pfn1 ^{flx/flx,Nestin-cre} #5	/	6	6	73,67 (\pm 10,34)

Bezüglich der Verteilung der Einfaltungen fiel auf, dass diese sich vor allem und in ihrer tiefsten Ausprägung in medialen Hirnregionen lokalisierten. Ihre Tiefe und Anzahl nahm in lateraler Orientierung ab. Innerhalb der medialen rostro-caudal-Achse tauchen sie vor allem im Bereich des frontalen Pols (FRP), des somatomotorischen Areals (MO) und des visuellen Areals (VIS) auf (Abb. 10). Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Einfaltungen als Invaginationen bezeichnet.

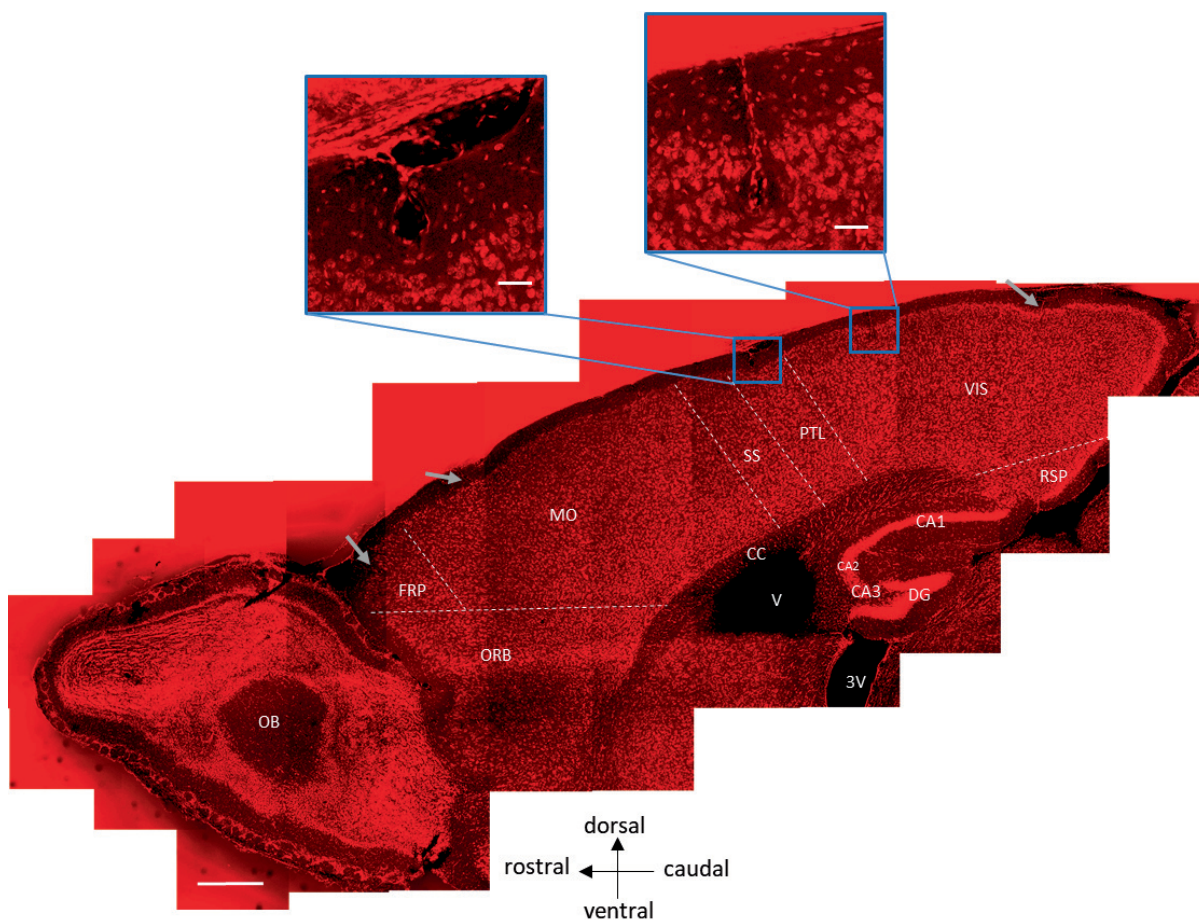


Abbildung 10: Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche adulter $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse. Repräsentative Aufnahme des Großhirns eines midsagittal geschnittenen KO-Mäusegehirns. Der Schnitt wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI gefärbt. Die gestrichelten Linien deuten die Grenzen der verschiedenen Areale des zerebralen Kortex an. Maßstab: 500 μm (Großaufnahme). Die Nahaufnahmen zeigen beispielhaft zwei Einfaltungen / Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche adulter Profilin1-defizienter Mäuse. Maßstab: 25 μm (Nahaufnahmen). Die grauen Pfeile weisen auf drei weitere Einfaltungen hin. 3V: 3-ter Ventrikel; CA1: Cornu Ammonis Region 1; CA2: Cornu Ammonis Region 2; CA3: Cornu Ammonis Region 3; CC: Corpus Callosum; DG: Gyrus Dentatus; FRP: Frontaler Pol; MO: Somatomotorisches Areal; OB: Olfaktorischer Bulbus; ORB: Orbitales Areal; PTL: Posteriore parietal-Assoziationsareal; RSP: Retrosplenial Areal; SS: Somatosensorisches Areal; V: Lateraler Ventrikel; VIS: Visuelles Areal.

Makroskopisch waren die Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche adulter $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse jedoch nicht sichtbar (Abb. 11).

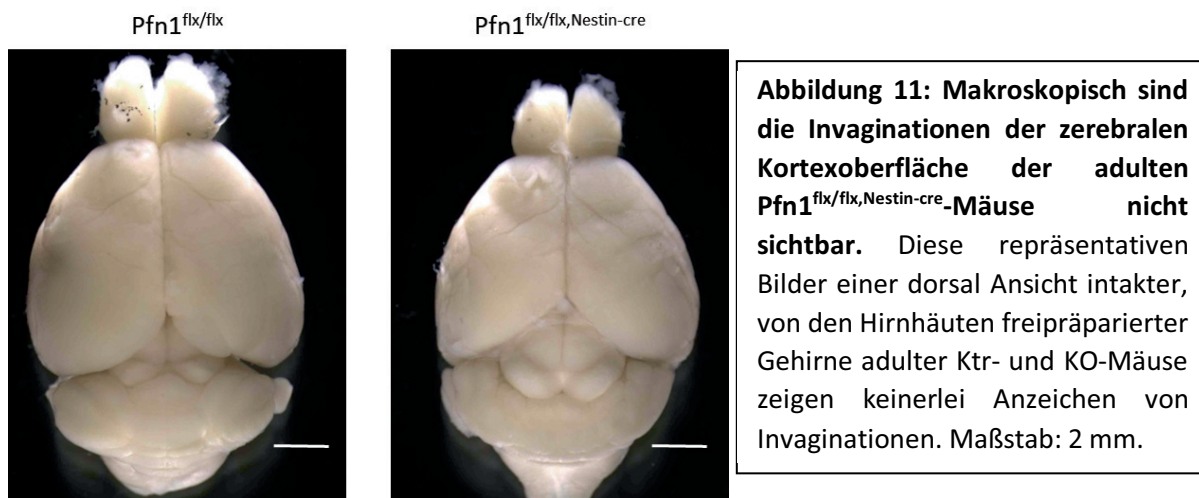


Abbildung 11: Makroskopisch sind die Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche der adulter $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse nicht sichtbar. Diese repräsentativen Bilder einer dorsal Ansicht intakter, von den Hirnhäuten freipräparierter Gehirne adulter Ktr- und KO-Mäuse zeigen keinerlei Anzeichen von Invaginationen. Maßstab: 2 mm.

3.1.1. Die Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche adulter $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse sind durch die Basallamina ausgekleidet

Um auszuschließen, dass es sich bei den Invaginationen um Verletzungen der zerebralen Kortexoberfläche handelte, wurde weiterführend der Verlauf der Basallamina adulter Ktr- und KO-Mäuse untersucht. Für gyrencephale Gehirne ist bekannt, dass die Basallamina dem Verlauf der Gyri und Sulci folgt (Dasgupta and Jeong, 2019; Llinares-Benadero and Borrell, 2019). Bei Verletzungen der Kortexoberfläche wäre eine Unterbrechung der Basallamina zu erwarten. Um den Verlauf der Basallamina zu untersuchen, wurde eine Antikörperfärbung gegen Laminin verwendet, da Laminin eine Hauptkomponente der Basallamina darstellt (Robel *et al.*, 2009).

Die Laminin-Färbung konnte zeigen, dass die Basallamina die vereinzelt auftretenden Invaginationen des zerebralen Kortex der $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse vollständig auskleidete (Abb. 12), was gegen eine Verletzung der zerebralen Kortexoberfläche sprach und auf die Ausbildung echter kortikaler Einfaltungen im Sinne von Sulci hindeutet.

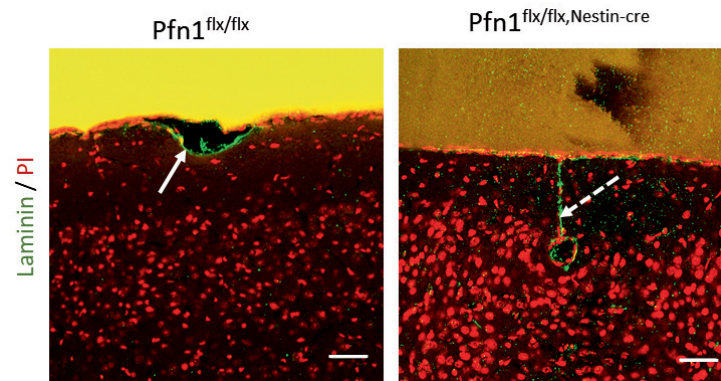


Abbildung 12: Die Basallamina kleidet die lokal auftretenden Invaginationen der adulten $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäusen vollständig aus. Diese repräsentativen Bilder zeigen anhand von Antikörperfärbungen gegen Laminin (grün) und Färbung mit PI (rot) an adulten $Pfn1^{flx/flx}$ - und $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäusen die Auskleidung der Invaginationen der adulten KO-Mäuse durch die Basallamina. Der weiße Pfeil deutet auf die normal verlaufende Basallamina der adulten Ktr-Mäuse. Der gestrichelte Pfeil weist auf eine Invagination der zerebralen Kortexoberfläche hin, welche von der Basallamina ausgekleidet wird. Maßstab: 50 μ m.

3.1.2. Im Bereich der Invaginationen ist die superfizielle Grenze der zerebralen Kortexschicht II/III teilweise in inferiorer Richtung verschoben

Echte kortikale Auffaltungen im Sinne von Gyri und Sulci charakterisieren sich allerdings nicht nur durch das Auffalten der pialen-Oberfläche sondern auch durch das Einfalten der sechs neuronalen Zellschichten (Borrell, 2018). Innerhalb echter kortikaler Einfaltungen sind dabei die zerebralen Kortexschichten I-VI im Bereich der Gyri dicker und im Bereich der Sulci dünner ausgeprägt, wobei die VO sowie die WM linear bleiben (Borrell, 2018). Um zu überprüfen, ob im Bereich der Invaginationen ebenfalls eine Auffaltung der zerebralen Kortexschichten nachweisbar war, fand eine Antikörperfärbung gegen Satb2 (Spezielle AT-reiche Sequenzen bindendes Protein 2), welche spezifisch callosale Projektionsneurone markiert (McKenna *et al.*, 2015) ihre Verwendung. Callosale Projektionsneurone treten im zerebralen Kortex in ihrer höchsten Konzentration in der Schicht II/III auf, kommen aber auch in Schicht IV-VI vor (McKenna *et al.*, 2015).

Mittels der Satb2-Färbung zeigte sich, dass die Grenze zwischen der zerebralen Kortexschicht I und Schicht II/III im Bereich der meisten Invaginationen der KO-Tiere, sehr lokal in inferiorer Richtung verschoben wurde (Abb. 13B). Innerhalb der adulten Ktr-Tieren grenzte sich Schicht II/III hingegen immer linear gegenüber Schicht I ab

(Abb. 13A). Solche inferior gerichteten „Verformungen“ der Grenze zwischen Schicht I und Schicht II/III konnten allerdings nicht bei allen Invaginationen beobachtet werden. Vor allem im Bereich weniger tiefer Invaginationen (Tiefe $\leq 60 \mu\text{m}$) kam es zu keinerlei sichtbaren „Verformungen“ der Grenze zwischen Schicht I und Schicht II/III (Abb. 13C). Zu einer relevanten Verdünnung oder Verdickung der superfiziellen Neuronenschichten schien es allerdings auch im Bereich tiefer Invaginationen nicht zu kommen (Abb. 13B). Weshalb die Ausbildung „echter“ kortikaler Auffaltungen (siehe Einleitung) innerhalb der adulten $\text{Pfn1}^{\text{flx/flx, Nestin-cre}}$ -Mäuse nicht eindeutig geklärt werden konnte.

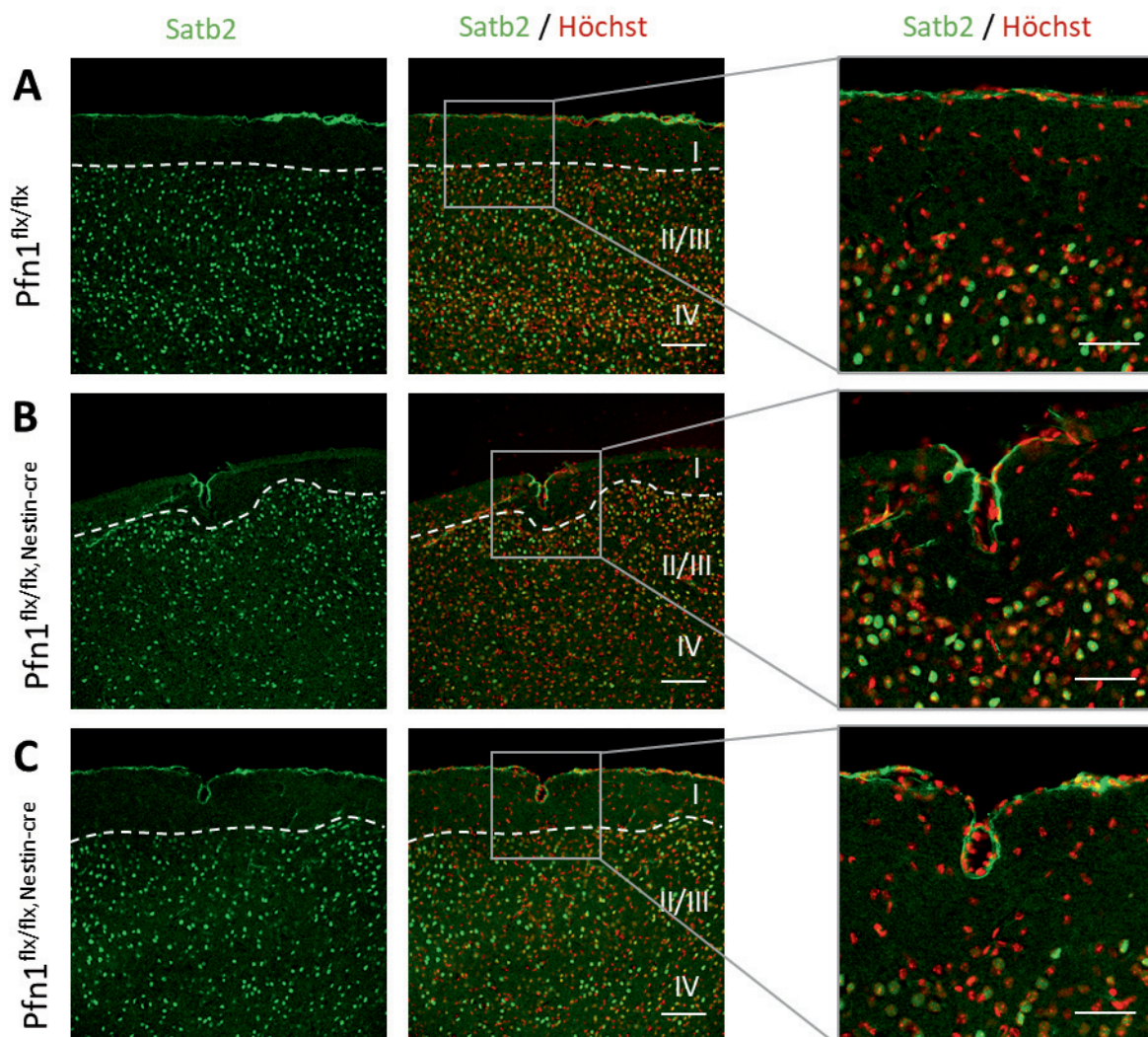


Abbildung 13: Im Bereich von Invaginationen kommt es in adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäusen nicht immer zu einer Verformung der superfiziellen Grenze der zerebralen Kortexschichten II/III. Repräsentative Aufnahmen zeigen Antikörperfärbungen gegen Satb2 (grün) in Verbindung mit Höchst (rot) an adulten Ktr- und KO-Mäusen. Die gestrichelten Linien symbolisieren die Form der Grenze zwischen der zerebralen Kortexschicht I und Schicht II/III. Maßstab: 100 µm (Großaufnahmen). Maßstab: 50 µm (Nahaufnahmen). **(A)** Die repräsentative Aufnahme der superfiziellen zerebralen Kortexschichten einer adulten Ktr-Maus verdeutlicht die normalerweise lineare Abgrenzung der zerebralen Kortexschicht II/III von Schicht I des zerebralen Kortex. **(B)** Innerhalb des zerebralen Kortex der adulten KO-Mäuse schien diese Grenze im Bereich der Invaginationen allerdings oftmals in inferiorer Richtung verschoben zu sein. **(C)** Nur weniger tiefer Invagination (> 60 µm Tiefe) schienen nicht durch eine Verformung der superfiziellen Grenze von Schicht II/III des zerebralen Kortex begleitet zu werden. I: Zerebrale Kortexschicht I; II/III: Zerebrale Kortexschicht II/III; IV: Zerebrale Kortexschicht IV.

3.1.3. Die Deletion von Profilin1 ist ursächlich für die Ausbildung der Invaginationen innerhalb des zerebralen Kortex der adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse

Um nachweisen zu können, dass die Invaginationen der zerebralen Kortexoberfläche durch die Deletion von Profilin1 und nicht durch das Einbringen der lox-P-Sites oder der Cre-Rekombinase in das Genom der Versuchstiere verursacht wurden, fand eine Untersuchung drei verschiedener Kontrollgenotypen hinsichtlich der Ausbildung von Invaginationen statt. Die Versuchsmäuse unterschieden sich dabei hinsichtlich der Anzahl ihrer lox-P-Sites und / oder dem Vorhandensein der Cre-Rekombinase. Verwendet wurden gefloxtete Versuchsmäuse, welche zum einen zwei lox-P-Sites aber keiner Cre-Rekombinase (Pfn1^{flx/flx}) besaßen und zum anderen Mäuse, welche unter dem Nestin-Promotor eine Cre-Rekombinase exprimierten, jedoch nur eine lox-P-Site (Pfn1^{flx/+;Nestin-cre}) aufwiesen. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung von Mäusen, welche unter dem Nestin-Promotor eine Cre-Rekombinase exprimierten, jedoch keine lox-P-Site besaßen (Pfn1^{+/+;Nestin-cre}) (Abb. 14). Bei der Durchsicht der entsprechenden, mittels PI gefärbten Schnittserien, konnte in keinem Fall eine Invagination nachgewiesen werden (Tab. 3).

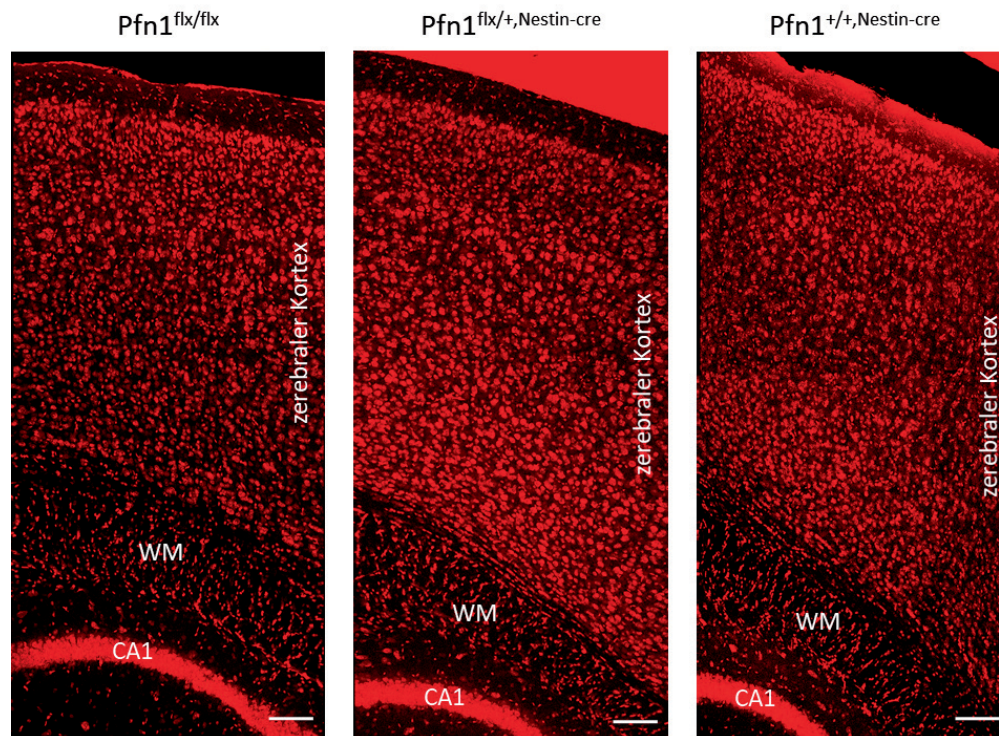


Abbildung 14: Keine Invaginationen in den superfiziellen zerebralen Kortexschichten adulter Pfn1^{flx/flx}-, Pfn1^{flx/+,Nestin-cre}- und Pfn1^{+/+,Nestin-cre}-Mäuse nachweisbar. Repräsentative Aufnahmen zerebraler PI gefärbter Kortexes adulter Pfn1^{flx/flx}-, Pfn1^{flx/+,Nestin-cre}- und Pfn1^{+/+,Nestin-cre}-Mäuse weisen anders als die adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse keinerlei Invaginationen auf. Maßstab: 100 µm. CA1: Cornu Ammonis Region 1; WM: weiße Substanz.

Tabelle 3: Quantitative Analyse der Anzahl an Invaginationen an mid-parasagittalen Hirnschnitten adulter Pfn1^{flx/flx}-, Pfn1^{flx/+,Nestin-cre}- und Pfn1^{+/+,Nestin-cre}-Mäuse. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von Invaginationen pro ausgezähltem, PI-gefärbtem mid- bzw. parasagittalem Hirnschnitt adulter Pfn1^{flx/flx}-, Pfn1^{flx/+,Nestin-cre}- und Pfn1^{+/+,Nestin-cre}-Mäuse.

Genotypen	Anzahl untersuchter Mäuse	Anzahl untersuchter Schnitte	Mittlere Anzahl an Invaginationen ± SA
Pfn1 ^{flx/flx}	4	16	0,00 (± 0,00)
Pfn1 ^{flx/+,Nestin-cre}	4	16	0,00 (± 0,00)
Pfn1 ^{+/+,Nestin-cre}	3	12	0,00 (± 0,00)

3.2. Reaktive Gliose im zerebralen Kortex adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse

Eine weitere Auffälligkeit innerhalb des zerebralen Kortex der adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse bildet die von Frau Lara Minnerup nachgewiesene reaktive Astroglieose (Minnerup, 2014). Innerhalb ihrer Masterarbeit konnte Frau Minnerup nicht abschließend klären, ob es sich um eine „partielle“ oder eine „vollständige“ reaktive Astroglieose (die reaktiven Astrozyten proliferieren) handelte. Dementsprechend fand innerhalb dieser Studie eine genauere Untersuchung dieses Sachverhaltes statt.

Um zu überprüfen, ob die reaktiven Astrozyten innerhalb der adulten KO-Mäuse proliferieren oder nicht, wurde ein BrdU-Experiment durchgeführt, innerhalb dessen adulten Ktr- und KO-Mäusen 14 Tage BrdU über das Trinkwasser verabreicht wurde. Die entsprechende Antikörperfärbung gegen BrdU konnten zeigen, dass innerhalb des zerebralen Kortex der adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse nahezu doppelt so viele Zellen pro 100000 μm^2 BrdU inkorporiert hatten wie in den Pfn1^{flx/flx}-Mäusen (Ktr: $3,47 \pm 0,33$; KO: $6,75 \pm 0,68$; $p < 0,01$) (Abb. 15B). Dies wies allgemein auf eine erhöhte Proliferationsrate innerhalb des zerebralen Kortex der KO-Tiere hin, konnte aber noch keinen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den proliferierenden Zellen um reaktivierte Astrozyten handelte.

Mittels weiterer Antikörperfärbung gegen BrdU und GFAP konnte zum einen das Ergebnis von Frau Minnerup verifizieren werden, dass im zerebralen Kortex der adulten KO-Mäuse eine deutlich erhöhte Anzahl GFAP⁺-Zellen pro 100000 μm^2 vorzufinden seien (Ktr: $3,57 \pm 0,41$; KO: $15,43 \pm 0,86$; $p < 0,001$) (Abb. 15B). Zum anderen wurde gezeigt, dass in beiden Genotypen nur ein sehr geringer Anteil der GFAP⁺-Zellen überhaupt BrdU inkorporiert hatten (Ktr: $0,54 \% \pm 0,25 \%$; KO: $1,24 \% \pm 0,29 \%$; $p = 0,11$) (Abb. 15C). Dies wies demnach auf eine sehr geringe proliferative Kapazität der Astrozyten sowohl in den adulten Ktr- als auch KO-Mäusen hin.

Auffällig war allerdings die unterschiedliche Lokalisation der BrdU⁺/GFAP⁺-Zellen innerhalb der untersuchten Genotypen. Innerhalb der Pfn1^{flx/flx}-Mäuse befanden sich alle BrdU⁺/GFAP⁺-Zellen im Bereich der WM und gehören somit den fibrösen Astrozyten an. Bei den Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäusen traten sie hingegen sowohl im Bereich der WM als auch in den inferioren und superioren zerebralen Kortexschichten auf (Abb. 15A). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die protoplasmischen Astrozyten der GM, welche die Hauptquelle der reaktiven Astrozyten bilden (Robel, Berninger and

Götz, 2011), nach der Adoleszenz im sogenannten „ruhenden Zustand“ nicht mehr proliferieren und auch kein GFAP mehr exprimieren (Robel *et al.*, 2009; Ge and Jia, 2016). Da innerhalb der superfiziellen Kortexschichten der KO-Mäuse proliferierende, reaktive Astrozyten nachgewiesen werden konnten, wurde so eine „vollständige“ reaktive Astroglieose nachgewiesen. Die deutlich erhöhte Anzahl BrdU⁺-Zellen die nicht GFAP⁺ waren wies zusätzlich auf eine Reaktivierung anderer Gliazellen (Mikroglia und NG2-Zellen) hin.

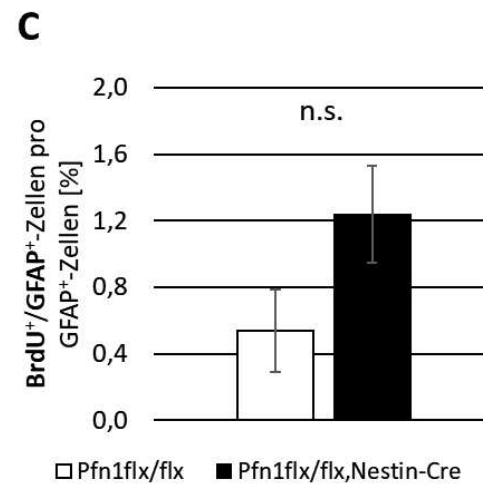
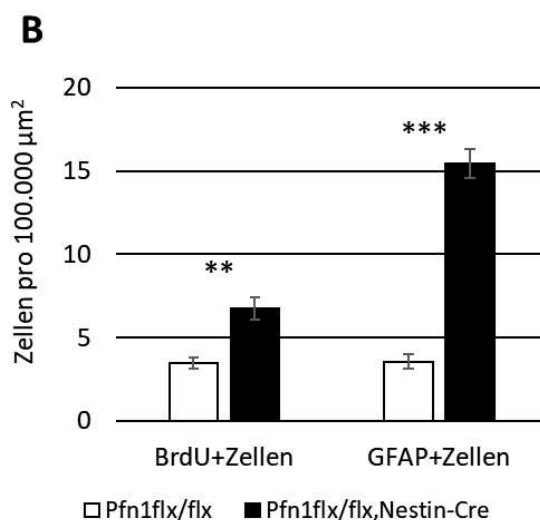
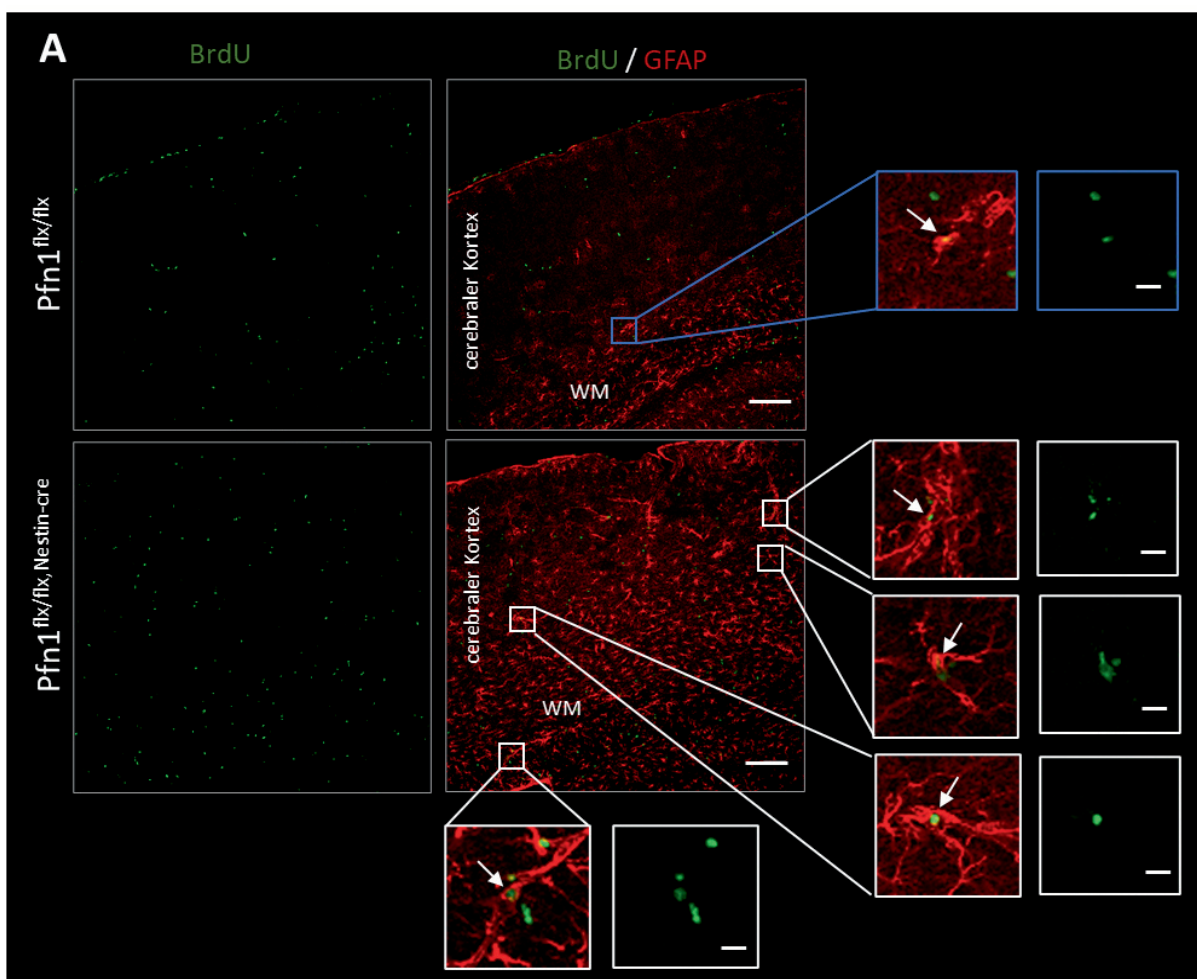
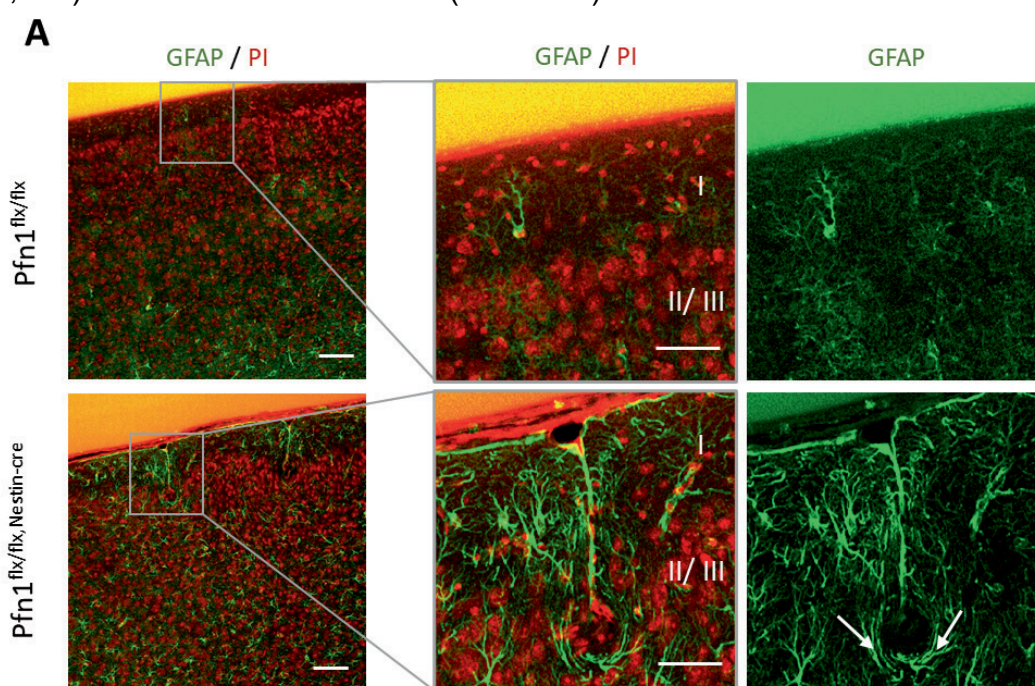


Abbildung 15: Nachweis von proliferierenden reaktiven Astrozyten im zerebralen Kortex adulter Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse. (A) Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen BrdU (grün) und GFAP (rot) im zerebralen Kortex adulter (14-Tage mit BrdU inkubierte) Ktr- und KO-Mäuse weisen auf eine erhöhte Anzahl neu gebildeter Zellen (BrdU⁺) und GFAP⁺-Zellen innerhalb der verschiedenen Schichten des zerebralen Kortex der adulten KO-Mäuse hin. Zudem bestätigen sie die Proliferation einiger Astrozyten (BrdU⁺/GFAP⁺) in beiden Genotypen. Maßstab: 100 μ m (Großaufnahmen). Die Nahaufnahmen verdeutlichen zudem die Lokalisation einiger BrdU⁺-reaktiver Astrozyten im Bereich der GM der adulten KO-Mäuse. Dies deutet auf eine reaktive Astrogliose hin, da murine Astrozyten der GM unter normalen physiologischen Bedingungen nach der Adoleszenz nicht mehr proliferieren. Maßstab: 10 μ m (Nahaufnahmen). (B) Die Analyse der relativen Anzahl BrdU⁺- und GFAP⁺-Zellen im zerebralen Kortex der adulten Ktr- und KO-Mäuse bestätigte die Vermutung eines deutlich erhöhten Anteils beider Zelltypen innerhalb der adulten KO-Mäuse. (C) Wohingegen die Auswertung des prozentualen Anteils BrdU⁺/GFAP⁺-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl GFAP⁺-Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen den adulten Ktr- und KO-Mäuse aufwies. n= 9 / 3 pro Genotyp (9 untersuchte Hemisphären (3 pro Maus) von insgesamt 3 adulten Ktr- und KO-Mäusen). GM: Graue Substanz; n.s.: nicht signifikant; WM: Weiße Substanz; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Durch die detaillierte Analyse der Lokalisation BrdU⁺/GFAP⁺-Zellen fielen zudem Akkumulationen GFAP⁺-Astrozyten im Bereich der zerebralen Kortexschicht I der adulten Profilin1-defizienten Mäuse auf (Abb. 16A). Solche Astrozyten-Ansammlungen kamen im zerebralen Kortex der Ktr-Mäuse nicht vor. Auffällig war zudem, dass sich diese Akkumulationen GFAP⁺-Zellen in den adulten KO-Mäusen im Bereich der Invaginationen ausbildeten. Eine nähere Untersuchung der Anzahl GFAP⁺-Zellen innerhalb der zerebralen Kortexschicht I der adulten Ktr- und KO-Mäuse zeigte zudem eine mehr als verdoppelte Anzahl GFAP⁺-Astrozyten (Ktr: $1,57 \pm 0,15$; KO: $3,88 \pm 0,19$; p < 0,001) innerhalb der KO-Mäuse (Abb. 16B).



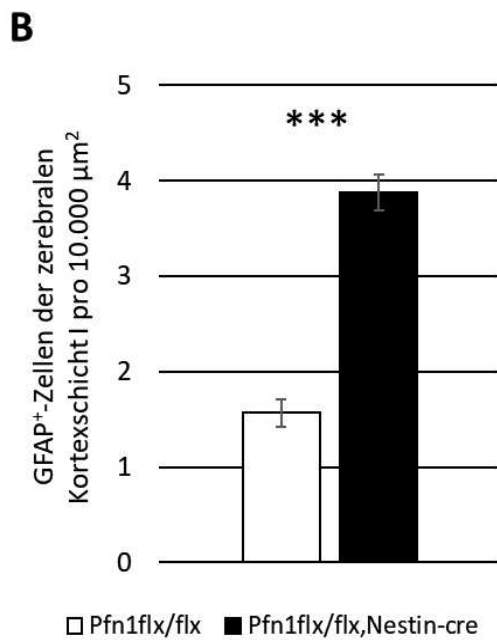


Abbildung 16: Stark erhöhte Anzahl GFAP⁺-Astrozyten innerhalb der zerebralen Kortexschicht I der adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäusen, welche sich zudem um die Invaginationen akkumulieren. (A) Repräsentative Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen GFAP (grün) und PI-Färbungen (rot) wiesen zum einen auf einen deutlich erhöhten Anteil GFAP⁺-Zellen in der zerebralen Kortexschicht I der adulten KO-Mäuse sowie auf Akkumulationen der GFAP⁺-Zellen um die Invaginationen hin. Maßstab: 100 μm (Großaufnahmen). Maßstab: 50 μm (Nahaufnahmen). Die weißen Pfeile deuten auf GFAP⁺-Astrozyten, welche eine Invagination umlagerte. **(B)** Eine Analyse der mittleren Anzahl GFAP⁺-Zellen innerhalb der zerebralen Kortexschicht I bestätigte zudem die Vermutung einer deutlich erhöhten Anzahl GFAP⁺-Zellen innerhalb der adulten KO-Mäuse. n= 9 / 3 pro Genotyp. I: Zerebrale Kortexschicht I; II/III: Zerebrale Kortexschicht II/III; ***: p < 0,001.

3.3. Embryonalentwicklung der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse

Generell basiert das Auffalten der zerebralen Kortexoberfläche auf der Expansion des zerebralen Kortex in radialer und tangentialer Dimension (del Toro *et al.*, 2017). Für das typischerweise lissencephale Gehirn von Mäusen ist dahingehend bekannt, dass kortikale Auffaltungen unter anderem durch die genetisch induzierte Erhöhung der Anzahl basaler Vorläuferzellen hervorgerufen werden können. Beispielsweise führt der Knock-down des DNA-assoziierten Proteins Trnp1 (TMF-reguliertes Kernprotein 1) zum Anstieg der Anzahl bIP und bRG, was eine radiale Expansion und daraus resultierend die Auffaltung des zerebralen Kortex zur Folge hat (Stahl *et al.*, 2013). Diese und andere Studien bildeten einen starken Hinweis darauf, dass auch in den Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäusen die Ausbildung der Invaginationen auf Veränderungen in der Anzahl oder Proliferationsrate der basalen Vorläuferzellen zurückzuführen sein könnte. Dementsprechend behandelt der folgende Teil der vorliegenden Studie die Untersuchung der zerebralen Embryonalentwicklung der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse, vor allem in Bezug auf die Anzahl, Lokalisation und Proliferationsrate der verschiedenen neuronalen Vorläuferzellen.

3.3.1. Erhöhte Anzahl mitotischer und neu gebildeter Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos

Um einen generellen Überblick über die Verteilung und den Anteil mitotischer Zellen innerhalb der zerebralen Embryonalentwicklung der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos zu erhalten, wurden Antikörperfärbungen gegen pH3 an E12,5; E14,5 und E16,5 Ktr- und KO-Embryos durch. Der Antikörper gegen pH3 markiert dabei Zellen, welche sich in der späten G2- bis hin zur späten M-Phase des Zellzyklus befinden (Scott *et al.*, 2003). Mittels dieser Färbung konnten in allen drei Embryonalstadien und in beiden Genotypen mitotische Zellen im Bereich des sich entwickelnden Schädelknochens und der Meninges (Hirnhaut) innerhalb des zerebralen Kortex (VZ, SVZ, IZ, SP und CP) sowie direkt an der VO ausgemacht werden (Abb. 17A-F). Aufgrund ihrer Lokalisation wurden pH3⁺-Zellen, welche sich direkt an der VO befanden, den aRG und die basal der VO lokalisierten den bP zugeordnet. Die superior des zerebralen Kortex angeordneten mitotischen Zellen der primären Meninx (bildet im Laufe der Entwicklung die Meningen und den Schädelknochen (Dasgupta and Jeong, 2019)) gehören nicht den neuralen Vorläuferzellen an und wurden für alle weiteren Analysen außer Acht gelassen.

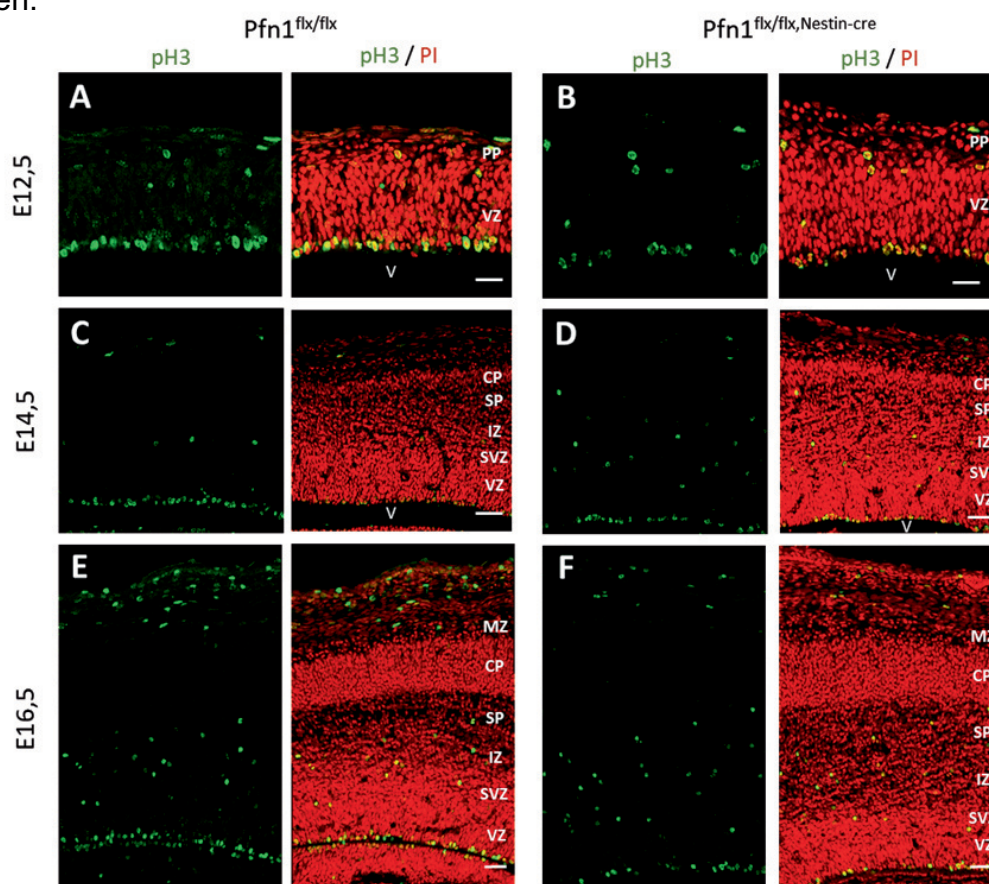


Abbildung 17: Deutlich erhöhte Anzahl mitotischer Zellen in basalen Bereichen des zerebralen Kortex von E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos. Repräsentative Aufnahmen zeigen Antikörperfärbungen gegen pH3 (grün) zusammen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI (rot) in den Entwicklungsstadien E12,5 (A-B), E14,5 (C-D) und E16,5 (E-F) an Pfn1^{flx/flx}- wie auch Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos. Innerhalb der E14,5 KO-Embryos ist eine deutlich erhöhte Anzahl mitotischer Zellen basal der VO sichtbar. Maßstab: 25 μm (A-B). Maßstab: 50 μm (C-F). CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; MZ: Maginalzone; PP: Präplatte; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; V: lateraler Ventrikel; VO: Ventrikeloberfläche; VZ: Ventrikularzone.

Die nähere Analyse der Anzahl mitotischer aRG, normalisiert auf die Länge der VO, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Ktr- und KO-Embryos für die Stadien E12,5; E14,5 oder E16,5 (Abb. 18A). Dies ließ generell auf keine offensichtlichen Veränderungen in der Anzahl oder der Mitoserate der aRG innerhalb des zerebralen Kortex der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos schließen.

Für die Untersuchung der Mitoserate der bP, wurde die Anzahl mitotischer Zellen in den basalen Bereichen des zerebralen Kortex auf die Gesamtfläche der zerebralen Kortexschichten des entsprechenden Gehirnschnittes normalisiert. Daraus ergab sich, dass es im Entwicklungsstadium E12,5 bei den KO-Embryos, zu einer nicht signifikanten Erhöhung der mittleren Anzahl mitotischer Zellen um rund 40 % kam (Ktr: $0,10 \pm 0,01$; KO: $0,14 \pm 0,04$). Diese Erhöhung vervielfältigte sich im Laufe der Entwicklung rapide und erreichte ihren Höhepunkt (innerhalb der untersuchten Entwicklungsstadien) an E14,5, wo es zu einer annähernden Verdopplung mitotischer bP kam (Ktr: $0,12 \pm 0,01$; KO: $0,20 \pm 0,02$; $p < 0,01$). An E16,5 hatte sich die relative Anzahl basaler pH3⁺-Zellen dem Kontrollzustand wieder angeglichen (Abb. 18B). Demnach war davon auszugehen, dass es sich bei dem Anstieg der relativen Anzahl mitotischer Zellen basal der VO um einen transienten Effekt handelte.

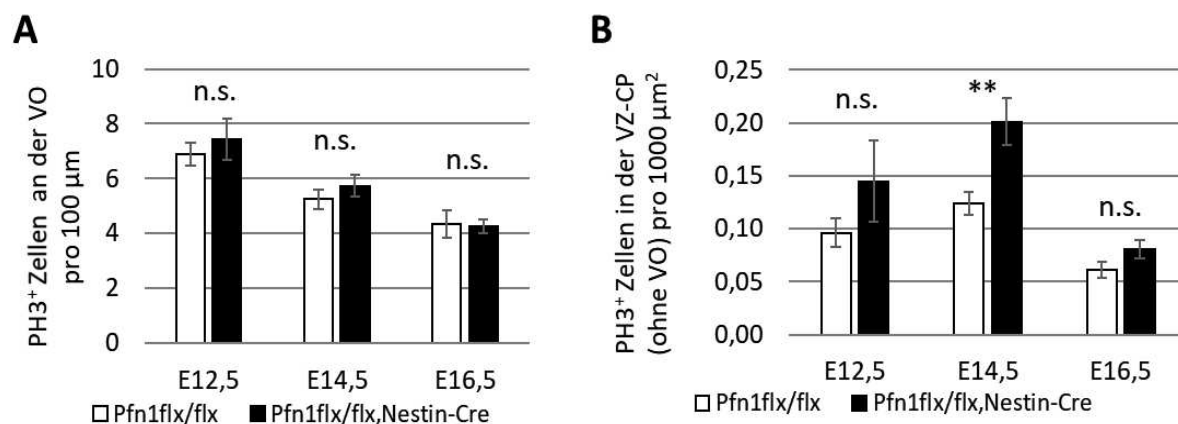


Abbildung 18: Erhöhter Anteil mitotischer Zellen basal der Ventrikeloberfläche im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos. (A) E12,5, E14,5 und E16,5 Ktr- und KO-Embryos zeigten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Anzahl mitotischer Zellen direkt an der Ventrikeloberfläche (VO). (B) Die Analyse der relativen Anzahl mitotischer Zellen im Bereich der VZ bis einschließlich zur CP (ausgenommen mitotische Zellen direkt an der VO) von E12,5, E14,5 und E16,5 Ktr- und KO-Embryos ergab für die E12,5 und E16,5 keinen signifikanten Unterschied in der relativen Anzahl mitotischer Zellen basal der VO. Jedoch konnte für das Entwicklungsstadium E14,5 eine annähernde Verdopplung basal mitotischer Zellen nachgewiesen werden. n= 9 / 3 pro Genotyp und Entwicklungsstadium. CP: Korticale Platte; n.s.: nicht signifikant; VZ: Ventrikularzone; **: p < 0,01.

In Bezug auf den starken Anstieg der Anzahl mitotischer KO-bP an E14,5 war auch ein erhöhter Anteil neu gebildeter Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos zu erwarten. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde eine Antikörperfärbung gegen BrdU an E14,5 Pfn1^{flx/flx}- und E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos, welche schon im Mutterleib für 2 Std. mit BrdU inkubiert wurden waren durchgeführt. Die Anzahl BrdU⁺-Zellen sollte demnach darüber Aufschluss geben, wie viele Zellen sich innerhalb der letzten 2 Std. vor der Entnahme der Embryos in der S-Phase des Zellzyklus befunden hatten. Die Analyse der Anzahl BrdU⁺-Zellen ergab, dass die mittlere Anzahl neu gebildeter Zellen (BrdU⁺) im zerebralen Kortex der E14,5 KO-Embryos signifikant erhöht war (Ktr: 449,04 ± 10,82 BrdU⁺-Zellen; KO: 519,03 ± 19,42 BrdU⁺-Zellen; p < 0,01) (Abb. 19), was die erhöhte Mitoserate innerhalb der E14,5 KO-Embryos noch einmal verifizierte.

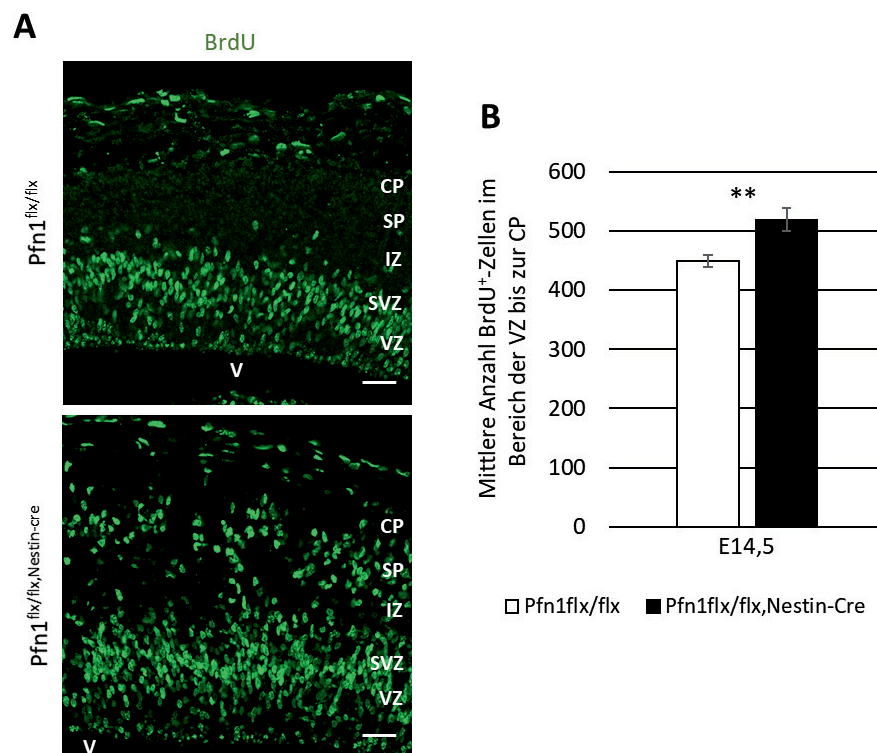


Abbildung 19: Erhöhte Anzahl neu gebildeter Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos. (A) Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen BrdU an E14,5 Ktr- und KO-Embryo zeigen einen deutlich erhöhten Anteil neu gebildeter Zellen basal der VZ und SVZ innerhalb der E14,5 KO-Embryos. Maßstab: 50 µm (A). (B) Die Analyse der mittleren Anzahl BrdU⁺-Zellen im Bereich der VZ bis zur CP bestätigte eine verstärkte Produktion neu gebildeter Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 KO-Embryos. n= 9 / 3 pro Genotyp. CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; V: lateraler Ventrikel; VZ: Ventrikularzone. **: p < 0,01.

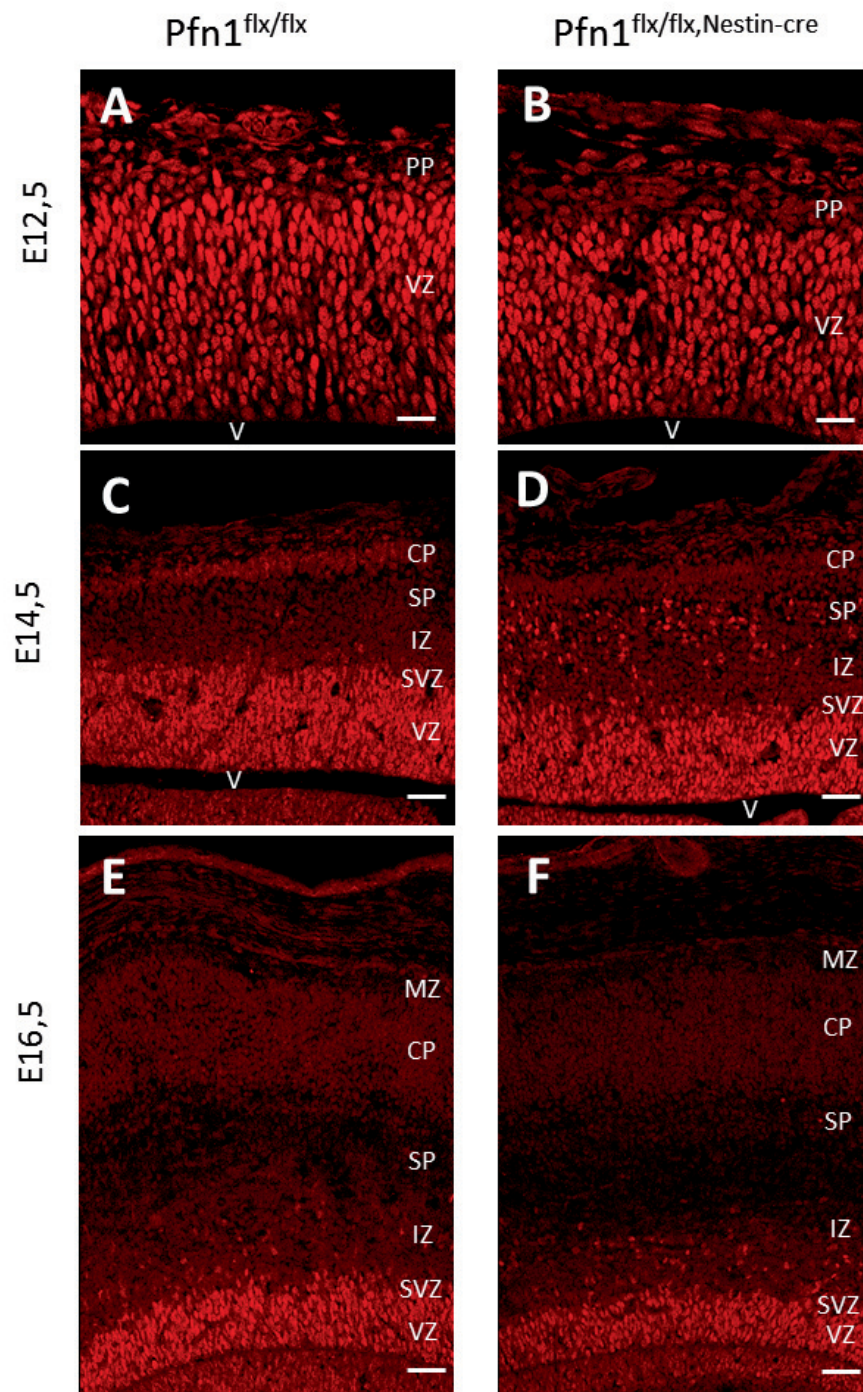
Die transiente Erhöhung der Anzahl mitotischer bP könnte dabei z. B. durch eine temporäre Erhöhung der Gesamtzahl der bP oder eine Veränderungen ihrer Zellzykluslänge (verkürzte G1-Phase bei proliferativen Teilungen im Vergleich zu differenzierenden Teilungen (Hardwick *et al.*, 2015)) hervorgerufen worden sein.

3.3.2. Deutlich erhöhte Anzahl bRG-Zellen im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos

Um eine transiente Erhöhung der Anzahl bRG zu überprüfen, wurden an Ktr- und KO-Embryos der Entwicklungsstadien E12,5; E14,5; E16,5 und E18,5 eine Antikörperfärbungen gegen Pax6 durchgeführt, welche spezifisch alle Typen von RG-Zellen markiert (Götz, Stoykova and Gruss, 1998).

Die mittels des Pax6-Antikörpers markierten RG waren innerhalb beider Genotypen und aller Entwicklungsstadien vor allem im Bereich der VZ (aRG) und nur in geringer Anzahl basal der VZ lokalisiert (bRG). Auffällig war jedoch eine deutlich erhöhte Anzahl an bRG innerhalb der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos, welche zudem anders als für murine bRG beschrieben, nicht nur in der SVZ und IZ (Wang *et al.*, 2011) sondern auch im Bereich der SP vorzufinden waren (Abb. 20A-H).

Durch eine genaue Analyse der Anzahl an bRG, relativiert auf die Gesamtfläche der SVZ bis einschließlich der SP, konnte der stark erhöhte Anteil an bRG innerhalb der E14,5 KO-Embryos bestätigt werden (Ktr: $0,10 \pm 0,01$; KO: $1,30 \pm 0,21$. $p < 0,001$). Diese Erhöhung an bRG schwächte sich über die weitere Entwicklung schnell ab, war jedoch auch in den E16,5 KO-Embryos noch nachweisbar (Ktr: $0,46 \pm 0,03$; KO: $0,59 \pm 0,03$. $p=0,007$) (Abb. 20I). Innerhalb des Entwicklungsstadiums E18,5 konnte keine Veränderung in der Anzahl der bRG nachgewiesen werden.



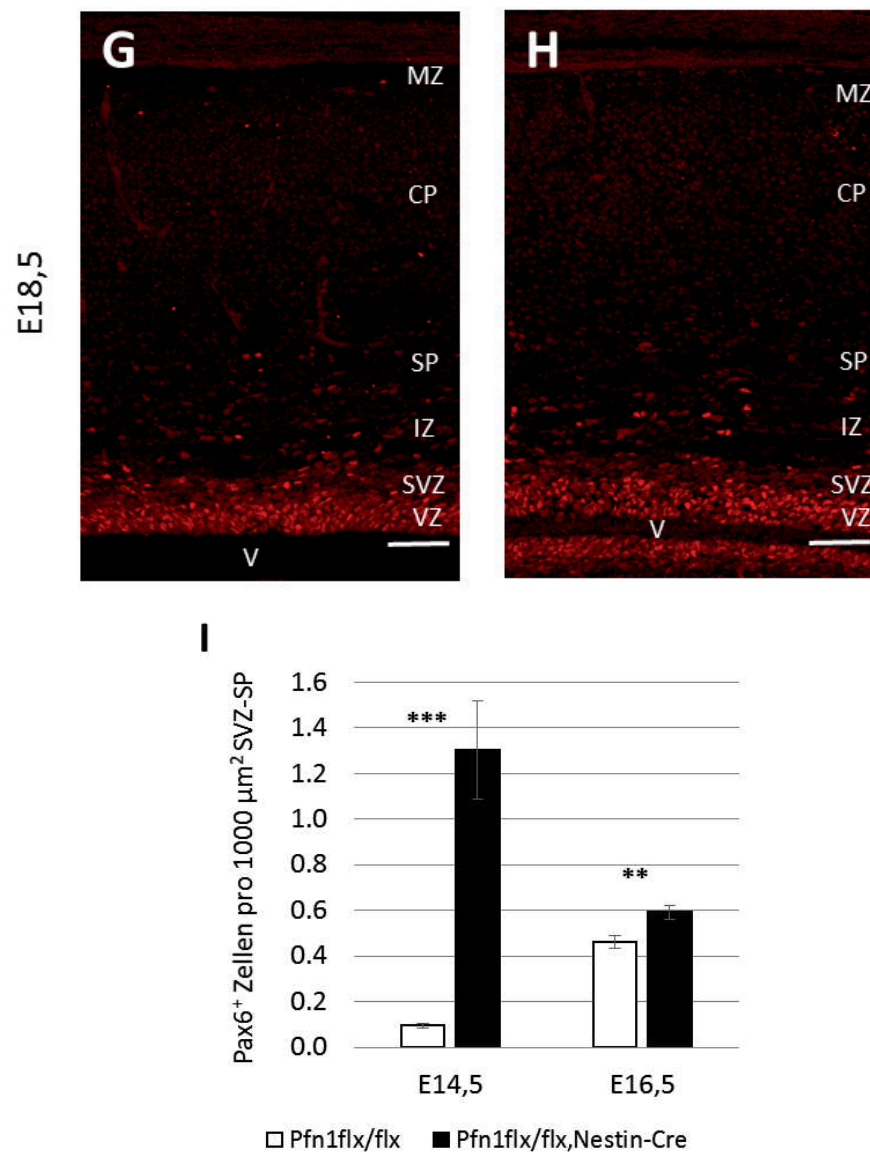


Abbildung 20: Erhöhte Anzahl Pax6⁺-Zellen im Bereich der SVZ bis SP in E14,5 und E16,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäusen. (A-H) Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen Pax6 an E12,5; E14,5; E16,5 und E18,5 Ktr- und KO-Embryos zeigen ein deutliches erhöhte Anzahl basal der VZ und SVZ lokalisierter Pax6⁺-Zellen innerhalb der E14,5 KO-Embryos. Maßstab: 25 μm (A-B). Maßstab: 50 μm (C-D). Maßstab: 100 μm (E-H). (I) Die detaillierte Analyse der relativen Anzahl Pax6⁺-Zellen im Bereich der SVZ bis SP von E14,5 und E16,5 zeigt einen transienten Anstieg der Anzahl basaler Pax6⁺-Zellen innerhalb der E14,5 und E16,5 KO-Embryo. n = 9 / 3 pro Genotyp und Entwicklungsstadium. CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; MZ: Maginalzone; PP: Präplatte; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; V: Lateraler Ventrikel; VZ: Ventrikularzone; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Ursächlich für eine Vergrößerung des Anteils bRG kann eine vermehrte Produktion von bRG durch die aRG sein (Florio and Huttner, 2014). Wobei sich dadurch in gyrencephalen Gehirnen die Dicke der VZ durch das Umschalten der aRG von einer

proliferativen zu einer differenzierenden Teilung (Götz and Huttner, 2005) schnell verringert.

Um einen solchen, der gyrencephalen Gehirnentwicklung ähnlichen, Effekt in den $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos zu überprüfen, wurde zum einen die Schichtdicke der VZ an E12,5; E14,5; E16,5 und E18,5 sowie die Anzahl der aRG relativiert auf die Fläche der VZ an E12,5; E14,5 und E16,5 der Ktr- und KO-Embryos ermittelt.

Die Altersstufen und Genotyp-abhängige Ausmessung der Schichtdicke der VZ ergab im Falle der Entwicklungsstadien E12,5; E14,5 und E18,5 keinerlei Auffälligkeiten. Nur im Entwicklungsstadium E16,5 trat eine signifikante Verringerung der VZ Schichtdicke im Vergleich zu den $Pfn1^{flx/flx}$ -Embryos (Ktr: $73,79 \mu\text{m} \pm 2,71 \mu\text{m}$; KO: $60,92 \mu\text{m} \pm 1,05 \mu\text{m}$. $p < 0,001$) auf (Abb. 21A). Dies deutet allgemein auf Veränderungen des Teilungsverhaltens der KO-aRG innerhalb der früheren Entwicklungsstadien hin.

In Bezug auf die relative Anzahl aRG in der VZ kam es bei den E12,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos zu einem signifikanten Anstieg (Ktr: $11,99 \pm 0,19$; KO: $14,75 \pm 0,75$. $p < 0,01$), welcher sich jedoch an E14,5 und E16,5 nicht weiter fortsetzte (Abb. 21B). Allgemein wies die erhöhte Anzahl aRG in den E12,5 KO-Embryos auf eine erhöhte Produktion von aRG, beispielsweise durch die NEZ, zu Beginn der Neurogenese hin.

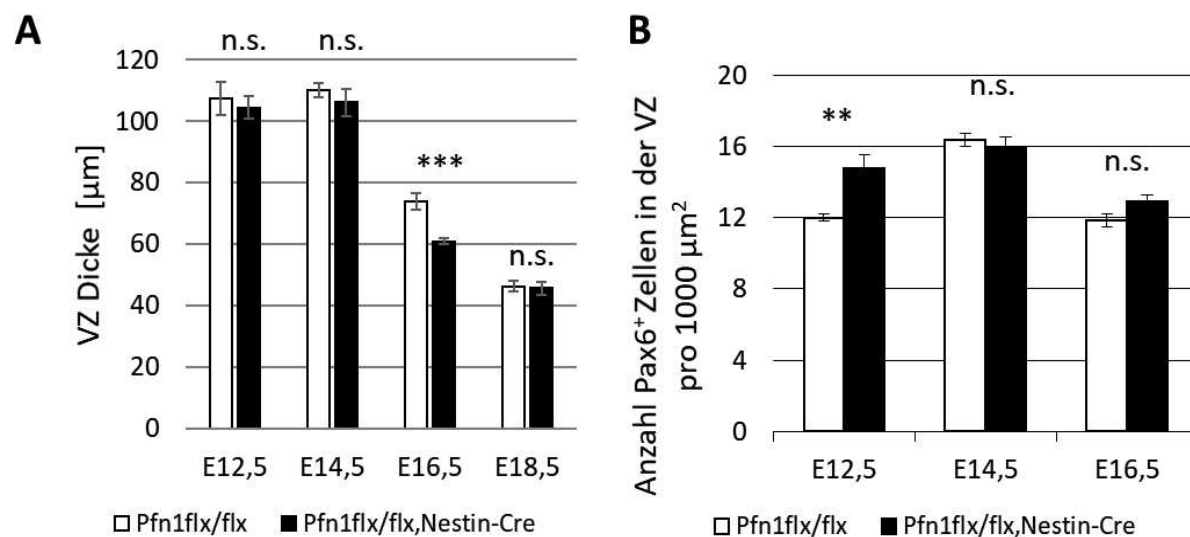


Abbildung 21: Verringerte Schichtdicke der VZ an E16,5 und erhöhte relative Anzahl RG an E12,5 in $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos. (A) Die Analyse der mittleren Schichtdicke der VZ ergab eine stark verringerte Dicke der VZ innerhalb der E16,5 KO-Embryos, wo hingegen an E12,5; E14,5 und E18,5 keine signifikanten Unterschiede zwischen Ktr- und KO-Embryos festgestellt werden konnten. (B) Eine Erhebung der relativen Anzahl Pax6⁺-Zellen wies zudem darauf hin, dass es innerhalb der E12,5 KO-Embryos zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl Pax6⁺-Zellen kam. Wo hingegen die Anzahl Pax6⁺-Zellen innerhalb der E14,5 und E16,5 KO-Embryos vergleichbar mit den jeweiligen Ktr-Embryos blieb. $n = 9 / 3$ pro Genotyp und Entwicklungsstadium. n.s.: nicht signifikant; VZ: Ventrikularzone; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3.3.3. Fehllokalisierte IP im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos

Da die erhöhte Rate mitotischer Zellen in den E14,5 KO-Embryos basal der VO nicht zwangsläufig allein auf den starken Anstieg von bRG zurückzuführen sein müsste, erfolgte zudem eine Untersuchung der Population der IP hinsichtlich ihrer Lokalisation und Anzahl. Verwendung fand dabei eine Antikörperfärbung gegen den Transkriptionsfaktor Tbr2, welcher spezifisch in allen Typen von IP exprimiert wird (Englund *et al.*, 2005; Hevner *et al.*, 2006).

Die größte Anzahl Tbr2⁺-IP war innerhalb der E14,5 Ktr-Embryos, mit der Literatur konform, in der SVZ lokalisiert (Haubensak *et al.*, 2004). Vereinzelt ließen sich allerdings auch in der VZ und IZ nachweisen, wobei deren Anzahl deutlich geringer war als in der SVZ (Abb. 22A). Die Verteilung der Tbr2⁺-Zellen, innerhalb der Profilin1-defizienten E14,5 Embryos, war zum größten Teil mit der Verteilung innerhalb der Ktr-Mäusen vergleichbar. Der größte Anteil der IP lokalisierte sich im Bereich der SVZ, wobei einige auch in der VZ vorzufinden waren. Einen gravierenden Unterschied zu den Ktr-Embryos bildete allerdings ein deutlich sichtbarer Anstieg an IP im Bereich der SP und CP (Abb. 22B). Die Quantifizierung der relativen Anzahl Tbr2⁺-Zellen, in Bezug auf die Gesamtfläche des zerebralen Kortex, ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtzahl der IP zwischen Ktr- und KO-Embryos (Abb. 22C).

Der auffällige Anstieg Tbr2⁺-Zellen basal der SVZ legte jedoch eine genauere Untersuchung der Verteilung der IP in den verschiedenen Schichten des zerebralen Kortex der E14,5 Ktr- und KO-Embryos nahe.

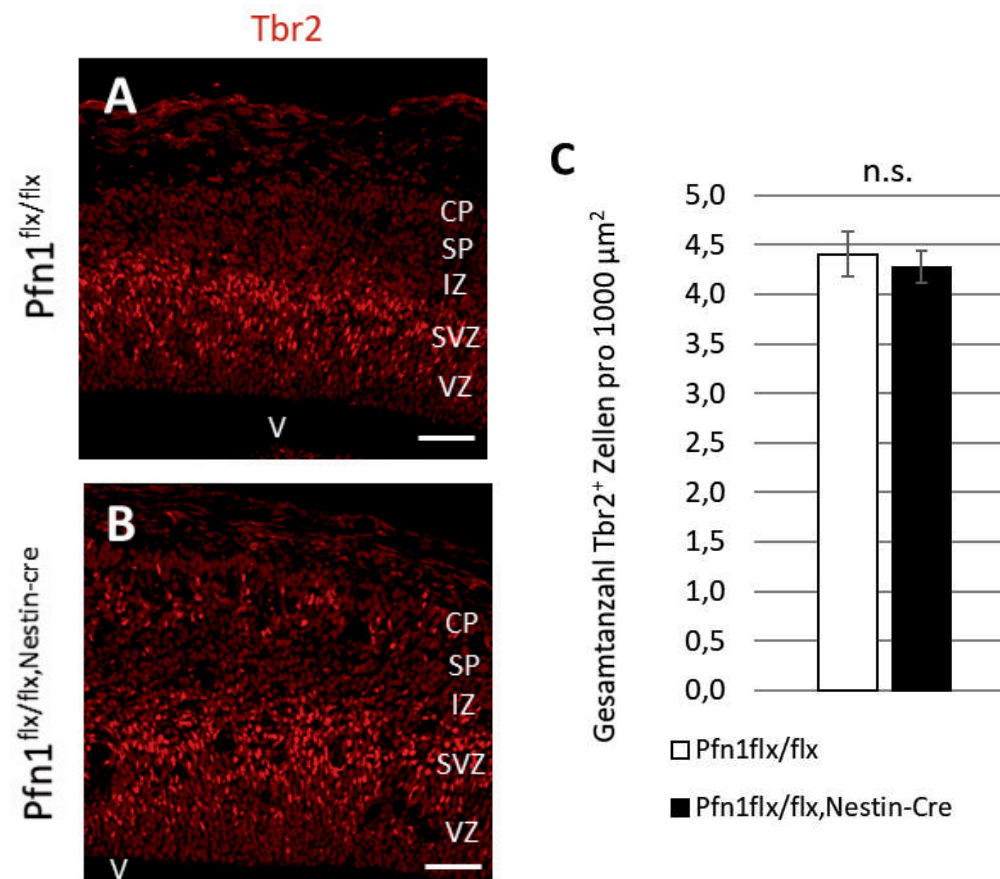


Abbildung 22: Fehllokalisierte IP bei gleichbleibender Gesamtzahl an IP im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Embryos. (A-B) Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen Tbr2 an E14,5 Ktr- und KO-Embryos zeigen die Fehllokalisation einiger IP innerhalb des zerebralen Kortex der E14,5 KO-Embryos, im Bereich der SP und CP. Maßstab: 50 µm (A-B). (C) Die Analyse der relativen Anzahl Tbr2⁺-Zellen in Bezug auf die Gesamtfläche des zerebralen Kortex ergab, trotz der Fehllokalisation einiger IP eine vergleichbare Anzahl an IP zwischen den E14,5 Ktr- und KO-Embryos. n = 9/3 pro Genotyp. CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; n.s.: nicht signifikant; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; V: lateraler Ventrikel; VZ: Ventrikularzone.

Dabei zeigte sich weiterhin, dass sowohl in den Ktr- als auch in den KO-Mäusen der weitaus größte Anteil Tbr2⁺-Zellen im Bereich der SVZ lokalisiert war, wobei auch in allen anderen zerebralen Kortexschichten Tbr2⁺-Zellen vorkamen, wenn auch in teils sehr geringen Mengen. Der relative Anteil Tbr2⁺-Zellen war dabei innerhalb der VZ, SVZ und IZ zwischen Ktr- und KO-Embryos vergleichbar, während es in der SP zu einer Verdreifachung (Ktr: $0,47 \pm 0,13$; KO: $1,49 \pm 0,26$; $p < 0,01$) und innerhalb der CP sogar zu einer Verzehnfachung (Ktr: $0,09 \pm 0,04$; KO: $0,92 \pm 0,18$; $p < 0,001$) der relativen Anzahl Tbr2⁺-Zellen in den KO-Mäusen kam (Abb. 23). Die leicht verringerte Anzahl an IP innerhalb der SVZ und IZ erklärte dabei die trotz allem vergleichbare Gesamtzahl an IP zwischen den E14,5 Pfn1^{flx/flx}- und den E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-

Embryos. Allgemein deutete diese „Fehllokalisierung“ von IP in der SP und CP darauf hin, dass sie von den basal der VZ und SVZ lokalisierten bRG gebildet wurden.

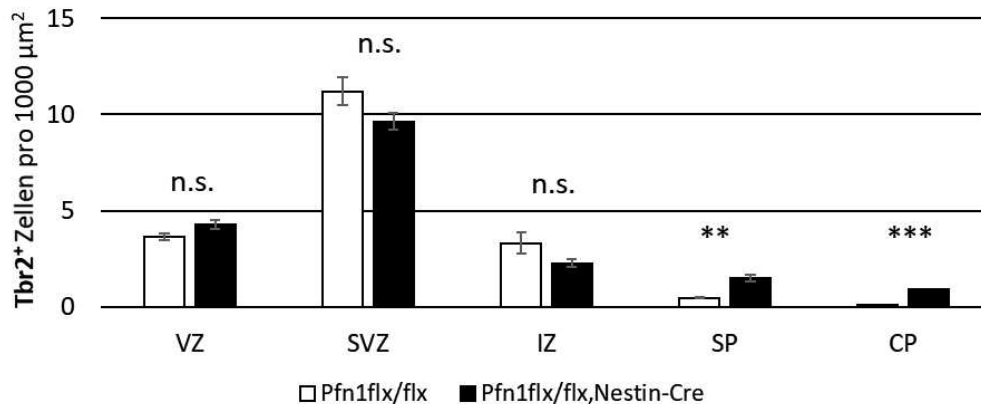


Abbildung 23: Deutlich erhöhte Anzahl an IP im Bereich der SP und CP innerhalb der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos. Die detaillierte Analyse der relativen Anzahl Tbr2⁺-Zellen in den verschiedenen zerebralen Kortexschichten der E14,5 Ktr- und KO-Embryos verdeutlicht den erhöhten Anteil fehllokalisierter IP innerhalb der SP und CP der E14,5 KO-Embryos. n= 9 / 3 pro Genotyp. CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; n.s.: nicht signifikant; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; VZ: Ventrikularzone; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

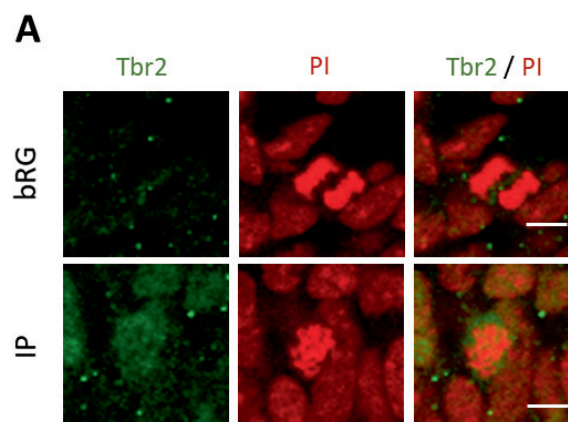
Die Fehllokalisierung der IP bildete zudem in Verbindung mit der deutlich erhöhten Anzahl an bRG einen starken Hinweis darauf, dass sich innerhalb des zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos eine oSVZ-ähnliche Struktur ausgebildet haben könnte. Die oSVZ gyrencephaler Gehirne charakterisiert sich durch ihre Lokalisation basal der iSVZ (Wang *et al.*, 2011) (in ihrer Zytoarchitektur vergleichbar mit der murinen SVZ (Florio and Huttner, 2014)) und enthält einen großen Anteil an bRG sowie auch IP (Betizeau *et al.*, 2013; Turrero García *et al.*, 2015). Dies konnte auch in den basalen Bereichen des zerebralen Kortex der E14,5 KO-Embryos beobachtet werden. Des Weiteren besitzen die bRG und IP der oSVZ gyrencephaler Spezies eine hohe proliferative Kapazität, sprich sie können, anders als in Mäusen, sich mehrfach teilen und dabei sogar selbst erneuern (Betizeau *et al.*, 2013). Allgemein ist für neurale Vorläuferzellen bekannt, dass die Verschiebung von einer proliferativen Teilung hin zu einer neurogenen Teilung im Laufe der Neurogenese mit einer Verlängerung des Zellzyklus im speziellen mit der Verlängerung der G1-Phase, einhergeht (Hardwick *et al.*, 2015). Dementsprechend wurde weiterführend die allgemeine Rate mitotischer bRG und IP innerhalb der E14,5 KO-Embryos näher untersucht. Ziel war es, einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die bRG und IP der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos eine für murine bP untypische Zellzykluslänge aufwiesen.

3.3.4. Basale Vorläuferzellen weisen in den E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre} Embryos eine erhöhte Mitoserate auf

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung erfolgten Antikörperfärbungen gegen Tbr2 und Färbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI. In diesem Fall wurde PI als Marker für Zellen mit segregierter oder kondensierter DNS (mitotische Zellen) verwendet, da PI solche Zellen besonders deutlich hervorhebt. Mittels Tbr2 konnten die in den basalen Bereichen des zerebralen Kortex befindlichen mitotischen Zellen des Weiteren eindeutig den IP (Tbr2⁺) bzw., wiesen sie keine Tbr2-Färbung aufwiesen, mit hoher Wahrscheinlichkeit den bRG zugeordnet werden (Abb. 24A).

Wie zu erwarten war, kam es auch bei dieser Analyse der SVZ-SP innerhalb der E14,5 Profilin1-defizienten Embryos zu einem stark erhöhten Anteil an mitotischer bRG pro 1 mm³. Der Anteil an mitotischen bRG war dabei bei den KO-Embryos um das Neunfache höher als bei den Ktr-Embryos (Ktr: 0,74 ± 0,17; KO: 6,75 ± 0,81; p < 0,001) (Abb. 24B) erklärte sich allerdings durch den allgemein für einen murinen zerebralen Kortex sehr stark erhöhten Anteil an bRG.

Auch die IP, welche in den E14,5 KO-Embryos nicht in ihrer Gesamtzahl, sondern nur in ihrer Lokalisation verändert waren, zeigten eine deutliche Erhöhung ihrer Mitoserate. Im Vergleich mit den E14,5 Ktr-Embryos befanden sich innerhalb der E14,5 KO-Tiere 1,5-fach mehr IP pro 1 mm³ in der M-Phase (Ktr: 3,69 ± 0,33; KO: 5,73 ± 0,57; p < 0,01) (Abb. 24B). Bei der diesbezüglich näheren Analyse der Zellschichten ergab sich, dass die innerhalb der IZ-SP fehllokalisierten IP der E14,5 KO-Mäuse eine deutlich höhere mittlere Anzahl mitotischer Zellen pro 1 mm³ aufwiesen als die Ktr-Mäuse (Ktr: 0,69 ± 0,29; KO: 4,59 ± 0,86. p < 0,001), wohingegen innerhalb der VZ-SVZ kein signifikanter Unterschied der Mitoserate der IP von Ktr- und KO-Embryos festgestellt werden konnte (Ktr: 5,29 ± 0,50; KO: 6,73 ± 0,95; p=0,21) (Abb. 24C).



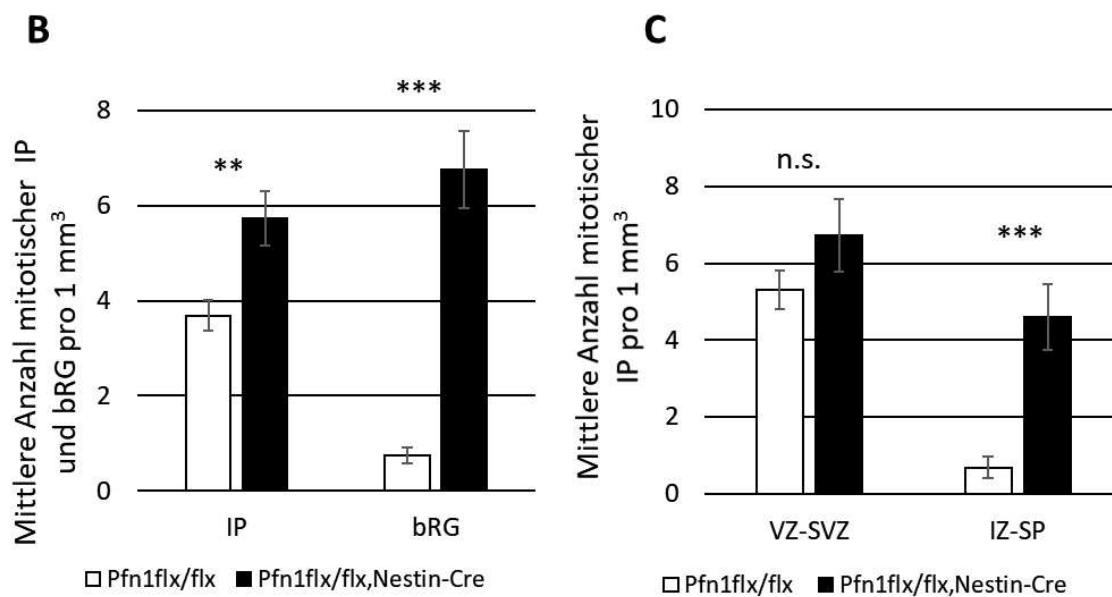


Abbildung 24: Erhöhte Mitoserate von IP und bRG in E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Mäusen.

(A) Die repräsentativen Aufnahmen zeigen mittels einer Tbr2-Färbung (grün) und einer DNS Färbung mit PI, mitotische bRG (segregierte oder kondensierte DNS und Tbr2⁻) sowie IP (segregierte oder kondensierte DNS und Tbr2⁺) im zerebralen Kortex von E14,5 Ktr- und KO-Embryos. Maßstab: 5 μ m (A). (B) Die Analyse der relativen Anzahl mitotischer IP und bRG innerhalb der SVZ bis zur SP zeigte einen deutlichen Anstieg der Anzahl mitotischer IP und bRG bei den E14,5 KO-Embryos. (C) Eine differenzierte Betrachtung der relativen Anzahl mitotischer IP in der VZ-SVZ und IZ-SP der E14,5 Ktr- und KO-Embryos zeigte zudem, dass es nur innerhalb der IZ-SP zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl mitotischer KO-IP kam. n = 12 / 3 pro Genotyp. bRG: Basale Radialglia; IP: Intermediäre Vorläufer; IZ: Intermediärzone; n.s.: nicht signifikant; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; VZ: Ventrikularzone; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Die erhöhte Mitoserate der fehllokalisierten bIP konnte dabei nicht allein auf die deutlich höhere Anzahl an bIP in der SP zurückgeführt werden, da die Gesamtanzahl fehllokalisierter bIP innerhalb der E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Embryos deutlich geringer war als die Anzahl an bIP in der SVZ, die Mitoserate beider Populationen allerdings fast identisch ausfiel. Die Vermutung lag nahe, dass die fehllokalisierten IP in den E14,5 Profilin1-defizienten Embryos weniger symmetrisch-neurogene Teilungen und dafür vermehrt symmetrisch-proliferative Teilungen durchführten, was mit einer Verkürzung des Zellzyklus einhergeht (Hardwick *et al.*, 2015) und die gestiegene Mitoserate erklären würde. Es war also zu vermuten, dass die Anzahl neu gebildeter Neurone im zerebralen Kortex der E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Embryos zwar, bedingt durch eine verringerte Neuronenproduktion der fehllokalisierten IP, verringert sein könnte, jedoch die deutlich erhöhte Anzahl an bRG insgesamt zu einer Erhöhung der Anzahl neu gebildeter Neuronen führen müsste.

3.3.5. Verdickte Schicht unausgereifter Neurone in E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos

Um eine erhöhte Neuronenproduktion innerhalb der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos nachweisen zu können, wurde eine Antikörperfärbung gegen Dcx (Doublecortin) durchgeführt, welche undifferenzierte Neurone markiert (Walker *et al.*, 2007). Zur besseren Übersicht erfolgte diese Färbung an Ktr- und KO-Embryos der Stadien E12,5; E14,5 und E16,5, um auch eventuelle Effekte vor und nach dem Hochpunkt des transienten Anstiegs der Anzahl bRG und fehllokalisierter IP in den E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos zu dokumentieren.

Innerhalb der E12,5 Ktr- und KO-Embryos waren die Dcx⁺-Zellen nur im Bereich der PP nachweisbar und bildeten dort ein relativ schmales, in apikaler und basaler Richtung gut abgrenzbares Band an Zellen (Abb. 25A-B). Eine solche gut sichtbare Abgrenzung der Dcx⁺-Schicht an Zellen fand innerhalb der E14,5 und E16,5 alten Embryos zumindest in der apikalen Orientierung nicht mehr statt. Im basalen Bereich des zerebralen Kortex wurde sowohl in den E14,5 wie auch den E16,5 Ktr- und KO-Embryos die Ansammlung unreifer Neurone von der MZ begrenzt und bildete deutlich die basale Grenze der CP ab (Abb. 25C-F).

Für die Untersuchung des Anteils undifferenzierter Neurone im embryonalen Kortex der Ktr- und KO-Embryos wurde der mittlere Durchmesser der Dcx⁺-Zellschicht ermittelt. Daraus ergab sich, dass es innerhalb des Entwicklungsstadiums E12,5 und E16,5 zu keinerlei signifikanten Unterschieden im mittleren Durchmesser der Dcx⁺-Zellschicht kam, was für eine vergleichbare Neuronenproduktion innerhalb dieser Stadien spricht. Die E14,5 KO-Embryos wiesen jedoch eine signifikante Vergrößerung des Durchmessers der Dcx⁺-Zellschicht auf (Ktr: 148,23 $\mu\text{m} \pm 6,09 \mu\text{m}$; KO: 178,53 $\mu\text{m} \pm 6,00 \mu\text{m}$; $p < 0,01$) (Abb. 25G), was auf eine erhöhte Neuronenproduktion hinwies.

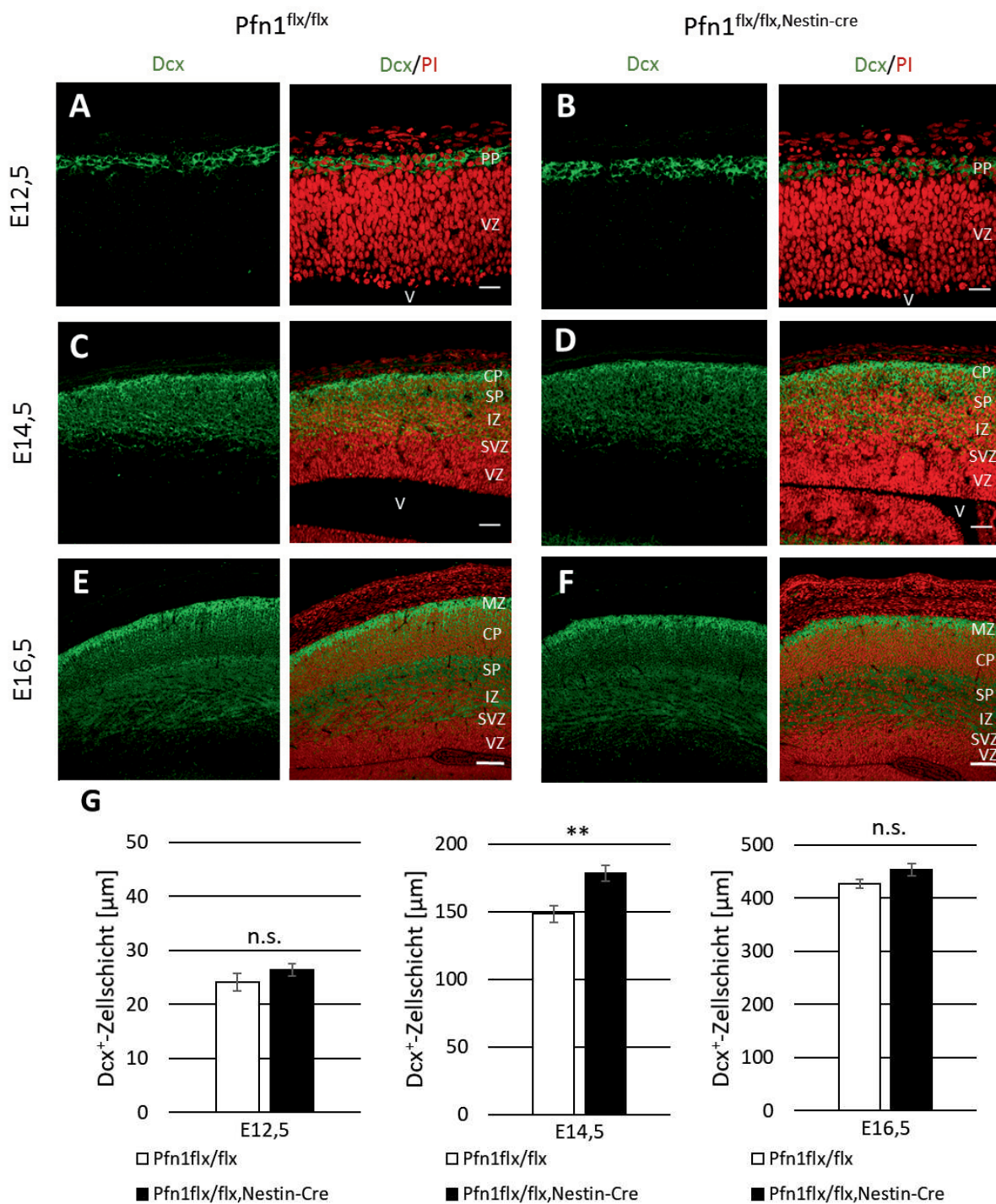


Abbildung 25: Vergrößerte Schicht unausgereifter Neurone in E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Mäusen. (A-F) Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen Dcx (grün) und dem Fluoreszenzfarbstoff PI (rot) an E12,5 (A-B), E14,5 (C-D) und E16,5 (E-F) Ktr- und KO-Embryos zeigen auf den ersten Blick keine nennenswerten Unterschiede in der Dicke oder Ausprägung der Dcx⁺-Zellschicht eines Entwicklungsstadiums. Maßstab: 25 µm (A-B). Maßstab: 50 µm (C-D). Maßstab: 100 µm (E-F). (G) Die Auswertung der mittleren Schichtdicke Dcx⁺-Zellen zeigte allerdings einen signifikanten Anstieg der Dcx⁺-Zellschicht innerhalb der E14,5 KO-Embryos. Für E12,5 und E16,5 blieb die mittlere Schichtdicke der Dcx⁺-Zellen allerdings zwischen Ktr- und KO-Embryos vergleichbar. n = 9 / 3 pro Genotyp und Entwicklungsstadium. CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; MZ: Maginalzone; n.s.: nicht signifikant; PP: Präplatte; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; V: lateraler Ventrikel; VZ: Ventrikularzone. **: p < 0,01.

3.3.6. Verringerte Signalintensität der apikalen Polaritätsproteine Par3 und α PKC in E12,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Embryos

Weiterführend stellte sich nun die Frage, wie es zu der stark erhöhten Anzahl bRG innerhalb der E14,5 KO-Embryos kommen konnte. Die naheliegendste Erklärung bildet eine erhöhte Produktion durch die aRG, da die bRG auch natürlicherweise aus den aRG hervorgehen (Taverna, Götz and Huttner, 2014). In diesem Zusammenhang könnte eine mögliche Fehllokalisierung der apikalen Polaritätsproteine Par3 und α PKC im Bereich der VO Aufschluss über vermehrte Delaminierungen von bP geben. Fehllokalisationen dieser Proteine konnten schon in früheren Studien mit dem Verlust von AJ und der vermehrten Delaminierung der bP in Verbindung gebracht werden (Cappello *et al.*, 2006).

Die Antikörperfärbungen gegen Par3 und α PKC zeigten dabei in Bezug auf die Ktr- und KO-Embryos der Entwicklungsstadien E12,5; E14,5 und E16,5 eine mit der Literatur konforme (Costa *et al.*, 2008) Reduktion der Signalintensität mit zunehmendem Entwicklungsstadium (Abb. 26A-F). Die Analyse der Signalintensität ergab eine deutliche Verringerung der Intensität von Par3 (Ktr: 100,00 % \pm 3,49 %; KO: 65,60 % \pm 5,20 %; $p < 0,001$) und α PKC (Ktr: 100,00 % \pm 3,42 %; KO: 80,10 % \pm 5,16 %; $p < 0,01$) im Bereich der VO von E12,5 KO-Embryos, wobei die entsprechenden Signalintensitäten innerhalb der E14,5 und E16,5 KO-Embryos keine signifikanten Veränderungen aufwiesen (Abb. 26G/H).

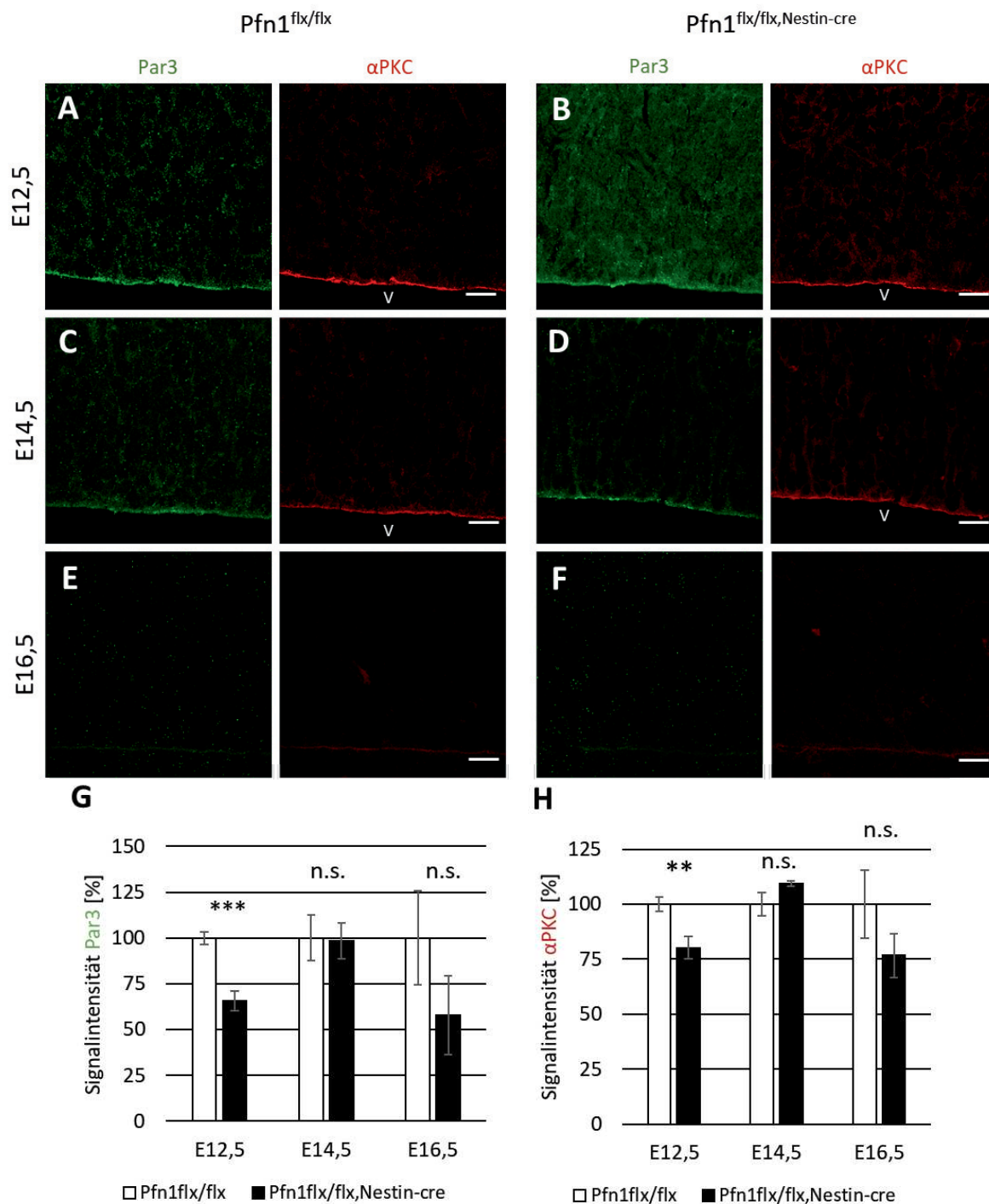


Abbildung 26: Verringerte Signalintensität der apikalen Polaritätsproteine Par3 und α PKC an der VO der E12,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Embryos. Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen Par3 (grün) und α PKC (rot) an Ktr- und KO-Embryos der Entwicklungsstadien E12,5 (A-B), E14,5 (C-D) und E16,5 (E-F) deuten auf eine leichte Reduktion der Menge der apikalen Polaritätsproteine Par3 und α PKC in den E12,5 KO-Embryos hin. Maßstab: 25 μ m (A-F). Eine Analyse der prozentualen Signalintensität von Par3 (G) von α PKC (H) an der VO von E12,5; E14,5 und E16,5 KO-Embryos unterstützte im Vergleich mit den entsprechenden Ktr-Embryos diese Vermutung. Innerhalb der E12,5 KO-Embryos kam es zu einer signifikanten Verringerung der Signalintensität von Par3 und α PKC. Innerhalb der anderen Entwicklungsstadien war die Signalintensität allerdings weiterhin zwischen Ktr- und KO-Embryos vergleichbar. n= 9 / 3 je Genotyp und Entwicklungsstadium. n.s.: nicht signifikant; V: lateraler Ventrikel; VO: Ventrikeloberfläche; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Die an E12,5 verringerte Signalintensität von Par3 und α PKC innerhalb der KO-Embryos wies dabei allgemein auf eine reduzierte Anzahl apikal verankerter aP und somit auf vermehrte Delaminierungen der bP zu Beginn der Neurogenese hin. Um diesen Hinweis zu verifizieren, wurde weiterführend mittels eines pan-Cadherin Antikörpers, die Verteilung der AJ im Bereich der VO der E12,5 Ktr- und KO-Embryos untersucht.

Die Analyse der Signalintensität des pan-Cadherin Antikörpers ergab keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung oder Menge der AJ (Abb. 27). Eine deutlich gestörte Verankerung der aP sowie eine vermehrte Delaminierung der bP konnten dementsprechend für die E12,5 KO-Embryos weitestgehend ausgeschlossen werden.

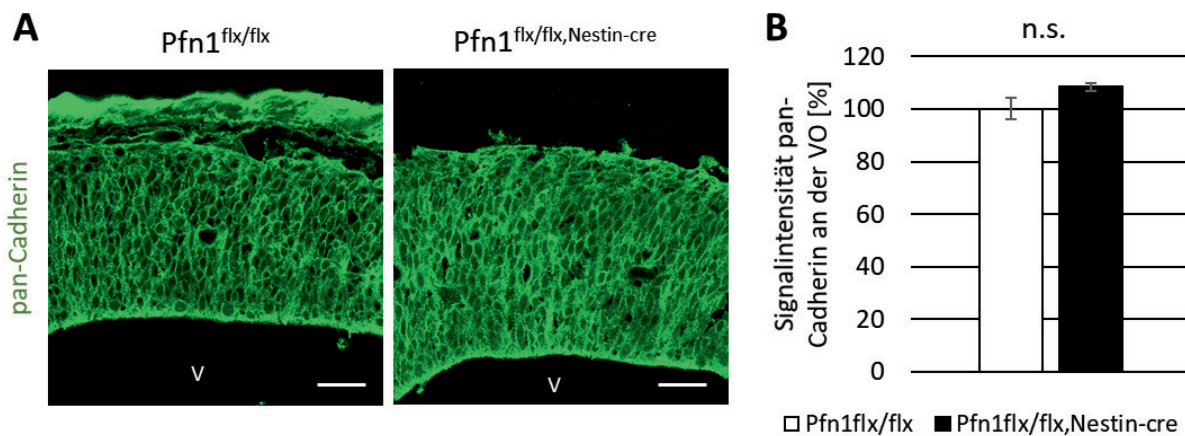


Abbildung 27: Vergleichbare Signalintensität von pan-Cadherin an der VO der E12,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos im Vergleich mit den E12,5 Pfn1^{flx/flx}-Embryos. (A) Repräsentative Aufnahmen der Antikörperfärbung gegen pan-Cadherin an E12,5 zeigen keinen deutlichen Unterschied in der Menge oder Verteilung von pan-Cadherin im Vergleich zwischen Ktr- und KO-Embryos. Maßstab: 25 μ m (A). (B) Auch mittels der spezifischen Analyse der Signalintensität von pan-Cadherin zwischen Ktr- und KO-Embryos im Bereich der VO konnten keine Unterschiede in der Menge oder Verteilung der AJ festgestellt werden. Die mittlere Intensität der pan-Cadherin-Färbung an der VO der Ktr-Embryos wurde auf 100 % gesetzt. n = 9 / 3 pro Genotyp. n.s.: nicht signifikant; V: lateraler Ventrikel; VO: Ventrikeloberfläche.

Die Reduzierung des Anteils an Par3 und α PKC wird allerdings in Bezug auf die fortschreitende Entwicklung des zerebralen Kortex auch mit dem Umschwenken der aRG weg von einer asymmetrischen Teilung hin zu einer symmetrisch-neurogenen Teilung in Verbindung gebracht (Chou, Li and Wang, 2018), was sich in einer Verlängerung der G1-Phase des Zellzyklus widerspiegelt (Hardwick *et al.*, 2015). Dementsprechend sollte die Untersuchung der IZM der aRG Aufschluss über

eventuelle Veränderungen der Länge einzelner Zellzyklusabschnitte (G1-, S- und G2-Phase) geben. Eine verlängerte G1-Phase würde dementsprechend die Theorie eines atypischen Teilungsverhaltens der aRG innerhalb der E12,5 KO-Embryos unterstützen und den verringerten Anteil an Par3 und α PKC an der VO erklären. Zusätzlich sind Defekte der IZM schon in anderen Studien mit einer erhöhten Anzahl an bP in Verbindung gebracht worden (Cappello *et al.*, 2006; Taverna, Götz and Huttner, 2014). Deshalb erschien die Untersuchung der IZM auch in Bezug auf die E14,5 KO-Embryos sinnvoll.

3.3.7. Veränderungen der IZM an E12,5 weisen in $Pfn1^{flx/flx, Nestin-Cre}$ Embryos auf eine Verkürzung der G1-Phase der aRG hin

Eine Möglichkeit, die IZM der aRG innerhalb der Ktr- und KO-Embryos an E12,5 und E14,5 zu untersuchen, bildeten zeitlich aufeinander abgestimmte BrdU Injektionen (40 min, 120 min und 480 min) an tragenden Weibchen mit anschließender Antikörperfärbung gegen BrdU.

Nach 40-minütiger Inkubation mit BrdU war der Großteil der untersuchten BrdU⁺-Zellen in beiden Entwicklungsstadien und Genotypen im Bereich der basalen VZ lokalisiert, wohingegen nach 120 min Inkubation die BrdU⁺-Zellen in einer apikal gerichteten Bewegung begriffen waren und sich über die gesamte VZ verteilten. Nach 480 min Inkubationszeit lokalisierte sich der Großteil der BrdU⁺-Zellen in allen Embryos unabhängig von Alter und Genotyp im apikalen Bereich der VZ (Abb. 28). Die Betrachtung des Verlaufes der IZM führte zu keinerlei offensichtlichen Unterschieden in der Verteilung BrdU⁺-Zellen innerhalb der Ktr- und KO-Embryos der verschiedenen Entwicklungsstadien.

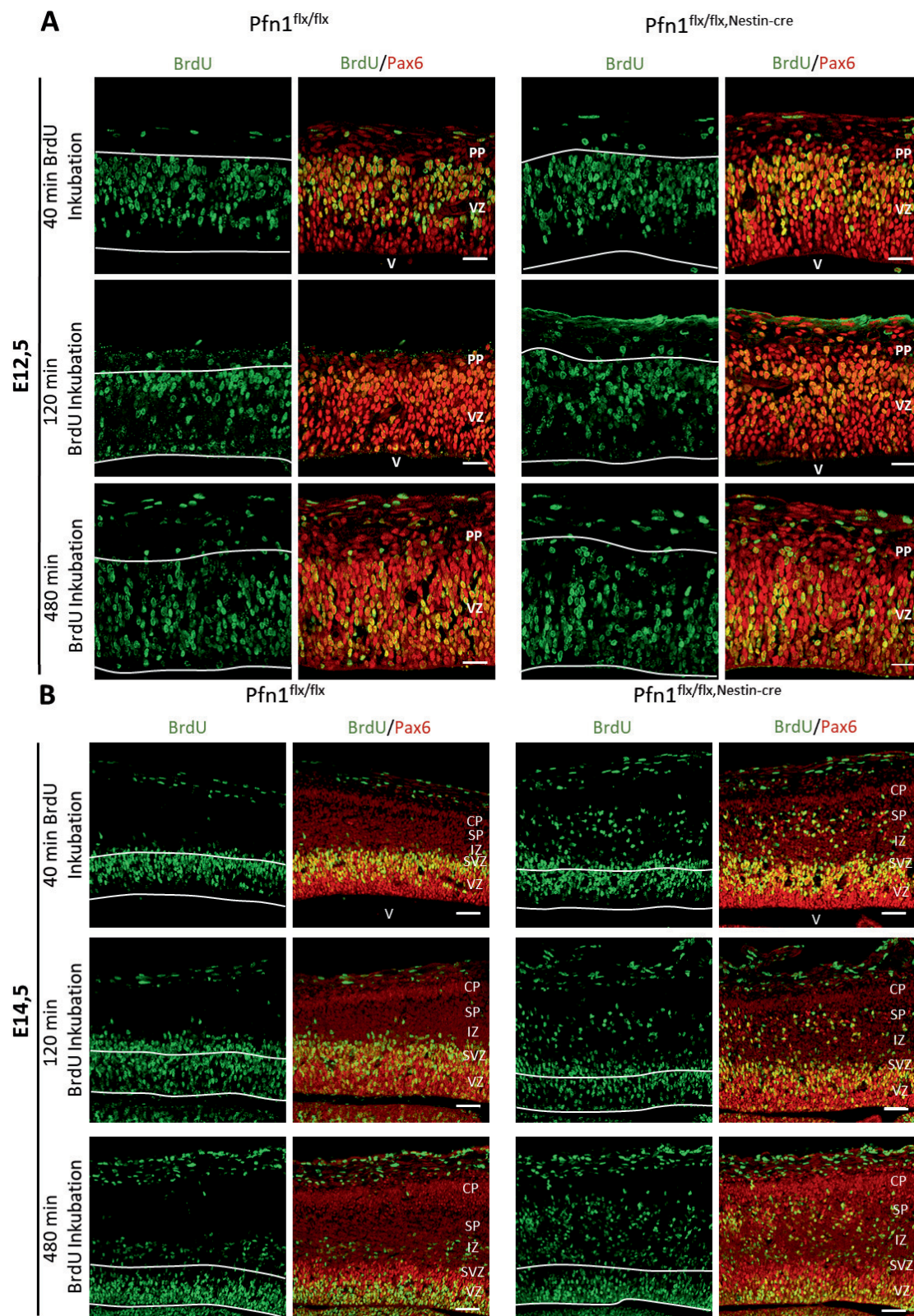


Abbildung 28: Keine offensichtlichen Veränderungen der IZM in den Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos an E12,5 oder E14,5. Repräsentative Antikörperfärbungen gegen BrdU (grün) und Pax6 (rot) an E12,5 (A) und E14,5 (B) Ktr- und KO-Embryos nach 40 min, 120 min und 480 min Inkubationszeit mit BrdU, zeigten keine offensichtlichen Veränderungen der IZM. Die weißen Linien symbolisieren die apikale und basale Grenze der VZ. Maßstab: 25 μ m (E12,5). Maßstab: 50 μ m (E14,5). CP: Kortikale Platte; IZ: Intermediärzone; IZM: interkinetische Zellkernmigration; PP: Präplatte; SP: Subplatte; SVZ: Subventrikularzone; V: lateraler Ventrikel; VZ: Ventrikularzone.

Da die verringerte Signalintensität von Par3 und α PKC im Bereich der VO an E12,5 und die extrem vergrößerte Anzahl bRG innerhalb der E14,5 KO-Embryos trotz allem stark auf Veränderungen des Zellzyklus der aRG hindeuteten, erfolgte weiterführend eine detaillierte Untersuchung der IZM der aRG. Durch eine Analyse der prozentualen Verteilung der BrdU⁺-Zellen im Bereich von sechs 20 μ m dicken Arealen der VZ (Areal #6 ist am weitesten superior und Areal #1 am weitesten inferior lokalisiert) sollten selbst feinste Veränderungen der IZM aufzeigbar sein.

In Bezug auf die IZM der aRG an E12,5 ergab diese Analyse einen signifikant erhöhten Anteil BrdU⁺-Zellen in Areal #6 (Ktr: 17,46 % \pm 3,25 %; KO: 28,31 % \pm 1,26 %; $p < 0,01$) der 40 min mit BrdU inkubierten KO-Embryos. Nach der 120-minütigen Inkubation mit BrdU konnten im Vergleich zwischen Ktr- und KO-Embryos keine deutlichen Unterschiede in der Verteilung der BrdU⁺-Zellen festgestellt werden. Erst nach 480 min zeigten sich signifikante Verringerungen des Anteils BrdU⁺-Zellen in Areal #6 (Ktr: 8,50 % \pm 0,81 %; KO: 5,71 % \pm 0,63 %; $p < 0,05$) und #5 (Ktr: 14,42 % \pm 1,21 %; KO: 9,05 % \pm 0,68 %; $p < 0,01$), sowie ein deutlich erhöhter Anteil BrdU⁺-Zellen in Areal #2 (Ktr: 25,11 % \pm 0,77 %; KO: 29,57 % \pm 0,64 %; $p < 0,001$) der E12,5 KO-Embryos (Abb. 29).

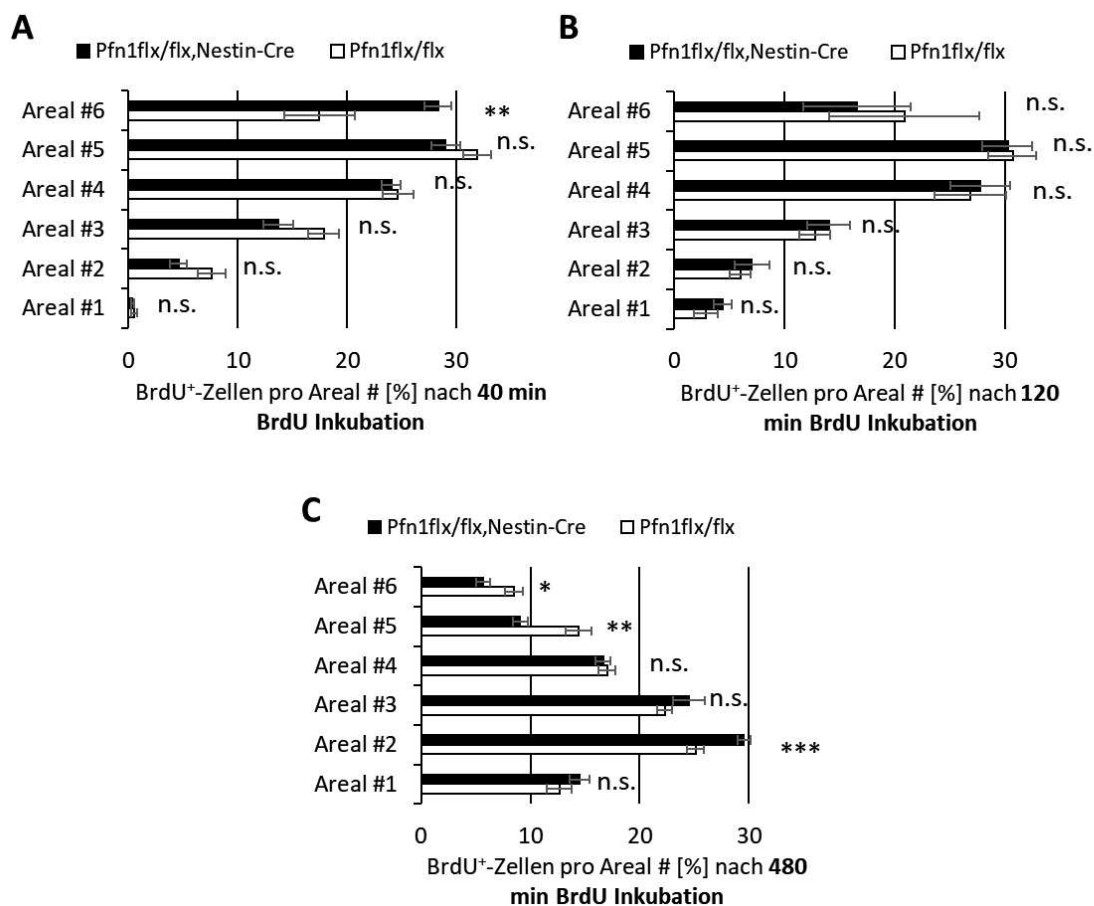
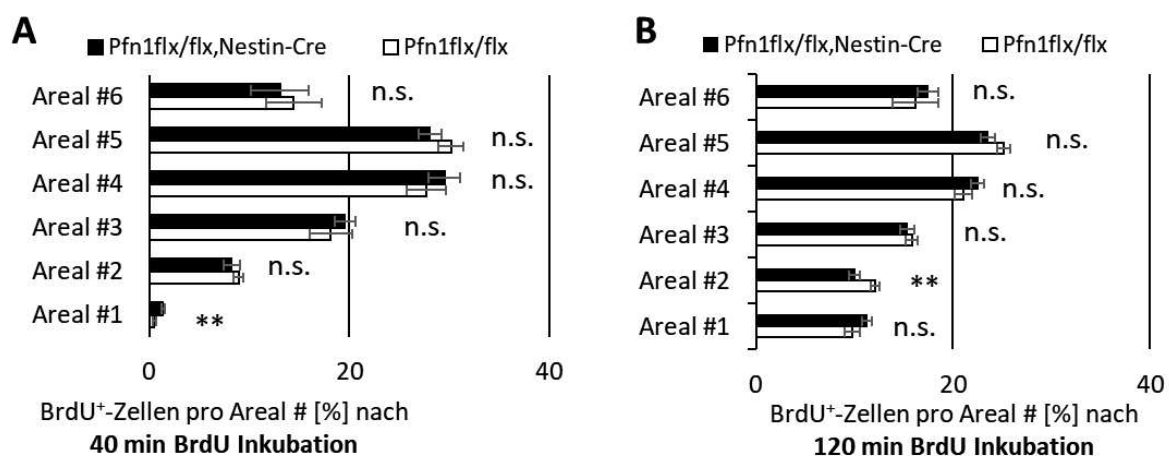


Abbildung 29: Veränderte IZM innerhalb der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos an E12,5. Die Analyse der relativen Anzahl BrdU⁺-Zellen in je 20 µm dicken Arealen der VZ (Bin#1: apikale Grenze der VZ; Bin#6: basale Grenze der VZ) zeigte einen erhöhten Anteil BrdU⁺-Zellen im basalen Bereich der VZ nach 40 min BrdU Inkubation (A), keine Veränderungen nach 120 min (B) sowie einen erhöhten Anteil BrdU⁺-Zellen im apikalen Bereich der VZ bei gleichzeitig verringertem Anteil BrdU⁺-Zellen im basalen Bereich der VZ nach 480 min BrdU Inkubation (C). n= 9 / 3 pro Genotyp und Injektionszeitpunkt. IZM: interkinetische Zellkernmigration; n.s.: nicht signifikant; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Vor allem der erhöhte Anteil BrdU⁺-Zellen im Bereich der basalen VZ nach 40 min und der ebenfalls vergrößerte Anteil BrdU⁺-Zellen im Bereich der apikalen VZ nach 480 min weisen im Vergleich mit ähnlichen Studien (Schenk *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2019) auf eine verringerte Länge der G1-Phase innerhalb der aRG der KO-Embryos an E12,5 hin.

Selbige Analyse der prozentualen Verteilung der BrdU⁺-Zellen ergab für das Entwicklungsstadium E14,5 einen erhöhten Anteil BrdU⁺-Zellen in Areal #1 (Ktr: 0,52 % ± 0,13 %; KO: 1,41 % ± 0,19 %; p < 0,01) der 40 min BrdU inkubierten KO-Embryos sowie eine signifikante Verringerung des Anteils BrdU⁺-Zellen in Areal #2 (Ktr: 12,09 % ± 0,48 %; KO: 9,95 % ± 0,55 %; p < 0,01) der 120 min BrdU inkubierten KO-Embryos. Innerhalb der 480 min BrdU inkubierten Embryos kam es im Vergleich zwischen Ktr und KO zu keinerlei nennenswerten Unterschieden in der prozentualen Verteilung der BrdU⁺-Zellen (Abb. 30). Allgemein wies diese Untersuchung demnach auf keine bedeutenden Veränderungen der Zellzykluslänge der aRG innerhalb der KO-Embryos an E14,5 hin.



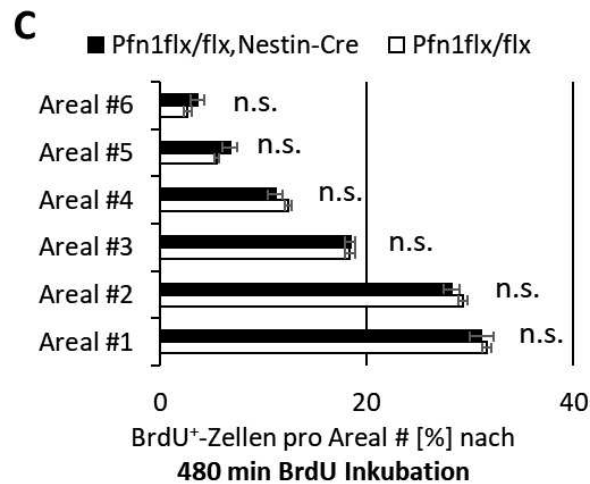


Abbildung 30: Normale IZM der aRG in E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Embryos. Die Analyse der relativen Anzahl BrdU⁺-Zellen in je 20 µm dicken Arealen der VZ (Bin#1: apikale Grenze der VZ; Bin#6: basale Grenze der VZ) zeigte für die 40 min (A), 120 min (B) und die 480 min (C) Inkubation mit BrdU keine maßgeblichen Veränderungen in der Verteilung der BrdU⁺-Zellen. Was auf eine normale IZM der E14,5 KO-aRG schließen ließ. n= 9 / 3 pro Genotyp und Injektionszeitpunkt. IZM: interkinetische Zellkernmigration; n.s.: nicht signifikant; **: p < 0,01.

3.3.8. Erhöhte Anzahl primärer Zilien im Bereich der VZ, basal der VO von E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Embryos

Da weder durch die Untersuchung der IZM noch durch die Lokalisation von Par3 und αPKC abschließend geklärt werden konnte, ob eine vermehrte Delaminierung von bP in den E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre-Embryos auftrat, erfolgte im nächsten Schritt dieser Studie eine Analyse der Anzahl und Lokalisation von primären Zilien in der VZ. Primäre Zilien werden allgemein von allen Typen neuronaler Vorläuferzellen und von ausgereiften Neuronen ausgebildet (Tramontin *et al.*, 2013). Sie sind immobile, Haar-ähnliche Organellen und entspringen dem Basalkörper (Mutterzentriol) der jeweiligen Zelle (Paridaen, Wilsch-Bräuninger and Huttner, 2013; Lepanto, Badano and Zolessi, 2016). In Bezug auf die aRG gibt es die Besonderheit, dass deren primäre Zilien, anders als bei bP oder ausgereiften Neuronen, sich nicht direkt am Zellkörper ausbilden, sondern immer an ihrem apikalen Endfuß lokalisiert sind und in den Ventrikel hineinragen (Tramontin *et al.*, 2013). Dort detektieren sie chemische und mechanische Signale aus der Zerebrospinalflüssigkeit (Paridaen, Wilsch-Bräuninger and Huttner, 2013; Lepanto, Badano and Zolessi, 2016).

Die relative Anzahl der primären Zilien innerhalb der VZ und direkt an der VO ist demnach ein guter Indikator für delaminierte bP. Um die primären Zilien zu markieren, wurde eine Antikörperfärbung gegen Arl13b verwendet. Arl13b ist eine kleine GTPase der Arf / Arl Familie, welche spezifisch in Zilien lokalisiert ist (Higginbotham *et al.*, 2013). Um keinen Effekt der Deletion von Profilin1 auf die Konzentration oder Lokalisation der primären Zilien über die Entwicklung zu verpassen, erfolgte die Untersuchung der primären Zilien an 40 min BrdU inkubierten Ktr- wie auch KO-Embryos der Stadien E12,5; E14,5 und E16,5. Die BrdU-Färbung wurde verwendet um die basale Grenze der VZ zu bestimmen.

Für alle drei Entwicklungsstadien und beide Genotypen ergab sich dabei, dass der größte Teil der Arl13b⁺-primären Zilien im Bereich der VO lokalisiert war, wohingegen innerhalb der VZ nur vereinzelt primäre Zilien nachgewiesen werden konnten (Abb. 31A-F).

Die Analyse der Anzahl an primären Zilien normalisiert auf die Länge der VO ergab dabei in allen drei Entwicklungsstadien keine signifikanten Unterschiede zwischen Pfn1^{flx/flx}- und Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos (Abb. 31G). Bei der Betrachtung der mittleren Anzahl primärer Zilien innerhalb der E14,5 KO-Embryos, relativiert auf die Fläche der VZ, konnte jedoch nahezu eine Verdopplung der relativen Anzahl primärer Zilien nachgewiesen werden (Ktr: $2,28 \pm 0,35$; KO: $4,14 \pm 0,39$; $p < 0,01$). Innerhalb der E12,5 und E16,5 KO-Embryos kam es diesbezüglich zu keinem signifikanten Effekt (Abb. 31H).

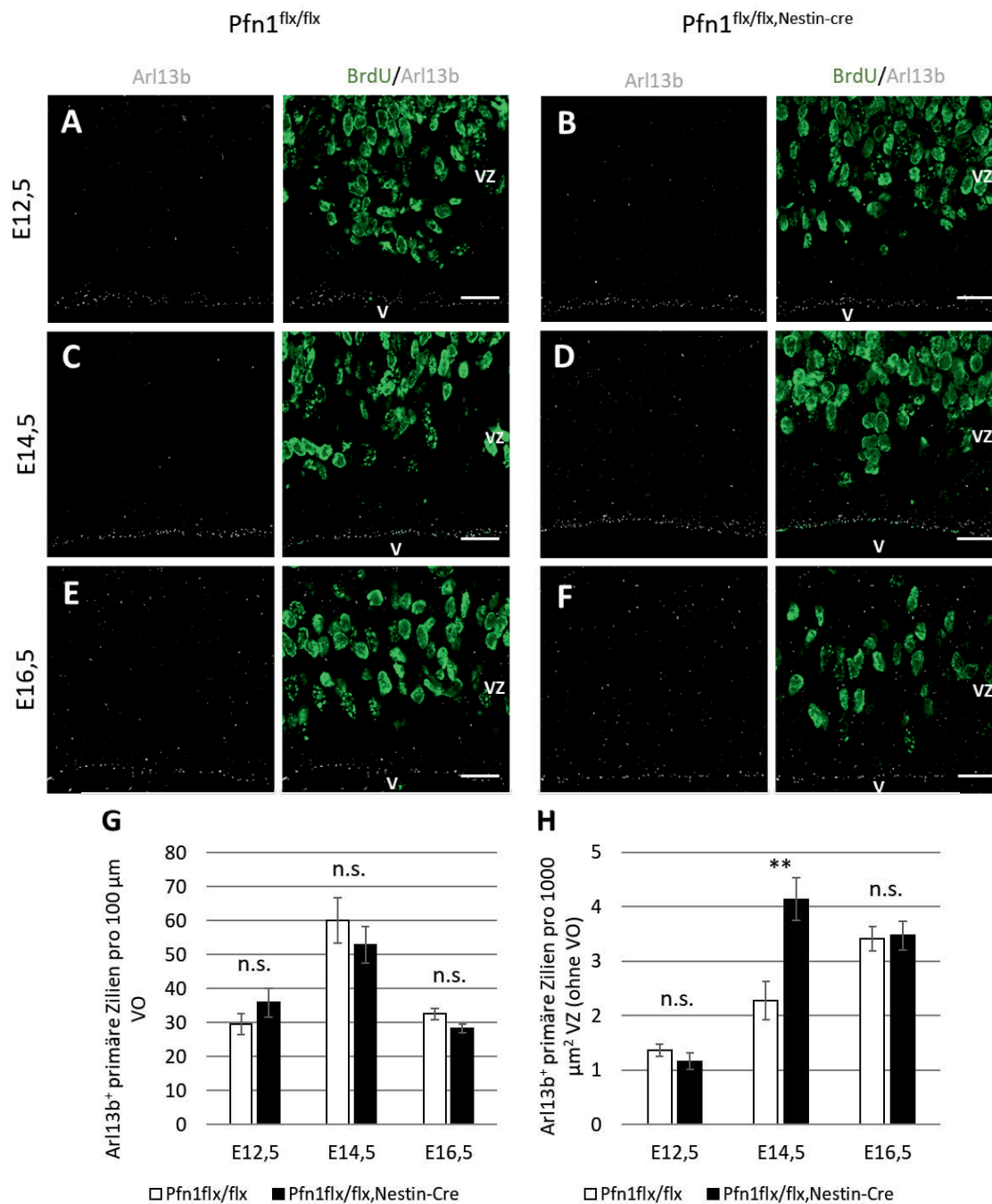


Abbildung 31: Erhöhte Anzahl primärer Zilien in der VZ von E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Mäusen. (A-F) repräsentative Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen Arl13b (weiß) und BrdU (grün) an Ktr- und KO-Embryos der Embryonalstadien E12,5 (A-B), E14,5 (C-D) und E16,5 (E-F) deuten auf einen erhöhten Anteil primärer Zilien innerhalb der VZ von E14,5 KO-Embryos hin. Maßstab: 25 μm. (G) Die Analyse der mittleren Anzahl Arl13b⁺-primärer Zilien im Bereich der Ventrikeloberfläche (VO) ergab keine Unterschiede zwischen den Ktr- und KO-Embryos der gleichen Entwicklungsstadien. n = 9 / 3 pro Genotyp und Entwicklungsstadium. (H) Allerdings bestätigte die Auswertung der mittleren Anzahl Arl13b⁺-primärer Zilien im Bereich der VZ (die VO wurde nicht berücksichtigt) die Vermutung, dass es innerhalb des VZ der E14,5 KO-Embryos zu einer signifikant erhöhten Anzahl primärer Zilien kam. Innerhalb der E12,5 und E16,5 KO-Embryos konnte diesbezüglich kein Unterschied zwischen den Ktr- und KO-Embryos dokumentiert werden. n = 9 / 3 pro Genotyp und Entwicklungsstadium. n.s.: nicht signifikant; V: lateraler Ventrikel; VZ: Ventrikularzone; **: p < 0,01.

Die annähernde Verdopplung der relativen Anzahl primärer Zilien innerhalb der VZ der E14,5 *Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}*-Embryos deutet demnach stark auf eine vermehrte Delaminierung der bP hin. Von bP ist bekannt, dass sie nach ihrer Entstehung ihr primäres Zilium im Bereich der lateralen Plasmamembran reetablieren (Wilsch-Bräuninger, Florio and Huttner, 2016). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der *Tbr2*-Färbung kann postuliert werden, dass es sich bei der deutlich erhöhten Anzahl primärer Zilien innerhalb der VZ um bRG handelt, da die Anzahl *Tbr2*⁺-IP in der VZ der E14,5 KO-Embryos nicht signifikant erhöht war.

3.3.9. Vermehrt horizontale Teilungen mitotischer aRG innerhalb der E14,5 *Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}*-Embryos

Durch den deutlichen Hinweis der *Arl13b*-Färbung auf vermehrte Delaminierungen der E14,5 KO-aRG, ergab sich weiterführend die Frage, warum die aRG vermehrt delaminieren. Verschiedene Studien unter anderem an Mäusen und Primaten konnten zeigen, dass horizontale Teilungen der aRG zur Bildung von bRG führen (LaMonica *et al.*, 2012; Pilz *et al.*, 2013; Taverna, Götz and Huttner, 2014). Bekannt ist allerdings auch, dass sich murine aRG, im Entwicklungsstadium E14, typischerweise hauptsächlich vertikal und nur zu einem geringen Prozentsatz diagonal teilen (Mora-Bermúdez, Matsuzaki and Huttner, 2014; Wong *et al.*, 2015). Horizontale Teilungen kommen in murinen aRG fast nicht vor (Mora-Bermúdez, Matsuzaki and Huttner, 2014; Wong *et al.*, 2015). Demnach wäre eine nahe liegende Erklärung für die vermehrten Delaminierungen innerhalb der E14,5 KO-Embryos eine Verschiebung der prozentualen Verteilung der Teilungsebene (vertikal (90° - 60°), diagonal (60° - 30°) und horizontal (30° - 0°)) der aRG (Abb. 32A).

Um die Teilungsebene in den mitotischen aRG zu Beginn und während des transienten Anstiegs an bRG innerhalb der *Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}*-Embryos zu untersuchen, wurde eine Antikörperfärbung gegen pH3 und der Fluoreszenzfarbstoff PI an E12,5 und E14,5 Ktr- und KO-Embryos verwendet. PI wurde in diesem Fall genutzt, um zum einen das Verhältnis von mitotischen aRG mit kondensierter vs. segregierter DNS (Abb. 32B) und zum anderen den Winkel der Teilungsebene mitotischer aRG mit segregierter DNS im Verhältnis zur VO zu bestimmen. Das Verhältnis von kondensierter zu segregierter DNS konnte dabei Aufschluss über Veränderungen in der Länge der Mitosephase geben.

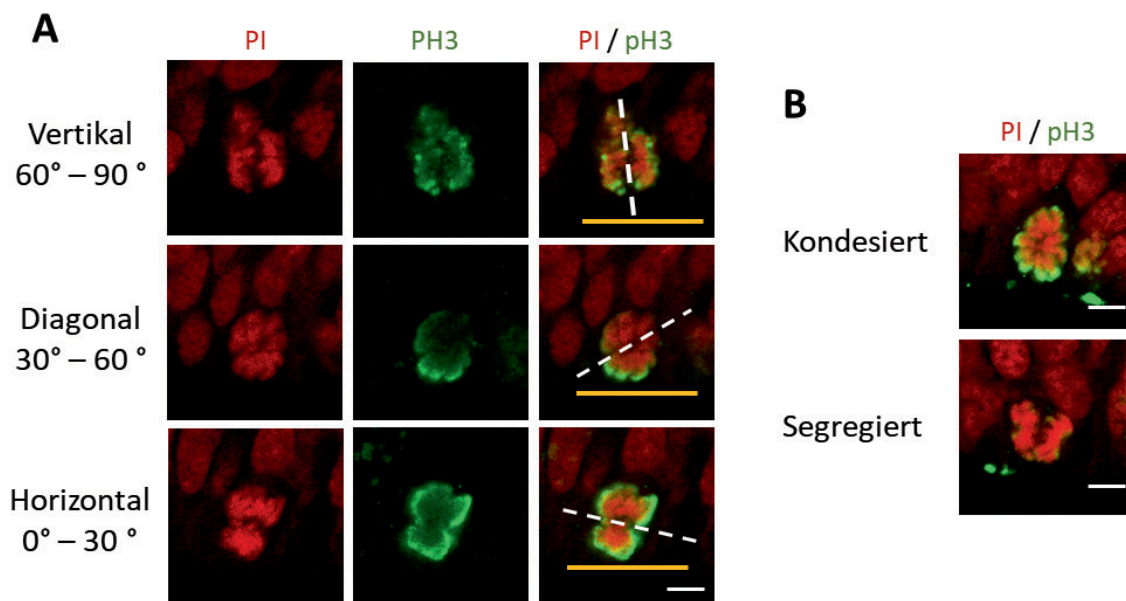


Abbildung 32: Darstellung mitotischer aRG in den drei Teilungsebenen vertikal, diagonal und horizontal sowie mit kondensierter und segregierter DNS. (A) Diese repräsentativen Aufnahmen mitotischer aRG verdeutlichen die 3 Teilungsebenen, vertikal (> 60° - 90°), diagonal (> 30° - 60°) und horizontal (0° - 30°) anhand von Antikörperfärbung gegen pH3 (grün) und dem Fluoreszenzfarbstoff PI (rot). Die gestrichelten Linien symbolisieren die Teilungsebene. Die gelben Linien stellen die Ausrichtung der Ventrikeloberfläche dar. Maßstab: 5 µm (A). Die in (B) dargestellten mitotischen aRG verdeutlichen mittels einer pH3- (grün) und PI-Färbung (rot) den Unterschied zwischen mitotischen aRG mit kondensierter vs. segregierter DNS. Maßstab: 5 µm (B).

Die Analyse der relativen Verteilung der Teilungsebene mitotischer aRG ergab im Vergleich zwischen $Pfn1^{flx/flx-}$ und $Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre-}$ -Embryos, für das Stadium E12,5 keine signifikanten Abweichungen. Zwischen 84 % bis 87 % der in Bezug auf ihrer Teilungsebene eindeutig bestimmbar E12,5 Ktr- und KO-aRG teilten sich vertikal oder diagonal (vertikale Teilungsebene (Ktr: 35,73 % \pm 8,54 %; KO: 46,53 % \pm 10,00 %), diagonale Teilungsebene (Ktr: 48,32 % \pm 6,95 %; KO: 40,64 % \pm 9,74 %)) (Abb. 33A). Auch das Verhältnis von aRG mit kondensierter vs. segregierter DNS blieb im Vergleich zwischen E12,5 $Pfn1^{flx/flx-}$ und $Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre-}$ -Embryos unverändert. Rund 80 % der mitotischen aRG wiesen kondensierte und nur rund 20 % segregierte DNS (Abb. 33B) auf, was auf keine Verschiebungen hinsichtlich der Länge der M-Phase innerhalb der E12,5 KO-Embryos schließen lässt. Das Entwicklungsstadiums E12,5 schien dementsprechend auch in Bezug auf die unauffällige Arl13b-Färbung nicht zu einer vermehrten Bildung von bRG in den KO-Embryos beizutragen.

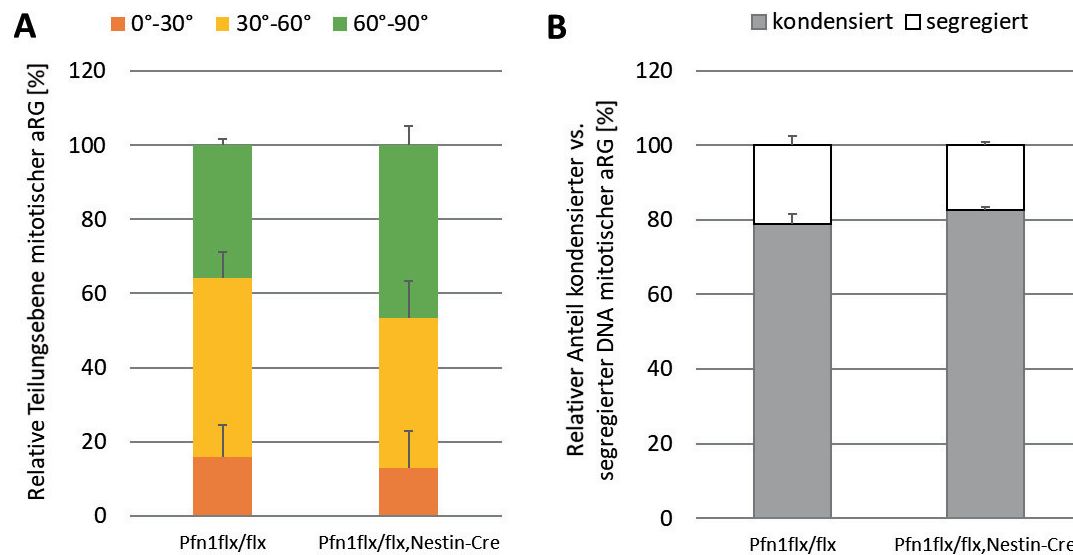


Abbildung 33: Keine Unterschiede in der Verteilung der Teilungsebenen oder im Verhältnis von kondensierter zu segregierter DNS bei mitotischen aRG in E12,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Mäusen. (A) Die Auswertung der relativen Verteilung der 3 Teilungsebenen horizontal (0° - 30°), diagonal (> 30° - 60°) und vertikal (> 60° - 90°) ergab für die mitotischen aRG der E12,5 KO-Embryos im Vergleich mit den E12,5 Ktr-aRG keinen signifikanten Unterschied. n = 146 analysierte Zellen von 3 Versuchstieren (146 / 3) (Ktr), n = 142 / 3 (KO). (B) Ebenfalls vergleichbar zwischen den E12,5 Ktr- und KO-Embryos war das Verhältnis von mitotischen aRG mit kondensierter oder segregierter DNS. n = 17 / 3 (Ktr), n = 16 / 3 (KO).

Selbige Analysen für das Entwicklungsstadium E14,5 ergab innerhalb der Population der Ktr- und KO-aRG ebenfalls keinerlei Unterschiede im Verhältnis von kondensierter zu segregierter DNS. In beiden Genotypen besaßen ~ 80 % der mitotischen aRG kondensierte und ~ 20 % segregierte DNS (Abb. 34B), was wiederum auf keine Verschiebungen hinsichtlich der Länge der M-Phase schließen ließ. Allerdings konnte eine Vervierfachung der relativen Anzahl horizontal teilender aRG (Ktr: 7,41 % ± 6,05 %; KO: 28,89 % ± 3,63 %), bei gleichzeitiger Verringerung des Anteils diagonal teilender aRG (Ktr: 53,33 % ± 3,78 %; KO: 36,67 % ± 10,30 %) in den KO-Embryos festgestellt werden. Der Anteil vertikal teilender aRG blieb dabei im Vergleich zwischen E14,5 Ktr- und KO-Embryos annähernd gleich (Abb. 34A).

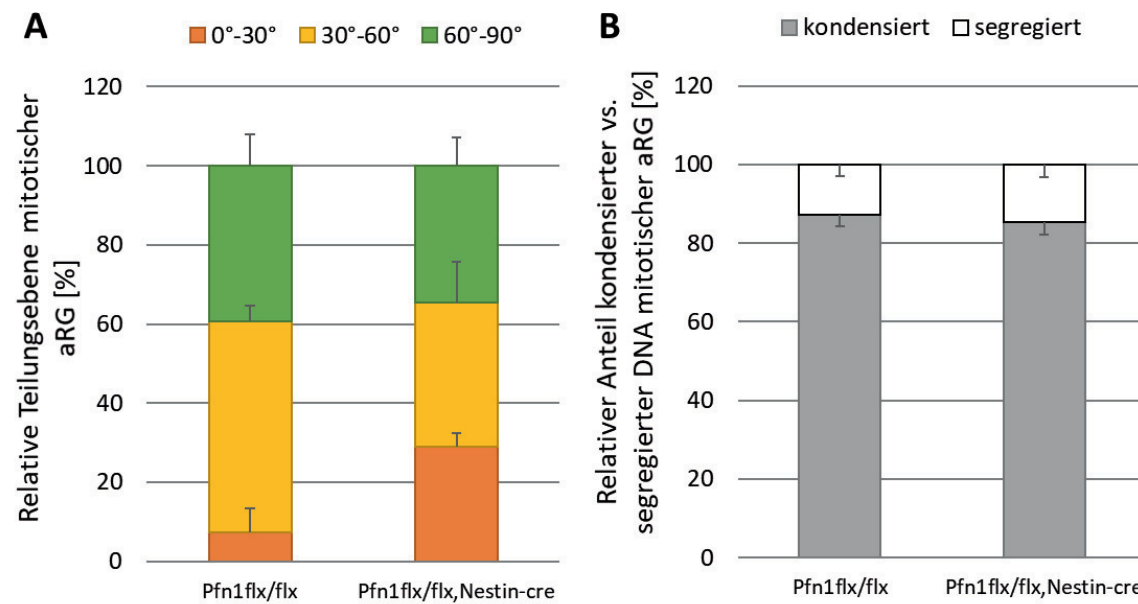


Abbildung 34: Vermehrt horizontale Teilungen mitotischer aRG in E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Mäusen bei gleichbleibendem Verhältnis von kondensierter zu segregierter DNS. (A) Die Analyse der relativen Teilungsebene mitotischer aRG an E14,5 anhand von Antikörperfärbungen gegen pH3 und einer PI-Färbung ergab einen deutlichen Anstieg horizontaler Teilungen (0° - 30°), bei gleichzeitiger Reduktion diagonaler (> 30° - 60°) und einem gleichbleibenden Anteil vertikaler Teilungen (> 60° - 90°) innerhalb der E14,5 KO-Embryos. n= 24 analysierte Zellen von 3 Versuchstieren (Ktr) (24 / 3), n= 14 / 3 (KO). **(B)** Unterschiede im relativen Anteil mitotischer aRG mit kondensierter oder segregierter DNS konnten zwischen E14,5 Ktr- und KO-Embryos nicht festgestellt werden. n= 18 / 3 (Ktr), n= 18 / 3 (KO).

Da diese Untersuchung ein Schlüsselexperiment dieser Studie bildete, wurde es mit einer weiteren Antikörperfärbung gegen γ -Tubulin (exprimiert in MTOZ's), phospho-Vimentin (Mitosemarker) und dem DNS Farbstoff Höchst verifiziert.

Auch diese Untersuchung zeigte eine eindeutige Verschiebung der relativen Teilungsebene innerhalb der mitotischen E14,5 KO-aRG hin zu mehr horizontalen (Ktr: 9,18 % \pm 2,28 %; KO: 15,96 % \pm 3,72 %) bei gleichzeitiger Verringerung der diagonalen (Ktr: 33,08 % \pm 10,84 %; KO: 25,60 % \pm 4,02 %) und gleichbleibendem Anteil an vertikalen (Ktr: 57,75 % \pm 13,06 %; KO: 58,44 % \pm 7,73 %) Teilungen (Abb. 35). Dies untermauerte den Schluss, dass die E14,5 aRG der Profilin1-defizienten Mäuse durch einen vermehrten Anteil horizontaler Teilungen die deutlich erhöhte Anzahl an bRG bilden.

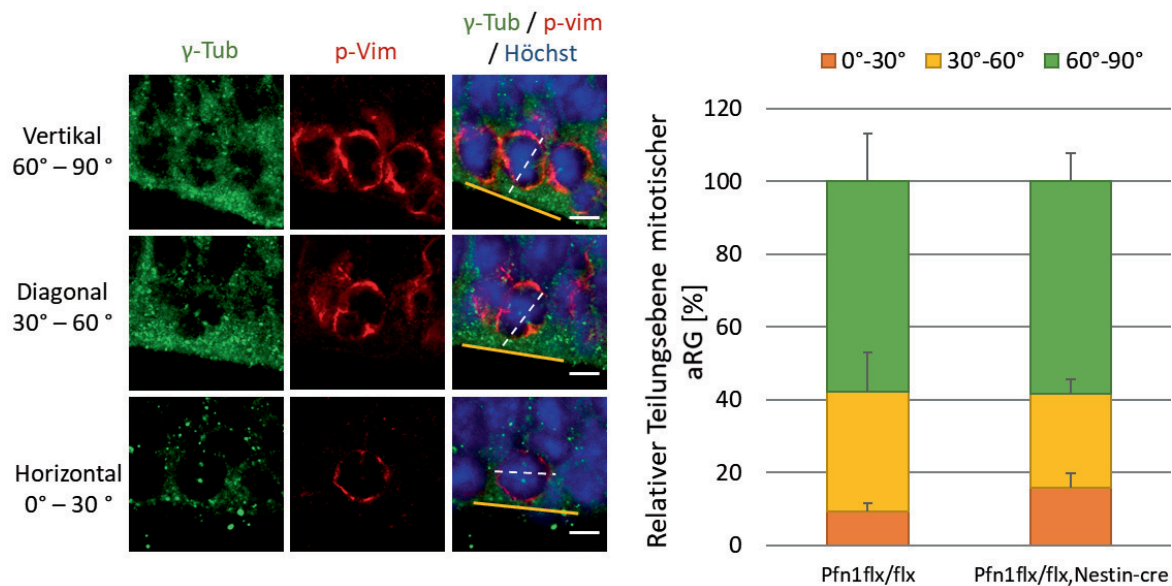


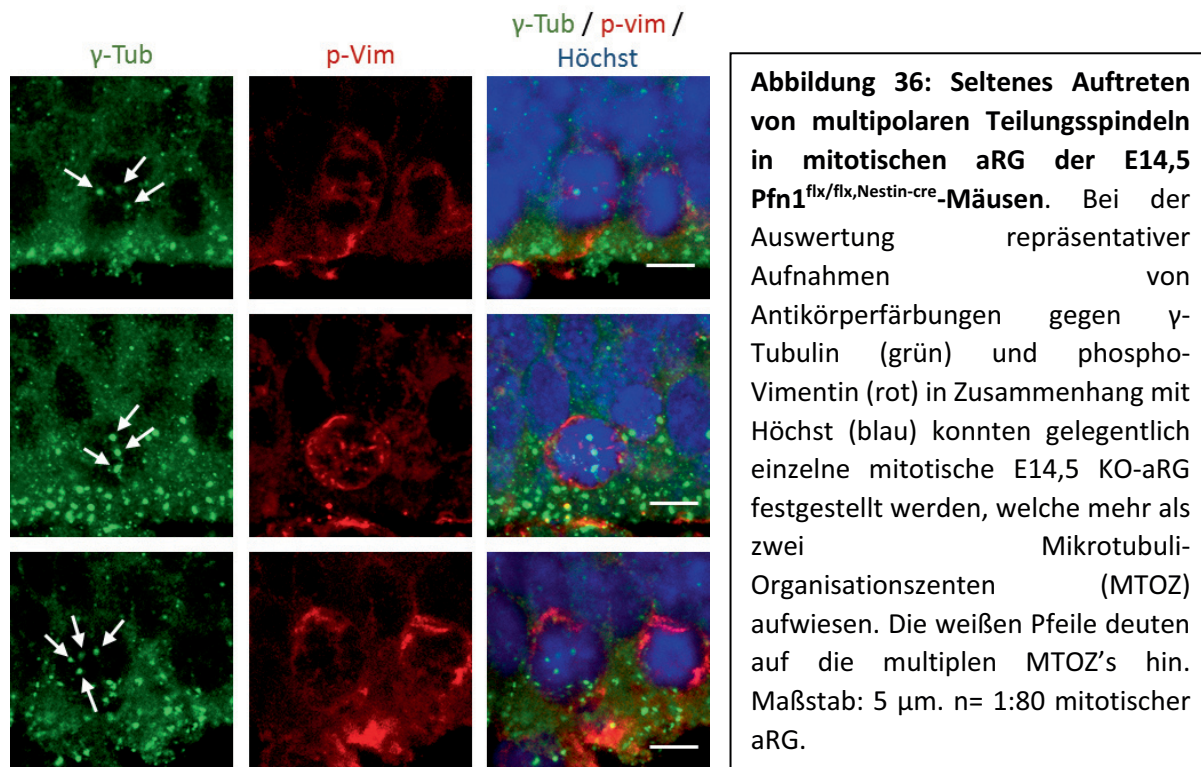
Abbildung 35: Vermehrte horizontale Teilungen mitotischer aRG in E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre^{-/-} Mäusen. Die Analyse des prozentualen Anteils vertikaler (> 60° - 90°), diagonaler (> 30° - 60°) und horizontaler (0° - 30°) Teilungen mitotischer aRG anhand von Antikörperfärbungen gegen γ -Tubulin (grün), phospho-Vimentin (rot) in Zusammenhang mit Höchst (blau) ergab einen erhöhten Anteil horizontal-teilender aRG innerhalb der E14,5 KO-Embryos. Die Anzahl vertikaler Teilungen blieb dabei zwischen Ktr- und KO-aRG weiterhin vergleichbar, während der Anteil diagonaler Teilungen sich innerhalb der E14,5 KO-Embryos leicht verringerte. n= 171 / 3 (Ktr), n= 206 / 3 (KO). Maßstab:

3.3.10. Vereinzelttes Auftreten von multipolaren Teilungsspindeln in mitotischen aRG der E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre^{-/-}-Embryos

Die Verschiebung der relativen Teilungsebene innerhalb der mitotischen aRG der E14,5 Pfn1^{flx/flx}, Nestin-cre^{-/-}-Embryos hin zu mehr horizontalen Teilungen weist dabei auf eine Randomisierung der Position der Mitosespindel hin. Die Mitosespindel besteht allgemein aus zwei Polen, die wiederum je aus einem Zentrosom bestehen, ein Zentriolenpaar beinhalten und im sogenannten perizentriolaren-Material eingebettet sind. Das perizentriolare Material enthält einen γ -Tubulin Ringkomplex, von dem aus die Mikrotubuli der Mitosespindel auskeimen (Mennella *et al.*, 2014).

Mittels der γ -Tubulin Färbung zur Bestimmung der relativen Teilungsebene der mitotischen aRG an E14,5 war im Zusammenhang mit der Mitosespindel in einigen Fällen (~ 1 von 80 mitotischen KO-aRG) die Ausbildung von drei bis vier Mikrotubuli-Organisationszentren innerhalb der E14,5 KO-Embryos zu beobachten (Abb. 36). Die Ausbildung von mehr als zwei Mikrotubuli-Organisationszentren weist dabei auf das Vorhandensein mehrerer Zentrosome bzw. Zentriolen und somit einer multipolaren

Teilungsspindel hin (Maiato and Logarinho, 2014). Auffälligkeiten dieser Art traten in den E14,5 KO-Embryos nicht auf. Allgemein weisen sie allerdings deutlich darauf hin, dass innerhalb der E14,5 KO-Embryos die Zellteilung der aRG nicht immer fehlerfrei abläuft.



3.3.11. Keine Veränderungen im Aufbau der Teilungsspindel mitotischer aRG von E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre} Embryos

Eine mögliche Erklärung, vor allem für die Verschiebung der relativen Teilungsebene hin zu mehr horizontalen Teilungen in den E14,5 KO-Embryos, könnte z. B. eine losere Verankerung der Mitosespindel am Zellkortex (Netzwerk aus Aktin, Myosin und assoziierten Proteinen, welche direkt unterhalb der Plasmamembran lokalisiert sind (Pietro, Echard and Morin, 2016)) sein. Die Mitosespindel besteht aus drei verschiedenen Typen von Mikrotubuli: den Astral-, Interpolar- und Kinetochor-Mikrotubuli. Die Astral-Mikrotubuli entspringen den Zentrosomen und sind mit dem Zellkortex verbunden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Positionierung der Mitosespindel. Interpolar-Mikrotubuli sind die Hauptbestandteile der Spindel und der Schlüssel für die Etablierung der Bipolarität des Spindelapparats, der Chromosomen-Kongression und der Anordnung der Zentralspindel. Kinetochor-Mikrotubuli sind

Mikrotubuli-Bündel, welche die Kinetochore mit den Spindelpolen verbinden und die Schwester-Chromatiden während der Anaphase segregieren (Meunier and Vernos, 2012).

Mögliche Veränderungen im Aufbau des Spindelapparates sollten mittels einer Antikörperfärbung gegen tyrosiniertes-Tubulin sichtbar gemacht werden. In Bezug auf den Spindelapparat beinhalten vor allem die Astral- und Kinetochor-Mikrotubuli tyrosiniertes-Tubulin (Ferreira *et al.*, 2018), was den dynamischen Mikrotubuli zugeordnet wird. Die vergleichende Betrachtung des Spindelapparates an E14,5 zeigte allerdings keine gravierenden Veränderungen hinsichtlich der Verteilung oder Morphologie der Astral- und Kinetochor-Mikrotubuli sowie auch keine Unstimmigkeiten in der allgemeinen Morphologie der Mitosespindeln (Abb. 37). Deutliche Veränderungen des Aufbaus oder der Verankerung des Spindelapparates innerhalb der E14,5 KO-Tiere konnten somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

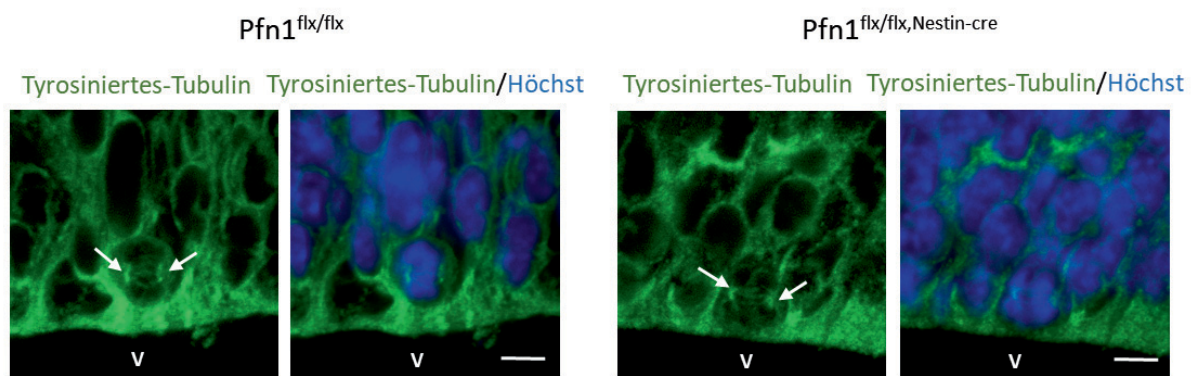


Abbildung 37: Keine offensichtlichen Veränderungen im Aufbau des Spindelapparates mitotischer aRG der E14,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos. Die Untersuchung repräsentativer Bilder mitotischer aRG mittels einer Antikörperfärbung gegen tyrosiniertes-Tubulin (grün) in Verbindung mit Höchst (blau) offenbarte im Vergleich zwischen E14,5 Ktr- und KO-Embryos keine Veränderungen im Aufbau des Spindelapparates. Die weißen Pfeile deuten auf die beiden Pole des Spindelapparates. Maßstab: 5 μm . V: Lateraler Ventrikel.

3.3.12. Keine Veränderungen im Expressionsmuster von β -, acetyliertem- oder tyrosiniertem-Tubulin im zerebralen Kortex von E14,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos

Da hinsichtlich der Morphologie und des Aufbaus der Mitosespindel der E14,5 KO-aRG keinerlei Veränderungen festgestellt werden konnten, erfolgte im weiteren Verlauf dieser Studie eine nähere Untersuchung des Mikrotubulizytoskelett der E14,5 KO-Embryos. Grund dafür war, dass Profilin mittels seiner Interaktion mit Formin

nachweislich die Mikrotubuli-Dynamik und Stabilität in Zellen beeinflussen kann (Bender *et al.*, 2014; Nejedla *et al.*, 2016) und somit die Vermutung nahe lag, dass die Deletion von Profilin1 einen indirekten Effekt auf das Mikrotubulizytoskelett der neuralen Vorläuferzellen haben könnte.

Für diese Untersuchung fanden Antikörperfärbungen gegen β -, tyrosiniertes- und acetyliertes-Tubulin, jeweils in Kombination mit pH3 bzw. phospho-Vimentin ihre Verwendung. Die beiden Mitosemarker pH3 und phospho-Vimentin wurden dabei genutzt, um mitotische aRG zweifelsfrei darstellen und vergleichen zu können. β -Tubulin sollte als Grundbaustein eines jeden MT-Heterodimers Aufschluss über eventuelle, globale Veränderungen im Aufbau des MT-Zytoskelettes der E14,5 KO-Mäuse geben. Die Antikörperfärbungen gegen tyrosiniertes- und acetyliertes-Tubulin wurden verwendet, um die Verteilung der eher dynamischen (tyrosiniertes-Tubulin (Prota *et al.*, 2013)) und eher stabilen (acetylierte-Mikrotubuli (Nagai *et al.*, 2013)) MT-Population zu untersuchen.

β -, acetyliertes- und tyrosiniertes-Tubulin waren sowohl in den E14,5 Pfn1^{flx/flx}- wie auch den Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos sehr global lokalisiert. Dies bedeutete, dass sich im gesamten zerebralen Kortex beider Genotypen alle drei Färbungen als sehr feines Netz darstellten. Unterschiede in der Lokalisation der Antikörperfärbung gegen β -, acetyliertes- und tyrosiniertes-Tubulin im Vergleich zwischen E14,5 Ktr- und KO-Embryos wurden nicht dokumentiert (Abb. 38A). Dadurch konnten offensichtliche Auswirkungen des gehirnspezifischen Knock-outs von Profilin1 auf das MT-Zytoskelett der neuralen Vorläuferzellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die darauf folgende sehr detaillierte Betrachtung der Lokalisation von β -, acetyliertem- und tyrosiniertem-Tubulin direkt im Bereich mitotischer aRG führte zu demselben Ergebnis (Abb. 38B) und wies auch in diesem Fall auf keine stärkeren Auswirkungen der Deletion von Profilin1 auf das MT-Zytoskelett hin.

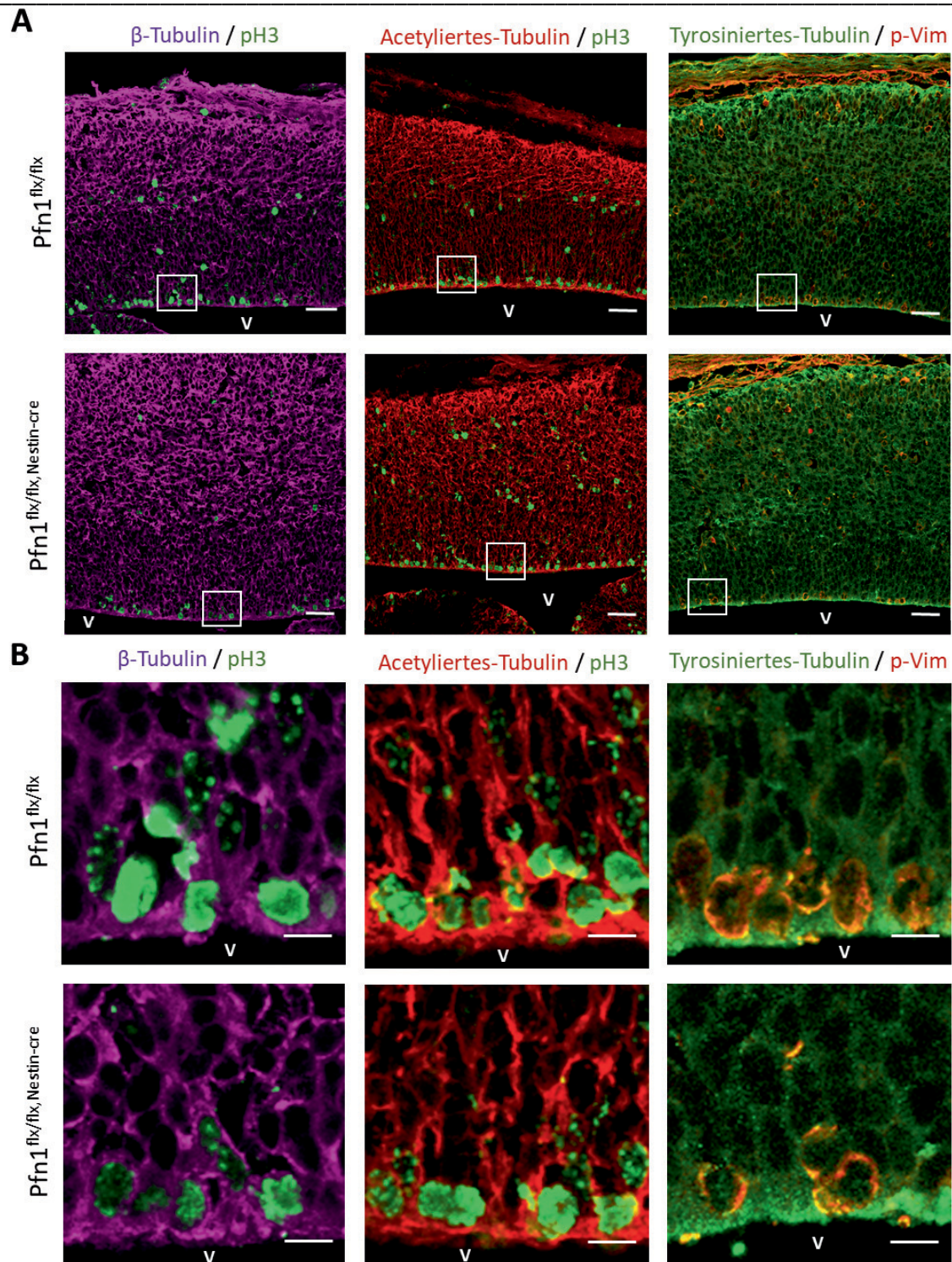


Abbildung 38: Keine Veränderungen in der Lokalisation von β -, acetyliertem- oder tyrosiniertem-Tubulin innerhalb der E14,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse. (A) Die repräsentativen Aufnahmen von Antikörperfärbungen gegen β -Tubulin (lila) und acetyliertem-Tubulin (rot) mit pH3 (grün) sowie tyrosiniertem-Tubulin (grün) zusammen mit phospho-Vimentin (rot) zeigen keine offensichtlichen Unterschiede in der Lokalisation von β -, acetyliertem- oder tyrosiniertem-Tubulin innerhalb der verschiedenen zerebralen Kortexschichten der E14,5 KO-Embryos. Die weißen Kästen markieren die in (B) vergrößerten Bereiche. Maßstab: 50 μ m (A). **(B)** Auch eine spezifische Untersuchung der Lokalisation von β -, acetyliertem- und tyrosiniertem-Tubulin im Bereich mitotischer aRG stellte keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den E14,5 Ktr- und KO-Embryos heraus. Maßstab: 5 μ m (B). V: Lateraler Ventrikel.

3.3.13. Verringerter Anteil an subkortikalem F-Aktin in mitotischen aRG der E14,5 Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Embryos

Da es in den E14,5 KO-Embryos zu keinen gravierenden Veränderungen des Aufbaus des MT-Zytoskelettes oder der Morphologie der Mitosespindel der aRG kam, welche die prozentuale Verschiebung der Teilungsebene hin zu mehr horizontal teilenden aRG hätte erklären können, erfolgte weiterführend eine nähere Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts. Vorangegangene Studien konnten diesbezüglich bereits zeigen, dass F-Aktin und sein Motorprotein Myosin an der Orientierung der Teilungsspindel beteiligt sind (Sugioka and Bowerman, 2018). Somit wäre zu vermuten, dass die Deletion des Aktin-regulierenden Proteins Profilin1 über die Regulation der Aktin-Assemblierung einen direkten Einfluss auf die Spindelorientierung innerhalb der E14,5 KO-aRG haben könnte.

Für die Untersuchung des F-Aktin-Levels im Umfeld der mitotischen aRG, fand Fluorophor-gekoppeltes Phalloidin (markiert spezifisch F-Aktin), in Verbindung mit PI seine Verwendung, um anhand segregierter und kondensierter DNS mitotische aRG zweifelsfrei detektieren zu können. Die Untersuchung des F-Aktin-Anteils zeigte dabei in den E14,5 Ktr- wie auch KO-Embryos, eine starke Anreicherung von F-Aktin im Bereich der VO, welche sich in basaler Richtung schnell abschwächte (Abb. 39A). Eine Analyse der Signalintensität der Phalloidin-Färbung im Bereich der VO ergab im Vergleich zwischen den E14,5 Ktr- und KO-Embryos keine signifikanten Unterschiede in der Intensität des Phalloidin-Signals (Abb. 39C), was auf einen vergleichbaren Aktin-Gehalt in diesem Bereich hindeutete. Allerdings wurde mittels der Phalloidin-Färbung eine F-Aktin-reiche, subkortikale Struktur innerhalb der mitotischen aRG sichtbar (Abb. 39B). Es war zu vermuten, dass es sich bei dieser F-Aktin-reichen, subkortikalen Struktur um den Aktin-Kortex handelte, welcher innerhalb der mitotischen E14,5 KO-aRG deutlich schwächer ausgeprägt zu sein schien als innerhalb der mitotischen Ktr-aRG (Abb. 39B). Diese deutlich sichtbare Verringerung des Anteils an F-Aktin im Aktin-Kortex der mitotischen E14,5 KO-aRG ist mit großer Wahrscheinlichkeit ursächlich für die Randomisierung der Teilungsebene innerhalb der mitotischen E14,5 KO-aRG.

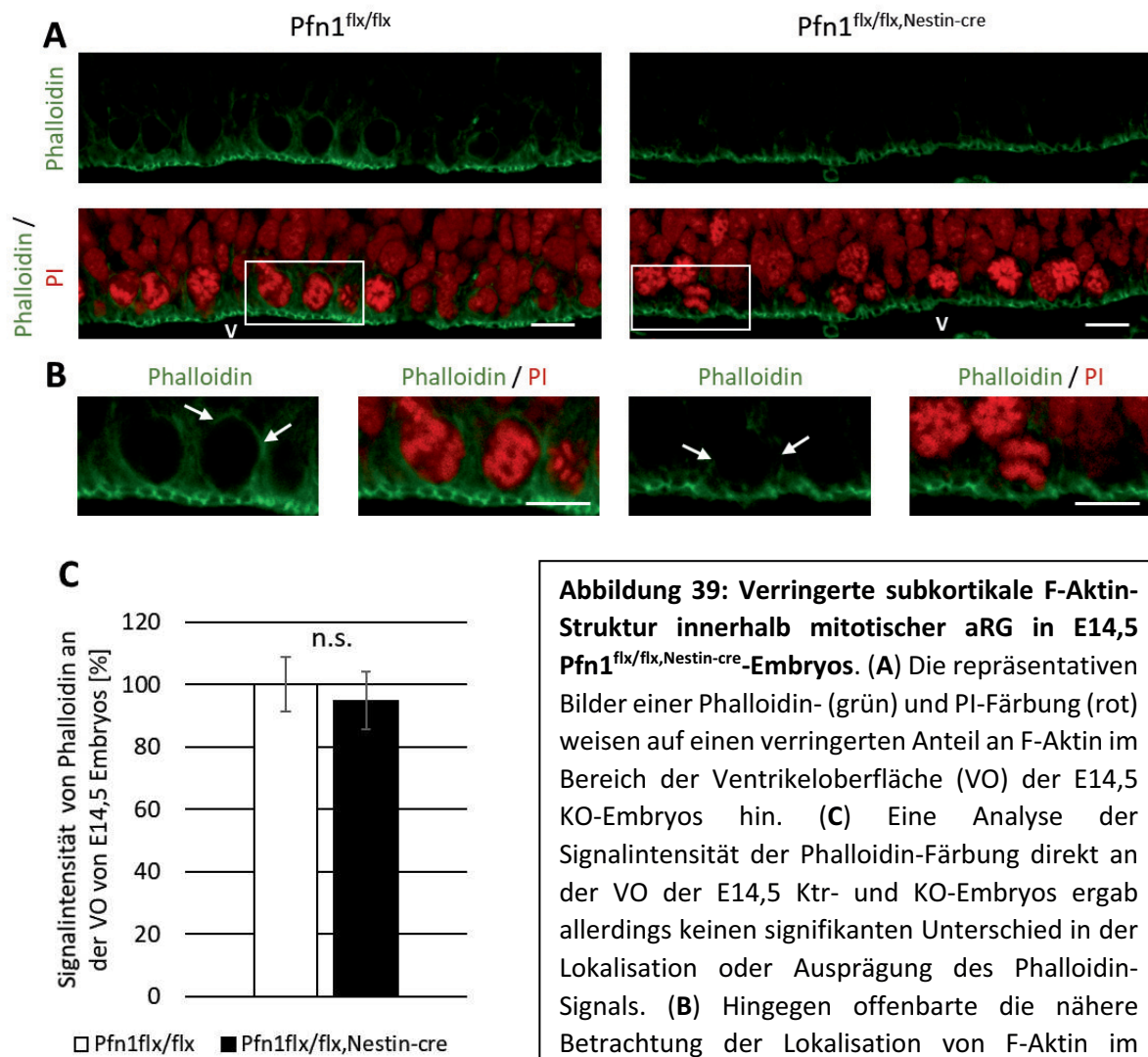


Abbildung 39: Verringerte subkortikale F-Aktin-Struktur innerhalb mitotischer aRG in E14,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos. (A) Die repräsentativen Bilder einer Phalloidin- (grün) und PI-Färbung (rot) weisen auf einen verringerten Anteil an F-Aktin im Bereich der Ventrikeloberfläche (VO) der E14,5 KO-Embryos hin. (C) Eine Analyse der Signalintensität der Phalloidin-Färbung direkt an der VO der E14,5 Ktr- und KO-Embryos ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Lokalisation oder Ausprägung des Phalloidin-Signals. (B) Hingegen offenbarte die nähere Betrachtung der Lokalisation von F-Aktin im Bereich mitotischer aRG (aRG mit kondensierter oder segregierter DNS) eine deutlich verringerte subkortikale F-Aktin-Struktur innerhalb der mitotischen E14,5 KO-aRG. Die weißen Pfeile deuten auf die subkortikale F-Aktin-Struktur hin. Maßstab: 5 μ m (A-B). n= 9 / 3 pro Genotyp. n.s. nicht signifikant; V: Lateraler Ventrikel.

4. Diskussion

4.1. Der gehirnspezifische Knock-out von Profilin1 führt embryonal zu einer transienten Expansion der bRG Population und einer Fehllokalisierung von bIP

Diverse kortikale Missbildungen wie Polymikrogyrie (exzessive Faltung der Hirnrinde), Pachygyrie (massiv verminderte Anzahl an Gyri) oder Lissencephalie stehen mit einer abnormalen Gyrierung des zerebralen Kortex in Verbindung (Subramanian, Calcagnotto and Paredes, 2020). Zwei Schlüsselgenmutationen, welche mit humanen Gyrierungsdefekten in Verbindung gebracht werden, sind das Mikrotubuli-assoziierte Protein LIS1 (Lissencephalie-assoziiertes Protein 1) und das ABP Filamin A. In Mausmodellen beeinflussen sie die Mitose und die frühe Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen, was Auswirkungen auf die Orientierung der Teilungsspindel, die Zellzykluslänge und die Zytokinese der neuronalen Vorläuferzellen hat (Sun and Hevner, 2014; Lian *et al.*, 2019).

Auch Profilin1 gehört zu den ABP und interagiert über dies mit einer Vielzahl von Liganden wie z. B. Formin, welches unter anderem mit Mikrotubuli interagieren und sie stabilisieren kann (Pinto-Costa and Sousa, 2020). Dementsprechend kann vermutet werden, dass Profilin1 einen bedeutenden Einfluss auf das Zellzytoskelett neuronaler Vorläuferzellen in Mäusen haben könnte. Die vorliegende Studie zeigt dahingehend, dass die gehirnspezifische Deletion von Profilin1 in Mäusen zu einer Verschiebung der Teilungsebene mitotischer aRG hin zu mehr horizontalen Teilungen an E14,5 führte (Abb. 34/35). Außerdem kam es durch die Deletion von Profilin1, an E14,5 zu einem erhöhten Anteil mitotischer Zellen in den basalen Bereichen des zerebralen Kortex (Abb. 17/18) und damit einhergehend zu einer erhöhten Anzahl neu gebildeter Zellen (Abb. 19).

Grund dafür könnte eine verringerte Verankerung der Mitosespindel am Aktin-Kortex der mitotischen KO-aRG an E14,5 sein. Jedoch gab es innerhalb der E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Embryos keine Veränderungen in der Länge des Zellzyklus (Abb. 28/30), dem Aufbau der Mitosespindel (Abb. 37) oder der allgemeinen Verteilung von β -, tyrosiniertem- oder acetyliertem-Tubulin (Abb. 38). Der verringerte Anteil von

subkortikalem F-Aktin innerhalb der mitotischen E14,5 KO-aRG (Abb. 39), welcher durch eine aktuelle Studie bestätigt werden konnte (Kullmann *et al.*, 2019) unterstützte dabei die Hypothese der verringerten Verankerung der Mitosespindel am Zellkortex. Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Zellkortex und Spindelorientierung ist bekannt, dass die spezifische Polarität des Aktin-Kortex die Spindelorientierung kontrolliert (Pietro, Echard and Morin, 2016) und dementsprechend der verringerte Anteil an subkortikalem F-Aktin durchaus ursächlich für die Verschiebung der Teilungsebene sein konnte.

Eine weitere Möglichkeit, warum der Knock-out von Profilin1 unabhängig von dem verringerten Aktin-Kortex zu einer loseren Verankerung der Mitosespindel führen könnte, ist über die Interaktion von Profilin1 mit Afadin zu erklären (Tsurumi *et al.*, 2016). Afadin ist ein F-Aktin-bindendes-Protein und reguliert unter anderem die Rekrutierung von LGN (Leucin-Glyzin-Asparagin-Komplex) (Pietro, Echard and Morin, 2016), welcher als Bestandteil des Gai/LGN/NuMA-Komplexes direkt an der Orientierung und Verankerung der Mitosespindel am Zellkortex beteiligt ist (Uzquiano *et al.*, 2018).

Eine „*in utero* Elektroporation“ (IUE)-Studie von Kullmann *et al.* konnte allerdings zeigen, dass aRG bei einer Überexpression von WT-Profilin1 in den proliferativen Zonen des zerebralen Kortex akkumulieren und signifikant weniger WT-Profilin1 exprimierende Zellen in die CP einwandern. Die Überexpression einer Profilin1-Mutante, deren Aktinbindung gehemmt war (R74E-Pfn1) führte hingegen zu einem mit dem Kontrollzustand vergleichbaren Phänotyp (Kullmann *et al.*, 2019). Mittels dieser Experimente wiesen Kullmann und Kollegen dementsprechend nach, dass Profilin1 in seiner Funktion als Aktin-regulierendes Protein an der Orientierung der Teilungsspindel direkt beteiligt ist.

Das Vorkommen vereinzelt auftretender multipler MTOZ's innerhalb der E14,5 KO-Embryos (Abb. 36) war vermutlich ebenfalls auf den reduzierten Aktin-Kortex innerhalb der mitotischen aRG zurückzuführen. Die Ausbildung von mehr als zwei MTOZ's weist dabei auf das Vorhandensein mehrerer Zentrosome bzw. Zentriolen und somit eine multipolare Teilungsspindel hin (Maiato and Logarinho, 2014). Diverse atypische Konditionen wie z. B. Zentriol Überduplikation, *de novo* Zentriol Assemblierung, Scheitern einer vollständigen Zytokinese oder die Verschmelzung von Zellen können zu Zentrosomen-Amplifikation und der Bildung multipolarer Mitosespindeln führen (Maiato and Logarinho, 2014). Im Fall der KO-aRG an E14,5 ist in Hinblick auf den

verringerten Aktin-Kortex allerdings von einer unvollständigen Zytokinese vereinzelter aRG auszugehen, da Profilin nachweislich für die Ausbildung des kontraktilen Rings sich teilender Zellen benötigt wird (Kadzik, Homa and Kovar, 2020). Eine nähere Untersuchung der Zytokinese der KO-aRG mittels Lebendzellmikroskopie an Schnittkulturen oder Organoiden könnte Aufschluss darüber geben ob die Ausbildung der vereinzelt auftretenden multiplen MTOZ's tatsächlich auf eine gestörte Zytokinese zurückzuführen ist.

Eine zu erwartende Konsequenz aus der vermehrten horizontalen Teilung der KO-aRG an E14,5 bestand in einem transienten Anstieg der Anzahl bRG an E14,5 und E16,5 (Abb. 20), da allgemein anerkannt ist, dass murine bRG genau wie humane bRG / oRG durch horizontale Teilungen der aRG hervorgebracht werden (Shitamukai and Matsuzaki, 2012; LaMonica *et al.*, 2013). Dementsprechend war ebenfalls die deutlich verringerte Schichtdicke der VZ innerhalb der E16,5 KO-Embryos zu erwarten (Abb. 21), welche ebenfalls auf vermehrte selbstverbrauchende Teilungen der KO-aRG innerhalb der früheren Entwicklungsstadien hindeutete. Der experimentelle Nachweis der Bildung der vermehrten Anzahl bRG-Zellen durch die KO-aRG an E14,5 sollte durch den Nachweis verstärkter Delaminierungen von bP-Zellen aus dem Adhäsionskontakt-Gürtel der aRG erfolgen.

Eine vermehrte Delaminierung der bP konnte über den erhöhten Anteil Arl13b⁺-primärer Zilien innerhalb der VZ der E14,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Embryos nachgewiesen werden (Abb. 31). Da die allgemeine Anzahl bIP im selben Entwicklungsstadium der KO-Embryos unverändert war (Abb. 22), welche ebenfalls primäre Zilien besitzen (Wilsch-Bräuninger *et al.*, 2012), konnte von einer vermehrten Delaminierung der bRG ausgegangen werden, was ihre Produktion durch die murinen KO-aRG bestätigte.

Deutliche Effekte auf die Menge und Verteilung der apikalen Polaritätsproteine Par3 und α PKC, welche im apikalen Endfuß der aRG lokalisiert sind (Costa *et al.*, 2008) und deren Reduzierung ebenfalls auf vermehrte Delaminierungen hingewiesen hätten, konnten im Bereich der VO der E14,5 KO-Embryos allerdings nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Untersuchungen an E12,5 Ktr- und KO-Embryos zeigten hingegen eine signifikante Verringerung der Signalintensität von Par3 und α PKC im Bereich der VO der KO-Embryos (Abb. 26). Solche Verringerungen stehen aufgrund der Interaktion von Par3 und α PKC mit N-Cadherin, β -Catenin und ZO-1 oft mit dem Verlust von AJ in Verbindung (Chou, Li and Wang, 2018), wobei die lokale Modulierung der Aktin-Organisation (z. B. durch ABP's wie Profilin) essenziell für die Integrität von

Adhäsionskontakten ist (Bachir *et al.*, 2017). Dementsprechend kann vermutet werden, dass die Deletion von Profilin1 einen indirekten Effekt auf die Stabilität der AJ von aRG hat. Die Untersuchung der Verteilung und Menge von Cadherin unter Verwendung eines pan-Cadherin Antikörpers im Bereich der VO an E12,5 zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede der Signalintensität zwischen Ktr- und KO-Embryos (Abb. 27), was auf keinen übermäßigen Verlust von AJ hindeutet. Überraschenderweise kam es innerhalb der VZ der E12,5 Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}-Embryos sogar zu einer erhöhten Anzahl von RG (Abb. 21).

Untersuchungen an konditionellen Par3 Knockout Mäusen (Pard3^{fl/fl, Emx-cre}) zeigten in Bezug auf die frühe Neurogenese (E12) einen erhöhten Anteil symmetrisch-proliferativer Teilungen der apikalen, neuralen Stammzellen (aNSC), welche zu einer Überproduktion von aNSC führten (Liu *et al.*, 2018; Jossin, 2020). In diesem Zusammenhang deutet die verringerte Signalstärke von Par3 und α PKC, in Verbindung mit den durch die Untersuchung der IZM gewonnenen Hinweisen einer verkürzten G1-Phase der E12,5 KO-aRG (Abb. 28/29), auf vermehrte proliferative Teilungen der aRG und daraus resultierend auf eine vermehrte Produktion von aRG hin, was ebenfalls den signifikanten Anstieg an RG in der VZ der E12,5 KO-Embryos erklären würde. Eine Analyse der Teilungsebene der KO-aRG an E12,5 ergab, im Vergleich zwischen den Ktr- und KO-aRG allerdings, keinen signifikanten Unterschied in der prozentualen Verteilung der Teilungsebenen (Abb. 32/33). Die Vermutung liegt nahe, dass die vermehrten proliferativen Teilungen der E12,5 KO-aRG zu einer verringerten Anzahl an IP führen müssten, da eine deutliche Reduzierung des Anteils neu gebildeter Neuronen mittels der Dcx-Färbung bereits weitestgehend ausgeschlossen werden konnte (Abb. 25). Eine Analyse der relativen Anzahl und Verteilung der IP an E12,5 und E13,5 könnte Aufschluss über eine verringerte Produktion von IP durch die KO-aRG liefern. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass es aufgrund der Gehirn-spezifischen Deletion von Profilin1 zu Beginn der Neurogenese zu einer Überproduktion von aRG und mit dem Hochpunkt der Neurogenese (bei Mäusen zwischen E13,5 und E14,5 (Tang *et al.*, 2019)) zu einer vermehrten Delaminierung der bRG vom Adhäsionskontaktgürtel der aRG kommt.

Die vermehrt produzierten bRG organisierten sich dabei zusammen mit fehllokalisierten bIP innerhalb der E14,5 KO-Embryos zum größten Teil im Bereich der IZ und SP (Abb. 20/23), was auf die Bildung einer oSVZ-ähnlichen Struktur hindeutet. Die oSVZ charakterisiert sich in gyrencephalen Spezies unter anderem durch einen

hohen Anteil bRG-Zellen, was innerhalb der E14,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos im Vergleich zur Kontrolle gegeben ist. Des Weiteren ist die oSVZ gyrencephaler Spezies durch die Anreicherung pbIP und durch eine klare Abgrenzung zu benachbarten Schichten (iSVZ und IZ/SP) mittels des iFL und des oFL geprägt (Dehay, Kennedy and Kosik, 2015). Untersuchungen hinsichtlich der Mitoserate der im Bereich der IZ und SP lokalisierten bRG und bIP an E14,5 zeigten eine deutlich erhöhte Mitoserate der fehllokalisierten bIP im Vergleich mit den Ktr-bIP der gleichen Region (Abb. 24). Dies deutet gerade in Hinblick auf die in den E14,5 KO-Embryos weiterhin höhere Anzahl an natürlich lokalisierten bIP (mit einer niedrigeren Mitoserate als die fehllokalisierte bIP), auf einen verkürzten Zellzyklus der fehllokalisierten bIP und damit auf vermehrt proliferative Teilungen hin. Untermuert wird diese Vermutung durch ein Experiment von Pilaz und Kollegen (Pilaz *et al.*, 2009) in dessen Verlauf neurale Vorläuferzellen der VZ durch eine Verkürzung der G1-Phase ebenfalls eine erhöhte Rate proliferativer Teilungen aufwiesen und weniger differenzierende Teilungen durchführten.

Dementsprechend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei den fehllokalisierten bIP der E14,5 KO-Embryos um den gyrencephalen-Spezies-ähnliche pbIP handelt, welche im Vergleich mit murinen bIP eine deutlich erhöhte proliferative Kapazität besitzen (Wong *et al.*, 2015). Diese gesteigerte proliferative Kapazität wird bei den bP gyrencephaler Spezies von einer horizontalen Teilungsebene begleitet. Murine bP weisen im Gegensatz dazu eine fast willkürliche Teilungsebene auf und teilen sich meist schon in ihrer ersten Mitose selbstverbrauchend symmetrisch-neurogen (Hansen *et al.*, 2010; Fietz and Huttner, 2011).

Um die Hypothese, dass es sich bei den fehllokalisierten bIP der E14,5 $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Embryos um den pbIP-ähnlichen Zellen handelt zu untersuchen, könnte man zum einen die prozentuale Verteilung der Teilungsebenen der fehllokalisierten bIP analysieren und mit den Teilungsebenen der Ktr-bIP vergleichen. Zum anderen könnte eine 24 h Inkubation mit BrdU (injiziert z. B. an E13,5) in Verbindung mit einer Antikörperfärbung gegen Ki67 (Markiert Zellen, welche sich noch im Zellzyklus befinden (Chenn and Walsh, 2002)), Tbr2 und Pax6 Aufschluss darüber geben, ob die fehllokalisierten bIP und die überzähligen bRG nach einer Teilung den Zellzyklus verlassen (z. B. $Tbr2^+/BrdU^+/Ki67^-$) oder nicht (z. B. $Tbr2^+/BrdU^+/Ki67^+$).

Allgemein ist zu vermuten, dass die fehllokalisierten bIP in den KO-Embryos von den bRG der IZ und SP gebildet werden. Für diese Theorie spricht die Lokalisation der fehllokalisierten bIP, welche im gleichen Bereich wie die überzähligen bRG auftraten

(IZ und SP). Da die Gesamtzahl an bIP innerhalb des zerebralen Kortex der E14,5 KO-Embryos allerdings im Vergleich mit den Ktr-Embryos unverändert war (Abb. 22), könnte man vermuten, dass die KO-aRG aufgrund der vermehrten Bildung bRG weniger bIP produzieren. Dies könnte durch IUE eines GFP exprimierenden Plasmids in den lateralen Ventrikel der KO-Embryos beispielsweise an E13,5 mit einer 24 Std. späteren Entnahme der Embryos überprüft werden. Antikörperfärbungen gegen GFP, Tbr2 und Pax6 sollten dabei Auskunft darüber geben können, ob es sich bei den Tochterzellen der KO-aRG um RG-Zellen oder IP handelt und der jeweilige Anteil zwischen Ktr- und KO-Embryos verglichen werden.

Die Vermutung, dass die erhöhte Anzahl bRG und mitotisch-aktiver bIP im Bereich der IZ und SP ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl neugebildeter Neuronen führen müsste, konnte mittels einer Dcx-Färbung für die E14,5 KO-Embryos bestätigt werden (Abb. 25). Aufgrund der nur transient auftretenden Erhöhung der Anzahl bRG und fehllokalisierter bIP entsprach die Anzahl neugebildeter Neuronen an E16,5 jedoch wieder dem der Ktr-Embryos und wirkte sich laut einer Untersuchung von Herrn Felix Schneider nicht nachhaltig auf die Zytoarchitektur des zerebralen Kortex postnataler *Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}*-Mäuse aus (Kullmann *et al.*, 2019). Umfangreiche neuronale Migrationsdefekte konnten von Herrn Schneider ebenfalls ausgeschlossen werden. Er dokumentierte allerdings innerhalb 7 Tage alter KO-Mäuse einen unregelmäßigeren Verlauf der superfiziellen Grenze der zerebralen Kortexschicht II/III und der Basallamina (Schneider, 2017), was auf erste Anzeichen der sich später ausbildender Invaginationen hindeutet.

4.2. Die gehirnspezifische Deletion von Profilin1 führt im zerebralen Kortex von Mäusen zur Ausbildung von Invaginationen

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung der innerhalb dieser Studie nachgewiesenen Invaginationen (Abb. 10/11/12/13/14) bildet der zum Hochpunkt der Neurogenese deutlich erhöhte Anteil an bRG innerhalb der KO-Embryos. Allgemein wird die in den meisten gyrencephalen Spezies expandierte Population der bRG als wichtigster Treiber für die Ausbildung kortikaler Auffaltungen angesehen (Borrell, 2018; Llinares-Benadero and Borrell, 2019). Eine wichtige Grundlage für diese Annahme bilden unter anderem verschiedenste Studien an Mäusen, welche z. B. durch den Knock-down des DNA-assozierten Proteins Trnp1 (Stahl *et al.*, 2013) oder

der dauerhaften Aktivierung des Sonic-hedgehog-Signalweges (Wang, Hou and Han, 2016) eine deutlich erhöhte Anzahl an bIP und bRG verzeichnen konnten, welche die Ausbildung kortikaler Auffaltungen zur Folge hatte. Auch in diesen Fällen war die vermehrte Produktion der bIP und bRG auf einen deutlich erhöhten Anteil horizontaler Teilungen der aRG zurückzuführen. Da es innerhalb der vorliegenden Arbeit, bei den Profilin1-defizienten Mäusen allerdings nur sehr kurzzeitig (E14,5 und E16,5) zu einer Erhöhung der Anzahl bRG kam (Abb. 20), wobei die Neuronenproduktion nur an E14,5 erhöht war (Abb. 25), erscheint die temporär erhöhte Produktion an Neuronen nicht alleine ausreichend zu sein, um die Ausbildung der Invaginationen in den adulten KO-Mäusen zu erklären.

Eine Studie an Makaken postuliert zudem, dass die starke Expansion des Cerebrums und die Entwicklung der Auffaltungen in gyrencephalen Spezies nicht nur von der Neurogenese, sondern ebenfalls und vermutlich sogar zu einem größeren Teil von der Gliogenese abhängt (Rash *et al.*, 2019). Für die Ausbildung primärer Auffaltungen in gyrencephalen Gehirnen scheint beispielsweise die Festigkeit der WM eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese ergibt sich aus einem mehr oder weniger hohen Anteil an durch die Oligodendrozyten myelinisierten Axonen (Van Essen, Donahue and Glasser, 2018; Subramanian, Calcagnotto and Paredes, 2020). Ein anderer wichtiger Faktor, welcher zur Ausbildung von primären Auffaltungen beiträgt, ist die unterschiedliche Festigkeit der verschiedenen Hirnregionen. Diese ergibt sich aus der Anzahl an Neuronen und ihren Verschaltungen untereinander sowie aus der Verschaltung mit den umliegenden Astrozyten (Rash *et al.*, 2019). Allgemein kann für die bRG der $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse nicht ausgeschlossen werden, dass sie nach Beendigung der Neuronenproduktion nicht auch Astrozyten und Oligodendrozyten generieren (Gliogenese). In Experimenten an Makaken konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass nach Beendigung der Neurogenese (~E90), wenn das Gehirn der Makaken noch lissencephal ist, sich die oSVZ deutlich vergrößert und die bRG mit der Produktion von Astrozyten und Oligodendrozyten beginnen (Rash *et al.*, 2019). Ein verfrühter Beginn der Astrogenese (in Mäusen normalerweise um E18,5 (Reemst *et al.*, 2016)) könnte die Festigkeit der betreffenden Gehirnregion vermutlich nachhaltig beeinflussen. Die deutlich erhöhte Anzahl an GFAP⁺-Astrozyten innerhalb der zerebralen Kortexschicht I der adulten $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse (Abb. 16) bildete einen deutlichen Hinweis auf eine vermehrte Produktion von Astrozyten in früheren Entwicklungsstadien. Die in der zerebralen Kortexschicht I lokalisierten Astrozyten

werden als Schicht-I Astrozyten bezeichnet und exprimieren auch unter natürlichen Bedingungen in adulten Mäusen GFAP (Tabata, 2015). Deshalb muss, trotz der allgemeinen Erhöhung GFAP⁺-Astrozyten (reaktive Gliose) in der gesamten GM der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse, der signifikante Anstieg GFAP⁺-Astrozyten in der zerebralen Kortexschicht I differenziert betrachtet werden. Einen weiteren Hinweis für die Bedeutung der erhöhten Anzahl an Astrozyten in Schicht-I des zerebralen Kortex bildete der Nachweis von Akkumulationen GFAP⁺-Astrozyten um die Invaginationen. Es scheint, als würden sich die Invaginationen nur in Bereichen mit sehr hohem Astrozyten-Aufkommen in der zerebralen Kortexschicht I bilden. In Bezug auf die Literatur lässt sich demnach die These aufstellen, dass die Ausbildung der Invaginationen in den adulten Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäusen auf eine erhöhte Steifheit der superfiziellen zerebralen Kortexschichten zurückzuführen sei. Diese wiederum ergibt sich aus der erhöhten Produktion vermutlich superfizieller Neurone innerhalb der E14,5 KO-Embryos und deren Verschaltung untereinander sowie dem erhöhten Anteil an Astrozyten in der zerebralen Kortexschicht I der adulten KO-Mäuse. Die deutliche Ausprägung der Invaginationen erst nach der Adoleszenz wäre dabei vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Mehrzahl an Gliazellen bei Nagetieren in der zweiten und dritten postnatal Wochen gebildet werden (Verkhatsky and Nedergaard, 2018) und es demnach erst in dieser Zeitspanne zu einer deutlichen Versteifung der einzelnen Gehirnregionen kommt. Ebenfalls von Bedeutung für die Ausbildung der Invaginationen ist vermutlich die verringerte rostro-caudale Ausbildung des CC, dessen Anteil an myelinisierten Axonen ebenfalls die Festigkeit einer Gehirnregion beeinflusst (Van Essen, Donahue and Glasser, 2018).

4.3. Profilin1-defiziente Mäuse bilden eine „vollständige“ reaktive Astroglie aus

Innerhalb dieser Studie konnte mittels BrdU-Experimenten die Ausbildung einer „vollständigen“ reaktive Astroglie (Charakterisiert durch Proliferation der reaktiven Astrozyten (Robel *et al.*, 2009)) nachgewiesen werden (Abb. 15). Die signifikant erhöhte Anzahl BrdU⁺-Zellen, welche nicht GFAP⁺ waren, wies zusätzlich auf eine Aktivierung von Mikroglia und NG2-Zellen und somit auf eine „klassische“ reaktive Gliose hin (Robel *et al.*, 2009). Bestätigt werden könnte dies mittels Antikörperfärbungen gegen BrdU (nach 14-tägiger Inkubation der Versuchstiere mit

BrdU über das Trinkwasser) in Verbindung mit einem Antikörper gegen Iba1 (Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptormolekül 1), welches spezifisch in Mikroglia exprimiert wird (Robel *et al.*, 2009), und gegen PDGFR α (von Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktorrezeptor α), welches einen Marker für NG2-Zellen darstellt (Sánchez-González, Bribián and López-Mascaraque, 2020). Proliferierende Mikroglia müssten BrdU⁺/Iba1⁺ und proliferierende NG2-Zellen müssten BrdU⁺/PDGFR α ⁺ sein.

Die Ausbildung der reaktiven Gliose im zerebralen Kortex der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse könnte in Bezug auf die Deletion von Profilin1 verschiedene Ursachen haben. Eine Ursache könnte beispielsweise sein, dass Astrozyten und Mikroglia sehr feinfühlig auf intrinsische und extrinsische Veränderungen reagieren und die Gliogenese in Mäusen erst kurz vor der Geburt beginnt. Ein Zeitraum, indem auch Profilin1 im zerebralen Kortex der Pfn1^{flx/flx,Nestin-cre}-Mäuse nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbar ist (Kullmann *et al.*, 2012). In Bezug auf Astrozyten und Mikroglia ist zudem wichtig, dass sie in direktem Kontakt zueinander stehen und die Aktivierung des jeweils anderen induzieren können (Jha *et al.*, 2019).

Vorstellbar ist, dass die Deletion von Profilin1 den natürlichen Alterungsprozess in Mikroglia nachahmt. In Bezug auf humane Mikroglia ist unter anderem bekannt, dass sie im Laufe des natürlichen Alterungsprozesses im Menschen ihr Transkriptionsprofil verändern und in den aktivierten Zustand übergehen (Galatro *et al.*, 2017). Dabei regulieren sie diverse Gene herunter, welche z. B. mit Zelladhäsion (z. B. das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 3 (ICAM3)), Rezeptorexpression an der Oberfläche der Mikroglia (z. B. „roundabout Homolog 2“ (ROBO2)) oder dem Aktin-Zytoskelett assoziiert (z. B. Pfn1 und Cyclase-assoziiertes Protein 1 (CAP1)) sind (Galatro *et al.*, 2017). Dies führt im alternden menschlichen Gehirn zu einer Aktivierung der Mikroglia, welche durch die Sekretion von Interleukin 1 α (IL-1 α), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und dem Komplementfaktor 1q (C1q) eine Reaktivierung von Astrozyten hervorruft (Clarke *et al.*, 2018). Ob die Deletion von Profilin1 in Mäusen tatsächlich ausreicht, um eine Aktivierung der Mikroglia hervorzurufen, könnte mittels muriner Mikroglia in Zellkultur untersucht werden, in denen Profilin1 mittels des CRISPER/Cas-Systems herunterreguliert oder direkt ausgeknockt wurde.

Die Deletion von Profilin1 könnte allerdings auch direkt eine Astrogliose hervorrufen, in dessen Zuge die Aktivierung der Mikroglia und NG2-Zellen passiv folgen könnte. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Profilin1 eine wichtige Rolle bei der Aktin-

Dynamik in perisynaptischen Astrozyten-Fortsätzen (PAP's) spielt (Schweinhuber *et al.*, 2015) und die Ca^{2+} -abhängige Plastizität der PAP's vermittelt (Zhou, Zuo and Jiang, 2019). PAP's sind dünne, stark verzweigte und hoch bewegliche Fortsätze. Sie umhüllen als ein wichtiger Teil der „Tripartite Synapse“ (Komplex aus Präsynapse, Postsynapse und der sie umgebenden Astrozytenmembran) die Prä- und Postsynapse und beeinflussen durch Veränderung ihrer Morphologie den Grad der Synapsen-Reichweite und damit die synaptische Übertragung (Schweinhuber *et al.*, 2015; Popov *et al.*, 2021). Die dauerhafte Überexpression von mutiertem Profilin1 (H119E-Pfn1), welches G-Aktin nicht mehr binden kann, unterdrückt dabei in kultivierten Astrozyten die Aktivitäts-abhängige Plastizität der PAP's (Molotkov *et al.*, 2013). Es ist zu vermuten, dass die Deletion von Profilin1 innerhalb der KO-Mäuse einen vergleichbaren Effekt auf die Plastizität der PAP's haben könnte. Allgemein gibt es starke Hinweise darauf, dass morphologische Veränderungen an Astrozyten einer Astrogliose vorausgehen (Zhou, Zuo and Jiang, 2019).

Wie sich eine verringerte Plastizität der PAP's *in vivo* auf die Funktionalität der Astrozyten auswirkt, muss noch näher untersucht werden. Bereits bekannt ist allerdings, dass eine Atrophie von PAP's oft in Zusammenhang mit Epilepsie beobachtet werden kann (Plata *et al.*, 2018). Eine Veränderung der PAP Organisation, der allgemeinen Morphologie der Astrozyten und der Anzahl an Astrozyten ist darüber hinaus für eine Vielzahl an Erkrankungen des Gehirns charakteristisch, wie z. B. Parkinson, Alzheimer und ALS (Plata *et al.*, 2018). Somit sollte auch in Hinblick auf die in Verhaltensexperimenten dokumentierte mentale Retardierung (unveröffentlichte Daten, Özge Sungur) der adulten $Pfn1^{flx/flx, Nestin-cre}$ -Mäuse mögliche Auswirkungen der Deletion von Profilin1 auf die Gliazell-Population näher untersucht werden. Eine Möglichkeit der Untersuchung auch kleinster Strukturen wie der PAP's bildet die STED („stimulated emission depletion“) Mikroskopie.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Profilin1 zu Beginn und während des Hochpunkts der Neurogenese einen wichtigen Einfluss auf das Teilungsverhalten muriner aRG und somit auch auf das Zellschicksal ihrer Tochterzellen hat. Weitere Untersuchungen könnten neue Erkenntnisse in Bezug auf die Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. Polymikrogyrie, Pachygyrie oder Lissencephalie liefern.

Des Weiteren bilden die vorliegenden Ergebnisse einen starken Hinweis darauf, dass Profilin1 in Mäusen wichtig für die native Homöostase von Mikroglia und Astrozyten sowie für eine native Plastizität der PAP's ist. Dahingehende Untersuchungen könnten neue Erkenntnisse in Bezug auf die Entstehung und das Fortschreiten von Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer und ALS bilden.

Zusammenfassung

Der dynamische Auf- und Abbau von Aktinfilamenten wird durch Aktin-bindende Proteine wie beispielsweise Profilin1 reguliert. Profilin1 reguliert dabei nicht nur die Polymerisation von Aktin-Monomeren am Aktinfilament, sondern interagiert darüber hinaus noch mit einer Vielzahl anderer Liganden. Es ist an einer Vielzahl von Prozessen im gesamten Körper beteiligt (z.B. Zellmigration, Proliferation und Apoptose) und wird mit diversen Erkrankungen wie beispielsweise vaskulärer Hypertrophie und Hypertension, Diabetes, amyotrophe Lateralsklerose und dem Fragil-X-Syndrom in Verbindung gebracht. Aufgrund der Beteiligung von Profilin1 an vielen verschiedenen Prozessen wie beispielsweise der Zellmigration und Proliferation, welche für die Entwicklung des Gehirns von entscheidender Bedeutung sind, wurde für Profilin1 eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit einer gesunden Gehirnentwicklung postuliert. Untersuchungen an gehirnspezifischen Profilin1 Knock-out Mäusen konnten zeigen, dass die gehirnspezifische Deletion von Profilin1 in Mäusen zu einer Hypoplasie des Cerebellums führt, welche mit einer anormalen Schichtung des cerebellaren Kortex einhergeht. Ebenfalls auffällig war eine verringerte Größe des Neokortex, eine „partielle“ reaktive Astroglie, sowie Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche.

Die Charakterisierung dieser Einfaltungen des nativ lissencephalen Gehirns der Mäuse und die Untersuchung ihrer möglichen Ursachen sowie die nähere Analyse der reaktiven Astroglie bildeten dabei die Zielsetzung dieser Arbeit.

Innerhalb dieser Arbeit konnte herausgestellt werden, dass die gehirnspezifische Deletion von Profilin1 in Mäusen zum Hochpunkt der Neurogenese zu einem transienten Anstieg der Anzahl bRG (basaler Radialgliazellen) und zu fehllokalisierten bIP (basalen intermediären Vorläuferzellen) führte. Ausgelöst wurde diese Anomalie durch eine Verschiebung der Teilungsebene mitotischer aRG (apikaler Radialgliazellen) hin zu mehr horizontalen Teilungen. Die Verschiebung der Teilungsebene konnte auf eine verringerte Verankerung der Mitosespindel am Zellkortex zurückgeführt werden, welche sich aus einer deutlichen Verringerung des subkortikalen F-Aktin-Anteils im Aktin-Kortex der mitotischen aRG ergab.

Die erhöhte Anzahl der bRG und eine gesteigerte Mitoserate der fehllokalisierten IP führten wiederum zu einer transient erhöhten Produktion von Neuronen. In Verbindung mit der vermehrten Anzahl von Astrozyten in Schicht I des zerebralen Kortex der

adulten Profilin1-defizienten Mäuse lag die Vermutung nahe, dass die Einfaltungen der zerebralen Kortexoberfläche auf eine vermehrte Festigkeit einzelner Zellschichten zurückzuführen ist.

Des Weiteren konnte innerhalb dieser Arbeit die vereinzelte Proliferation reaktiver Astrozyten in den adulten Profilin1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, was für eine „vollständige“ reaktive Astrogliose sprach. Andere Studien legen nahe, dass die Deletion von Profilin1 sogar direkt für die Reaktivierung von Mikroglia und Astrozyten verantwortlich sein könnte.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht den Stellenwert von Profilin1 für die korrekte Ausrichtung der Mitosespindel in murinen aRG und liefert starke Hinweise für die Bedeutung von Profilin1 für eine natürliche Homöostase in Gliazellen. Weitere dahin gehende Untersuchungen könnten neue Erkenntnisse in Bezug auf die Entstehung und das Fortschreiten von neurodegenerativen Erkrankungen wie Polymikrogyrie, Lissencephalie oder ALS bringen.

Summary

The dynamic polymerization and depolymerization of actin filaments is regulated by actin-binding proteins such as profilin1. Profilin1 not only regulates the polymerization of actin monomers on the actin filament, but also interacts with a large number of other ligands. It is involved in a variety of processes throughout the body (e. g. cell migration, proliferation and apoptosis) and has been associated with various diseases such as vascular hypertrophy and hypertension, diabetes, amyotrophic lateral sclerosis, and fragile-x-syndrome. Due to the involvement of profilin1 in many different processes such as cell migration and proliferation, it has been postulated to play an important role in healthy brain development.

Previous studies on brain-specific profilin1 knock-out mice were able to show that the brain-specific deletion of profilin1 in mice leads to hypoplasia of the cerebellum, which is associated with abnormal stratification of the cerebellar cortex. Also striking were a reduced size of the neocortex, a “partial” reactive astrogliosis and folds of the cerebral cortex. The characterization of these folds and the investigation of their possible causes as well as the closer analysis of the reactive astrogliosis formed the aim of this work.

The present dissertation showed that the brain-specific deletion of profilin1 leads to a transient increase in the number of bRG (basal radial glia cells) and to mislocated bIP (basal intermediate progenitor cells) in the neocortex of mice. This anomaly was triggered by a shift in the division plane of mitotic aRG (apical radial glia cells) towards more horizontal divisions. The shift in the division plane was due to a reduced anchoring of the mitotic spindle to the cell cortex, which resulted from a significant reduction in the subcortical F-actin structure of mitotic aRG.

The increased number of bRG and an increased mitotic rate of the mislocated IP in turn led to a transiently increased production of neurons. In connection with the increased number of astrocytes in layer I of the cerebral cortex of the adult profilin1-deficient mice, the hypothesis arose that the folds of the cerebral cortex are due to an increased strength of individual cell layers.

Furthermore, the isolated proliferation of reactive astrocytes in the adult profilin1-deficient mice could be demonstrated, which is indicative of a “complete” reactive astrogliosis. In comparison with pre-existing studies, it was found that the deletion of

profilin1 could even be directly responsible for the reactivation of microglia and astrocytes.

The present work clarifies the importance of profilin1 for the correct alignment of the mitotic spindle in murine aRG and provides strong indications for the importance of profilin1 for natural homeostasis in glial cells. Further investigations in this direction could provide new insights into the development and progression of neurodegenerative diseases such as polymicrogyria, lissencephaly or ALS.

Literaturverzeichnis

- Agirman, G., Broix, L. and Nguyen, L. (2017) 'Cerebral cortex development: an outside-in perspective', *FEBS Letters*, 591(24), pp. 3978–3992. doi: 10.1002/1873-3468.12924.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2015) 'Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 16(12), pp. 711–726. doi: 10.1038/nrm4084.
- Alkam, D. *et al.* (2017) 'Profilin1 biology and its mutation, actin(g) in disease', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 74(6), pp. 967–981. doi: 10.1007/s00018-016-2372-1.
- Angevine, J. B. *et al.* (1969) 'Embryonic Vertebrate Central Nervous System', *Anatomical Record*, pp. 257–261.
- Arai, Y. and Taverna, E. (2017) 'Neural Progenitor Cell Polarity and Cortical Development', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(December), pp. 1–11. doi: 10.3389/fncel.2017.00384.
- Bachir, A. I. *et al.* (2017) 'Actin-based adhesion modules mediate cell interactions with the extracellular matrix and neighboring cells', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7). doi: 10.1101/cshperspect.a023234.
- Bae, H. G. *et al.* (2020) 'White matter and neurological disorders', *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea, 43(9), pp. 920–931. doi: 10.1007/s12272-020-01270-x.
- Baum, J. *et al.* (2006) 'Regulation of apicomplexan actin-based motility', *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), pp. 621–628. doi: 10.1038/nrmicro1465.
- Bellenchi, G. C. *et al.* (2007) 'N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex', *Genes and Development*, 21(18), pp.

2347–2357. doi: 10.1101/gad.434307.

Bender, M. *et al.* (2014) 'Megakaryocyte-specific Profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott-Aldrich syndrome-like platelet defect', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms5746.

Betizeau, M. *et al.* (2013) 'Precursor Diversity and Complexity of Lineage Relationships in the Outer Subventricular Zone of the Primate', *Neuron*, 80(2), pp. 442–457. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.032.

Borrell, V. (2018) 'How Cells Fold the Cerebral Cortex', *The Journal of Neuroscience*, 38(4), pp. 776–783. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1105-17.2017.

Böttcher, R. T. *et al.* (2009) 'Profilin 1 is required for abscission during late cytokinesis of chondrocytes', *EMBO Journal*, 28(8), pp. 1157–1169. doi: 10.1038/emboj.2009.58.

Budday, S., Steinmann, P. and Kuhl, E. (2015) 'Secondary instabilities modulate cortical complexity in the mammalian brain', *Philos Mag (Abingdon)*, 95(28–30), pp. 3244–3256. doi: 10.1080/14786435.2015.1024184.Secondary.

Cadwell, C. R. *et al.* (2019) 'Development and Arealization of the Cerebral Cortex', *Neuron*, 103(6), pp. 980–1004. doi: 10.1016/j.neuron.2019.07.009.

Campbell, K. and Götz, M. (2002) 'Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development', *TRENDS in Neurosciences*, 25(5), pp. 235–238.

Campbell, N., Reece, J. and Markl (Hg), J. (2005). *Biologie* (6.,aktualisierte Auflage). Pearson Studium.

Cappello, S. *et al.* (2006) 'The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface', *Nature Neuroscience*, 9(9), pp. 1099–1107. doi: 10.1038/nn1744.

- Carlsson, L. *et al.* (1977) 'Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells', *Journal of Molecular Biology*, 115(3), pp. 465–483. doi: 10.1016/0022-2836(77)90166-8.
- Chenn, A. and Walsh, C. A. (2002) 'Neural Precursors Regulation of Cerebral Cortical Size by Control of Cell Cycle Exit in Neural Precursors', *Science*, 365(2002), pp. 365–370. doi: 10.1126/science.1074192.
- Chou, F. S., Li, R. and Wang, P. S. (2018) 'Molecular components and polarity of radial glial cells during cerebral cortex development', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 75(6), pp. 1027–1041. doi: 10.1007/s00018-017-2680-0.
- Clarke, L. E. *et al.* (2018) 'Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), pp. E1896–E1905. doi: 10.1073/pnas.1800165115.
- Costa, M. R. *et al.* (2008) 'Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex', *Development*, 135(1), pp. 11–22. doi: 10.1242/dev.009951.
- Dasgupta, K. and Jeong, J. (2019) 'Developmental Biology of the Meninges', *Genesis*, 57(3). doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Davey, R. J. and Moens, P. D. (2020) 'Profilin: many facets of a small protein', *Biophysical Reviews*. Biophysical Reviews. doi: 10.1007/s12551-020-00723-3.
- Dehay, C. and Kennedy, H. (2007) 'Cell-cycle control and cortical development', *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), pp. 438–450. doi: 10.1038/nrn2097.
- Dehay, C., Kennedy, H. and Kosik, K. S. (2015) 'The Outer Subventricular Zone and Primate-Specific Cortical Complexification', *Neuron*. Elsevier Inc., 85(4), pp. 683–694. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.060.

- Dominguez, R. and Holmes, K. C. (2011) 'Actin structure and function', *Annual Review of Biophysics*, 40(1), pp. 169–186. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
- Di Donato, N. *et al.* (2017) 'Lissencephaly: Expanded imaging and clinical classification', *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 173(6), pp. 1473–1488. doi: 10.1002/ajmg.a.38245.
- Englund, C. *et al.* (2005) 'Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex', *Journal of Neuroscience*, 25(1), pp. 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.
- Van Essen, D. C., Donahue, C. J. and Glasser, M. F. (2018) 'Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex', *Brain Behav Evol.*, 91(3), pp. 158–169. doi: 10.1159/000489943.Development.
- Feng, L., Hatten, M. E. and Heintz, N. (1994) 'Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS', *Neuron*, 12(4), pp. 895–908. doi: 10.1016/0896-6273(94)90341-7.
- Ferreira, L. T. *et al.* (2018) 'Dissecting the role of the tubulin code in mitosis', *Methods in Cell Biology*, 144, pp. 33–74. doi: 10.1016/bs.mcb.2018.03.040.
- Fietz, S. A. *et al.* (2010) 'OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 13(6), pp. 690–699. doi: 10.1038/nn.2553.
- Fietz, S. A. and Huttner, W. B. (2011) 'Cortical progenitor expansion , self-renewal and neurogenesis — a polarized perspective', *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 21(1), pp. 23–35. doi: 10.1016/j.conb.2010.10.002.
- Florio, M. and Huttner, W. B. (2014) 'Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex', *Development*, 141(11), pp. 2182–2194. doi:

10.1242/dev.090571.

Frederiksen, K. and McKay, R. D. (1988) 'Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(4), pp. 1144–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3357014>.

Gal, J. S. *et al.* (2006) 'Molecular and Morphological Heterogeneity of Neural Precursors in the Mouse Neocortical Proliferative Zones', *J Neurosci.*, 26(3), pp. 1045–1056. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking.

Galatro, T. F. *et al.* (2017) 'Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 20(8), pp. 1162–1171. doi: 10.1038/nn.4597.

Ge, W.-P. and Jia, J.-M. (2016) 'Local production of astrocytes in the cerebral cortex', *Neuroscience*, 323(3), pp. 3–9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.057.Local.

Götz, M. and Huttner, W. B. (2005) 'The cell biology of neurogenesis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), pp. 777–788. doi: 10.1038/nrm1739.

Götz, M., Stoykova, A. and Gruss, P. (1998) 'Pax6 Controls Radial Glia Differentiation', *Neuron*, 21, pp. 1031–1044.

Gratzner, H. G. (1982) 'Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine : A New Reagent for Detection of DNA Replication Placental Mononuclear Phagocytes as a Source of Interleukin-1', *Science*, 218(October), pp. 474–475. doi: 10.1126/science.7123245.

Guarnieri, F. C. *et al.* (2018) 'Disorders of neurogenesis and cortical development', *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 20(4), pp. 20–23. doi: 10.1007/978-3-642-40308-8_2.

Guerrini, R. and Dobyns, W. B. (2014) 'Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes', *Lancet Neurol.*, 13(7), pp. 710–726. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70040-7.Malformations.

Hansen, D. V. *et al.* (2010) 'Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7288), pp. 554–561. doi: 10.1038/nature08845.

Hardwick, L. J. A. *et al.* (2015) 'Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system', *Cell and Tissue Research*, 359(1), pp. 187–200. doi: 10.1007/s00441-014-1895-8.

Haubensak, W. *et al.* (2004) 'Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), pp. 3196–3201. doi: 10.1073/pnas.0308600100.

Henty-Ridilla, J. L., Juanes, M. A. and Goode, B. L. (2017) 'Profilin Directly Promotes Microtubule Growth through Residues Mutated in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Current Biology*, 27(22), pp. 3535-3543.e4. doi: 10.1016/j.cub.2017.10.002.

Hevner, R. F. *et al.* (2006) 'Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: Conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus', *Neuroscience Research*, 55(3), pp. 223–233. doi: 10.1016/j.neures.2006.03.004.

Hevner, R. F. (2019) 'Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development', *Journal of Anatomy*, 235(3), pp. 616–625. doi: 10.1111/joa.12939.

Higginbotham, H. *et al.* (2013) 'Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 16(8), pp. 1000–1007. doi: 10.1038/nn.3451.

Howard, B., Chen, Y. and Zecevic, N. (2006) 'Cortical progenitor cells in the developing human telencephalon', *Glia*, 53(1), pp. 57–66. doi: 10.1002/glia.20259.

- Hu, E. *et al.* (2001) 'Molecular Cloning and Characterization of Profilin-3: A Novel Cytoskeleton-Associated Gene Expressed in Rat Kidney and Testes', *Nephron Experimental Nephrology*, 9(4), pp. 265–274. doi: 10.1159/000052621.
- Hurst, V., Shimada, K. and Gasser, S. M. (2019) 'Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair', *Trends in Cell Biology*. The Authors, 29(6), pp. 462–476. doi: 10.1016/j.tcb.2019.02.010.
- Jäkel, S. and Dimou, L. (2017) 'Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(February), pp. 1–17. doi: 10.3389/fncel.2017.00024.
- Jha, M. K. *et al.* (2019) 'Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation', *Neuroscientist*, 25(3), pp. 227–240. doi: 10.1177/1073858418783959.
- Jin, H. Y. *et al.* (2012) 'ACE2 deficiency enhances angiotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production', *PLoS ONE*, 7(6), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0038502.
- Jockusch, B. M., Murk, K. and Rothkegel, M. (2007) *The profile of profilins*, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Jossin, Y. (2020) 'Molecular mechanisms of cell polarity in a range of model systems and in migrating neurons', *Molecular and Cellular Neuroscience*. Elsevier, 106(February), p. 103503. doi: 10.1016/j.mcn.2020.103503.
- Kadzik, R. S., Homa, K. E. and Kovar, D. R. (2020) 'F-Actin Cytoskeleton Network Self-Organization through Competition and Cooperation', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 36, pp. 35–60. doi: 10.1146/annurev-cellbio-032320-094706.
- Kamei, Y. *et al.* (1998) 'Visualization of mitotic radial glial lineage cells in the developing rat brain by Cdc2 kinase-phosphorylated vimentin', *Glia*, 23(3), pp. 191–199. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199807)23:3<191::aid-glia2>3.0.co;2-8.

Kettenmann, H. *et al.* (2011) 'Physiology of microglia', *Physiological Reviews*, 91(2), pp. 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.

Kiaei, M. *et al.* (2018) 'ALS-causing mutations in profilin-1 alter its conformational dynamics: A computational approach to explain propensity for aggregation', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-31199-7.

Kirchhof, K. *et al.* (2003) 'Fokale kortikale dysplasien: Neuroradiologische befunde und differenzialdiagnosen', *RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Rontgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren*, 175(8), pp. 1056–1063. doi: 10.1055/s-2003-40916.

Kullmann, J. A. *et al.* (2012) 'Profilin1 is required for glial cell adhesion and radial migration of cerebellar granule neurons', *EMBO Reports*. Nature Publishing Group, 13(1), pp. 75–82. doi: 10.1038/embor.2011.211.

Kullmann, J. A. *et al.* (2019) 'Profilin1-Dependent F-Actin Assembly Controls Division of Apical Radial Glia and Neocortex Development', *Cerebral Cortex*, pp. 1–16. doi: 10.1093/cercor/bhz321.

Lambrechts, A. *et al.* (1997) 'The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences.', *The EMBO Journal*, 16(3), pp. 484–494. doi: 10.1121/1.396954.

LaMonica, B. E. *et al.* (2012) 'OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease', *Curr Opin Neurobiol. Author manuscript*, 22(5), pp. 747–753. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4002.BONE.

LaMonica, B. E. *et al.* (2013) 'Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms2647.Mitotic.

Lassing, I. and Lindberg, U. (1985) 'Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin', *Nature*, 314(6010), pp. 472–474. doi:

10.1038/314472a0.

Lepanto, P., Badano, J. L. and Zolessi, F. R. (2016) 'Neuron's little helper: The role of primary cilia in neurogenesis', *Neurogenesis*. Taylor & Francis, 3(1), pp. 1–9. doi: 10.1080/23262133.2016.1253363.

Lian, G. *et al.* (2019) 'Cytoskeletal associated filamin a and RhoA affect neural progenitor specification during mitosis', *Cerebral Cortex*, 29(3), pp. 1280–1290. doi: 10.1093/cercor/bhy033.

Liu, W. A. *et al.* (2018) 'PARD3 dysfunction in conjunction with dynamic HIPPO signaling drives cortical enlargement with massive heterotopia', *Genes and Development*, 32(11–12), pp. 763–780. doi: 10.1101/gad.313171.118.

Llinares-Benadero, C. and Borrell, V. (2019) 'Deconstructing cortical folding: genetic, cellular and mechanical determinants', *Nature Reviews Neuroscience*. Springer US, 20(3), pp. 161–176. doi: 10.1038/s41583-018-0112-2.

Maiato, H. and Logarinho, E. (2014) 'Mitotic spindle multipolarity without centrosome amplification', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 16(5), pp. 386–394. doi: 10.1038/ncb2958.

McKenna, W. L. *et al.* (2015) 'Mutual regulation between Satb2 and Fezf2 promotes subcerebral projection neuron identity in the developing cerebral cortex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), pp. 11702–11707. doi: 10.1073/pnas.1504144112.

Mennella, V. *et al.* (2014) 'Amorphous no more: subdiffraction view of the Pericentriolar Material architecture', *Trends in Cell Biology*, 24(3), pp. 188–197. doi: 10.4324/9780080940441.

Meunier, S. and Vernos, I. (2012) 'Microtubule assembly during mitosis – from distinct origins to distinct functions?', *Journal of Cell Science*, 125(12), pp. 2805–2814. doi: 10.1242/jcs.092429.

Michaelsen-Preusse, K. *et al.* (2016) 'Neuronal profilins in health and disease: Relevance for spine plasticity and Fragile X syndrome', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), pp. 3365–3370. doi: 10.1073/pnas.1516697113.

Minnerup, L. (2012) *Anatomische Veränderungen im Gehirn der PFN1flx/flx, Nestin-cre Mäuse, Bachelorarbeit.*

Minnerup, L. (2014) *Immunhistochemische Analyse des Cerebellums und des cerebralen Cortex von Profilin1 Knock out-Mäusen, Masterarbeit.*

Miyata, T. *et al.* (2004) 'Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells', *Development*, 131(13), pp. 3133–3145. doi: 10.1242/dev.01173.

Molotkov, D. *et al.* (2013) 'Calcium-induced outgrowth of astrocytic peripheral processes requires actin binding by Profilin-1.', *Cell calcium*. Netherlands, 53(5–6), pp. 338–348. doi: 10.1016/j.ceca.2013.03.001.

Molyneaux, B. J. *et al.* (2007) 'Neuronal subtype specification in the cerebral cortex', *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), pp. 427–437. doi: 10.1038/nrn2151.

Mora-Bermúdez, F., Matsuzaki, F. and Huttner, W. B. (2014) 'Specific polar subpopulations of astral microtubules control spindle orientation and symmetric neural stem cell division', *eLife*, 3, pp. 1–31. doi: 10.7554/elife.02875.

Mouneimne, G. *et al.* (2012) 'Differential Remodeling of Actin Cytoskeleton Architecture by Profilin Isoforms Leads to Distinct Effects on Cell Migration and Invasion', *Cancer Cell*, 22(5), pp. 615–630. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Nagai, T. *et al.* (2013) 'Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase', *Journal of Cell Science*, 126(19), pp. 4369–4380. doi: 10.1242/jcs.127209.

Namba, T. and Huttner, W. B. (2017) 'Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex', *WIREs Dev Biol*, 6(1). doi: 10.1002/wdev.256.

Nejedla, M. *et al.* (2016) 'Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics', *Molecular Biology of the Cell*, 27(15), pp. 2381–2393. doi: 10.1091/mbc.E15-11-0799.

Nelson, B. R. *et al.* (2013) 'Dynamic interactions between intermediate neurogenic progenitors and radial glia in embryonic mouse neocortex: Potential role in Dll1-notch signaling', *Journal of Neuroscience*, 33(21), pp. 9122–9139. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0791-13.2013.

Noctor, S. C. *et al.* (2004) 'Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases', *Nature Neuroscience*, 7(2), pp. 136–144. doi: 10.1038/nn1172.

Nölle, A. *et al.* (2011) 'The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin', *Human Molecular Genetics*, 20(24), pp. 4865–4878. doi: 10.1093/hmg/ddr425.

Obermann, H. *et al.* (2005) 'Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation', *Molecular Human Reproduction*, 11(1), pp. 53–64. doi: 10.1093/molehr/gah132.

Ostrem, B., Di Lullo, E. and Kriegstein, A. R. (2017) 'oRGs and mitotic somal translocation - a role in development and disease', *Curr Opin Neurobiol.*, 42, pp. 61–67. doi: 10.1016/B978-0-12-809762-5.00014-0.

Pae, M. and Romeo, G. R. (2014) 'The multifaceted role of profilin-1 in adipose tissue inflammation and glucose homeostasis', *Adipocyte*, 3(1), pp. 69–74. doi: 10.4161/adip.26965.

- Paridaen, J. T. and Huttner, W. B. (2014) 'Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system', *EMBO Reports*, 15(4), pp. 351–364. doi: 10.1002/embr.201438447.
- Paridaen, J. T. M. L., Wilsch-Bräuninger, M. and Huttner, W. B. (2013) 'Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division', *Cell*, 155(2), pp. 333–344. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.060.
- Pehar, M. *et al.* (2017) 'Role and Therapeutic Potential of Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Current Pharmaceutical Design*, 23(33), pp. 5010–5021. doi: 10.2174/1381612823666170622095802.
- Pekny, M. and Nilsson, M. (2005) 'Astrocyte activation and reactive gliosis', *Glia*, 50(4), pp. 427–434. doi: 10.1002/glia.20207.
- Pietro, F., Echard, A. and Morin, X. (2016) 'Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view', *EMBO reports*, 17(8), pp. 1106–1130. doi: 10.15252/embr.201642292.
- Pilaz, L. J. *et al.* (2009) 'Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), pp. 21924–21929. doi: 10.1073/pnas.0909894106.
- Pilo-Boyl, P. *et al.* (2007) 'Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior', *EMBO Journal*, 26(12), pp. 2991–3002. doi: 10.1038/sj.emboj.7601737.
- Pilz, G. A. *et al.* (2013) 'Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type', *Nature Communications*, 4, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms3125.

Pinto-Costa, R. *et al.* (2020) 'Profilin 1 delivery tunes cytoskeletal dynamics toward CNS axon regeneration', *Journal of Clinical Investigation*, 130(4), pp. 2024–2040. doi: 10.1172/JCI125771.

Pinto-Costa, R. and Sousa, M. M. (2020) 'Profilin as a dual regulator of actin and microtubule dynamics', *Cytoskeleton*, 77(3–4), pp. 76–83. doi: 10.1002/cm.21586.

Plata, A. *et al.* (2018) 'Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(June), pp. 1–17. doi: 10.3389/fnmol.2018.00215.

Pollard, T. D. (2016) 'Actin and Actin-Binding Proteins', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), pp. 1–17.

Popov, A. *et al.* (2021) 'Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity', *Aging Cell*, 20(3), pp. 1–14. doi: 10.1111/accel.13334.

Prota, A. E. *et al.* (2013) 'Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase', *Journal of Cell Biology*, 200(3), pp. 259–270. doi: 10.1083/jcb.201211017.

Rakic, P. (1974) 'Neurons in Rhesus Monkey Visual Cortex: Systemic Relation between Time of Origin and Eventual Disposition', *Science*, 183.

Rakic, P. (2008) 'Confusing cortical columns', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), pp. 12099–12100. doi: 10.1073/pnas.0807271105.

Rash, B. G. *et al.* (2019) 'Gliogenesis in the outer subventricular zone promotes enlargement and gyrification of the primate cerebrum', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), pp. 7089–7094. doi: 10.1073/pnas.1822169116.

Reemst, K. *et al.* (2016) 'The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development', *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(November), pp. 1–28. doi:

10.3389/fnhum.2016.00566.

Reillo, I. *et al.* (2011) 'A Role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex', *Cerebral Cortex*, 21(7), pp. 1674–1694. doi: 10.1093/cercor/bhq238.

Reiner, O., Sapir, T. and Gerlitz, G. (2012) 'Interkinetic nuclear movement in the ventricular zone of the cortex', *Journal of Molecular Neuroscience*, 46(3), pp. 516–526. doi: 10.1007/s12031-011-9633-0.

Robel, S. *et al.* (2009) 'Conditional deletion of beta1-integrin in astroglia causes partial reactive gliosis', *Glia*, 57(15), pp. 1630–1647. doi: 10.1002/glia.20876.

Robel, S., Berninger, B. and Götz, M. (2011) 'The stem cell potential of glia: Lessons from reactive gliosis', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 12(2), pp. 88–104. doi: 10.1038/nrn2978.

Romero, C. D. J. and Borrell, V. (2015) 'Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex', *Glia*, 63(8), pp. 1303–1319. doi: 10.1002/glia.22827.

Sánchez-González, R., Bribián, A. and López-Mascaraque, L. (2020) 'Cell Fate Potential of NG2 Progenitors', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-66753-9.

Schenk, J. *et al.* (2009) 'Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), pp. 16487–16492. doi: 10.1073/pnas.0908928106.

Schneider, F. (2017) *Bedeutung von Profilin 1 für die Entwicklung des Neocortex und der Morphologie von dendritischen Dornen im Hippocampus, Masterarbeit.*

Schutt, C. E. *et al.* (1993) 'The structure of crystalline profilin-beta-actin.', *Nature*, 365(6449), pp. 810–816.

- Schweinhuber, S. K. *et al.* (2015) 'Profilin isoforms modulate astrocytic morphology and the motility of astrocytic processes', *PLoS ONE*, 10(1), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0117244.
- Scott, I. S. *et al.* (2003) 'A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer', *The Journal of Pathology*. Wiley-Blackwell, 201(2), pp. 187–197. doi: 10.1002/path.1444.
- Shitamukai, A., Konno, D. and Matsuzaki, F. (2011) 'Oblique Radial Glial Divisions in the Developing Mouse Neocortex Induce Self-Renewing Progenitors outside the Germinal Zone That Resemble Primate Outer Subventricular Zone Progenitors', *Journal of Neuroscience*, 31(10), pp. 3683–3695. doi: 10.1523/jneurosci.4773-10.2011.
- Shitamukai, A. and Matsuzaki, F. (2012) 'Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors', *Development Growth and Differentiation*, 54(3), pp. 277–286. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01345.x.
- Smart, I. H. M. *et al.* (2002) 'Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey.', *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 12(1), pp. 37–53.
- Stahl, R. *et al.* (2013) 'Trnp1 regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate', *Cell*, 153(3), pp. 535–549. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.027.
- Subramanian, L., Calcagnotto, M. E. and Paredes, M. F. (2020) 'Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(January), pp. 1–17. doi: 10.3389/fncel.2019.00576.
- Sugioka, K. and Bowerman, B. (2018) 'Combinatorial Contact Cues Specify Cell Division Orientation by Directing Cortical Myosin Flows', *Developmental Cell*. Elsevier

Inc., 46(3), pp. 257-270.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.020.

Sun, T. and Hevner, R. F. (2014) 'Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(4), pp. 217–232. doi: 10.1038/nrn3707.

Tabata, H. (2015) 'Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis', *Frontiers in Neuroscience*, 9(APR), pp. 1–7. doi: 10.3389/fnins.2015.00114.

Tang, T. *et al.* (2019) 'HDAC1 and HDAC2 Regulate Intermediate Progenitor Positioning to Safeguard Neocortical Development', *Neuron*. Elsevier Inc., 101(6), pp. 1117-1133.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.007.

Tavano, S. *et al.* (2018) 'Insm1 Induces Neural Progenitor Delamination in Developing Neocortex via Downregulation of the Adherens Junction Belt-Specific Protein Plekha7', *Neuron*, 97(6), pp. 1299-1314.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.052.

Taverna, E., Götz, M. and Huttner, W. B. (2014) *The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155801.

Taverna, E. and Huttner, W. B. (2010) 'Neural progenitor nuclei IN motion', *Neuron*. Elsevier Inc., 67(6), pp. 906–914. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.027.

Toma, K. and Hanashima, C. (2015) 'Switching modes in corticogenesis: Mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex', *Frontiers in Neuroscience*, 9(274), pp. 1–18. doi: 10.3389/fnins.2015.00274.

del Toro, D. *et al.* (2017) 'Regulation of Cerebral Cortex Folding by Controlling Neuronal Migration via FLRT Adhesion Molecules', *Cell*, 169(4), pp. 621-635.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.012.

Tramontin, A. D. *et al.* (2013) 'Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ)', *Cerebral Cortex*, 13, pp. 580–587.

Tronche, F. *et al.* (1999) 'Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety', *Nature Genetics*, 23(1), pp. 99–103. doi: 10.1038/12703.

Tsurumi, H. *et al.* (2016) 'Afadin is localized at cell-cell contact sites in mesangial cells and regulates migratory polarity', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 96(1), pp. 49–59. doi: 10.1038/labinvest.2015.133.

Turrero García, M. *et al.* (2015) 'S-phase duration is the main target of cell cycle regulation in neural progenitors of developing ferret neocortex', *Journal of Comparative Neurology*, 524(3), pp. 456–470. doi: 10.1002/cne.23801.

Uzquiano, A. *et al.* (2018) 'Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation', *Journal of Neurochemistry*, 146(5), pp. 500–525. doi: 10.1111/jnc.14338.

Verkhatsky, A. and Nedergaard, M. (2018) 'Physiology of astroglia', *Physiological Reviews*, 98(1), pp. 239–389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016.

Walker, T. L. *et al.* (2007) 'The Doublecortin-Expressing Population in the Developing and Adult Brain Contains Multipotential Precursors in Addition to Neuronal-Lineage Cells', *Journal of Neuroscience*, 27(14), pp. 3734–3742. doi: 10.1523/jneurosci.5060-06.2007.

Wang, L., Hou, S. and Han, Y.-G. (2016) 'Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex', *Nat Neurosci.*, 19(7), pp. 888–896. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Wang, X. *et al.* (2011) 'A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(5), pp. 555–562. doi: 10.1038/nn.2807.

Wilsch-Bräuninger, M. *et al.* (2012) 'Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination', *Development*, 139(1), pp. 95–105. doi: 10.1242/dev.069294.

Wilsch-Bräuninger, M., Florio, M. and Huttner, W. B. (2016) 'Neocortex expansion in development and evolution - from cell biology to single genes', *Current Opinion in Neurobiology*, 39(April), pp. 122–132. doi: 10.1016/j.conb.2016.05.004.

Witke, W. *et al.* (2001) 'Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development', *PNAS*, 697, pp. 49–64. doi: 10.1007/978-1-60327-198-1.

Witke, W. (2004) 'The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes', *Trends in Cell Biology*, 14(8), pp. 461–469. doi: 10.1016/j.tcb.2004.07.003.

Wong, F. K. *et al.* (2015) 'Sustained pax6 expression generates primate-like basal radial glia in developing mouse neocortex', *PLoS Biology*, 13(8). doi: 10.1371/journal.pbio.1002217.

Zhou, B., Zuo, Y. X. and Jiang, R. T. (2019) 'Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases', *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(6), pp. 665–673. doi: 10.1111/cns.13123.

Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Gießen:

Althaus, Mike
Bindereif, Albrecht
Clauss, Wolfgang
Dammann, Reinhard
Dorresteijn, Adriaan
Ekschmitt, Klemens
Fronius, Martin
Göttlich, Richard
Holz, Anne
Hughes, Jonathan
Kauschke, Ellen
Klug, Gabriele
Lakes-Harlan, Reinhard
Pingoud, Alfred
Schindler, Siegfried
Strauss, Johannes
Trenczek, Tina E.
van Bel, Aart J. E.
Werding, Bernd
Wilke, Thomas
Wisseemann, Volker
Wolters, Volkmar

Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn **Prof. Dr. Marco Rust** für die Einstellung als Doktorandin und die Vergabe eines sehr spannenden Themas.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Lara-Jane Kepser** und **Isabell Metz** für die aufmunternden Gespräche und den vielen Spaß, den wir zusammen hatten. Ich verbinde mit euch viele sehr schöne Erinnerungen und Ihr wart der Grund, warum ich trotz allem immer wieder gerne ins Labor gekommen bin.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen weiteren Mitstreitern **Felix Schneider**, **Anika Heinze** und **Cara Schuldt**. Ihr habt mich in guten wie auch schlechten Zeiten meiner Doktorarbeit unterstützt wir hatten viel Spaß zusammen.

Des Weiteren möchte ich mich bei **Dr. Jan Kullmann**, für seine fachliche und persönliche Unterstützung sowie die anregenden Diskussionen bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls allen **technischen Mitarbeitern** sowie **Dr. Birgit Rost** und **Dr. Christian Wrocklage** für das stets freundliche Arbeitsklima und die angenehmen Gespräche.

Besonders Danken möchte ich zudem **Beatrix Stadler**, deren Kommentare maßgeblich zur endgültigen Finalisierung meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich ebenso meiner Mama **Karin Meyer**, die immer für mich und meine Jungs da ist und stets versucht hat, mich bei meinem Vorhaben den Doktorgrad zu erlangen, zu unterstützen.

Der größte Dank gilt meinem Mann **Dr. Robert Kügler**, der mich immer wieder motiviert und mit aller Kraft dabei unterstützt hat meine Doktorarbeit gegen alle Widrigkeiten fertig zu stellen