

Aus dem Institut für Neuroanatomie
(Prof. Dr. med. J. Staiger)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Schichtenspezifische Charakterisierung
Somatostatin-exprimierender Interneurone in der GIN- und
SOMcre/tdTomato-Maus mittels neurochemischer Marker im
primären somatosensorischen Barrel-Kortex**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tatjana Fischer (geb. Kinzel)

aus

Krasnoscekovo, Russland

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. J. Staiger

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. S. Hülsmann

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 19.11.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Schichtenspezifische Charakterisierung Somatostatin-exprimierender Interneurone in der GIN- und SOMcre/tdTomato-Maus mittels neurochemischer Marker im primären somatosensorischen Barrel-Kortex“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 16.05.2018

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Großhirnrinde (Cortex cerebri) und Neokortex	1
1.2 Primärer somatosensorischer Kortex der Maus (Barrel-Kortex).....	2
1.3 GABAerge Interneurone.....	5
1.3.1 γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamatdecarboxylase (GAD)	6
1.3.2 Somatostatin (SOM)	6
1.3.3 Parvalbumin (PV)	9
1.3.4 Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)	9
1.3.5 Vesikulärer Glutamat-Transporter (VGLUT).....	9
1.4 GIN-Maus	10
1.5 SOMcre/tdTomato-Maus	11
1.6 Ziel der Dissertation	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Perfusion der Versuchstiere und Vorbereitung der Gehirne	13
2.3 Schneiden der Gehirne.....	14
2.4 Immunhistochemie (IHC) der GIN-Maus	14
2.4.1 α GABA-Färbung der GIN-Maus.....	15
2.5 Immunhistochemie (IHC) der SOMcre-Maus	16
2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	17
2.7 Aufnahmen / Auszählung / Auswertung	18
2.7.1 Aufnahmen	19
2.7.2 Auszählung	19
2.7.3 Auswertung.....	21
2.7.4 Kontrollen.....	23

3	Ergebnisse	25
3.1	Charakterisierung der GIN-Maus	25
3.1.1	Immunhistochemie (IHC).....	25
3.1.2	Immunhistochemie (IHC) mit GABA-Antikörpern	31
3.1.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	33
3.1.4	Vergleich von IHC und FISH	46
3.2	Charakterisierung der SOMcre-Maus.....	49
3.2.1	Immunhistochemie (IHC).....	49
3.2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	54
3.2.3	Vergleich von IHC und FISH	64
3.3	Test der SOM-Sonde mit α SOM	65
3.4	Test α DsRed (Fa. Clontech) und α RFP (Fa. Rockland)	66
4	Diskussion	68
4.1	Methodische Betrachtungen	69
4.1.1	Schnittdicke	69
4.1.2	IHC und FISH.....	69
4.1.3	Aufnahmen	71
4.1.4	Auszählung	73
4.2	Diskussion der Ergebnisse	73
4.2.1	Schichtenspezifische Verteilung der SOM-exprimierenden Interneurone.....	74
4.2.2	SOM-Zellen als inhibitorische GABAerge Interneurone	79
4.2.3	Kolokalisationen der SOM-Zellen mit PV und VIP	80
4.3	Relevanz der Studie	81
5	Zusammenfassung	84
6	Anhang	86
7	Literaturverzeichnis	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Sechsschichtiger Aufbau des Neokortex	3
Abbildung 2:	Frontaler Hirnschnitt einer Maus im Bereich des Barrel-Kortex	5
Abbildung 3:	Martinotti-Zellen einer GIN-Maus	8
Abbildung 4:	Schichtenabgrenzung im Barrel-Kortex einer GIN-Maus in der IHC.....	21
Abbildung 5:	α SOM-Immunhistochemie zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	26
Abbildung 6:	Kolumnenassoziierte Darstellung der α SOM-Immunhistochemie im Barrel-Kortex der GIN-Maus	27
Abbildung 7:	Verteilung der GFP-, Somatostatin-immunpositiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	29
Abbildung 8:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP- und Somatostatin-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus.....	31
Abbildung 9:	α GABA-Immunhistochemie zur Markierung der GABAergen Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	32
Abbildung 10:	GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der GAD1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	34
Abbildung 11:	Kolumnenassoziierte Darstellung der GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der GIN-Maus.....	35
Abbildung 12:	Verteilung der GFP-, GAD1-immunpositiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus.....	36
Abbildung 13:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP- und GAD1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	38
Abbildung 14:	SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	39
Abbildung 15:	Kolumnenassoziierte Darstellung der SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der GIN-Maus.....	40
Abbildung 16:	Verteilung der GFP-, SOM-immunpositiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus.....	41
Abbildung 17:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP- und SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	43

Abbildung 18:	PV-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der PV-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus.....	44
Abbildung 19:	VIP-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	45
Abbildung 20:	VGLUT1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der VGLUT1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	46
Abbildung 21:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der α GFP-markierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus	47
Abbildung 22:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der α SOM- und SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus im Vergleich	48
Abbildung 23:	α SOM-Immunhistochemie zur Markierung der Somatostatin-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus.....	50
Abbildung 24:	Kolumnenassoziierte Darstellung der α SOM-Immunhistochemie im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	51
Abbildung 25:	Verteilung der tdTomato-, Somatostatin-immunpositiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus ..	52
Abbildung 26:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung aller Somatostatin-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	53
Abbildung 27:	GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der GABAergen Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	55
Abbildung 28:	Kolumnenassoziierte Darstellung der GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus.....	56
Abbildung 29:	Verteilung der tdTomato-, GAD1-immunpositiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus ..	57
Abbildung 30:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der tdTomato- und GAD1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	59
Abbildung 31:	SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	60
Abbildung 32:	Kolumnenassoziierte Darstellung der SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus.....	61
Abbildung 33:	Verteilung der tdTomato-, SOM-immunpositiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus.....	62
Abbildung 34:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der tdTomato-positiven und kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus ..	64

Abbildung 35:	Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der tdTomato-Zellen in Kolokalisation mit α SOM, GAD1 und SOM im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus.....	65
Abbildung 36:	Verteilung der mit α SOM und SOM kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	66
Abbildung 37:	Antikörper-markierte Zellen in der SOMcre/tdTomato-Maus	67

1 Einleitung

1.1 Großhirnrinde (Cortex cerebri) und Neokortex

Die Großhirnrinde des Menschen besteht aus dem phylogenetisch ältesten Paleokortex mit dem Riechhirn, dem Archikortex mit dem limbischen System und einem dreischichtigen mikroskopischen Aufbau, sowie dem Neokortex. Der Neokortex, der auch als Isokortex bezeichnet wird, ist der phylogenetisch jüngste und am höchsten entwickelte Teil der Großhirnrinde. Er hat eine Oberfläche von ca. 2600 cm² und eine Dicke von 3-4 mm (Mountcastle 1997). Funktionell lässt er sich dreiteilen in die primären Felder, die der Sensorik dienen, die Sekundärfelder, die an diese angrenzen und für die ersten Verarbeitungen der Informationen zuständig sind und die Assoziationsfelder. Der Neokortex hat einen sechsschichtigen Aufbau, der parallel von der Pia mater bis zur weißen Substanz verläuft:

- I. Molekularschicht (Lamina molecularis)
- II. äußere Körnerzellschicht (Lamina granularis externa)
- III. äußere Pyramidenschicht (Lamina pyramidalis externa)
- IV. innere Körnerzellschicht (Lamina granularis interna)
- V. innere Pyramidenschicht (Lamina pyramidalis interna)
- VI. multiforme Schicht (Lamina multiformis).

Der Neokortex enthält diverse Neurone, zum einen die Pyramidenzellen und weiterhin verschiedene Nicht-Pyramidenzellen (Gilbert 1984). Die Pyramidenzellen machen ca. 70% aller kortikaler Neurone aus (Nieuwenhuys 1994), sind Projektionszellen, die Glutamat oder Aspartat als exzitatorischen Neurotransmitter verwenden. Ihr Zellkörper ähnelt, mit wenigen Ausnahmen, einer Pyramide. Sie besitzen einen Hauptdendriten (apikaler Dendrit), der Richtung Hirnoberfläche zieht und zum Teil mehrere Dendritenabgänge am Zellkörper (basale Dendriten). Sowohl der apikale Dendrit als auch die basalen Dendriten von Pyramidenzellen besitzen Dornfortsätze, sogenannte *spines* (Dornen). Die *spines* der Pyramidenzellen repräsentieren die Kontaktstellen mit präsynaptischen Zellen. Die Axone der Pyramidenzellen können zu subkortikalen Regionen ziehen und intrakortikale Kollaterale abgeben.

Zu den Nicht-Pyramidenzellen werden die exzitatorischen Körnerzellen, z. B. die *spiny stellate cells* der Schicht IV (Staiger et al. 2004), und die GABAergen Interneurone gezählt (Staiger et al. 2015). GABAerge Interneurone weisen GABA (Gamma-Aminobuttersäure =

γ-aminobutyric acid) als inhibitorischen Neurotransmitter auf. Ihre Somagröße sowie ihre dendritische und axonale Verzweigung (Feldman und Peters 1978) sind sehr variabel. Sie tragen meist keine beziehungsweise nur wenige Dornfortsätze und ihre Axone verlassen in der Regel die Hirnrinde nicht (DeFelipe et al. 2013; Markram et al. 2004; Nieuwenhuys 1994).

Neben dem sechsschichtigen Aufbau des Neokortex konnten bereits vor gut 50 Jahren Anzeichen für eine vertikale bzw. kolumnäre Organisation des Neokortex durch elektrophysiologische Stimulation von Einzelneuronen in anästhesierten Katzen und Affen gezeigt werden (Mountcastle 1957; Powell und Mountcastle 1959). Besonders auffällig ist diese kolumnäre Organisation im primären somatosensorischen Kortex, z. B. der Maus (Woolsey und Van der Loos 1970).

1.2 Primärer somatosensorischer Kortex der Maus (Barrel-Kortex)

Der primäre somatosensorische Kortex (S1) gehört zum ersten somatosensorischen Gebiet des Neokortex. Der S1 wurde ursprünglich als eine einzelne systematische somatotopische Repräsentation der Körperoberfläche durch elektrophysiologische Kartografieprozeduren definiert (Woolsey CN und Fairman 1946). Der Begriff S1 ist jedoch nicht immer für die gleiche Ausdehnung im Gehirn verschiedener Arten zutreffend (Kaas 1983). Bereits 1937 wurde an Affen und Katzen festgestellt, dass S1 aus den Brodmann-Arealen 3, 1 und 2 besteht (Marshall et al. 1937).

Bei Mäusen und Ratten wird der primäre somatosensorische Kortex als Barrel-Kortex (*barrel*, Fass) bezeichnet, genauer als S1BF (BF = *barrel field*, Fass-Feld, siehe Abbildung 2). Er repräsentiert die Vibrissen bzw. die Schnurrhaare der Nagetiere, die ein wichtiges System zur taktilen Sinneswahrnehmung darstellen (Glassman 1994). Dieser entspricht bei Mäusen dem Areal III (Caviness 1975). Erstaunlicherweise haben nicht alle Tiere mit Schnurrhaaren auch Barrels (Woolsey et al. 1975a).

Der Barrel-Kortex besteht aus sechs Schichten (Abb. 1), die parallel zur pialen Oberfläche ausgerichtet sind und besitzt eine kolumnäre Organisation in vertikaler Ebene (Mountcastle 1997). Die kortikalen Schichten lassen sich durch charakteristische Zelldichten wie folgt voneinander abgrenzen.

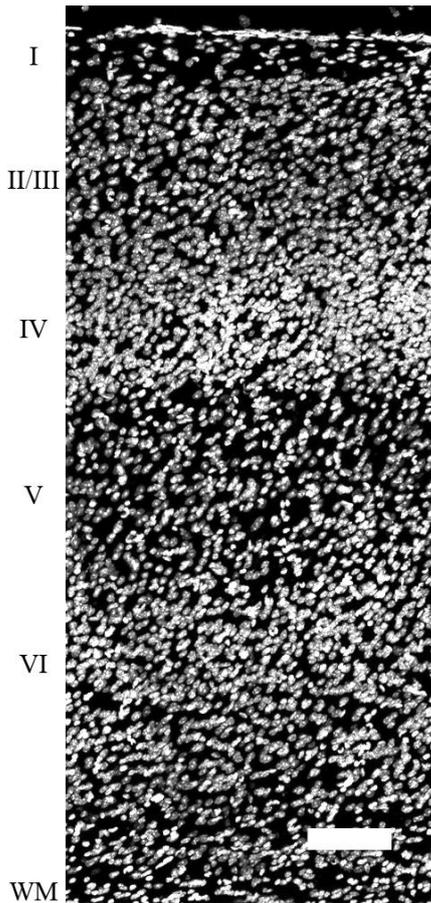


Abbildung 1: Sechsschichtiger Aufbau des Neokortex

Ausschnitt des Neokortex im primären somatosensorischen Bereich einer GIN-Maus mit dem typischen sechsschichtigen Aufbau: (I) Schicht I, (II/III) Schicht II und Schicht III, (IV) Schicht IV, (V) Schicht V bestehend aus Schicht Va und Vb, (VI) Schicht VI, (WM, *white matter*) weiße Substanz. Die Zellkerne sind mittels DAPI-Färbung als Grauwerte dargestellt.

Maßstab: 100 µm

Die erste Schicht, die auf die Pia mater folgt, ist eine recht zellarme Schicht, in der über 94% der hier vorhandenen Zellen GABAerge Nicht-Pyramidenzellen sind (Prieto et al. 1994). Sie besitzen zumeist eine heterogene Morphologie und ihre Dendriten weisen keine oder nur wenige *spines* auf. Die Mehrheit dieser Schicht-I-Zellen sind neurogliaforme Zellen mit absteigendem Axon oder in früherer Entwicklungsstufe Cajal-Retzius-Zellen und etwa ein Drittel sind multipolare Zellen (Hestrin und Armstrong 1996). Die Schicht I umfasst ca. 10% des Kortex (Gentet 2012) und lässt sich eindeutig von der zellreichen Schicht II/III abgrenzen.

Die supragranulären Schichten II und III können optisch nur schwer voneinander differenziert werden. Sie erhalten hauptsächlich excitatorische Inputs aus Schicht IV der einzelnen funktionellen kortikalen Kolumne (Lubke et al. 2000; Staiger et al. 2015). Annähernd 15% der hier vorhandenen Neurone im somatosensorischen Kortex der Maus sollen GABAerg sein (Lefort et al. 2009). Je nach Mauslinie liegen hier diverse morphologisch unterschiedliche Zelltypen, wie z. B. Korbzellen, Martinotti-Zellen, Chandelierzellen, bipolare, projizierende oder neurogliaforme Zellen, vor (Gentet 2012).

Schicht IV ist typischerweise durch das Vorhandensein von Barrels charakterisiert. Ein Barrel stellt eine multizelluläre zytoarchitektonische Einheit mit einem Durchmesser von ca. 100-400 μm dar, hat eine runde oder ellipsenartige Form und das gesamte Barrel-Feld hat eine Dimension von etwa 1100 x 2800 μm (Woolsey und Van der Loos 1970). Die absolute Dimension des Barrel-Felds kann von Tier zu Tier variieren (Riddle und Purves 1995). Die höchste Anzahl der Barrels beträgt bei der Maus maximal 209 (Welker und Woolsey 1974), wobei sie bei der Ratte sogar 220 Barrels umfasst (Welker 1971). Die Barrels des PMBF (*postero-medial barrel field* = posteromediales Barrel-Feld) sind in fünf Reihen organisiert, welche die korrespondierenden Vibrissenreihen der kontralateralen Seite darstellen (Van der Loos und Woolsey 1973). Die Repräsentation der Schnurrhaare wurde unter anderem durch induzierbare Transkriptionsfaktoren wie C-Fos bewiesen (Staiger et al. 2000; Staiger et al. 2002). Die Barrels des Maus-Kortex erhalten spezifische thalamische Afferenzen (Lorente de Nó 1938; Staiger et al. 1996). Neurone in der Schicht IV können in zwei Hauptklassen gegliedert werden: 85% mit zum einzelnen Barrel orientierten Dendriten und 15% mit Dendriten, die zu zwei oder mehr Barrels ziehen (Woolsey et al. 1975b). Zellen aus der Barrelwand tendieren dazu, ihre Dendriten in Richtung Barrelzentrum auszurichten (Simons und Woolsey 1984).

Schicht V ist eine zellärmere subgranuläre Schicht, die sich aufgrund ihrer zellulären Dichte weiter in die Schichten Va und Vb unterteilen lässt. Schicht Va nimmt etwa ein Drittel der gesamten Schicht V ein und hat eine geringere Zelldichte als Schicht Vb. Beide Schichten lassen sich sowohl morphologisch als auch funktionell differenzieren. In der Ratte enthält die obere Schicht Va mehrheitlich Pyramidenzellen von kleiner bis mittlerer Größe und die untere Schicht Vb von variabler Größe (Schubert et al. 2006). In der Maus erhält Schicht Vb direkten Input aus dem Thalamus vom VPM (Nucleus ventralis posteromedialis), während die Schicht Va von dort keinen direkten Eingang erhält (Mercier et al. 1990).

Schicht VI hat eine höhere Zelldichte als Schicht V und endet am Übergang zur weißen Substanz. Annähernd 50% der Zellen projizieren zum Thalamus. Sie enthält normale und modifizierte Pyramidenzellen sowie Sternzellen (Andjelic et al. 2009). Die Zellen haben stark ausgeprägte Verbindungen sowohl in der Schicht selbst als auch zu anderen Schichten (Zhang und Deschenes 1997).

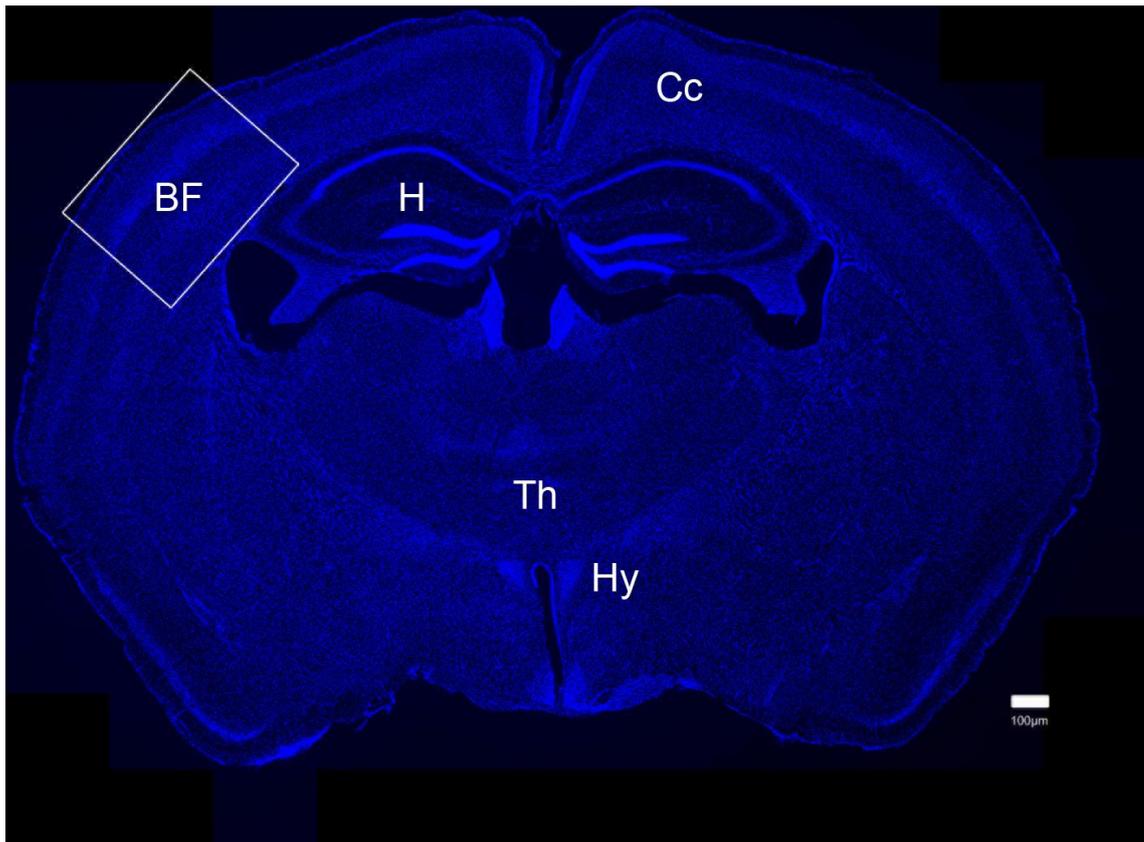


Abbildung 2: Frontaler Hirnschnitt einer Maus im Bereich des Barrel-Kortex

Epifluoreszenzaufnahme eines Frontalschnittes der GIN-Maus (10-fache Vergrößerung) in Einzelebene nach einer DAPI-Färbung (blau). Der Barrel-Kortex ist mit einem weißen Rahmen abgesetzt. BF = Barrel-Feld, CC = Corpus callosum, H = Hippocampus, Th = Thalamus, Hy = Hypothalamus. Maßstab: 100 μm

1.3 GABAerge Interneurone

15-20% der kortikalen Neurone sind inhibitorische, γ -Aminobuttersäure (GABA)-freisetzende Interneurone, die hinsichtlich ihrer anatomischen, elektrophysiologischen und molekularen Merkmale voneinander separiert werden können (Ascoli et al. 2008; Markram et al. 2004). GABAerge Interneurone lassen sich in drei distinkte molekulare Subgruppen unterteilen, die entweder eine Expression von Somatostatin (SOM), Parvalbumin (PV) oder dem ionotropen Serotoninrezeptor 3a (5HT3aR) aufweisen (Rudy et al. 2011). In der 5HT3aR-Gruppe können die Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) exprimierenden, von den nicht VIP-exprimierenden Interneuronen abgegrenzt werden (Pfeffer et al. 2013; Rudy et al. 2011). In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass circa zwei Drittel aller Interneurone entweder PV, SOM oder VIP exprimieren (Xu et al. 2010) und in der Maus klar getrennte Populationen bilden (Miyoshi et al. 2010). Dabei sind diese drei Hauptklassen von Interneuronen stets GABA-freisetzende Neurone (Kubota et al. 1994).

GABAerge Zellen regulieren strikt die Pyramidenzellaktivität und sind für das Gleichgewicht kortikaler Erregung verantwortlich (Klausberger und Somogyi 2008; Markram et al. 2004; McBain und Fisahn 2001). Es wird angenommen, dass es für jeden exzitatorischen Erregungsweg einen kontrollierenden inhibitorischen Schaltkreis gibt (Buzsaki und Chrobak 1995).

1.3.1 γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamatdecarboxylase (GAD)

Alle GABAergen Interneurone setzen den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) an ihren Synapsen frei, welcher die nachgeschaltete Zelle hemmt. GABA wird durch die Umwandlung des erregenden Neurotransmitters Glutamat, welcher im gesamten zentralen Nervensystem vorkommt, gebildet. Diese Transformation wird durch das GABA-Synthetisierungsenzym Glutamatdecarboxylase (GAD) ermöglicht. Das GAD1-Gen kodiert für die 67-kDa-Form GAD (GAD 67), welches ubiquitär in GABAergen Interneuronen exprimiert wird (Oliva et al. 2000). Das GAD2-Gen kodiert für die 65-kDa-Form des Proteins GAD65, welches nicht in allen GABAergen Zellen vorkommt.

Alle inhibitorischen Interneurone exprimieren GAD und wurden in größerer Anzahl in den Schichten II, IV und VI des primären somatosensorischen Kortex gefunden (Houser et al. 1983). GAD-positive Zellen mit einer Somagröße von 15-33 μm sind in den Schichten III bis VI repräsentiert und besitzen viele Dendriten, die in alle Richtungen zeigen und auf die Pyramidenzellen verschalten (Houser et al. 1983). GAD-positive Zellen mit kleineren Somata und unterschiedlichen Morphologien kommen in den Schichten II bis IV im S1 vor (Houser et al. 1983). Dabei verlassen die Axone der GABAergen Interneurone den Kortex primär nicht (Emson und Lindvall 1979).

1.3.2 Somatostatin (SOM)

Somatostatin (SOM) ist ein zyklisches Neuropeptid aus 14 Aminosäuren mit endokrinen und neuronalen Funktionen. Als Gegenspieler von gastrointestinalen Hormonen hemmt es z. B. Gastrin, so dass weniger Magensaft gebildet wird. Es ist auch an Lern- und Gedächtnisprozessen und den dadurch entstehenden Veränderungen im kortikalen inhibitorischen Netzwerk beteiligt (Cybulska-Klosowicz et al. 2013).

Im Neokortex wird SOM hauptsächlich von multipolaren und doppelt bebüschelten Zellen synthetisiert, welche meistens Martinotti-Zellen darstellen (Kawaguchi und Kubota 1996; Ma et al. 2006; Wang et al. 2004). Dort ist SOM mit GABA kolokalisiert (Kubota et al. 1994). Im Nager-Neokortex stellt SOM mit etwa 30% die zweitgrößte Population GABAerger Interneurone dar (Lee et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass SOM sehr selten mit PV koexprimiert wird (Demeulemeester et al. 1991), was auch auf mRNA-Ebene (*messenger ribonuclein acid*) nachgewiesen wurde (Cauli et al. 1997; Wang et al. 2002). Andere Wissenschaftler behaupten, dass SOM und PV nicht überlappende Populationen darstellen (Rudy et al. 2011; Xu et al. 2006; Xu et al. 2010). Einheitlich sind dagegen die Befunde, dass 30-37% der SOM-Neurone auch Calretinin-positiv sind (Gonchar et al. 2007; Xu et al. 2006). SOM-exprimierende Interneurone sind auch Reelin-positiv (Pesold et al. 1999). Weiterhin wurde im Neokortex der Maus eine Immunreaktivität der SOM-Fraktion für das Neuropeptid Y (NPY) sowie die neuronale Stickstoffmonoxid Synthase (nNOS = *neuronal nitric oxide synthase*) detektiert (Gonchar et al. 2007; Perrenoud et al. 2012). Damit weisen SOM-exprimierende Neurone eine ausgeprägte Heterogenität auf (Sohn et al. 2013). Des Weiteren wurde festgestellt, dass im S1 über 95% der Preprodynorphin (PPD)-Peptid-positiven Zellen ebenfalls SOM-positiv, und umgekehrt, dass je nach Schicht 17-79% der SOM-Neurone PPD-positiv sind (Sohn et al. 2013; Taki et al. 2000).

Zur Konnektivität Somatostatin-positiver Zellen wird derzeit intensiv geforscht. SOM-Zellen sind ausgesprochen stark mit Pyramidenzellen der Schichten II und III (Kapfer et al. 2007; Silberberg und Markram 2007) sowohl konvergent als auch divergent vernetzt. SOM-positive Zellen inhibieren Pyramidenzellen und alle anderen Subtypen von Interneuronen (Pfeffer et al. 2013) und werden in neueren Studien selbst von VIP-Interneuronen inhibiert (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013; Walker et al. 2016).

Martinotti-Zellen (MC)

Martinotti-Zellen (MC = *Martinotti cells*) wurden erstmalig 1889 von Carlo Martinotti beschrieben und 1891 von Ramon y Cajal benannt. Martinotti-Zellen (Abb. 3) sind multipolare oder doppelt gebüschelte Neurone, die sowohl in oberen kortikalen (Schicht II/III) als auch in unteren (IV und V) Schichten vorkommen. MC wurden

ebenfalls in Schicht VI gefunden (Wang et al. 2004). Sie haben ein langes aufsteigendes Axon, welches sich in Schicht I buschig ausbreitet, in benachbarte Kolumnen ziehen kann und Synapsen mit den Dendriten der Pyramidenzellen bildet (Silberberg und Markram 2007; Wang et al. 2004). Teile des Axons kontaktieren die Terminalen von oberflächlichen und tiefen Pyramidenzellen, wobei der lokale axonale Plexus die tiefen Pyramidenzellen erreicht (Ruiz-Marcos und Valverde 1970). Als GABAerge Interneurone inhibieren sie somit die Pyramidenzellen. Entfällt die Inhibition der Pyramidenzellen durch die MC, so steigt ihre Antwort dramatisch an (Cottam 2009; Murayama et al. 2009).

MC exprimieren Somatostatin und enthalten Calbindin (Kawaguchi und Kubota 1996) sowie das Neuropeptid Y (Beal et al. 1988). Allerdings ist SOM in über der Hälfte der MC der einzige biochemische Marker und alle MC sind sowohl PV- als auch VIP-negativ (Wang et al. 2004). MC der Schicht VI sind immunpositiv für Reelin (Pesold et al. 1999). Die Somata haben diverse unterschiedliche Morphologien. So können sie in etwa 94% der Fälle ovoid oder spindelförmig sein, jedoch zeigen sie sich auch in runder, pyramidenartiger oder multipolarer Form (Wang et al. 2004). MC besitzen eine niedrige Feuerschwelle und sind damit sogenannte LTS (*low-threshold-spiking* = bei niedrigem Schwellenwert feuernde) Zellen (Goldberg et al. 2004).

In einer Studie von Xu und Callaway (2009) wurden als Ursprungsbereiche inhibitorischer Projektionen auf die Martinotti-Zellen der Schichten II/III die Schichten IV und Va gefunden. Über die in Schicht V vorkommenden Martinotti-Zellen ist bezüglich ihrer funktionellen oder strukturellen Eingänge noch nichts bekannt.

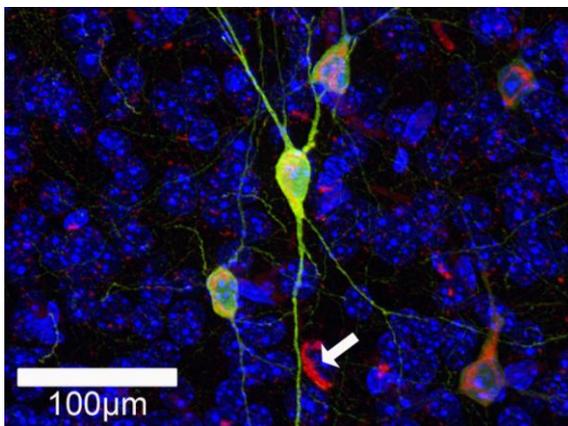


Abbildung 3: Martinotti-Zellen einer GIN-Maus

Eigene Aufnahme eines Schnittes mit ApoTome, Einzelebene, Maßstab 100 µm. Markierungen: GIN-Zellen markiert mit α GFP (grün), Somatostatin-positive Zellen markiert mit α SOM (rot) und Zellkerne aller Zellen markiert mit DAPI (blau). Es handelt sich hier um Schicht II/III Martinotti-Zellen, die sowohl mit α GFP als auch mit α SOM markiert wurden. Im unteren Bereich ist eine nur Somatostatin-positive Zelle (Pfeil) abgebildet.

1.3.3 Parvalbumin (PV)

Parvalbumin (PV) ist ein aus 109 Aminosäuren bestehendes, Calcium bindendes Protein und gehört zur Troponin C-Familie ebenso wie Calbindin und Calretinin. Es wurde im Jahr 1965 in Muskelexperimenten entdeckt (Briggs und Fleishman) und kommt auch in schnell feuernenden (FS = *fast-spiking*) Neuronen vor (Cauli et al. 1997). PV-positive Zellen im Neokortex sind mit GABA kolokalisiert (Kubota et al. 1994) und bilden dort die größte Interneuronenpopulation (Kawaguchi und Kubota 1997; Pfeffer et al. 2013). PV-Zellen sind nicht mit VIP kolokalisiert (Toledo-Rodriguez et al. 2005), jedoch können sie selten mit SOM kolokalisiert sein (Demeulemeester et al. 1991).

1.3.4 Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)

Das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) gehört zur Glucagon- und Sekretin-Familie und besteht aus 28 Aminosäuren (Mutt und Said 1974). Die Mehrheit aller VIP-Zellen (Loren et al. 1979), genauer 85-90% der VIP-Zellen sollen bipolar sein (Connor und Peters 1984). In dieser vertikalen bipolaren Form kommen sie in Schicht II/III sowie V gehäuft vor. In Schicht I sind sie von unterschiedlicher Gestalt, in Schicht IV oft multipolar und in Schicht VI horizontal bipolar (Peters et al. 1987). VIP kommt sowohl im Gastrointestinaltrakt (Bloom et al. 1975) als auch im Zentralnervensystem (ZNS) vor (Bryant 1978). VIP wird auch ein Effekt auf die Freisetzung von Vasopressin oder Oxytocin und somit eine osmoregulatorische Funktion nachgesagt (van Noorden et al. 1979). Im Neokortex ist VIP mit GABA kolokalisiert (Bayraktar et al. 1997; Kubota et al. 1994) und kann zusammen mit Cholecystokinin exprimiert werden (Porter et al. 1999). Die VIP-Neurone werden unter anderem durch nikotinerge Acetylcholinrezeptoragonisten (Porter et al. 1999) und Pyramidenzellen erregt. Ihrerseits inhibieren sie SOM-positive Zellen (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013; Walker et al. 2016).

1.3.5 Vesikulärer Glutamat-Transporter (VGLUT)

Die Aminosäure Glutamat ist ein exzitatorischer Neurotransmitter und wird im Neokortex von den Pyramidenzellen synthetisiert (Conti et al. 1987; Dori et al. 1992). Die vesikulären Glutamat-Transporter nehmen Glutamat aus dem präsynaptischen Zytoplasma in Vesikeln auf. Bei Stimulation wird Glutamat freigesetzt. Eine Fehl-, Über- oder Unterfunktion kann

zu pathologischen Zuständen wie Verhaltensstörungen (u. a. Schizophrenie) oder Neurodegenerationen (Daniels et al. 2011) führen. Es können drei unterschiedliche VGLUT unterschieden werden: VGLUT1, VGLUT2 und VGLUT3. Der VGLUT1 hieß früher Gehirn-spezifischer Natrium-abhängiger anorganischer Phosphat Transporter (BNPI = *brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter*) (Ni et al. 1994) und wurde im Jahr 2000 umbenannt (Bellocchio et al. 2000; Takamori et al. 2000). Zeitgleich wurde ein weiterer Differenzierungs-assoziiertes Natrium-abhängiger anorganischer Phosphattransporter (DNPI = *differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter*) gefunden (Aihara et al. 2000), der bei 82% der Aminosäuren homolog zum VGLUT1 war und eine Namensänderung in VGLUT2 erfuhr (Fujiyama et al. 2001; Herzog et al. 2001). Im Jahr 2002 wurde VGLUT3 entdeckt (Gras et al. 2002; Schafer et al. 2002). VGLUT1 ist der vorherrschende Transporter im Kortex, im Hippocampus und Cerebellum (Fremeau et al. 2001; Fujiyama et al. 2001). VGLUT2 kommt vermehrt in thalamischen Regionen vor (Fujiyama et al. 2001; Hisano et al. 2000; Sakata-Haga et al. 2001). VGLUT3 dagegen wurde in serotonergen, cholinergen (Fremeau et al. 2002; Gras et al. 2002) und GABAergen (Fremeau et al. 2002) Axonendigungen gefunden, was für eine Rolle von Glutamat als Kotransmitter spricht.

In dieser Studie wird die Expression von GLUT1 genutzt, um die exzitatorischen Zellen gegenüber den GABAergen Interneuronen im Barrel-Kortex abzugrenzen.

1.4 GIN-Maus

Dank der molekularen Diversität der GABAergen Interneurone konnten transgene Mauslinien geschaffen werden, bei denen entweder die Expression von fluoreszierenden Proteinen direkt mit der Expression eines Markers (GABA, GAD, SOM, PV und VIP) kombiniert ist oder indirekt über das Cre/loxP-System. Bei der GIN-Maus (GFP-exprimierende inhibitorische Neurone = *GFP-expressing Inhibitory Neurons*) wird das verstärkte grün fluoreszierende Protein (eGFP = *enhanced green fluorescent protein*) in einer Subpopulation von Somatostatin-enthaltenden Zellen im Neokortex exprimiert (Oliva et al. 2000). Zu diesen markierten Zellen zählen neben mindestens zwei weiteren Subtypen von Interneuronen hauptsächlich die Martinotti-Zellen (McGarry et al. 2010). Das eGFP-Gen befindet sich bei der GIN-Maus im GAD67-Genlocus (Oliva et al. 2000).

Die Entdeckung des GFPs fand im Jahre 1961 als Nebenprodukt während der Extraktion von einer leuchtenden Substanz der Quallenart *Aequorea aequorea* statt (Shimomura et al. 1962). Dieses Protein wurde knapp zehn Jahre nach seiner Entdeckung in grün fluoreszierendes Protein (Morin und Hastings 1971) umbenannt und seine chemische Struktur später analysiert. Das GFP besteht aus einer Peptidkette, die mehr als 200 Aminosäurereste enthält. Sein Chromophor wird von drei Aminosäureresten durch Dehydration und Dehydrogenation gebildet, wobei es Teil der Kette ist (Cody et al. 1993; Shimomura 1979). Es konnte dadurch geklont (Prasher et al. 1992) und erfolgreich in lebenden Organismen exprimiert werden (Chalfie et al. 1994).

1.5 SOMcre/tdTomato-Maus

Bei der SOMcre/tdTomato-Maus (im Folgenden als SOMcre bezeichnet) handelt es sich um eine transgene Mauslinie, bei der die Expression von fluoreszierendem Protein indirekt über das Cre/loxP-System ausgelöst wird. So exprimieren alle Zellen mit Cre-Rekombinaseaktivität zusätzlich das tdTomato-Protein, wodurch die Zellen bei entsprechender Anregung mit grünem Licht (550 nm) rot leuchten.

Nach Angaben von The Jackson Laboratory ist die Cre-Rekombinase (Cre = *Cyclization recombination*) ein Enzym, das die DNA zwischen den beiden eingebauten loxP-Positionen (loxP = *locus of x over P1*) schneidet. Sie stammt vom Bakteriophagen P1 ab (Nagy 2000). Diese Sequenz kann z. B. ein Stop-Codon sein, so dass das nachfolgende Gen nicht abgelesen und somit auch nicht exprimiert werden würde. Das LoXP ist eine 34 Basenpaar lange Sequenz (5'ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT3'), deren Position und Orientierung das Rekombinaseergebnis beeinflusst. Eine loxP-Maus trägt das gefloxtete Gen und wird mit einer Cre-Maus verpaart, die Cre mit spezifischem Promoter besitzt. In der Tochtergeneration kommt beides zusammen und die Rekombinase wird aktiv. Sie schneidet die gefloxtete (flankiert von loxP) DNA-Sequenz heraus, so dass das darauf folgende Gen nun abgelesen wird. Somit wird veranlasst, dass in der SOMcre/tdTomato-Maus alle Cre-positiven Zellen mit dem tdTomato-Signal versehen werden. Die SOMcre-Maus wurde nach Taniguchi (2011) unter Zuhilfenahme des binären Cre/loxP Expressions-Systems (Dymecki und Kim 2007) generiert.

1.6 Ziel der Dissertation

In diesem Projekt sollen die Somatostatin-exprimierenden Interneurone im Bereich des primären somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex) mittels Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) schichtenspezifisch charakterisiert werden. Hierfür werden zwei transgene Mauslinien, die GIN- und die SOMcre-Maus, eingesetzt. Die Charakterisierung erfolgt mittels der zellulären Proteine Glutamatdecarboxylase 1 (GAD1), Somatostatin (SOM) und des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA = *γ -aminobutyric acid*).

Zusätzlich wird für die GIN-Maus das grünfluoreszierende Protein (GFP) und für die SOMcre-Maus das tdTomato-Signal in die Analyse einbezogen und auf Kollokalisierung mit den oben genannten zellulären Markern untersucht. Ziel für die GIN-Maus ist es, die Spezifität und Sensitivität der GFP-Markierung für Somatostatin-exprimierende Neurone sowie deren Verteilung in den Schichten I bis VI abzuschätzen. Für die SOMcre-Maus wird analog verfahren, und sie wird zum Vergleich zur GIN-Maus herangezogen. Dazu werden 2- oder 3-fach-Markierungen an frontalen Hirnschnitten beider Mauslinien im Bereich des Barrel-Kortex angefertigt, mikroskopisch ausgewertet, mit Softwarehilfe gezählt und statistisch analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In dieser Untersuchung wurden insgesamt 27 Tiere verwendet. Hierbei handelte es sich um adulte transgene Mäuse in einem Alter zwischen 4 und 9 Monaten. In diese Studie flossen die Daten von 13 GIN-Tieren (2 Weibchen, 11 Männchen) und 12 SOMcre/tdTomato-Tieren (1 Weibchen, 11 Männchen) mit einem Gewicht von 20 bis 30 g ein.

Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen unter Standardbedingungen gehalten. Alle durchgeführten Experimente erfolgten unter strenger Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (Stand 2010). Eine Erlaubnis zur Durchführung von Eingriffen gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes lag vor.

2.2 Perfusion der Versuchstiere und Vorbereitung der Gehirne

Die Tiere wurden am Tag der Perfusion aus dem zentralen Tierstall der Universitätsmedizin Göttingen in die Neuroanatomie gebracht.

Diese wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit 10% Ketamin (0,1 ml pro 10 g Körpergewicht, Fa. Medistar®, Ascheberg, Deutschland) narkotisiert. Das Ausbleiben von Reflexen wurde durch Kneifen in Schwanz und Pfoten sowie durch Streichen einer Nadel mit der Längsseite über das Auge überprüft.

Nach dem Positionieren der Tiere auf der Perfusionsunterlage wurden die Haut am Bauch sowie das Peritoneum eröffnet und das Zwerchfell entfernt. Im Folgenden wurden die Rippen durchtrennt und das Herz dargestellt. Zur transkardialen Perfusion wurde eine stumpfe Kanüle über den linken Ventrikel in Herzachse Richtung Aorta eingeführt und durch eine Gefäßklemme gegen ein Verrutschen gesichert. Das rechte Atrium wurde eingeschnitten, um zu gewährleisten, dass der Lungenkreislauf unterbrochen wird und das Blut abfließen kann. Zum Herausspülen des Blutes wurden 20 ml einer 10%igen Sucroslösung (Saccharose gelöst in Aqua dest.) verwendet, gefolgt von 250 ml 4%iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd in 0,01 M Phosphatpuffer (PB), pH 7,4) zur homogenen Fixation des Hirngewebes. Nach der Eröffnung des Schädels wurde das Gehirn herauspräpariert und zwei Stunden in 4%iger PFA-Lösung bei 4 °C postfixiert.

Für die Immunhistochemie (IHC) wurden die Gehirne nach der Postfixation zunächst zweimal für 15 Minuten in PB (0,1 M, pH 7,4) gewaschen und dann bei 4 °C gelagert.

Die Gehirne für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden im Fixativ der Kryoprotektion (20% Sucrose in 0,1 M Phosphatgepufferter Saline (PB mit 0,9% NaCl; PBS, pH 7,4)) bei 4 °C über Nacht fixiert. Am Folgetag wurden die Gehirne kurz in Isopentan (C₅H₁₂) bei -40 °C schockgefroren und bei -80 °C für maximal 3 Monate gelagert. Für die FISH wurden nach der Fixation nur RNase-freie Materialien (u.a. Glashaken, Pinzetten, Löffel) verwendet, die vorher 4 h bei ca. 180 °C gebacken wurden. Die Lösungen wurden vor Gebrauch mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC, C₆H₁₀O₅) behandelt und am nachfolgenden Tag 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht hitzebeständige Materialien, wie z. B. Well-Platten, wurden bereits RNase-frei gekauft.

2.3 Schneiden der Gehirne

Es wurden für die IHC der GIN-Tiere und SOMcre-Tiere Frontalschnitte mit einer Dicke von 50 µm bzw. 40 µm im Bereich des Barrel-Kortex am Vibratom (VT 1200S, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt, in PB (0,1 M, pH 7,4) gesammelt und bis zum Beginn der IHC bei 4 °C darin aufbewahrt. Für die IHC der GIN-Maus wurden je vier und bei der SOMcre-Maus drei nicht konsekutive Gehirnschnitte pro verwendeten Antikörper (Ak) ausgewählt.

Gehirne der GIN- und SOMcre-Tiere, die die FISH durchlaufen sollten, wurden zunächst mittels Tissue-Tek O.C.T. Compound (Fa. Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet. Daraufhin wurden 40-µm-Frontalschnitte am Mikrotom-Kryostat (Cryo-Star HM 560 MV, Fa. Microm, Walldorf, Deutschland) bei -18 °C angefertigt. Diese wurden in 0,01 M PBS (pH 7,4) gesammelt. Für die noch am selben Tag beginnende FISH wurden pro Tier drei nicht konsekutive Schnitte für jede Sonde verwendet.

2.4 Immunhistochemie (IHC) der GIN-Maus

Zum Start der IHC wurden die Schnitte wie folgt behandelt: 3x15 min spülen in 0,1 M PB, 1x15 Minuten in 0,05 M Tris-Puffer (TB, pH 7,6), 3x15 Minuten in 0,05 M Tris gepufferter Saline-Lösung (TBS, pH 7,6) und 3x15 Minuten in TBS mit 0,5% Triton

X-100 (TBST, pH 7,6) mit anschließender Verwahrung in selbiger über Nacht und dem erneuten 3x15 min Spülen am Folgetag. Zum Ausschluss unspezifischer Antigenbindung erfolgte ein 90 minütiger Blockierschritt bei Raumtemperatur (RT) mit 0,25% Bovinem Serumalbumin (BSA, Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 10% Normalem Esel Serum (NDS = *normal donkey serum*, Fa. Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) in TBST (0,05 M, pH 7,6).

Die primären Ak wurden in der Blockierungslösung verdünnt,

- *Goat anti GFP*, 1:2000 (Fa. Abcam, Cambridge, England)
- *Rabbit anti SOM 14*, 1:5000 (Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)

für 36-72 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert und 3x15 min in TBS gespült bevor die sekundären Ak für 4 h im Dunkeln bei RT in TBS verdünnt zur Anwendung kamen:

- *Donkey anti goat*, 1:500 (Alexa Fluor (AF) 488, Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
- *Donkey anti rabbit*, 1:500 (AF 594, Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland).

Danach wurden die Gehirnschnitte 3x15 Minuten in TBS gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgte mit 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS für 5 min bei RT. Dann wurden die Schnitte 3x15 Minuten in TBS, 2x15 Minuten in TB bei RT und über Nacht in TB bei 4 °C gewaschen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, mit Aqua Poly/Mount (Fa. Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA) und Deckgläsern eingedeckt.

2.4.1 α GABA-Färbung der GIN-Maus

Zusätzlich zum Standardprotokoll für die Perfusion (siehe 2.2) wurde bei der α GABA-Färbung bei einem GIN-Tier die Fixierung mit Zusatz von 15Vol% Pikrinsäure und 0,25% Glutaraldehyd durchgeführt. Weiterhin wurde das fixierte Gewebe im Vorfeld der IHC (siehe 2.4) mit 1% Natrium-Borohydrid (in 0,1 M PB, pH 7,4) behandelt und anschließend 3x15 min in 0,1 M PB gewaschen. Durch diese Schritte sollte das Signal-Hintergrund-Verhältnis verbessert werden. In der anschließenden IHC wurden die

primären Ak *Mouse anti GABA*, 1:2000 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und *Rabbit anti GABA*, 1:2000 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), sowie die Sekundärantikörper *Donkey anti mouse*, 1:500 (Cy 3, Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) bzw. *Donkey anti rabbit*, 1:500 (AF 594, Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.5 Immunhistochemie (IHC) der SOMcre-Maus

Die IHC der SOMcre-Tiere erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll (siehe 2.4). Kurz zusammengefasst:

Je 2x15 min waschen in TB, TBS und TBST und Blockieren mit 0,25% BSA (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% Normalem Ziegen Serum (NGS = *normal goat serum*, Fa. Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) in TBST für 90 Minuten bei RT. Die primären Ak wurden in der **Blockierungslösung** verdünnt,

- *Rabbit anti SOM 14*, 1:5000 (Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
- *Rabbit anti PV 25*, 1:5000 (Fa. Swant, Marly, Schweiz)
- *Rabbit anti VIP*, 1:5000 (Fa. Abcam, Cambridge, England)

für 36-72 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert, 1x5 min und 4x 15min in TBST gespült bevor der sekundäre Ak für 4 h im Dunkeln bei RT verdünnt in TBST auf die Schnitte kam

- *Goat anti rabbit*, 1:500 (AF 488, Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland).

Anschließend wurden die Gehirnschnitte in TBST (1x5 min, 2x15 min) und TBS (1x15 min) gespült. Zum Anfärben der Zellkerne wurde DAPI (Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) 1:1000 verdünnt in TBS für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte 1x15 min in TBS, 2x15 min in TB bei RT und in TB bei 4 °C über Nacht gewaschen.

Schließlich wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, mit Aqua Poly/Mount (Fa. Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA) und Deckgläsern eingedeckt.

2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die zuvor (am selben Tag) gesammelten Schnitte wurden bei RT 15 min in PBS gespült, mit 1%igem H₂O₂ in Methanol für 20 min geblockt, das Quenching mit 0,2 M HCl für 8 min, das Andauen des Gewebes mit Proteinase K (Fa. Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) für 10 min und die Fixation bei 0 °C in 4%igem PFA in 0,1 M PB (pH 7,4) für 20 min folgten. Zwischen den Schritten wurde jeweils 2x2 min mit PBS gespült. Die zweite Vorbehandlung bei RT beinhaltete die Behandlung mit einer Triethanolamin-Gebrauchslösung (1,5% Triethanolamin in H₂O, pH 8,0) und Essigsäureanhydrid (6 µl auf 1250 µl) für 10 min. Dann wurden die Schnitte für 3x15 min mit PBS und 1x15 min in 2x Standard Saline Citratpuffer (1xSSC= 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,1) gewaschen. Die Schnitte wurden 15 min in 2xSSC + Hybridisierungspuffer (HB = 50% deionisiertes Formamid, 4xSSC, 5% Dextransulfat, 25 mg/ml DNA, MB-grade aus Fischsperma, 4 mg/ml Hefe t-RNA und 1% Denhardts-Reagenz) mit einem Mischungsverhältnis von 1:1 inkubiert und 1 h in HB bei 55 °C prähybridisiert. Zum Hybridisieren wurden die nachfolgenden Sonden (0,5 µl Sonde pro 0,5 ml HB), in Hybridisierungspuffer angesetzt und für 2 Minuten bei 90 °C hitzegeschockt, damit aus der doppelsträngigen einzelsträngige DNA ohne intramolekulare Faltung entsteht. In dieser Lösung wurden die Schnitte bei 55 °C über Nacht hybridisiert.

Diese Sonden wurden in einer Ausgangskonzentration von 200 ng/µl DEPC von Dr. med. Robin Wagener zur Verfügung gestellt (Anhang Tabelle 1):

- GAD67 (AS hergestellt am 12.07.2012, 25.09.2012 und 28.01.2013),
- SOM (AS hergestellt am 30.03.2012 und 18.02.2013),
- PV (AS hergestellt 10/12),
- VIP (AS hergestellt am 21.06.12) und
- VGLUT1 (AS hergestellt am 05.03.12)

An Tag 2 wurden die Schnitte gewaschen (2x15 min in 2xSSC bei RT, 2x30 min in 2xSSC / 50% Formamid und 2x5 min in 2xSSC bei 65 °C). Die nicht gebundenen Sonden wurden durch RNase A (Fa. Marcherey-Nagel, Düren, Deutschland) in 2xSSC bei 37 °C für 35 min entfernt. Weitere Waschschrte folgten (bei RT 5 min in 2xSSC und 30 min in 2xSSC / 50% Formaldehyd, bei 65 °C 30 min in 2xSSC / 50% Formaldehyd, 15 min 0,1xSSC / 50% Formaldehyd und 2x15 min in 0,1xSSC, bei RT 2x10 min in Puffer 1 (TBS, pH 7,5)). Blockiert wurde mit 4% normalem Schaf-Serum (NSS = *normal sheep*

serum, Fa. Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) in Puffer 1 für 1 h bei RT. Nach 3x2 minütigem Waschen in Puffer 1, wurde das 0,5%ige Blockier-Reagenz (aus dem TSA Biotin System NEL 700, Fa. Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) für 1 h bei RT benutzt, bevor die Inkubation in Anti-Digoxigenin-POD 1:2000 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in 0,5%igem Blockier-Reagenz über Nacht bei 4 °C zur Sondendetektion durchgeführt wurde.

Am dritten Tag wurden die Schnitte bei RT gewaschen (3x5 min, 1x15 min in Puffer 1), zur Detektionsverstärkung 2 h mit dem TSA Biotin System NEL700 biotinyliert, erneut gewaschen, mit Streptavidin Alexa 594 bei GIN-Tieren und 488 bei SOMcre-Tieren (1:400, Fa. Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in Puffer 1 für 15 min bei RT konjugiert und anschließend 3x5 min und 2x15 min in Puffer 1 gewaschen. Danach wurde direkt die IHC zur Visualisierung der GFP-positiven Neurone der GIN-Tiere bzw. der tdTomato-positiven Neurone der SOMcre-Tiere angeschlossen. Diese Amplifikation ist durch die Abschwächung bzw. komplette Auslöschung des nativen GFP- bzw. SOM/tdTomato-Signals durch die Behandlung der Schnitte während des FISH-Protokolls notwendig. In der IHC erfolgte zuerst ein 90-minütiger Block (10% NDS für GIN, 10% NGS für SOMcre) in Puffer 1 und anschließend eine 72-stündige Inkubation mit dem primären Ak (*Goat anti GFP*, 1:2000 (Fa. Abcam, Cambridge, England) für GIN und *Rabbit anti DsRed*, 1:250 (Fa. Clontech Laboratories, Mountainview, Californien, USA) bzw. *aRFP*, 1:500 (Fa. Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, USA) für SOMcre) in Puffer 1 mit 1% NDS bzw. NGS. Die restlichen zwei Tage verliefen analog zum beschriebenen Protokoll in Abschnitt 2.4 bzw. 2.5, jedoch ohne Triton X-100. Als sekundäre Ak wurden *Donkey anti goat*, 1:500 (AF 488) bei GIN oder *Goat anti rabbit*, 1:500 (AF 594) bei SOMcre der Fa. Life Technologies verwendet.

2.7 Aufnahmen / Auszählung / Auswertung

In die Auswertung der GIN-Tiere wurden für die IHC 8 Tiere mit jeweils 3 Schnitten pro Antikörper (α SOM) und für die FISH 4 Tiere mit je 3 Schnitten pro Sonde (jeweils GAD1 und SOM) analysiert. In die SOMcre-Auswertung wurden je 6 Tiere (IHC und FISH) mit 3 Schnitten pro Ak (α SOM) beziehungsweise Sonde (GAD1 und SOM) einbezogen. Die Kortexaufnahmen erfolgten jeweils von nur einer Hemisphäre jedes Schnittes. Es wurde

die besser erhaltene Hemisphäre beziehungsweise die mit der klareren Darstellung der Barrel-Struktur ausgewählt.

2.7.1 Aufnahmen

Die nach der IHC bzw. FISH behandelten Schnitte wurden an einem Mikroskop (AxioImager.M2, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) mit dem Programm Neurolucida (Fa. MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) aufgenommen. Generell wurden zunächst pro Maus und Ak (IHC) bzw. Sonde (FISH + IHC) jeweils zwei Übersichtsaufnahmen des gesamten Gehirnschnittes bei 10-facher Vergrößerung in einer Ebene erstellt. Des Weiteren wurden Aufnahmen im Gebiet des Barrel-Kortex mit 25-facher Vergrößerung in X-Y-Z-Ebene mit dem ApoTome (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) angefertigt, um eine hochspezifische quantitative Auszählung des Stapels vornehmen zu können. Die X-Y-Ausdehnung umfasste den Bereich von der Pia mater bis zur weißen Substanz und mindestens 3-4 Barrels. Die Auflösung in der Z-Ebene betrug 1 μm . Die Aufnahmen begannen und endeten stets etwas ober- und unterhalb des Gewebes, um zu gewährleisten, dass der gesamte Schnitt zur Analyse aufgenommen wurde. Die Belichtungsintensität wurde separat in jeder der drei Exzitationswellenlängen (blau: 358 nm, grün: 488 nm und rot: 594 nm) so eingestellt, dass einige wenige Zellen minimal überbelichtet wurden. Dadurch konnte das gesamte Detektionsspektrum der Kamera ausgenutzt werden. Jeder Aufnahmescan dauerte ca. 4-6 Stunden. An der über Stunden belichteten Stelle konnten keine weiteren Aufnahmen getätigt werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe ausgebleicht wurden.

2.7.2 Auszählung

Das Auszählen der markierten Zellen, genauer deren Somata, erfolgte manuell mit der Neurolucida Software (Fa. MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA). Hierzu wurde zu Beginn eine Umrandung (*Outline Cortex* = Außenlinie des Kortexbereichs) um den auszählenden Bereich Pia mater bis weiße Substanz und mindestens 3-4 Barrels gezogen. In einem kleineren Auszählfenster fand die manuelle Markierung samt automatischer Zählung der Zellen im roten und grünen Farbkanal statt. Um Kollokalisierungen zu überprüfen, wurde zwischen den Farbkanälen hin und her geschaltet und die Kanäle übereinander gelegt. Es musste die jeweils stärkste Farbeintensität in dem

Rot- und Grünkanal übereinstimmen. War eine Zelle nur im Rot- oder Grünkanal zu sehen, wurde sie als nicht kolokalisiert bewertet und mit dem passenden Marker (für nur rot oder grün) versehen. In X-Y-Ebene am Randgebiet liegende Zellen wurden markiert, wenn sie zu mindestens 50% ihres Somas im *Outline Cortex* lagen. An den Rändern in Z-Ebene wurden die Zellen gezählt, wenn sie deutlich erkennbar über mehrere Z-Ebenen zu sehen waren. Zellen, die in nur 1-3 Z-Ebenen des Randgebiets erkennbar waren, wurden nicht mitgezählt. Die Morphologie der Zellen spielte dabei keine Rolle. Es zählte nur das Färbeergebnis (ja / nein-Entscheidung). Auf ein potentielles Durchbluten der Fluoreszenzfarbstoffe im jeweils anderen Detektionskanal wurde stets geachtet und Schnitte, die dieses Phänomen zeigten, wurden nicht in die Analyse einbezogen. In die Auszählung gingen α GFP-positive, tdTomato-positive, α SOM-positive, GAD1-positive, SOM-positive sowie in wechselnden Antigenkombinationen kolokalisierte Zellen ein.

Der blaue Kanal zeigt die DAPI-Färbung und somit alle vorhandenen Zellkerne an. Dieser Kanal wurde zum manuellen Einzeichnen der einzelnen Schichten gewählt, da er die verschiedenen Zelldichten gut darstellt, die charakteristisch sind (siehe 1.2). Es wurde darauf geachtet, dass direkt an Schichtgrenzen liegende Zellen einer Schicht zugeordnet wurden.

Da während der Behandlungen (IHC oder FISH+IHC) die Struktur der Pia beeinträchtigt oder nicht immer vollständig erhalten war, zählt sie analytisch zur zellärmeren Schicht I („Lamina I“), die sich deutlich von der zellreicheren Schicht II/III („Lamina II/III“) abgrenzen ließ. Zwischen Schicht II und III wurde entsprechend der Konvention im Nagergehirn nicht weiter differenziert. Die Barrels kennzeichneten Schicht IV („Lamina IV“). Die Abgrenzung der Schicht IV erfolgte anhand der deutlich sichtbaren Barrels. Die darunter angrenzende Schicht V („Lamina V“) wurde einerseits insgesamt betrachtet und andererseits wurde anhand der spezifischen Zelldichte zwischen der Schicht Va und Vb unterschieden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde für jede Schicht eine andere Konturfarbe gewählt (Abb. 4).

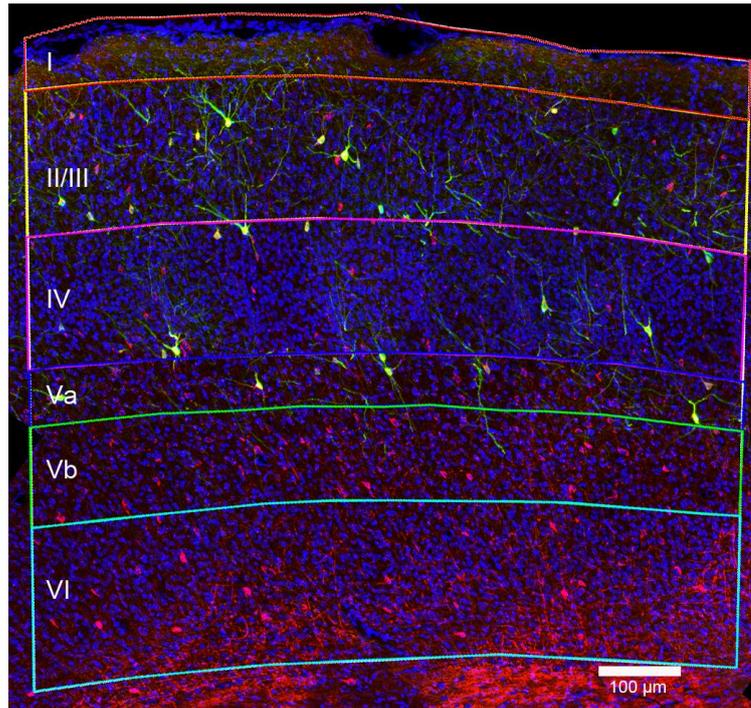


Abbildung 4: Schichtenabgrenzung im Barrel-Kortex einer GIN-Maus in der IHC

Barrel-Kortex einer GIN-Maus, 25-fache Vergrößerung

Die Schichten sind hier in verschiedenen Konturfarben umrandet: Schicht I (rot), Schicht II/III (gelb), Schicht IV (pink), Schicht Va (dunkelblau), Schicht Vb (grün) und Schicht VI (türkis).

Färbung: α GFP (grün), α SOM (rot) und DAPI (blau)

Maßstab: 100 μ m

2.7.3 Auswertung

Für die Auswertung wurden die erhobenen Zellzahlen pro Marker und Schicht eines jeden Schnittes mit dem Neuroexplorer (Fa. MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) in das Programm Excel 2010 (Fa. Microsoft, Redmond, Washington, USA) exportiert. Dort wurden die Zellzahlen für jeden Schnitt erfasst, korrigiert und für jedes Tier gemittelt, sowie eine schichtenspezifische Auswertung der Marker vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte anschließend mit SigmaPlot 12.0 (Fa. Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

Die ausgezählten Zellzahlen in jedem Schnitt wurden für eine Mittelung für folgende Parameter korrigiert: Schnittdicke und ausgezählte Fläche. Die Korrektur der Schnittdicke wurde vorgenommen, um eventuelle Ungenauigkeiten beim Schneideprozess, bei den Schrumpfungartefakten während der Färbungen und Z-Ebenenfehler bei der mikroskopischen Aufnahme des individuellen Schnittes herauszurechnen. Dazu wurden die

tatsächlich ausgezählten Z-Ebenen (= μm Schnittdicke) jedes einzelnen Schnittes jeweils separat für die beiden Tierlinien und Versuchsprotokoll (IHC bzw. FISH) erhoben. Schnitte, die mit ihren Schnittdicken nicht innerhalb der 25-75% Quartil eines jeweiligen Experimentes lagen, wurden wie folgt korrigiert: Der Mittelwert aller Schnittdicken wurde durch die angenommene Ursprungsschnittdicke (40 μm bzw. 50 μm) dividiert. Dieser durchschnittliche Schrumpfungsfaktor kann nun genutzt werden, um die Schnitte mit abweichenden Schnittdicken und deren Zellzahlen anzugleichen. Dafür wird die ursprüngliche Dicke dieses Schnittes berechnet und ins Verhältnis zur mittleren Ursprungsschnittdicke gesetzt. Dieser Korrekturfaktor (auf drei Nachkommastellen gerundet) konnte nun genutzt werden, um die Zellzahlen in diesem Schnitt anzupassen und mit den anderen Schnitten vergleichbar zu machen.

Ein Rechenbeispiel:

1. Die Schnittdicken eines Experimentes wiesen einen Mittelwert von 29 Z-Ebenen (= 29 μm) und 25-75% Quartil von 26-32 μm bei einer Ursprungsschnittdicke von 50 μm auf.
2. Durchschnittlicher Schrumpfungsfaktor: $29 \mu\text{m} : 50 \mu\text{m} = 0,58$
3. Einzelner Schnitt von 22 μm Schnittdicke (außerhalb der Quartile!) angenommene ursprüngliche Schnittdicke:
 $22 \mu\text{m} : 0,58 = 37,931034 \mu\text{m}$
4. Ermittlung des Korrekturfaktors für die Anzahl der Zellen pro 50 μm :
 $50 \mu\text{m} : 37,931034 \mu\text{m} = 1,318$ (gerundet)

In einem weiteren Schritt erfolgte eine Angleichung aller Schnitte auf eine einheitliche ausgezählte Fläche bzw. ein Volumen von 1 mm^3 . Dazu wurde die tatsächlich ausgezählte Fläche „Outline Cortex“ und dessen Volumen ($\times 40 \mu\text{m}$) auf 1 mm^3 normiert. Der Normierungsfaktor ergab sich aus $1\,000\,000\,000 \mu\text{m}^3 : \text{Volumen} (\mu\text{m}^3)$ des „Outline Cortex“ = Normierungsfaktor.

Daraufhin wurde die Zellzahl der ausgezählten Schnitte für den „Outline Cortex“ auf ein Volumen von 1 mm^3 Barrel-Kortex (Zellzahl \times Normierungsfaktor) bezogen. Die Zellzahlen in den einzelnen Schichten I bis VI wurden ebenfalls mit diesem Faktor multipliziert. Dadurch spiegeln die Zellzahlen der Schichten I bis VI den Anteil der Zellen in jeder Schicht bezogen auf 1 mm^3 Barrel-Kortex wieder und geben **keine** Zelldichte pro mm^3 an.

Die Auswertung wurde getrennt nach Tierlinien GIN und SOMcre/tdTomato, sowie nach den eingesetzten Methoden IHC und FISH durchgeführt. Dabei wurden für jeden ausgezählten Schnitt die Zellzahlen erhoben und anschließend die Mittelwerte (*mean*), Standardfehler (SEM = *standard error of mean*), sowie die Standardabweichungen (SD = *standard deviation*) pro Tier bzw. Experiment mit Microsoft Excel 14.0 ermittelt. Mittels SigmaPlot 12.0 wurden die Ergebnisse graphisch aufbereitet und statistisch untersucht. Für die Bestimmung der Signifikanz wurde bei der Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der t-Test (Student's t-Test) und bei Nicht-Normalverteilung der Daten der *Rank Sum Test* (Rangsummentest) nach Wilcoxon-Mann-Whitney angewendet. Die statistische Analyse erfolgte stets anhand der Originaldaten der einzelnen Schnitte mit einem Signifikanzniveau von 0,05 (*, $p < 0,05$). Dabei wurden für den schichtenspezifischen Vergleich die Zellzahlen der einzelnen Schichten in den Versuchsblöcken untereinander (z. B. Verteilung GFP-positiver Zellen in der GIN-Maus) sowie zwischen den Versuchsblöcken (Verteilung der SOM-positiven Zellen in der GIN- und SOMcre/tdTomato-Maus) herangezogen.

2.7.4 Kontrollen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Kontrollen zur Verbesserung der Färbungen und zur Sicherstellung des hohen Standards bei den mikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Bei letzterem wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CF-LSM, SP2 der Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) einige Färbungen gesichtet und aufgenommen (20-fache Vergrößerung, 2048 x 2048 Pixel, $\Delta z = 1 \mu\text{m}$), um eine Fehlanalyse der Kolo-kalisation an den mit dem ApoTome aufgenommenen und ausgezählten Hirnschnitten zu verhindern. Bei Kolo-kalisationsstudien von neurochemischen Markern kann ein Durchbluten der Farbkanäle zu falsch-positiven Werten führen. Beim CF-LSM kann ein Durchbluten ausgeschlossen werden, da die Fluoreszenzen für jeden Farbkanal einzeln angeregt und detektiert werden können (sequenzielle Aufnahmen).

Zur Verbesserung der Färbungen und des vorhandenen immunhistochemischen Protokolls wurden zwei primäre Antikörper gegen das native tdTomato der SOMcre-Maus, *Rabbit anti DsRed* (1:250, Fa. Clontech Laboratories, Mountainview, Californien, USA) und *anti Red Fluorescent Protein* (αRFP , in den Verdünnungen 1:250, 1:500, 1:1000, Fa. Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, USA) eingesetzt und miteinander verglichen.

Des Weiteren wurde zur Überprüfung der Spezifität der eingesetzten Somatostatin-Sonde eine Kolokalisation mit dem SOM-14 Antikörper aus der IHC an einer SOMcre-Maus durchgeführt und an einem Schnitt exemplarisch ausgewertet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zwei transgene Mauslinien, die GIN-Maus und die SOMcre-Maus, unter Zuhilfenahme der Immunhistochemie (IHC) sowie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), hinsichtlich ihrer Spezifität als Marker für eine bestimmte Population von Nervenzellen im Bereich des Barrel-Kortex schichtenspezifisch untersucht und miteinander verglichen. Dazu werden insgesamt 13 GIN-Mäuse (9 für IHC und 4 für FISH) und von 12 SOMcre-Mäusen (jeweils 6 für IHC und FISH) in die Analyse einbezogen.

3.1 Charakterisierung der GIN-Maus

Die Charakterisierung der GIN-Mauslinie wird unter der Fragestellung durchgeführt, ob die GFP-Markierung in den Schichten I bis VI als spezifisch und sensitiv für die Somatostatin-exprimierenden Neurone angesehen werden kann und wie deren schichtenbezogene quantitative Verteilung ist. Die Analyse erfolgt sowohl auf Proteinebene in der Immunhistochemie als auch auf mRNA-Ebene in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Es wurden nur adulte Tiere verwendet. Die Gruppe setzte sich aus 11 Männchen und 2 Weibchen zusammen (siehe 2.1).

3.1.1 Immunhistochemie (IHC)

Für die IHC der GIN-Linie wurden Antikörper gegen Somatostatin (SOM) sowie grünfluoreszierendes Protein (GFP) an insgesamt 24 Schnitten von 8 Tieren (alle ♂) eingesetzt (siehe 2.4). Der GFP-Antikörper diente zur Verstärkung des nativen GFP-Signals in den GIN-Tieren. Für die SOM-Färbung wurde ausschließlich der SOM 14-Antikörper ausgewertet, da andere Antikörper (z. B. SOM 28-Antikörper) in vorangegangenen Versuchen kein zufriedenstellendes Ergebnis erbrachten. Von allen 24 Schnitten wurden **mittels Software-gekoppelten Mikroskops plus ApoTome** im Bereich des Barrel-Kortex (Abb. 6) Aufnahmen in 25-facher Vergrößerung angefertigt und ausgewertet (siehe Material und Methoden). Zusätzlich wurde von jedem Tier mindestens eine Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung des gesamten Hirnschnittes angefertigt (Abb. 5).

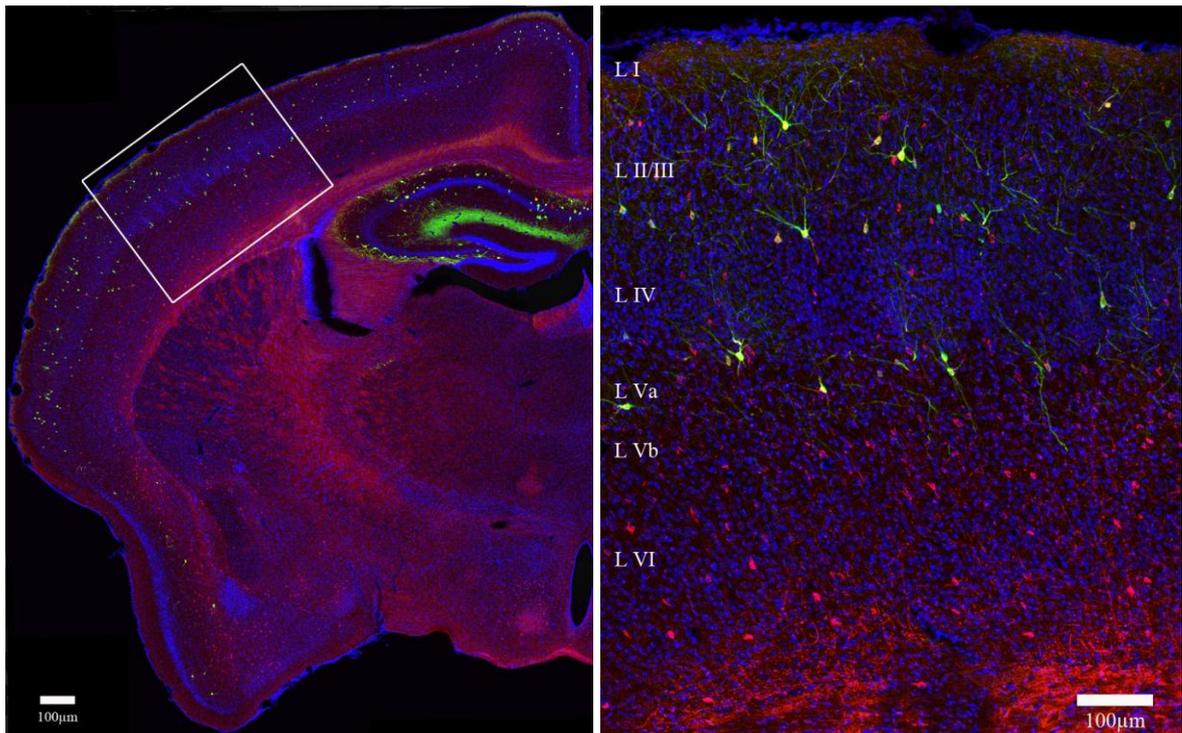


Abbildung 5: α SOM-Immunhistochemie zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Immunhistochemie an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP amplifiziert wurde (grün), die α SOM-markierten Zellen (rot), die Kolokalisation (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* des Barrel-Kortex (Teil des umrandeten Bereichs aus A). Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert. Eine Kolokalisation des transgenen GFP-Signals mit den α SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

Durch die Verwendung des GFP-Antikörpers ist in allen 24 frontalen Hirnschnitten das GFP-Signal (grün) deutlich zu erkennen (Abb. 5). Der Somatostatin-Antikörper (rot) weist eine geringe Hintergrundfärbung auf, somit sind die angefärbten Zellen, vor allem in den Schichten V und VI, klar vom Hintergrund zu unterscheiden (Abb. 5, B). In der Übersicht (Abb. 5, A) lassen sich sowohl im Neokortex als auch im Hippocampus viele GFP-positive Zellen nachweisen. Eine starke GFP-Immunreaktion weist die Molekularschicht des Gyrus dentatus auf. In der Vergrößerung im Bereich des Barrel-Kortex werden in der DAPI-Färbung die Barrels in Schicht IV, mehrere GFP- und α SOM-positive Zellen deutlich (Abb. 5, B). Auffällig ist, dass die GFP-positiven Zellen vermehrt in der Schicht II/III und Va vorkommen. Dabei ist die Kolokalisation des Somatostatin-Antikörpers mit dem GFP-Signal in den gleichen Zellen zu erkennen (Gelbfärbung), welche in der kolumnenassoziierten Darstellung der Schicht I bis VI eindrucksvoll belegt wird (Abb. 6).

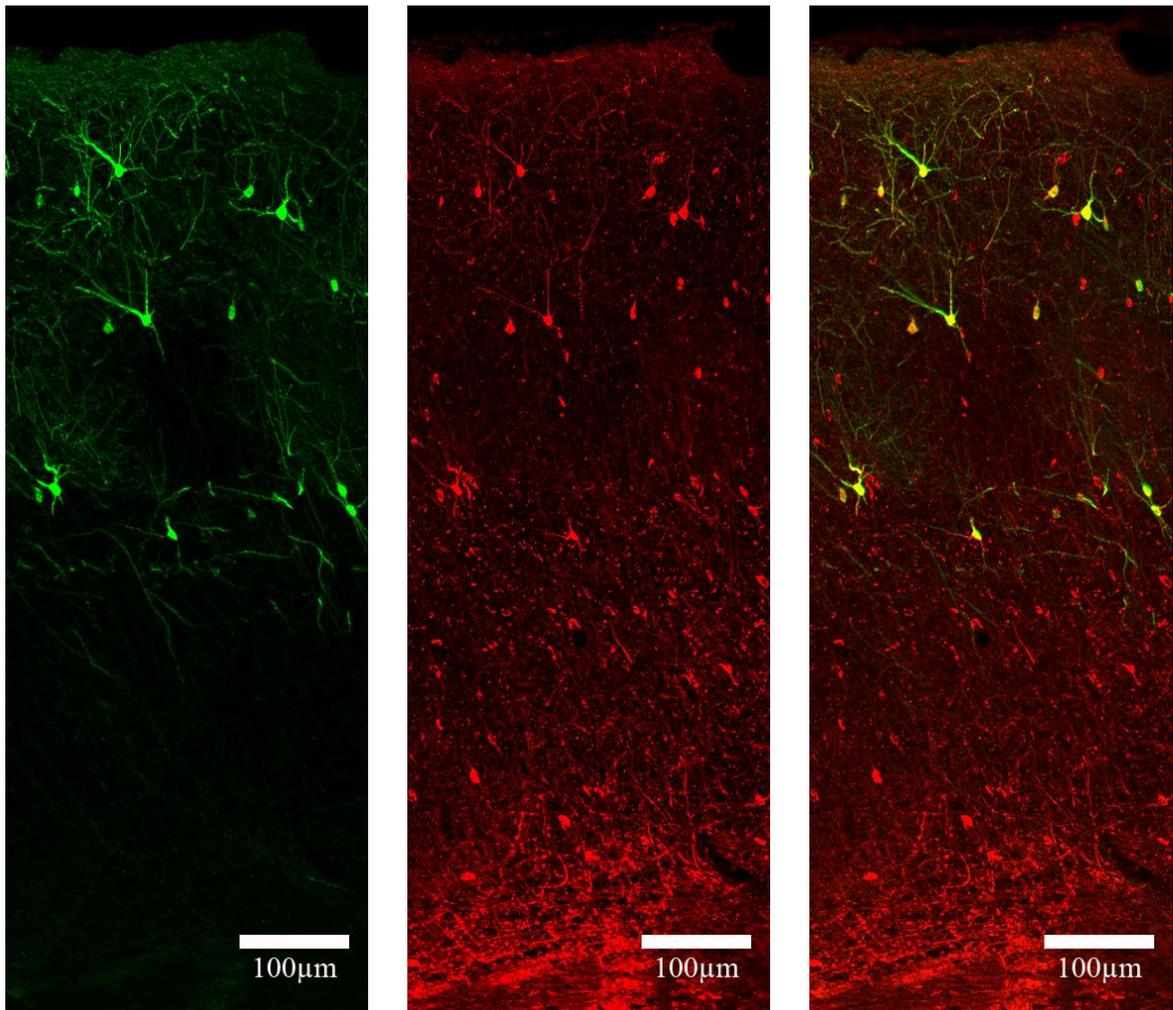


Abbildung 6: Kolumnenassoziierte Darstellung der α SOM-Immunhistochemie im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Der Auszug aus Abb. 5 zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die α SOM-markierten Zellen (rot) und die Kolokalisation (gelb) im Bereich einer **barrelasoziierten** Kolumne in der *maximum intensity projection*. In A sind die GFP-positiven Zellen, in B die Somatostatin-positiven Zellen und in C die Übereinanderlagerung beider Signale dargestellt. Eine Kolokalisation des GFP-Signals mit den α SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

In der quantitativen Analyse des Somatostatin-Antikörpers an den 24 Schnitten von 8 Tieren sind im Bereich des Barrel-Kortex alle GFP-positiven Zellen mit dem SOM-Antikörper kolokalisiert (Anhang Tab. (Tabelle) 2). In 1 mm³ Barrel-Kortex weisen $648,3 \pm 164,1$ Zellen (Mittelwert \pm SD) eine Koexpression auf und $2535,1 \pm 918,8$ Zellen besitzen ausschließlich eine Immunreaktion auf den SOM-Antikörper, demzufolge waren $3183,4 \pm 1039,1$ Somatostatin-positiv (Abb. 7 und Anhang Tab. 2).

Von all diesen Zellen befanden sich in der Schicht I $0,8 \pm 1,5$ Somatostatin-positive Zellen, die alle mit GFP kolokalisiert waren. In Schicht II/III wurden $595,3 \pm 121,0$ Somatostatin-positive Zellen ermittelt, von denen $257,2 \pm 51,8$ kolokalisiert und $338,1 \pm 87,3$ nur mit α SOM markiert waren. Die Schicht IV enthielt insgesamt $628,2 \pm 188,0$ Somatostatin-positive Zellen, $204,8 \pm 75,8$ von diesen waren mit GFP kolokalisiert, während $423,4 \pm 127,3$ kein GFP-Signal zeigten. Die $507,0 \pm 259,5$ Somatostatin-positiven Zellen der Schicht Va setzten sich aus $155,6 \pm 47,4$ kolokalisierten und $351,3 \pm 218,6$ nicht kolokalisierten SOM-Neuronen zusammen. Die Schicht Vb enthielt $833,7 \pm 343,7$ Somatostatin-positive Zellen. Davon waren nur $29,8 \pm 33,5$ mit GFP überlagert, während an $803,8 \pm 343,8$ kein GFP-Antikörper gebunden hat. Zusammenfassend beinhaltete die Schicht V (a + b) $185,5 \pm 58,7$ kolokalisierte und $1155,2 \pm 543,8$ nur Somatostatin-positive Zellen (gesamt $1340,6 \pm 580,8$). Alle $618,0 \pm 197,0$ Somatostatin-positiven Zellen der Schicht VI waren nicht mit GFP kolokalisiert.

Vergleicht man die Zellzahl von kolokalisierten und ausschließlich Somatostatin-positiven Zellen innerhalb der gleichen kortikalen Schicht so weisen sie in den Schichten II bis VI signifikante Unterschiede ($P < 0,001$) auf. Dabei ist der Unterschied in der Schicht II/III ($P = 0,048$) am geringsten und liegt damit knapp unterhalb der Irrtumswahrscheinlichkeitsgrenze von 0,05. Für die Schicht I konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, welches in der geringen Zellzahl begründet ist (Anhang Tab. 3).

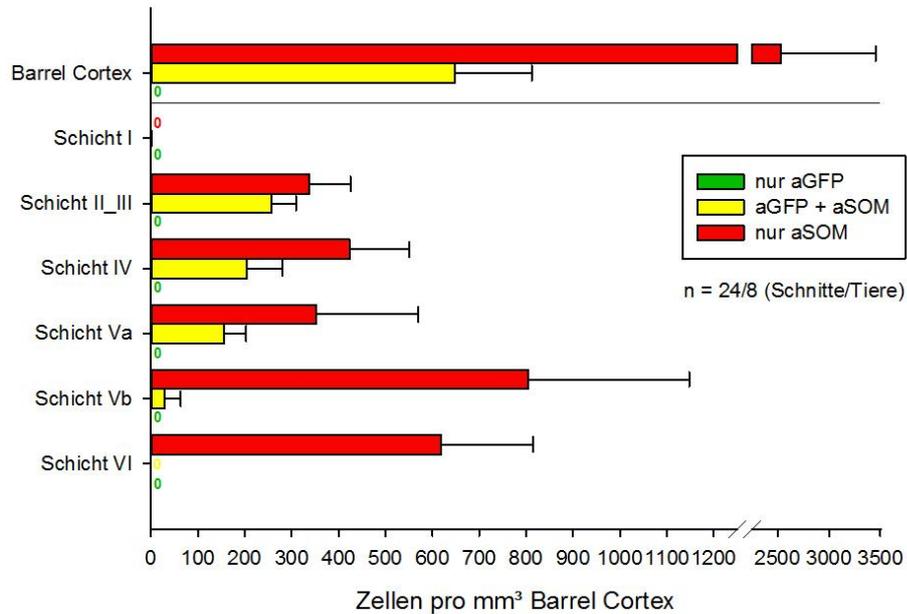


Abbildung 7: Verteilung der GFP-, Somatostatin-positiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die auf 1 mm³ Barrel-Kortex berechneten Zellzahlen für die ausschließlich GFP-positiven (grün), die ausschließlich Somatostatin-positiven Zellen (rot) sowie für die mit α GFP und α SOM kolokalisierten Zellen (gelb). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI für die analysierten 24 Schnitte von 8 Tieren dargestellt.

Es gibt keine ausschließlich GFP-positiven Zellen ohne Somatostatin-Antikörper. Die rein Somatostatin-positiven Zellen kommen in jeder Schicht häufiger vor als die kolokalisierten, am meisten in der Schicht Vb. Dagegen sind die kolokalisierten Zellen vermehrt in der Schicht II/III zu finden und nehmen Richtung weiße Substanz kontinuierlich ab.

In der Betrachtung der relativen Verteilung der GFP-positiven Zellen, der SOM-positiven Zellen und deren Kolokalisationen über die kortikalen Schichten I bis VI lassen sich folgende Ergebnisse festhalten. Nachdem in der Auszählung keine nur α GFP-markierte Zellen vorkommen, sondern immer in Kolokalisation mit dem α SOM-Signal auftreten, liegt in allen Schichten eine 100%ige Kolokalisation der GIN-Zellen mit Somatostatin vor (Anhang Tab. 4). Für die Analyse der schichtenspezifischen Verteilung der GFP-positiven Zellen und aller SOM-positiven Zellen, d.h. inklusive der mit GFP-kolokalisierten, wurden die Zellzahlen pro Schicht durch die Gesamtanzahl der GFP- bzw. SOM-Zellen in dem jeweiligen Schnitt geteilt. Dadurch wird die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen neokortikalen Schichten deutlich. Für die GFP-positiven Zellen ergibt sich folgende Verteilung: Schicht I 0,1% \pm 0,2%, Schicht II/III 39,7% \pm 8,0%, Schicht IV 31,6% \pm 11,7%, Schicht Va 24,0% \pm 7,3%, Schicht Vb 4,6% \pm 5,2% und Schicht VI 0,0% \pm 0,0% (Abb. 8, grüne Balken). Für die Verteilung aller SOM-positiver Zellen können folgende Werte festgehalten werden: Schicht I 0,0% \pm 0,0%, Schicht II/III

18,7% \pm 3,8%, Schicht IV 19,7% \pm 5,9%, Schicht Va 15,9% \pm 8,2%, Schicht Vb 26,2% \pm 10,8% und Schicht VI 19,4% \pm 6,2% (Abb. 8, rote Balken). Aus dieser Verteilung wird deutlich, dass GFP-positive Zellen selten in der obersten Schicht I vorkommen und über die Schichten II/III bis Vb kontinuierlich in ihrer Anzahl abnehmen bis in der untersten Schicht VI keine von ihnen vorhanden sind. In Schicht I konnten nur in 2 von 24 Schnitten vereinzelte GFP-positive Zellen beobachtet werden. Der Unterschied zwischen den Schichten II/III, IV und Va ist nicht signifikant ($p > 0,05$). Derweil kommen in der Schicht Vb signifikant weniger GFP-positive Zellen als in den Schichten II/III, IV und Va ($P < 0,05$, Anhang Tab. 5) vor. Die Verteilung aller SOM-positiver Zellen weist deutliche Unterschiede zu der Verteilung der GFP-Zellen auf. In der Schicht I konnten in 24 Schnitten keine rein SOM-positive Zellen beobachtet werden. Die SOM-positiven Zellen kommen in den Schichten II/III bis VI vor, wobei sie in der Schicht Vb signifikant am häufigsten anzutreffen sind (P-Werte Anhang Tab. 6).

Insgesamt beträgt der Anteil aller GFP-positiven Zellen an allen Somatostatin-positiven Zellen (Abb. 8 und Anhang Tab. 4) in 1 mm³ Barrel-Kortex im Mittel 21,3% \pm 4,6%. Auf die einzelnen Schichten verteilt liegt der Anteil GFP-positiver Zellen an allen SOM-positiven Zellen in der Schicht I bei 8,3% \pm 14,4%, am größten ist er in der Schicht II/III mit 44,4% \pm 5,7%, etwas geringer in Schicht IV bei 32,0% \pm 5,6 und in Schicht Va bei 35,2% \pm 9,2%. Signifikant geringer ist der Anteil der GFP-positiven Zellen in den Schichten Vb mit 3,5% \pm 4,2% und Schicht VI mit 0,0% \pm 0,0% (Abb. 8, grauer Balken). In der statistischen Auswertung konnten mit Ausnahme von Schicht I zu VI und Schicht IV zu Va stets signifikante Unterschiede in der Verteilung über die Schichten hinweg festgestellt werden (Anhang Tab. 7).

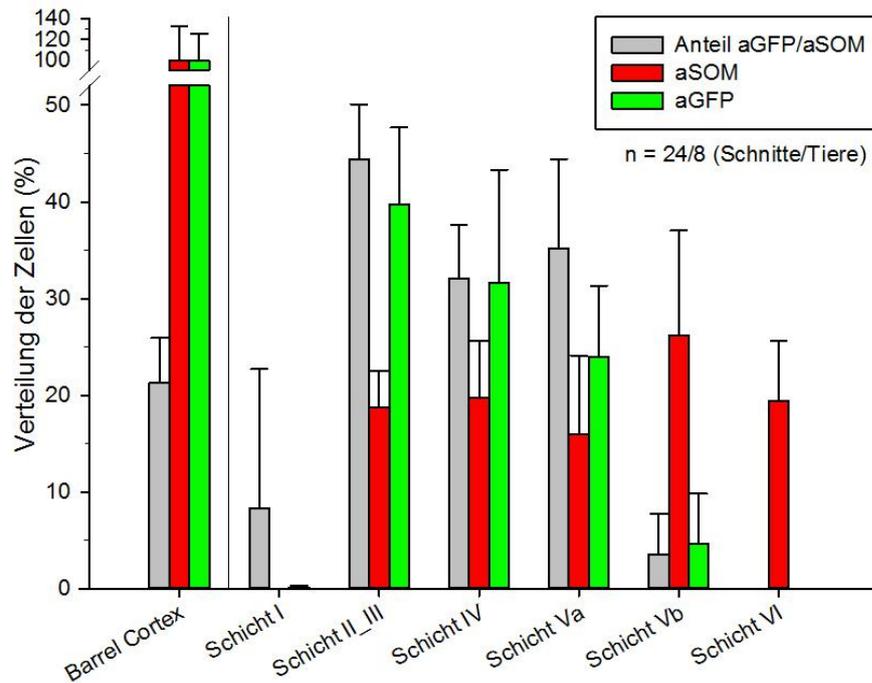


Abbildung 8: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP- und Somatostatin-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP-positiven Zellen (grün), sowie aller SOM-positiver (inklusive der mit GFP-kolokalisierten) Zellen (rot). Des Weiteren ist der Anteil der GFP-positiven an den SOM-positiven Zellen abgebildet (grau). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der 24 analysierten Schnitte von 8 Tieren dargestellt.

Insgesamt sind $21,3\% \pm 4,6\%$ aller Somatostatin-positiver Zellen auch GFP-positiv. GFP-positive Zellen kommen in den Schichten I bis Vb vor, in Schicht VI konnten keine GFP-Zellen beobachtet werden. Der größte Anteil ist in Schicht II/III ($44,4\% \pm 5,7\%$) lokalisiert und nimmt kontinuierlich Richtung weißer Substanz ab, mit einem Minimum in Schicht Vb ($3,5\% \pm 4,2\%$). SOM-positive Zellen kommen dagegen am häufigsten in den Schichten II/III bis VI vor, mit dem Maximum in Schicht Vb.

3.1.2 Immunhistochemie (IHC) mit GABA-Antikörpern

Um den Nachweis zu erbringen, dass die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus inhibitorisch sind, wurde für die weitere IHC der GIN-Linie in zwei voneinander separat durchgeführten Versuchen entweder der Antikörper *Mouse anti GABA* (1:2000, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) oder *Rabbit anti GABA* (1:2000, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gegen den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) sowie der Antikörper gegen grünfluoreszierendes Protein (GFP) in einem Tier (♀) eingesetzt (siehe 2.4.1).

Die Schnitte wurden unter einem Software-gekoppelten Mikroskop plus ApoTome im Bereich des Barrel-Kortex aufgenommen und begutachtet (siehe Material und Methoden).

Zusätzlich wurden Übersichtsaufnahmen in zehnfacher Vergrößerung des gesamten Hirnschnittes angefertigt (Abb. 9).

Der Nachweis einer Kolo-kalisation konnte nicht erbracht werden, da die Färbungen mit beiden GABA-Antikörpern zu schwach waren und zu viel Hintergrund aufwiesen. Somit war eine eindeutig reproduzierbare Auszählung nicht möglich. Die Aufnahmen des Barrel-Kortex in 25-facher Vergrößerung werden hier nicht gezeigt. Es wurden weitere Versuche mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (siehe 3.1.3) durchgeführt, um das Problem des starken Hintergrundes zu lösen und nachzuweisen, dass die GFP-positiven Zellen GABAerge Neurone sind.

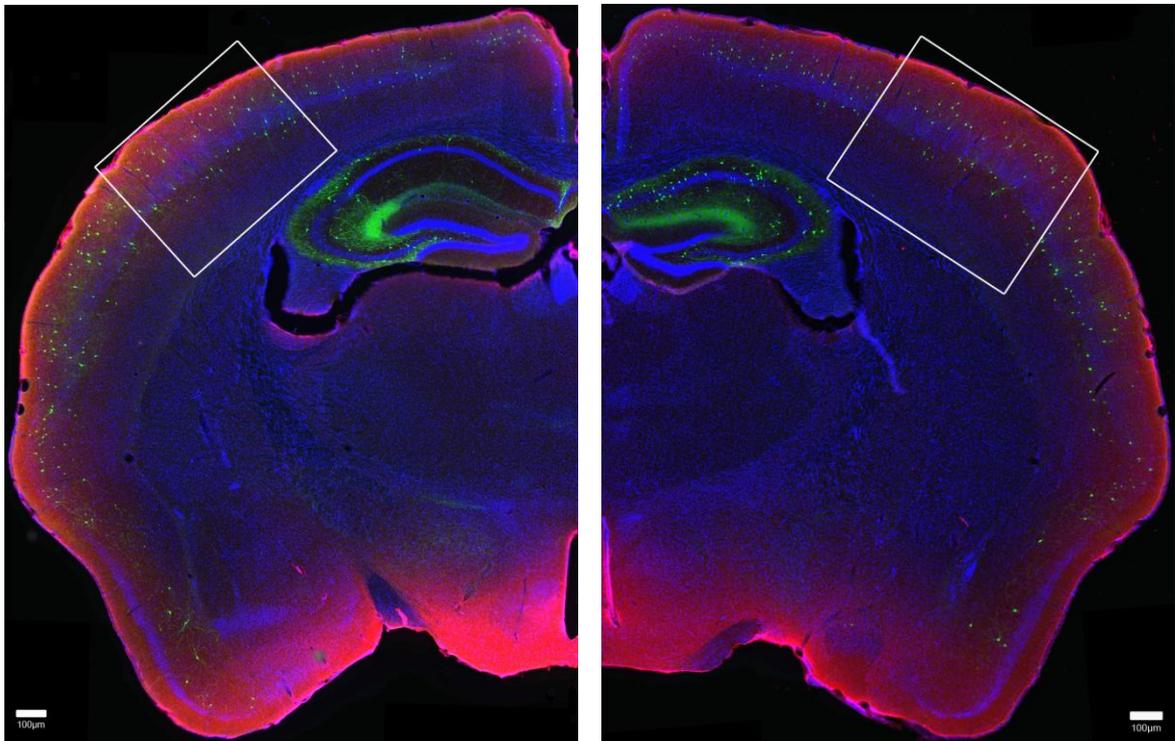


Abbildung 9: α GABA-Immunhistochemie zur Markierung der GABAergen Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Immunhistochemie der GABA-Antikörper an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die α GABA-markierten Zellen (rot), die Kolo-kalisation (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt eine rechte Hemisphäre (Einzelebene) im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck). Markierungen: α GFP (grün), Maus- α GABA (rot) und DAPI (blau).

B zeigt eine linke Hemisphäre (Einzelebene) im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck). Markierungen: α GFP (grün), Kaninchen- α GABA (rot) und DAPI (blau).

Maßstab: 100 μ m.

3.1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Zur schichtenspezifischen Charakterisierung der GIN-Maus wurde neben der Immunhistochemie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Zum einen für eine weitere Quantifizierung auf dem Level der Transkription (mRNA) und um den Nachweis zu erbringen, dass GFP-positive Zellen inhibitorische Neurone darstellen, da letzteres durch die starke Hintergrundfärbung der GABA-Antikörper nicht möglich war. Für die FISH wurden von vier adulten GIN-Tieren (drei ♂ und ein ♀) jeweils drei frontale Hirnschnitte pro Sonde (GAD1, SOM, PV, VIP und VGLUT1) verwendet. Zur Amplifikation des GFP-Signals wurde bei jedem Schnitt der GFP-Antikörper eingesetzt. Alle Sonden wurden qualitativ ausgewertet. Für die quantitative Analyse wurden die GAD1- und die SOM-Sonde mit je drei Schnitten pro Tier im Bereich des Barrel-Kortex aufgenommen (25-fache Vergrößerung mittels ApoTome) und ausgezählt. Ebenfalls wurde von jedem Tier mindestens eine Übersichtsaufnahme in 10-facher Vergrößerung des gesamten Hirnschnittes angefertigt (Abb. 10 und 11 für die GAD1-Sonde sowie Abb. 14 und 15 für die SOM-Sonde).

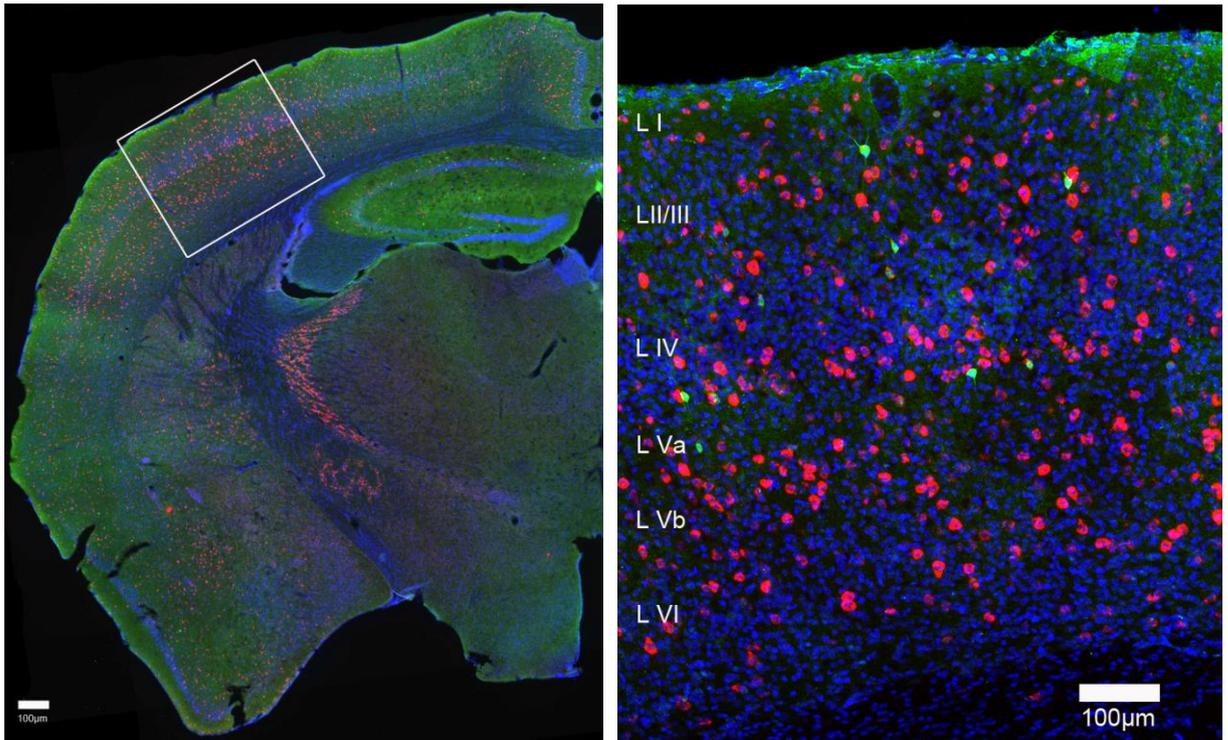


Abbildung 10: GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der GAD1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der GAD1-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die GAD1-markierten Zellen (rot), die Kolokalisation (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* des Barrel-Kortex (umrandeter Bereich aus A). Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolokalisation des transgenen GFP-Signals mit den GAD1-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

In allen 12 frontalen Hirnschnitten der GIN-Maus sind sowohl das amplifizierte transgene GFP-Signal (Abb. 10, grün) als auch die mit der GAD1-Sonde markierten GABAergen Neurone (Abb. 10, rot) deutlich dargestellt. Die erhöhte Hintergrundfluoreszenz für die α GFP-Färbung im Vergleich zu reinen immunhistochemischen Färbungen (Abb. 5 + 6) ist jedoch auffällig. Allerdings lassen sich die GFP-positiven Zellen eindeutig vom Hintergrund unterscheiden. Die GAD1-Sonde (rot) weist dagegen so gut wie keinen Hintergrund auf, so dass selbst schwach angefärbte GAD1-positive Zellen klar zu identifizieren sind (Abb. 11). In der Übersicht (Abb. 10, A) lassen sich sowohl im Neokortex als auch im Striatum und Thalamus (Nucleus reticularis) GAD1-positive Zellen nachweisen. Im Bereich des Barrel-Kortex in der Vergrößerung sind in der DAPI-Färbung die Barrels in Schicht IV, vermehrt GFP-positive Zellen in Schicht II/III und V und GAD1-positive Zellen über alle kortikalen Schichten zu sehen (Abb. 10, B). In der

kolumnenassoziierten Darstellung inklusive Aufspaltung der Fluoreszenzen (Abb. 11) der GAD1-FISH und des GFP-Signals wird die zuvor beschriebene Verteilung eindrucksvoll belegt. Dabei wird die Übereinanderlagerung und demzufolge Koexpression von GAD1 und GFP in den GFP-positiven Zellen deutlich.

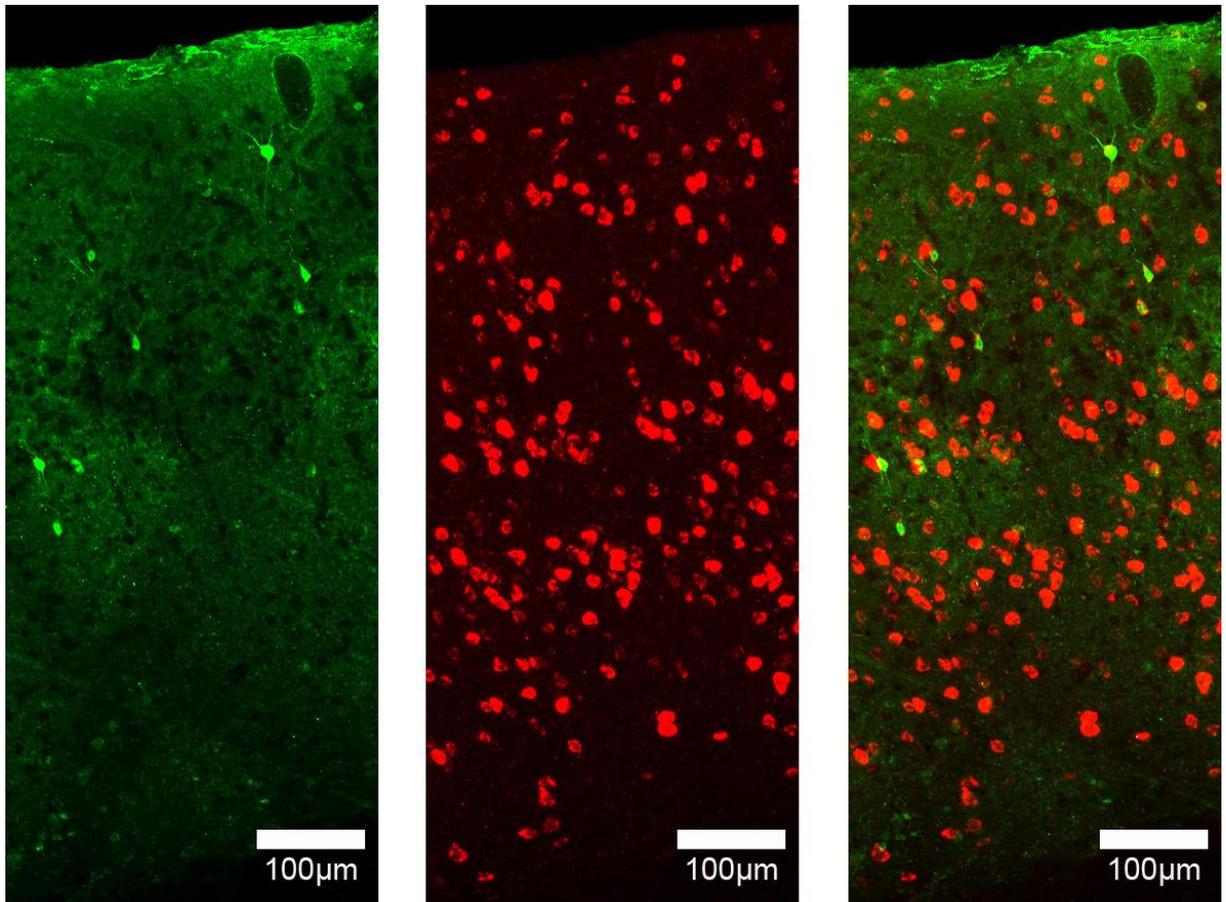


Abbildung 11: Kolumnenassoziierte Darstellung der GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Der Auszug aus Abb. 10 zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die GAD1-markierten Zellen (rot) und die Kolokalisation (gelb) im Bereich einer barrelassozierten Kolumne in der *maximum intensity projection*. In A sind die GFP-positiven Zellen, in B die GAD1-positiven Zellen und in C die Übereinanderlagerung beider Signale dargestellt. Eine Kolokalisation des GFP-Signals mit den GAD1-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

In der quantitativen Auswertung der GAD1-FISH konnte klar gezeigt werden, dass keine nur mit α GFP-markierten Neurone vorkommen (Abb. 12 und Anhang Tab. 8). Das GFP-Signal wurde nur in Kolokalisation mit dem GAD1-Signal der GAD1-markierten Zellen gefunden. Weiterhin gibt es eine große Anzahl an nur GAD1-markierten Zellen, da alle vorkommenden GABAergen Interneurone angefärbt wurden. Insgesamt konnten in 1 mm³ Barrel-Kortex 14419,0 \pm 1333,3 nur GAD1-positiv und 579,7 \pm 22,8

α GFP-positive Zellen gezählt werden (Anhang Tab. 8). In Verteilung über die Schichten kann festgestellt werden, dass sowohl in der obersten (I) als auch in der untersten Schicht (VI) des primären somatosensorischen Kortex keine α GFP-positiven Zellen vorkommen. Die Mehrheit von ihnen liegt in den Schichten II/III ($250,3 \pm 13,0$) und IV ($225,0 \pm 39,2$) und nimmt an Anzahl in den folgenden Schichten Va ($86,7 \pm 16,5$) und Vb ($17,6 \pm 5,5$) ab. Das höchste Vorkommen an GAD1-positiven Zellen liegt, ebenfalls wie die der α GFP-positiven Zellen, in den Schichten II/III ($3397,8 \pm 427,9$) und IV ($3826,2 \pm 555,5$). Im Gegensatz zu der Verteilung der α GFP-positiven Zellen, gibt es einen Anstieg der GAD1-positiven Zellen in den supragranulären Schichten und weiterhin kommen GAD1-positive Zellen in der Schicht I vor. Die Verteilung der α GFP-positiven und der GAD1-positiven Zellen ist zwischen den Schichten und innerhalb der gleichen Schicht stets signifikant unterschiedlich (Anhang Tab. 9).

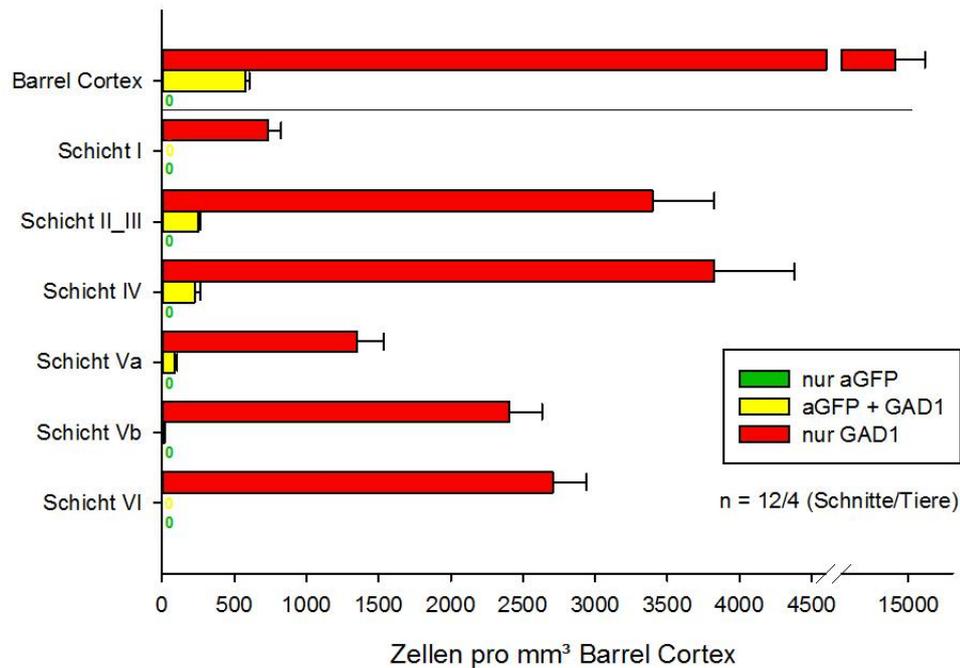


Abbildung 12: Verteilung der GFP-, GAD1-positiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die auf 1 mm^3 Barrel-Kortex berechneten Zellzahlen für die ausschließlich GFP-positiven (grün), die ausschließlich GAD1-positiven Zellen (rot) sowie für die mit α GFP und GAD1 kolokalisierten Zellen (gelb). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten 12 Schnitte von 4 Tieren dargestellt.

Es gibt keine explizit GFP-positiven Zellen ohne GAD1-Sonde. Die rein GAD1-positiven Zellen kommen in jeder Schicht häufiger vor als die kolokalisierten, am meisten in der Schicht II/III und IV. Ihre Anzahl nimmt von Schicht Va zu Schicht VI zu. Die kolokalisierten Zellen sind vermehrt in den Schichten II/III und IV zu finden und nehmen dagegen in Richtung weiße Substanz kontinuierlich ab.

Die relative Verteilung aller mit α GFP versehenen Zellen ähnelt dem Ergebnis der IHC. Es kommen keine Zellen vor, die nur mit α GFP markiert sind. Somit liegen sämtliche GFP-positiven Zellen in allen ausgezählten Schnitten und Schichten des Barrel-Kortex zu 100% in Kolokalisation mit GAD1 vor. Insgesamt beinhaltet die Schicht I sowie die Schicht VI keine GFP-positiven Zellen. In den Schichten II/III und IV befinden sich jeweils etwa 40% aller GFP-positiven Zellen (Abb. 13, grüne Balken und Anhang Tab. 10). Die obere Schicht Va enthält mit ca. 15% deutlich weniger GFP-positive Zellen, deren Zahl für die untere Schicht Vb weiter sinkt (ca. 3%). Im Gegensatz zur Verteilung der GFP-Zellen kommen GAD1-positive Neurone in allen Schichten vor. Die prozentuale Verteilung aller vorkommenden GAD1-positiven Zellen (Abb. 13, rote Balken) zeigt in den Schichten II/III und IV die höchsten Vorkommen mit jeweils etwa 24-27%. Die niedrigsten Zellzahlen finden sich in Schicht I und Schicht Va. Die Menge der GAD1-markierten Zellen steigt jedoch ab der Schicht Va Richtung weiße Substanz wieder an. Die Verteilung der GFP-positiven Zellen ist, mit Ausnahme der Verteilung von Schicht I zu Schicht VI und Schicht II/III zu IV, zwischen den Schichten signifikant verschieden (Anhang Tab. 11). In der Verteilung aller GAD1-positiven Zellen (Anhang Tab. 12) war keine Signifikanz zwischen den Schichten II/III zu IV gegeben. Alle anderen Schichten sind signifikant unterschiedlich zu einander.

Der Anteil aller GFP-positiver Zellen an der Gesamtanzahl der GAD1-markierten Zellen beträgt in 1 mm³ Barrel-Kortex $3,9\% \pm 0,3\%$ (Abb. 13, grauer Balken). Da es weder in Schicht I noch in Schicht VI GFP-positive Zellen gibt, liegt hier der Anteil dieser an allen GAD1-positiven Zellen bei $0,0\% \pm 0,0\%$ (Anhang Tab. 10). In den Schichten II/III, IV und Va liegen die Werte mit etwa 6-7% nah beieinander und sinken in Schicht Vb auf circa 0,6% deutlich ab. Ein signifikanter Unterschied konnte mit Ausnahmen der Schichten I zu VI, II/III zu IV, II/III zu Va sowie IV zu Va gezeigt werden (Anhang Tab. 13).

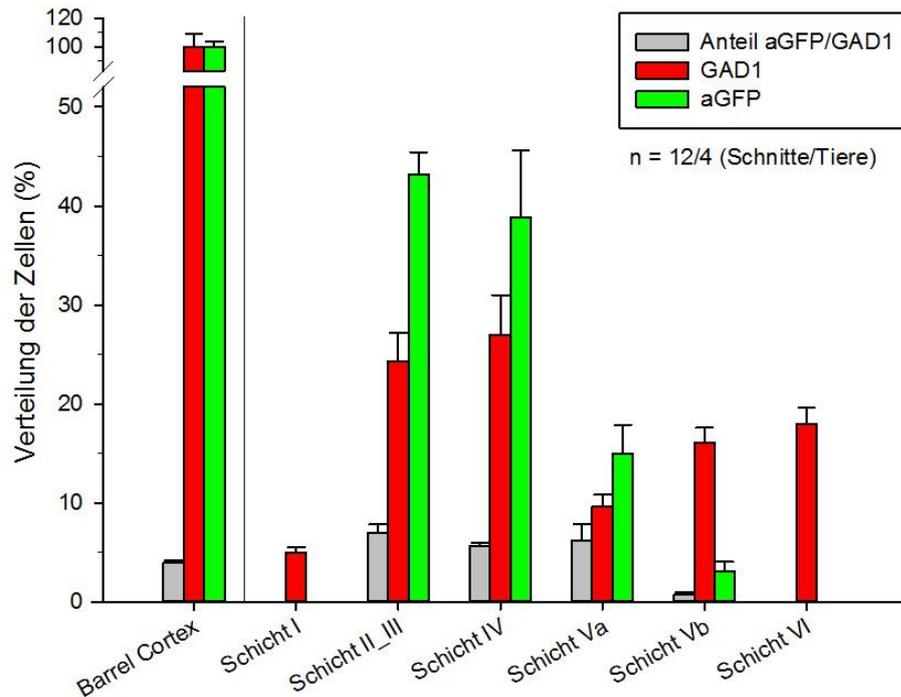


Abbildung 13: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP- und GAD1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP-positiven Zellen (grün), sowie aller GAD1-positiver (inklusive der mit GFP-kolokalisierten) Zellen (rot). Des Weiteren ist der Anteil der GFP-positiven an den GAD1-positiven Zellen abgebildet (grau). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der 12 analysierten Schnitte von 4 Tieren dargestellt.

Insgesamt sind etwa 4% aller GAD1-positiver Zellen auch GFP-positiv. Der größte Anteil ist in den Schichten II/III bis Va, der geringste in Schicht Vb lokalisiert. GFP-Zellen kommen in den Schichten II/III bis Vb vor, in den Schichten I und VI sind keine GFP-Zellen angesiedelt. Das Maximum ihres Vorkommens liegt in Schicht II/III und nimmt stetig in Richtung weißer Substanz ab. GAD1-Zellen kommen in allen Schichten vor, am häufigsten in den Schichten II/III und IV. Ihre Anzahl nimmt von Schicht Va zu Schicht VI stetig zu.

Neben der GAD1-Sonde wurde ebenso die SOM-Sonde quantitativ mittels einer FISH ausgewertet und deren Spezifität überprüft (siehe 3.3). Das native GFP-Signal der GIN-Mauslinie wurde in der FISH mit der SOM-Sonde (Abb. 14, rot) durch einen GFP-Antikörper (Abb.14, grün) in jedem der 12 Schnitte der 4 Tiere verstärkt. Trotz der geringen Hintergrundfärbung sind dennoch alle markierten Zellen deutlich von Hintergrund zu differenzieren. Bestehende Kolokalisationen sind bereits in den Aufnahmen mit 25-facher Vergrößerung gut erkennbar (Abb. 14 B und Abb. 15). Das vermehrte Vorkommen der GFP-positiven Zellen zeigt sich in den Schichten II/III bis Va.

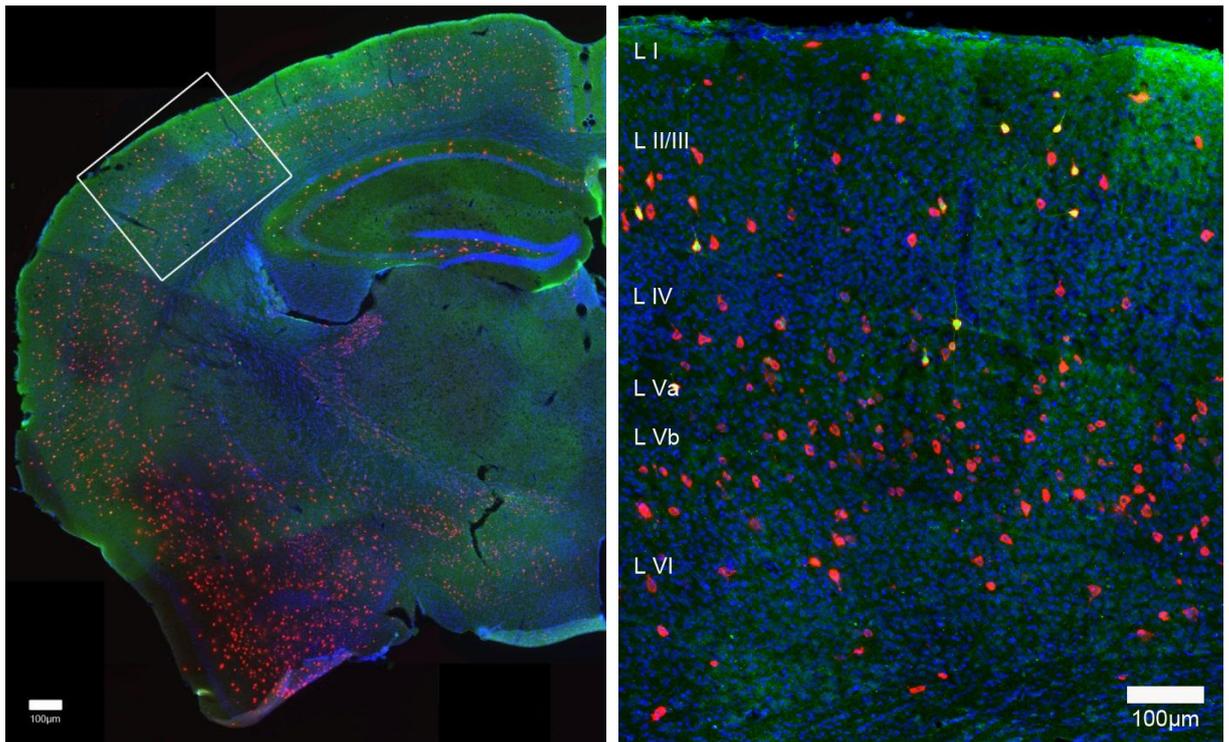


Abbildung 14: SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der SOM-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die SOM-markierten Zellen (rot), die Kolokalisation (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* des Barrel-Kortex (umrandeter Bereich aus A). Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolokalisation des transgenen GFP-Signals mit den SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

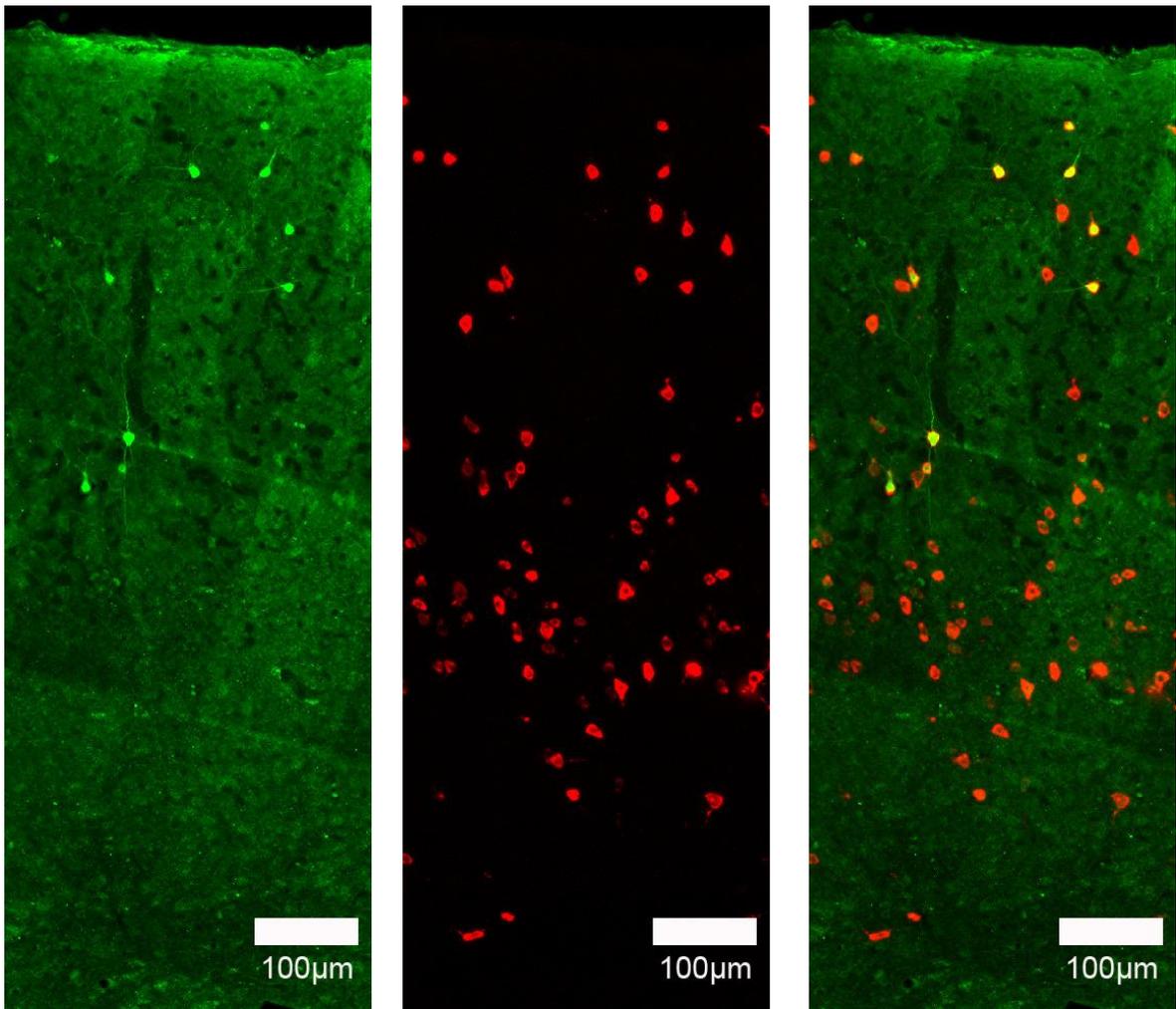


Abbildung 15: Kolumnenassoziierte Darstellung der SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Der Auszug aus Abb. 14 zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die SOM-markierten Zellen (rot) und die Kolokalisation (gelb) im Bereich einer barrelasoziierten Kolumne in der *maximum intensity projection*. In A sind die GFP-positiven Zellen, in B die SOM-positiven Zellen und in C die Übereinanderlagerung beider Signale dargestellt. Eine Kolokalisation des GFP-Signals mit den SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

In der Auszählung der SOM-Sonde konnten keine nur mit dem GFP-Antikörper markierten Zellen identifiziert werden, d.h. dass alle GFP-positiven Zellen immer nur in Kolokalisation mit der SOM-Sonde vorliegen (100% Kolokalisation). In 1 mm³ Barrel-Kortex befinden sich insgesamt $5673,5 \pm 231,8$ Somatostatin-positive Neurone, von denen $532,0 \pm 47,3$ auch mit α GFP kolokalisiert sind (Abb. 16 und Anhang Tab. 14). Ihre schichtenspezifische Verteilung wird im Folgenden beschrieben: In Schicht I und Schicht VI gibt es fast keine GFP-positiven Zellen. In nur einem einzigen Schnitt kommt sowohl in Schicht I als auch in Schicht VI jeweils eine GFP-markierte Zelle vor. In den übrigen elf

Schnitten gibt es dort keine GFP-positiven Neurone. Die Mehrheit der GFP-positiven Neurone kommt in den Schichten II/III und IV vor. Ihre Anzahl nimmt in Richtung der weißen Substanz stetig ab. Die absolute Verteilung der SOM-positiven Zellen hat ihr Minimum in Schicht I ($4,6 \pm 2,7$). In den Schichten II/III ($525,1 \pm 65,6$) bis Va ($796,7 \pm 19,4$) steigt ihre Anzahl und hat ihr Maximum in der Schicht Vb ($1895,2 \pm 206,4$). Die Schicht VI enthält mit $1159,2 \pm 102,7$ wiederum mehr SOM-positive Zellen als die Schichten I bis Va. Im Vergleich zu den GFP-positiven Zellen kamen in den Schichten II/III bis VI stets signifikant mehr SOM-positive Zellen vor (Anhang Tab. 15).

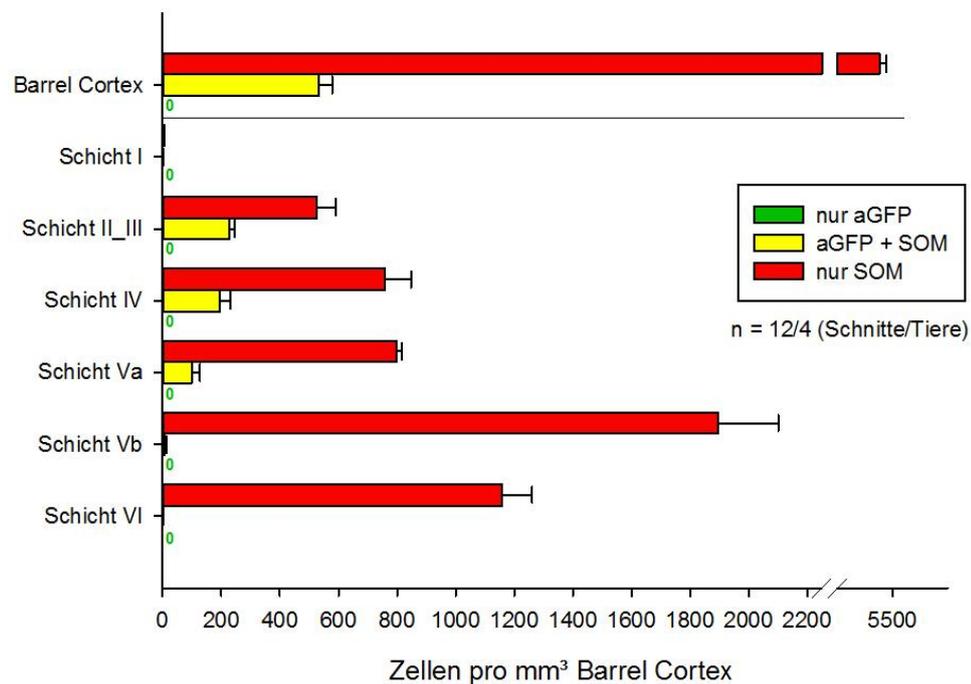


Abbildung 16: Verteilung der GFP-, SOM-positiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die auf 1 mm³ Barrel-Kortex berechneten Zellzahlen für die ausschließlich GFP-positiven (grün), die ausschließlich SOM-positiven Zellen (rot) sowie für die mit α GFP und SOM kolokalisierten Zellen (gelb). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten 12 Schnitte von 4 Tieren dargestellt.

Es gibt keine explizit GFP-positiven Zellen ohne SOM-Sonde. Die rein SOM-positiven Zellen kommen in jeder Schicht häufiger vor als die kolokalisierten, am meisten in der Schicht Vb. Ihre Anzahl nimmt bis Schicht Va zu und in Schicht VI wieder ab. Die kolokalisierten Zellen sind vermehrt in den Schichten II/III und IV zu finden und nehmen dagegen in Richtung weiße Substanz kontinuierlich ab.

Für die relative Verteilung der GFP-positiven, der SOM-positiven sowie der kolokalisierten Zellen (Abb. 17, Anhang Tab. 16) lassen sich folgende Befunde erheben: In Schicht I und VI kommen nur $0,2\% \pm 0,4\%$ aller α GFP-markierten Neurone (Abb.17,

grüne Balken) vor. Knapp 80% aller GFP-positiver Zellen liegen in den Schichten II/III bis Va. Ihre Anzahl nimmt von Schicht II/III zu Schicht VI stetig ab. Die Zellen, die mit der Somatostatin-Sonde markiert wurden (Abb.17, rote Balken) kommen in allen Schichten vor. Im Gegensatz zu der Verteilung der GFP-positiven Zellen steigt ihre Anzahl bis Schicht IV und sinkt etwas in Schicht Va ab. Somatostatin-positive Neurone kommen in den tieferen Schichten Vb und VI mit $33,5\% \pm 3,8\%$ und $20,5\% \pm 1,8\%$ signifikant häufiger vor. Weiterhin ist die schichtenspezifische Verteilung der SOM-positiven Neurone zwischen den Schichten, außer Schicht IV zu Va, stets signifikant unterschiedlich (Anhang Tab. 18). Für die relative Verteilung der GFP-positiven Neurone lassen sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Schichten feststellen, außer zwischen den Schichten I und Vb bzw. VI, sowie zwischen der Schicht IV zu den Schichten II/III und Vb (Anhang Tab. 17).

Der Anteil der α GFP-markierten Zellen an allen Somatostatin-Sonde-tragenden Neuronen beträgt im gesamten 1 mm^3 Barrel-Kortex $9,3\% \pm 0,6\%$. Der größte Anteil mit $30,6\% \pm 3,4\%$ liegt in Schicht II/III, gefolgt von den Schichten IV ($20,4\% \pm 1,1\%$), Va ($10,8\% \pm 2,3\%$) und I ($8,3\% \pm 14,4\%$). In den beiden tiefsten Schichten tendiert der Anteil gegen Null. Signifikante Unterschiede können mit Ausnahme der Schicht I sowohl zu der Schicht Vb als auch zur Schicht VI und der Schicht Vb zur Schicht VI beobachtet werden (Anhang Tab. 19).

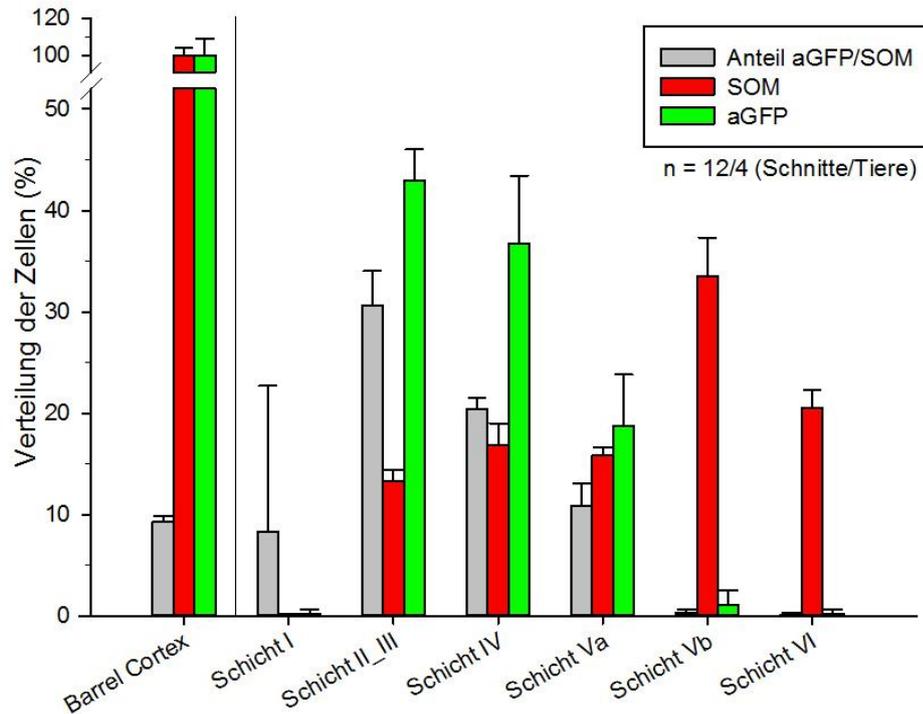


Abbildung 17: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP- und SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP-positiven Zellen (grün) sowie aller SOM-positiven (inklusive der mit GFP-kolokalisierten) Zellen (rot). Des Weiteren ist der Anteil der GFP-positiven an den SOM-positiven Zellen abgebildet (grau). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der 12 analysierten Schnitte von 4 Tieren dargestellt.

Insgesamt sind etwa 10% aller SOM-positiven Zellen auch GFP-positiv. Der größte Anteil ist in den Schichten II/III bis Va, gefolgt von Schicht I, der geringste in Schicht Vb lokalisiert. GFP-Zellen kommen in allen Schichten vor. In den Schichten I und VI sind nur vereinzelt GFP-Zellen angesiedelt. Das Maximum ihres Vorkommens liegt in Schicht II/III und nimmt stetig in Richtung weißer Substanz ab. SOM-Zellen kommen in allen Schichten vor. Ihre Anzahl nimmt bis Schicht IV zu und nimmt in Schicht Va wieder ab. Am häufigsten sind SOM-positive Zellen in den Schichten Vb und VI zu finden.

FISH der GIN-Maus mit PV, VIP und VGLUT1

Neben der quantitativen Auswertung der GAD1- und SOM-Sonden wurden die FISH mit der PV-Sonde (Abb. 18), der VIP-Sonde (Abb. 19) sowie der VGLUT1-Sonde (Abb. 20) im Rahmen meiner Dissertation ausschließlich qualitativ ausgewertet. Gegenstand der Untersuchung ist, ob die Sonden in Kolokalisation mit dem GFP-Signal vorliegen. Analog zum Vorgehen mit der GAD1- und SOM-Sonde wurden Übersichtsaufnahmen (10-fach) und Detailaufnahmen (25-fach), letztere mit Hilfe des ApoTomes angefertigt.

Sowohl für die PV-Sonde als auch für die VIP-Sonde lässt sich keine Kolokalisation der Sonden (rot) mit den GFP-positiven Zellen (grün) feststellen (Abb. 18 und 19). Ebenso

zeigt die VGLUT1-Sonde als Marker für exzitatorische Neurone keine Überlappung mit dem GFP-Signal (Abb. 20).

In einer nachfolgenden Studie sollen die PV-, VIP- und VGLUT1-Sonde quantitativ ausgewertet werden, um die hier aufgestellten Beobachtungen zu belegen.

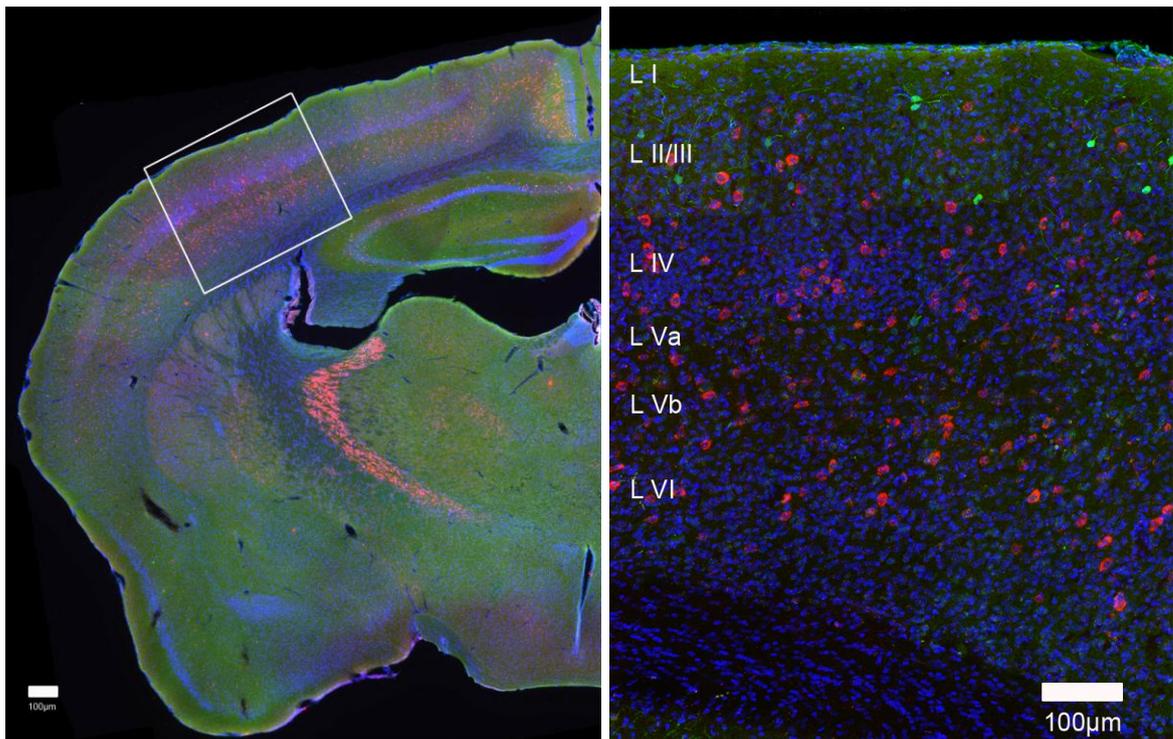


Abbildung 18: PV-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der PV-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der PV-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die PV-markierten Zellen (rot) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* eines Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolokalisation des transgenen GFP-Signals mit den PV-positiven Zellen liegt nicht vor. Maßstab: 100 μ m.

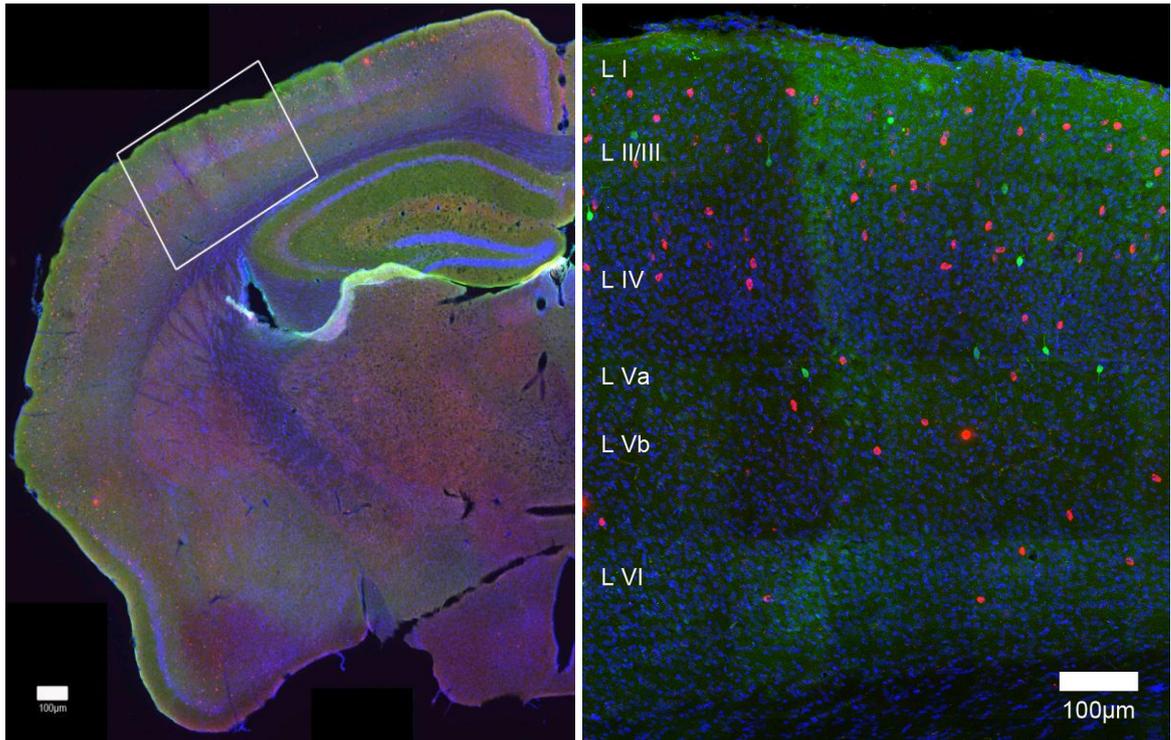


Abbildung 19: VIP-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der VIP-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die VIP-markierten Zellen (rot) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* eines Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolokalisation des transgenen GFP-Signals mit den VIP-positiven Zellen liegt nicht vor. Maßstab: 100 μ m.

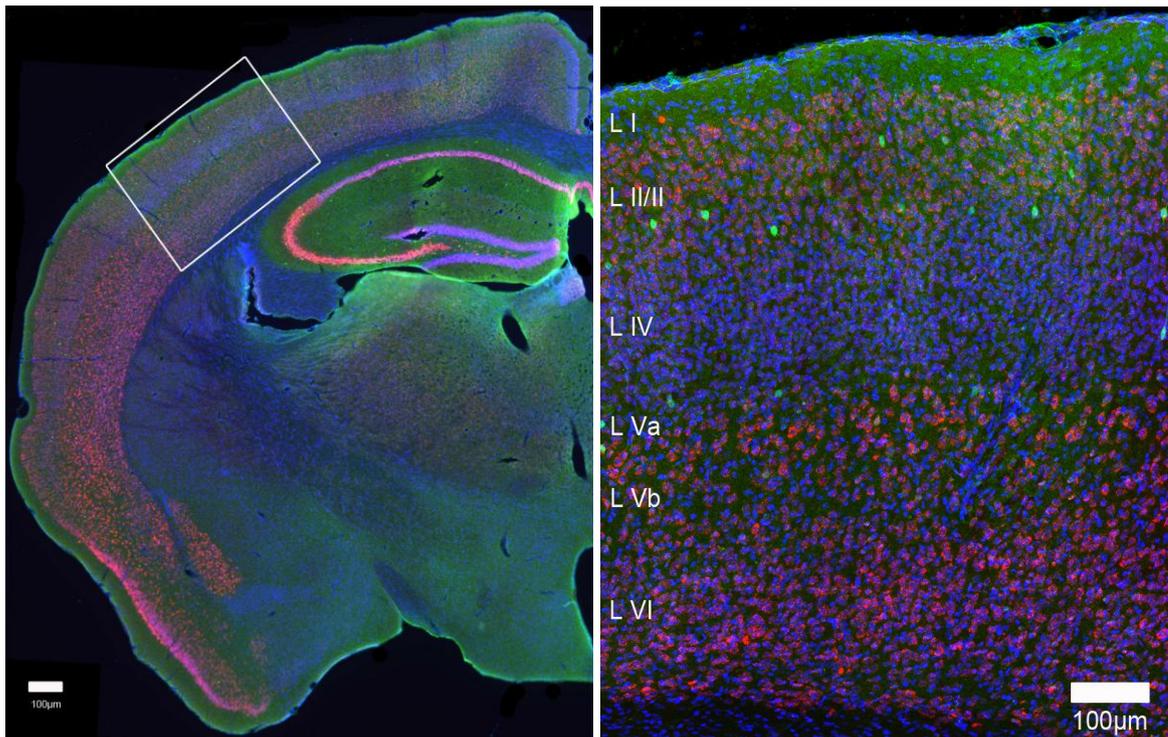


Abbildung 20: VGLUT1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der VGLUT1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der VGLUT1-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer GIN-Maus zeigt das transgene GFP-Signal, welches mit α GFP markiert wurde (grün), die VGLUT1-markierten Zellen (rot) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* eines Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolo­kalisation des transgenen GFP-Signals mit den VGLUT1-positiven Zellen liegt nicht vor. Maßstab: 100 μ m.

3.1.4 Vergleich von IHC und FISH

Nachdem Einsatz zweier unterschiedlicher Methoden zum Nachweis der Somatostatin- und GABA-Expression bzw. -Transkription in den GFP-positiven Zellen der GIN-Maus soll deren Reproduzierbarkeit und insbesondere die schichtenspezifische Verteilung der GFP-tragenden Zellen untersucht werden. Dazu wurde die relative Verteilung aller α GFP-markierten Neurone in den unterschiedlich durchgeführten Verfahren (Immunhistochemie mit dem SOM-Antikörper und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit den GAD1- und SOM-Sonden) für die kortikalen Schichten gegenübergestellt (Abb. 21). Für alle drei Experimente kann man festhalten, dass sie ein ähnliches Ergebnis in der schichtenspezifischen Verteilung zeigen und stets alle GFP-positiven Zellen mit den Antikörpern bzw. Sonden kolo­kalisiert sind (Abb. 21). In den Schichten I und VI kommen

nur in seltenen Fällen und dann nur vereinzelt GFP-positive Zellen vor. Die größten Zellanzahlen befinden sich in Schicht II/III und IV und nehmen Richtung weiße Substanz kontinuierlich ab. In den einzelnen Schichten gibt es keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Verteilung der GFP-positiven Zellen zwischen den drei unterschiedlichen Experimentreihen (Anhang Tab. 20).

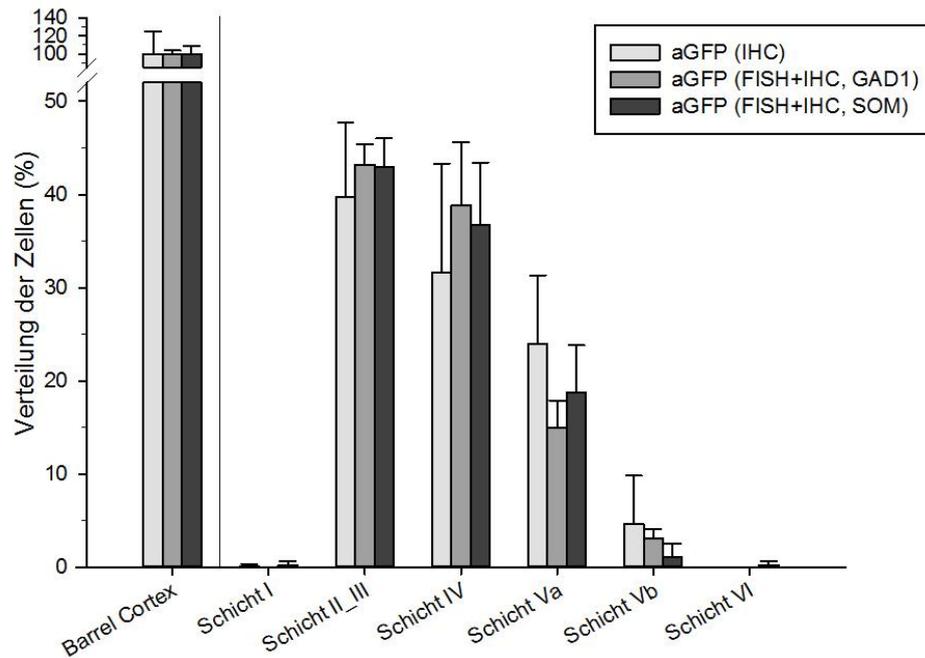


Abbildung 21: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der α GFP-markierten Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung der GFP-positiven Zellen in der Immunhistochemie mit dem SOM-Antikörper (hellgrau), in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der GAD1-Sonde (mittelgrau) und der SOM-Sonde (dunkelgrau).

Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten Schnitte und Tiere dargestellt (IHC: n=24/8, FISH: n=12/4).

Insgesamt sind alle α SOM-, GAD1- und SOM-markierten Zellen auch GFP-positiv. GFP-Zellen kommen in den Schichten I und VI sind nur vereinzelt vor. Das Maximum ihres Vorkommens liegt in den Schichten II/III sowie IV und nimmt stetig in Richtung weißer Substanz ab. Die Verteilung in den drei verschiedenen Experimentreihen ist nahezu identisch und nicht signifikant unterschiedlich in den einzelnen kortikalen Schichten.

Neben dem Vergleich der Lokalisation der GFP-positiven Zellen wurde ebenso die relative Verteilung (in %) der mit dem α SOM-Antikörper in der IHC und der mit der SOM-Sonde in der FISH markierten Zellen verglichen (Abb. 22). Die Verteilung ist sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene ähnlich. In der obersten Schicht I befinden sich selten Somatostatin-positive Zellen (1 von 48 Schnitten). In den Schichten II/III bis Va befinden sich im Mittel jeweils etwa 16-20% aller SOM-markierten Zellen (α SOM/SOM-Sonde). Die meisten Somatostatin-positiven Zellen kommen in den tieferen infragranulären Schichten vor, wobei ihr Maximum in der Schicht Vb liegt. In allen Schichten konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den α SOM-positiven und den mit der Somatostatin-Sonde markierten Zellen nachgewiesen werden. (Anhang Tab. 21).

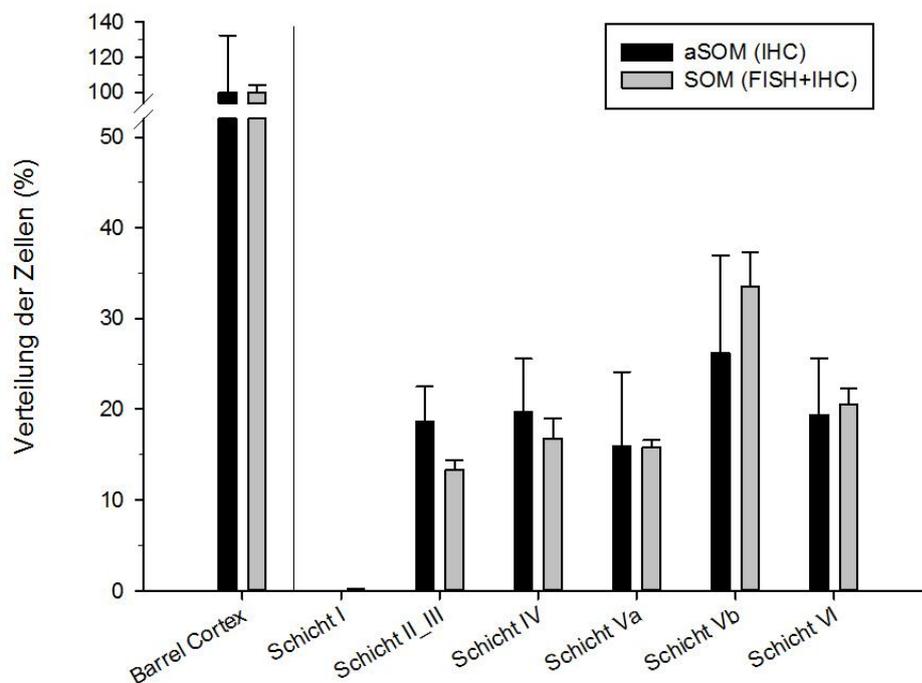


Abbildung 22: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der α SOM- und SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der GIN-Maus im Vergleich

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung der Somatostatin-positiven Zellen in der Immunhistochemie mit dem SOM-Antikörper (dunkelgrau) und in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der SOM-Sonde (hellgrau).

Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten Schnitte und Tiere dargestellt (IHC: n=24/8, FISH: n=12/4).

SOM-Zellen kommen selten in allen Schichten vor. In der Schicht I sind sie nur vereinzelt angesiedelt. Das Maximum ihres Vorkommens liegt in den Schichten Vb sowie VI. In den Schichten II/III bis Va sind jeweils etwa 16-19% von ihnen lokalisiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle GFP-positiven Zellen der GIN-Maus für α SOM-, GAD1- und SOM-positiv sind und keine Kolokalisation mit den Sonden PV, VIP und VGLUT1 nachgewiesen werden konnte. Es kamen sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung keine rein GFP-positiven Zellen ohne Kolokalisation vor.

3.2 Charakterisierung der SOMcre-Maus

Neben der Charakterisierung der GIN-Maus wurde in dieser Arbeit die SOMcre-Maus zum Vergleich und als Referenz zur GIN-Maus verwendet. Die untersuchten Tiere setzten sich aus elf adulten Männchen und einem Weibchen zusammen (siehe 2.1). Die Charakterisierung der SOMcre-Mauslinie wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob die transgene tdTomato-Markierung der Somatostatin-exprimierenden Neurone spezifisch und sensitiv für SOM und wie deren quantitative Verteilung innerhalb der Schichten I bis VI ist. Die Experimente erfolgten analog zur GIN-Maus. Die Auswertung erfolgte sowohl auf Proteinebene in der Immunhistochemie als auch auf mRNA-Ebene in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

3.2.1 Immunhistochemie (IHC)

Für die IHC der SOMcre-Tierlinie wurden Antikörper gegen Somatostatin (SOM 14) in sechs männlichen adulten Tieren eingesetzt (siehe 2.4). Das tdTomato-Signal wurde nicht verstärkt, sondern nativ belassen, da es eine ausreichende Fluoreszenzstärke besaß. Pro Tier wurden im Bereich des Barrel-Kortex jeweils drei Schnitte unter Zuhilfenahme eines Software-gekoppelten Mikroskops plus ApoTome in 25-facher Vergrößerung aufgenommen und ausgewertet (siehe Material und Methoden). Zusätzlich wurden Übersichtsaufnahmen in zehnfacher Vergrößerung des gesamten Hirnschnittes angefertigt.

Das native transgene tdTomato-Signal (rot) ist in allen 18 frontalen Hirnschnitten der sechs SOMcre/tdTomato-Tiere deutlich zu erkennen (Abb. 23 A). Eine Hintergrundfärbung liegt aufgrund der nicht notwendigen Nachverstärkung in keinem der ausgewerteten Schnitte vor. Der Somatostatin-Antikörper (grün) weist nur eine geringe Hintergrundfärbung auf, so

dass die markierten Zellen klar zu erkennen sind (Abb. 24). In der Übersicht (Abb. 23 A) lässt sich eine starke Anfärbung der tdTomato-tragenden Zellen um den zentralen Nucleus der Amygdala und entlang der subthalamischen Zona incerta der grauen Substanz finden. Durch die Anfärbung mit DAPI sind in der Vergrößerung einige Barrels der Schicht IV gut erkennbar (Abb. 23 B). Die Somatostatin-positiven Zellen kommen in jeder Schicht des primären somatosensorischen Kortex vor, jedoch ist es auffällig, dass sie in den tieferen Schichten vermehrt vorliegen (Abb. 24). In der Übereinanderlagerung des Somatostatin-Antikörpers mit dem nativen tdTomato-Signal in der kolumnenassoziierten Darstellung der Schichten I bis VI wird der hohe Prozentsatz an Kolo­kalisierung bereits deutlich (Abb. 24).

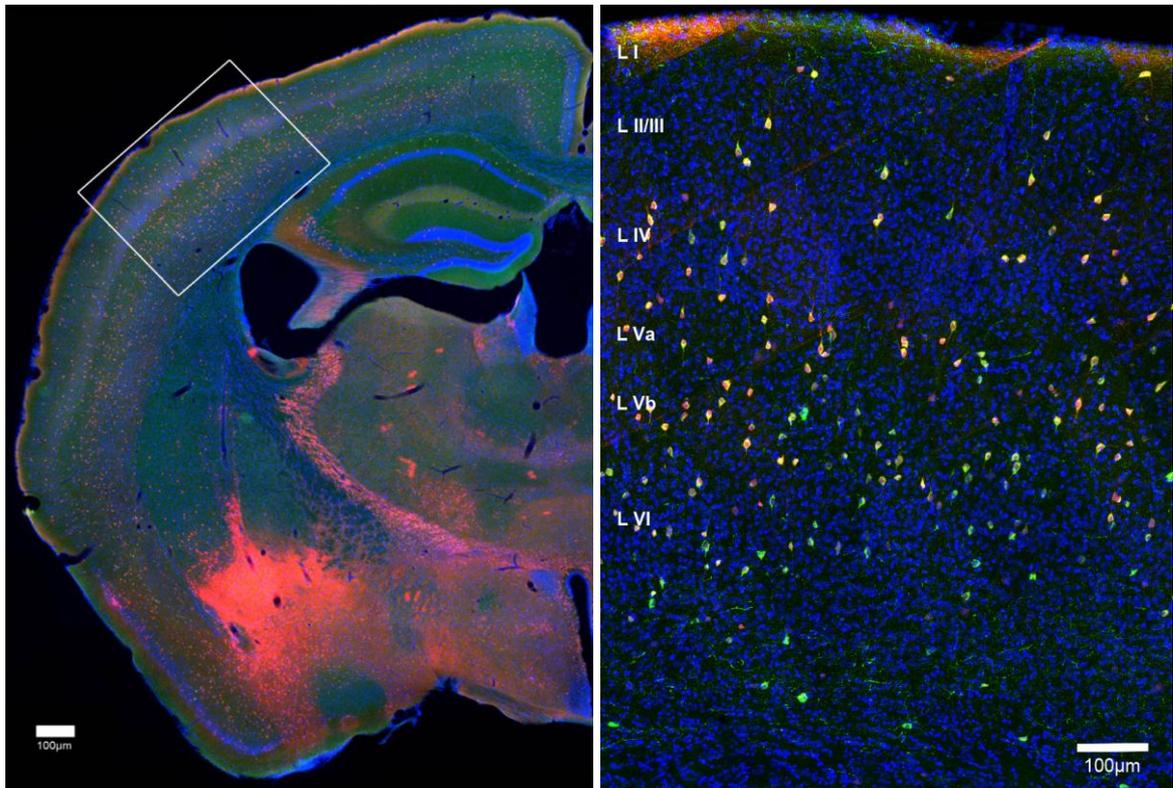


Abbildung 23: α SOM-Immunhistochemie zur Markierung der Somatostatin-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Immunhistochemie des α SOM-Antikörpers an frontalen Hirnschnitten einer SOMcre/tdTomato-Maus zeigt das native transgene tdTomato-Signal (rot), die mit α SOM-markierten Zellen (grün), die Kolo­kalisierungen (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* eines Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolo­kalisierung des transgenen tdTomato-Signals mit den α SOM-positiven Zellen liegt vor (gelb). Maßstab: 100 μ m.

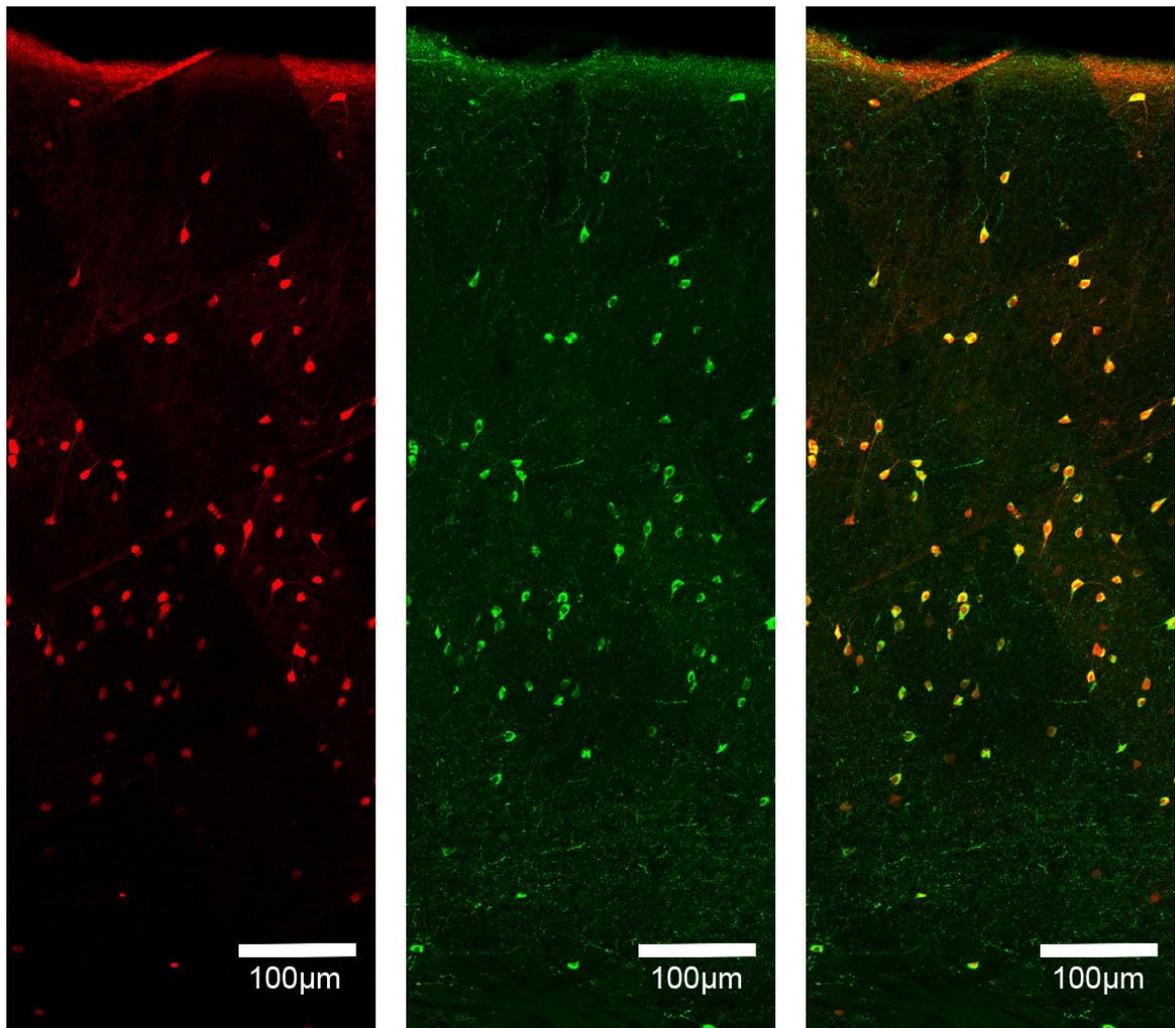


Abbildung 24: Kolumnenassoziierte Darstellung der α SOM-Immunhistochemie im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Der Auszug aus Abb. 23 zeigt das native transgene tdTomato-Signal (rot), die α SOM-markierten Zellen (grün) und die Kolokalisation (gelb) im Bereich einer barrelasoziierten Kolumne in der *maximum intensity projection*. In A sind die tdTomato-positiven Zellen, in B die Somatostatin-positiven Zellen und in C die Übereinanderlagerung beider Signale dargestellt. Eine Kolokalisation des tdTomato-Signals mit den α SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

Die weitere quantitative Auswertung ergibt, dass in 1 mm³ Barrel-Kortex insgesamt $15,4 \pm 22,4$ (Mittelwert \pm SD) nur tdTomato-positive Zellen vorkommen, während die übrigen $6323,1 \pm 761,7$ Neurone kolokalisiert mit tdTomato und α SOM vorliegen (Abb. 25 und Anhang Tab. 22). Die Schichtenverteilung zeigt, dass rein tdTomato-positive Zellen in allen Schichten, mit Ausnahme der Schichten I und Va, vorkommen. Diese Zellen weisen keine Überlagerung mit dem verwendeten Somatostatin-Antikörper auf. Neurone, die nur mit dem Somatostatin-Antikörper markiert wurden treten in den ausgewerteten

18 Schnitten von 6 Tieren in keiner Schicht auf. Im Gegensatz dazu finden sich in allen Schichten des Barrel-Kortex Zellen, die beide Signale aufweisen. Die wenigsten von diesen befinden sich in der Schicht I ($16,6 \pm 14,8$). Die angrenzenden Schichten II/III ($858,8 \pm 118,3$) bis Va ($933,3 \pm 97,8$) beinhalten jeweils eine quantitativ ähnliche Zellanzahl an kolokalisierten Zellen, wobei die Schicht IV ($986,3 \pm 96,8$) mit einer etwas höheren Anzahl auffällt (Abb. 25). Die größten Zellzahlen sind in den beiden unteren Schichten zu finden mit einem Maximum von $1842,3 \pm 161,4$ in der Schicht Vb. Aufgrund der hohen Kolokalisationsquote lässt sich eine sehr gute Spezifität des nativen tdTomato-Signals für Somatostatin-positive Neuronen ableiten (Anhang Tab. 23).

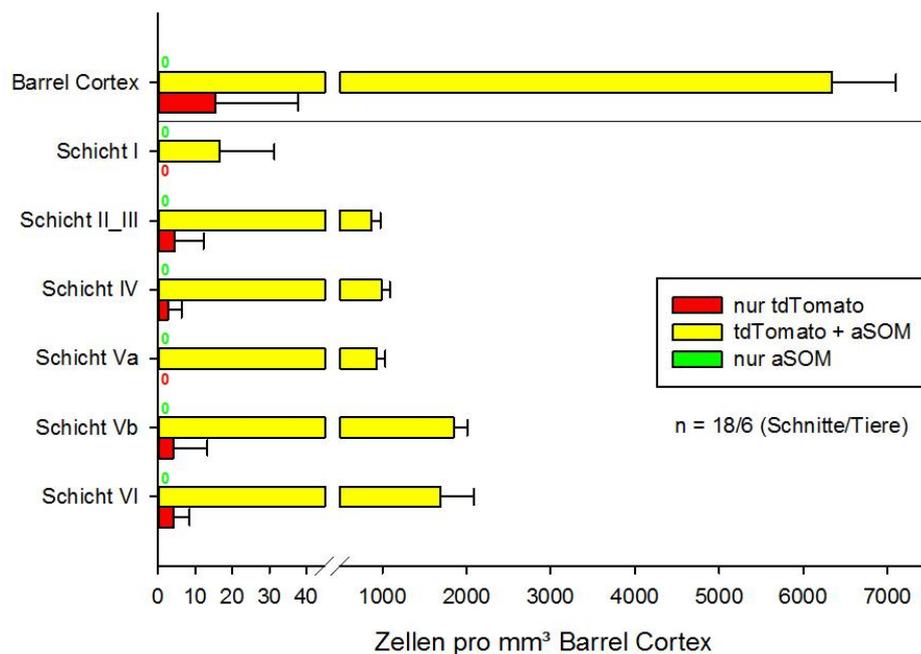


Abbildung 25: Verteilung der tdTomato-, Somatostatin-positiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMCre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die auf 1 mm³ Barrel-Kortex berechneten Zellzahlen für die ausschließlich tdTomato-positiven (rot), die ausschließlich Somatostatin-positiven Zellen (grün) sowie für die mit tdTomato und α SOM kolokalisierten Zellen (gelb). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die einzelnen Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI für die analysierten 12 Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Es gibt keine ausschließlich α SOM-positiven Zellen ohne tdTomato-Signal. Die kolokalisierten Zellen kommen in jeder Schicht häufiger vor als die rein tdTomato-positiven, am meisten in der Schicht Vb. Dagegen sind die tdTomato-positiven Zellen vermehrt in den Schichten II/III, IV, Vb und VI zu finden. Sie kommen in der Schicht I und Va nicht vor.

Die prozentuale Verteilung (Abb. 26 und Anhang Tab. 24) aller Somatostatin-positiver Zellen ergibt, dass in 1 mm³ Barrel-Kortex nahezu alle markierten Zellen sowohl tdTomato- als auch α SOM-positiv sind ($100,0\% \pm 12,0\%$). Schicht I enthält mit einem

Anteil von $0,3\% \pm 0,2\%$ die geringsten Somatostatin-positiven Zellen. Die folgenden Schichten II/III, IV und Va liegen mit Werten von $13,6\% \pm 1,9\%$, $15,6\% \pm 1,5\%$ und $14,8\% \pm 1,5\%$ nah bei einander und sind nicht signifikant unterschiedlich (Anhang Tab. 25). Im Verhältnis dazu gibt es deutlich mehr Zellen in den beiden untersten Schichten Vb ($29,1\% \pm 2,6\%$) und VI ($26,7\% \pm 6,2\%$), mit einem Maximum in Schicht Vb. Diese beiden Schichten weisen eine signifikant höhere Anzahl an Somatostatin-positiven Zellen auf, wobei es keine Unterschiede zwischen den Schichten Vb und VI gibt.

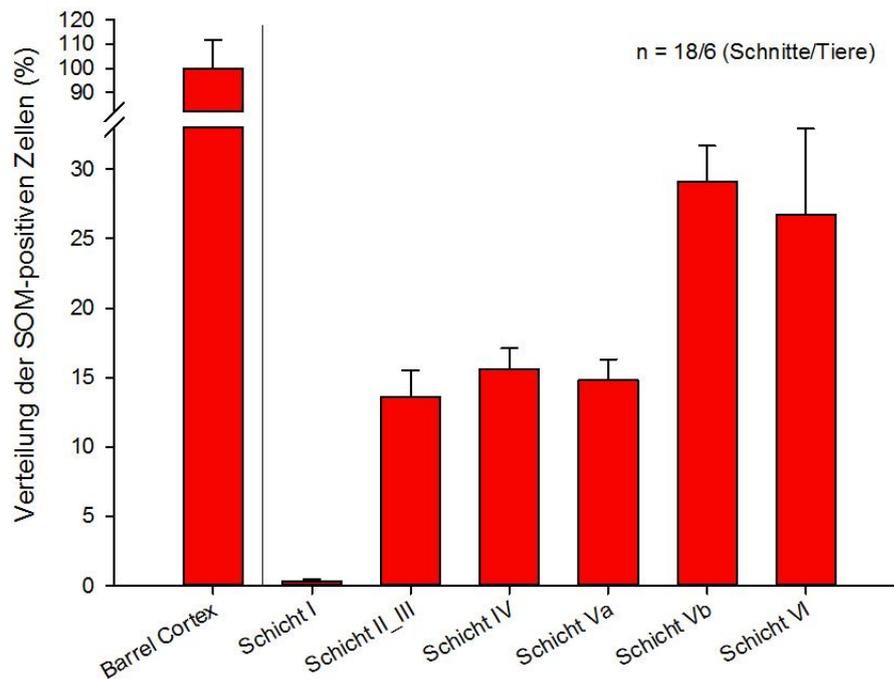


Abbildung 26: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung aller Somatostatin-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung aller Somatostatin-positiver Zellen, d.h. aller nativen tdTomato-positiven Zellen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der 12 analysierten Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Insgesamt sind nahezu alle tdTomato-tragenden Zellen auch Somatostatin-positiv (linker Balken). Der geringste Prozentsatz der Somatostatin-positiven Zellen ist in Schicht I zu finden. Die Schichten II/III bis Va zeigen eine ähnliche Verteilung, mit einer leicht größeren Zellzahl in Schicht IV. In den untersten beiden Schichten Vb und VI kommen die meisten dieser Zellen vor mit einem Maximum in Schicht Vb ($29,1\% \pm 2,6\%$).

Die Verteilung der tdTomato-positiven Neurone in der SOMcre/tdTomato-Maus ähnelt den Ergebnissen der α SOM-positiven Zellen in der GIN-Mauslinie.

3.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die weiteren Versuche zur schichtenspezifischen Charakterisierung der SOMcre/tdTomato-Maus auf mRNA-Ebene wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gefolgt von der Amplifikation des tdTomato-Signals mittels Immunhistochemie durchgeführt. Es wurden fünf männliche Tiere und ein weibliches Tier innerhalb der FISH analysiert. Pro verwendete Sonde und Tier wurden drei Hirnschnitte im Bereich des primären somatosensorischen Kortex angefertigt. Die mit den Sonden GAD1 und SOM behandelten Schnitte wurden aufgenommen und durch Auszählung ausgewertet. Weitere Schnitte wurden zum Zwecke der Vollständigkeit mit den Sonden PV, VIP und VGLUT1 zur qualitativen Ansicht auf Kollokationen markiert. Sie weisen keine kollokaliserten Zellen auf und werden daher weder abgebildet noch einer quantitativen Auswertung unterzogen.

Die GAD1-markierten Zellen (Abb. 27 und 28, grün) sind zahlreich in allen Schnitten und Schichten des primären somatosensorischen Barrel-Kortex zu finden. Die Intensität der Markierung ist nicht immer gleich stark, dennoch sind die GAD1-positiven Zellen aufgrund der geringen Hintergrundfärbung gut zu erkennen. In der Übersicht (Abb. 27, A) lassen sich GAD1-positive Zellen ebenfalls im Striatum, Hippocampus und Nucleus reticularis des Thalamus nachweisen. Das native transgene tdTomato-Signal wurde durch die Antikörper α DsRed bzw. α RFP (siehe Material und Methoden) sichtbar gemacht (Abb. 27 und 28, rot). Zellen, die das native tdTomato-Signal tragen sind trotz der stärkeren Anfärbung des Hintergrunds eindeutig erkennbar. In der kolumnenassoziierten Darstellung inklusive Aufspaltung der Fluoreszenzen der GAD1-FISH und des tdTomato-Signals wird die hohe Kollokolation beider Signale deutlich (Abb. 28).

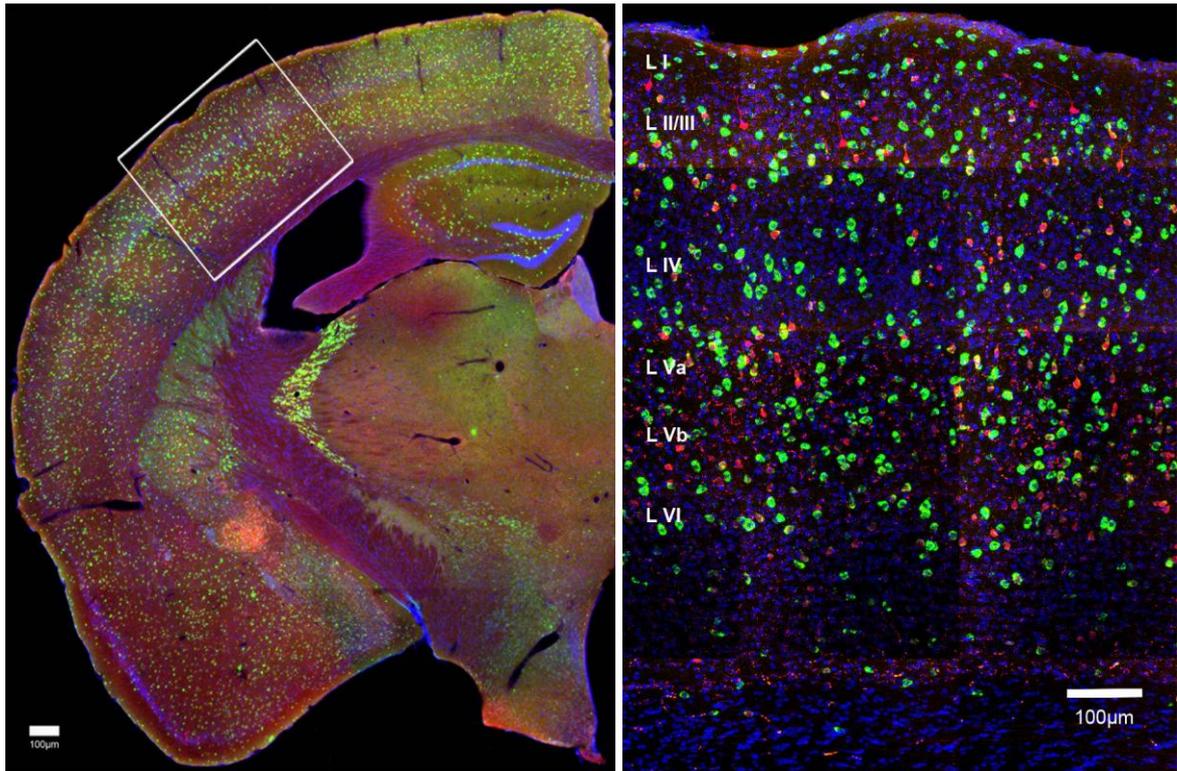


Abbildung 27: GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der GABAergen Zellen im Barrel-Kortex der SOMCre/tdTomato-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der GAD1-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer SOMCre/tdTomato-Maus zeigt das transgene tdTomato-Signal, welches mit α DsRed/ α RFP markiert wurde (rot), die GAD1-markierten Zellen (grün), die Kolokalisation (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* des Barrel-Kortex (umrandeter Bereich aus A). Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kolokalisation des transgenen tdTomato-Signals mit den GAD1-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

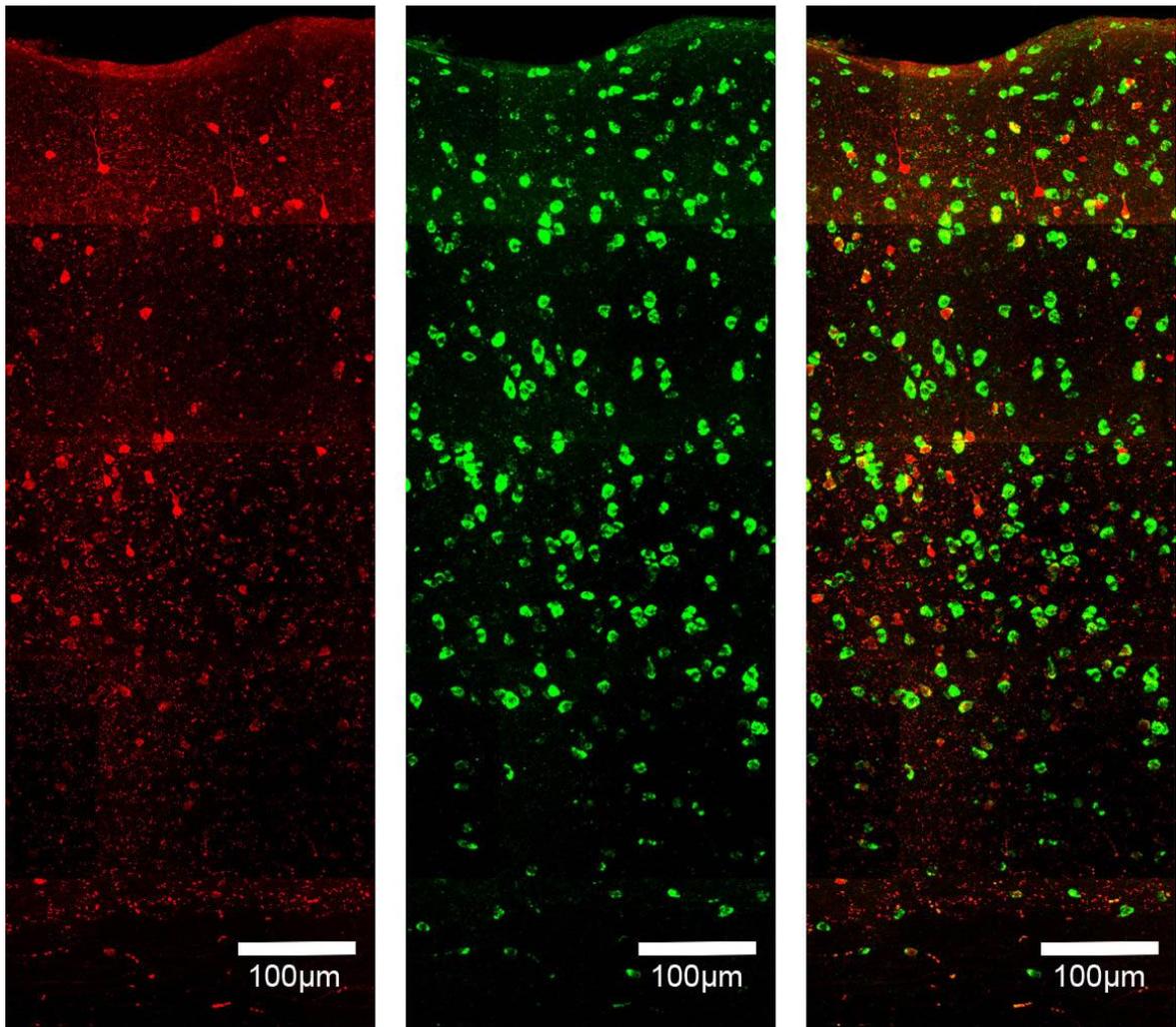


Abbildung 28: Kolumnenassoziierte Darstellung der GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Der Auszug aus Abb. 27 zeigt das transgene tdTomato-Signal, welches mit α DsRed/ α RFP markiert wurde (rot), die GAD1-markierten Zellen (grün) und die Kolokalisation (gelb) im Bereich einer barrelasoziierten Kolumne in der *maximum intensity projection*. In A sind die tdTomato-positiven Zellen, in B die GAD1-positiven Zellen und in C die Übereinanderlagerung beider Signale dargestellt. Eine Kolokalisation des tdTomato-Signals mit den GAD1-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

Die absolute Verteilung zeigt, dass in der GAD1-FISH Zellen vorkommen, die kolokalisiert oder nur GAD1-positiv sind und welche, die nur das tdTomato-Signal tragen. In 1 mm³ Barrel-Kortex kommen $234,5 \pm 125,1$ nur mit tdTomato-markierte, $5935,7 \pm 464,0$ kolokalisierte und $10298,3 \pm 1331,8$ nur mit der GAD1-Sonde versehene Neurone vor (Abb. 29 und Anhang Tab. 26). Die GAD1-positiven Zellen kommen von Schicht I bis Schicht IV immer in einer höheren Anzahl als die kolokalisierten und die rein tdTomato-positiven Zellen vor. In den beiden untersten Schichten überwiegen die

Kolokalisationen. Die reinen tdTomato-Neurone sind stets in einer kleinen, nahezu konstanten Anzahl vorhanden. Eine Ausnahme bildet hier die Schicht I, in der sich keine reinen tdTomato-positiven Zellen befinden. Im Vergleich zu den übrigen Schichten, ist die Menge an reinen tdTomato-positiven Zellen in Schicht IV etwas geringer. Die nur GAD1-markierten Zellen kommen in der Schicht I in ihrer kleinsten Anzahl ($366,9 \pm 61,3$) vor. Ihr Maximum ist in Schicht II/III zu finden, in welcher knapp 1/3 aller nur GAD1-positiver Zellen liegt ($3141,4 \pm 641,8$). Sie nehmen zahlenmäßig bis Schicht Va ab und zeigen einen erneuten Anstieg in Schicht Vb. Die Schicht VI enthält eine minimal geringere Anzahl an nur GAD1-positiven Zellen als Schicht Vb. Die kolokalisierten Zellen kommen in allen Schichten vor. Ihr Minimum liegt dabei in Schicht I, während sich ihre Anzahl von Schicht II/III bis Va nahezu konstant bei 800 ± 100 Zellen hält. Ihre Anzahl steigt auf über das Doppelte in Schicht Vb ($1853,0 \pm 239,1$) und sinkt geringfügig in der Schicht VI ab. Die Verteilung der GAD1-positiven und der kolokalisierten Zellen war zwischen allen Schichten signifikant unterschiedlich (Anhang Tab. 27).

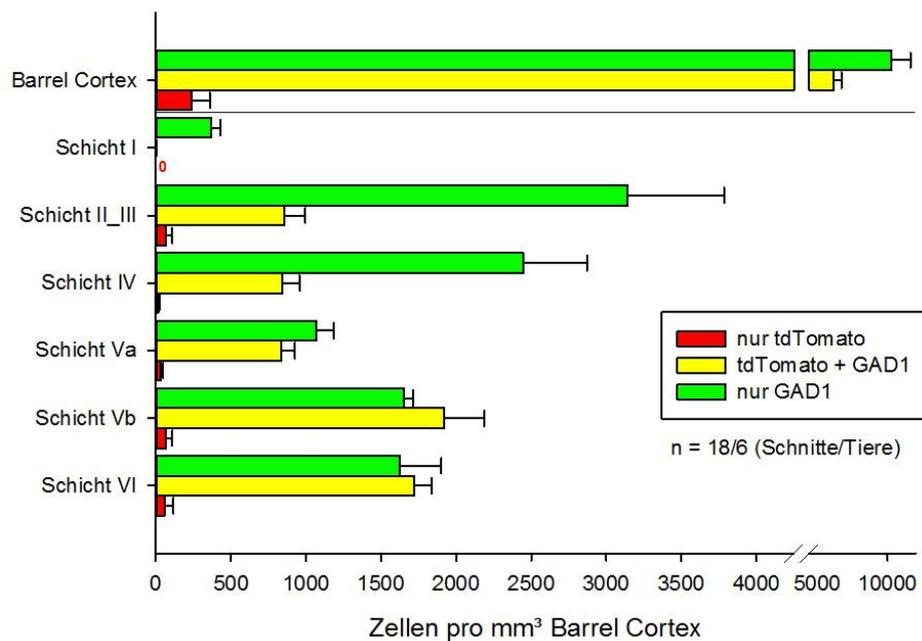


Abbildung 29: Verteilung der tdTomato-, GAD1-positiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die auf 1 mm^3 Barrel-Kortex berechneten Zellzahlen für die ausschließlich tdTomato-positiven (rot), die ausschließlich GAD1-positiven Zellen (grün), sowie für die mit tdTomato und GAD1 kolokalisierten Zellen (gelb). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten 18 Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Es gibt in Schicht I keine ausschließlich tdTomato-positiven Zellen. Sie kommen jedoch in allen übrigen Schichten in einer geringen Zellzahl vor. Die rein GAD1-positiven Zellen kommen in den Schichten I bis Va häufiger vor als die kolokalisierten, am meisten in der Schicht I und II/III. Ihre Anzahl nimmt von Schicht I zu Schicht Va ab, steigt in Schicht Vb wieder an und nimmt in Schicht VI etwas ab. Die kolokalisierten Zellen sind in allen Schichten zu finden. Ihr Minimum liegt in Schicht I, während sich ihre Anzahl in den

Schichten II/III bis Va nahezu konstant hält. Das Maximum befindet sich in Schicht Vb und ihre Anzahl nimmt in Schicht VI etwas ab.

Die prozentuale Verteilung der Zellen in der GAD1-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Abb. 30 und Anhang Tab. 28) zeigt, dass die tdTomato-positiven Zellen (ausschließlich tdTomato-tragende und mit GAD1 kolokalisierte Zellen) in allen Schichten des Barrel-Kortex vorkommen. In der Schicht I sind nahezu keine tdTomato-Zellen vorhanden (Abb. 30, rote Balken). Jeweils etwa 14% von ihnen liegen in den Schichten II/III bis Va. Das Maximum ihres Vorkommens befindet sich in der Schicht Vb ($31,1\% \pm 4,4\%$) und sinkt in Schicht VI geringfügig ab. Somit kommen in den Schichten Vb und VI signifikant mehr tdTomato-positive Zellen vor als in den Schichten II/III bis Va (Anhang Tab. 29).

GAD1-positive Zellen kommen in allen Schichten vor. Die wenigsten von ihnen sind in der Schicht I lokalisiert ($2,3\% \pm 0,4\%$). Ihre Anzahl nimmt ausgehend vom Maximum in der Schicht II/III ($24,2\% \pm 4,4\%$) zu den tieferen Schichten ab: $20,2\% \pm 3,2\%$ in Schicht IV, $11,5\% \pm 1,2\%$ in Schicht Va, $21,6\% \pm 1,3\%$ in Schicht Vb und $20,3\% \pm 1,2\%$ in Schicht VI. Signifikante Unterschiede sind im Anhang Tab. 30 dargestellt.

Der Anteil der tdTomato-Zellen an den GAD1-positiven Zellen kann im gesamten Barrel-Kortex mit $38,4\% \pm 3,5\%$ angegeben werden. Der größte Anteil ist in den Schichten Va bis VI mit jeweils circa 45-55% anzutreffen. Der geringste Anteil ist mit knapp 1% in der Schicht I lokalisiert. Dabei ist das Verhältnis zwischen allen Schichten signifikant unterschiedlich, mit Ausnahme ($P = 0,402$) zwischen der Schicht Vb und Schicht VI (Anhang Tab. 31).

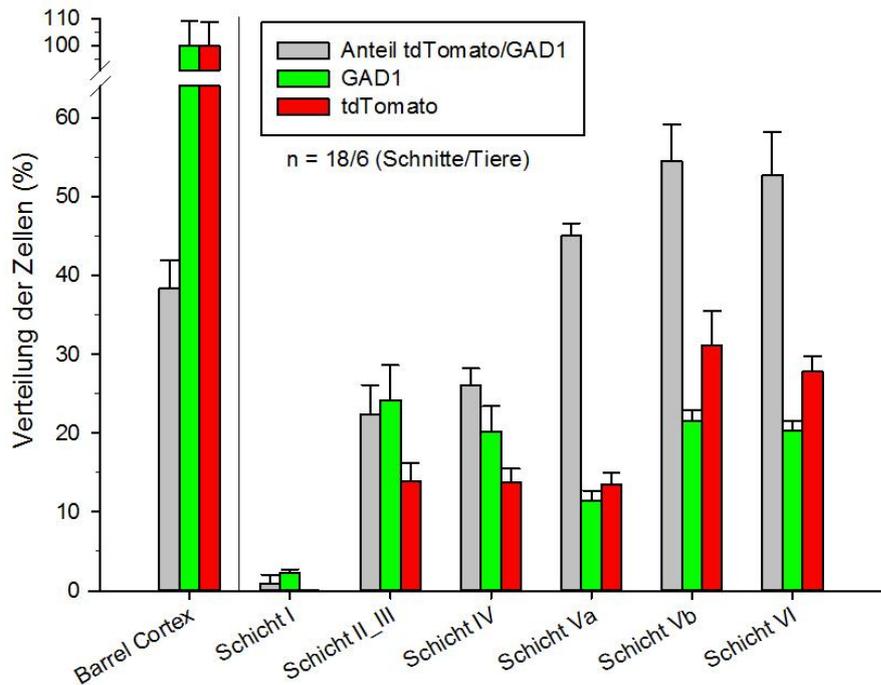


Abbildung 30: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der tdTomato- und GAD1-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung aller tdTomato-positiven (inklusive der mit GAD1 kolokalisierten) Zellen (rot), sowie aller GAD1-positiver (inklusive der mit tdTomato kolokalisierten) Zellen (grün). Des Weiteren ist der Anteil der tdTomato-positiven an den GAD1-positiven Zellen abgebildet (grau). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten 18 Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Insgesamt sind etwa 38% aller GAD1-positiven Zellen auch tdTomato-positiv. Der größte Anteil ist in den Schichten Va bis VI, der geringste in der Schicht I lokalisiert. Die tdTomato-Zellen kommen in allen Schichten vor. In der Schicht I sind kaum tdTomato-Zellen angesiedelt. Jeweils etwa 14% von ihnen liegen in den Schichten II/III bis Va. Das Maximum ihres Vorkommens liegt in Schicht Vb und sinkt in Schicht VI geringfügig ab. GAD1-Zellen kommen in allen Schichten vor, am häufigsten in den Schichten II/III und Vb. Ihre Anzahl nimmt von Schicht II/III zu Schicht Va stetig ab, steigt in Schicht Vb und VI wieder auf das Niveau von Schicht IV an.

Zur Wahrung der gleichen Vorgehensweise und besseren Vergleichbarkeit der beiden hier untersuchten und charakterisierten transgenen Tierlinien (GIN und SOMcre/tdTomato), wurde bei den SOMcre/tdTomato-Tieren ebenfalls eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer Somatostatin-Sonde durchgeführt und wie folgt ausgewertet.

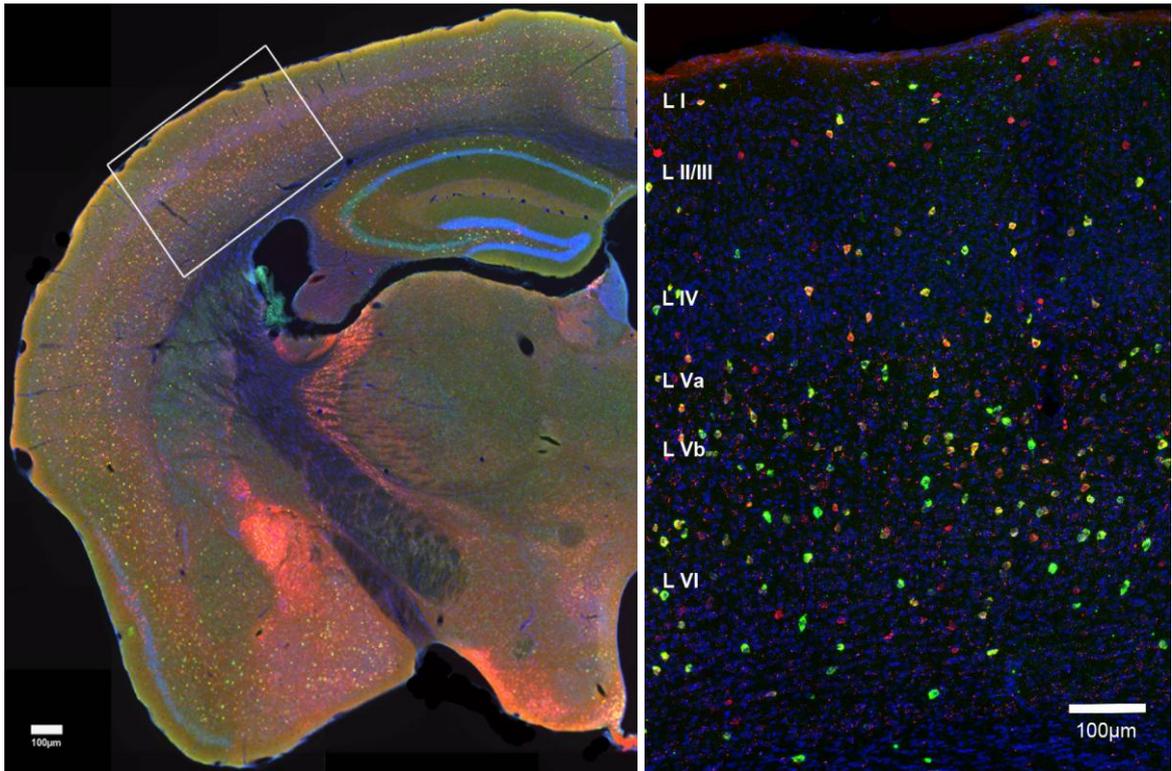


Abbildung 31: SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der SOM-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer SOMcre/tdTomato-Maus zeigt das transgene tdTomato-Signal, welches mit α DsRed/ α RFP markiert wurde (rot), die SOM-markierten Zellen (grün), die Kokoloration (gelb) und die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (blau).

A zeigt die rechte Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (weißes Rechteck).

B zeigt die *maximum intensity projection* eines Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind als römische Zahlen angegeben. Eine Kokoloration des transgenen tdTomato-Signals mit den SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

Das tdTomato-Signal (rot) der SOMcre/tdTomato-Maus wurde durch die Verwendung eines α DsRed- oder α RFP-Antikörpers in allen 18 Schnitten von 6 Tieren verstärkt (Abb. 31, A). Die Somatostatin-Sonde (grün) weist eine geringe Hintergrundfärbung auf, so dass sich die Zellen deutlich von diesem abgrenzen lassen (Abb. 32, B). Die Zellkerne und einige Barrels sind mit der DAPI-Färbung (blau) gut dargestellt (Abb. 31, B). Auffällig ist, dass die Somatostatin-positiven Zellen in den infragranulären Schichten in einer höheren Anzahl vorliegen (Abb. 32, B). Die Kokoloration des transgenen tdTomato-Signals mit der Somatostatin-Sonde ist dabei deutlich in der Übereinanderlagerung durch eine gelbe Färbung zu erkennen (Abb. 32, C).

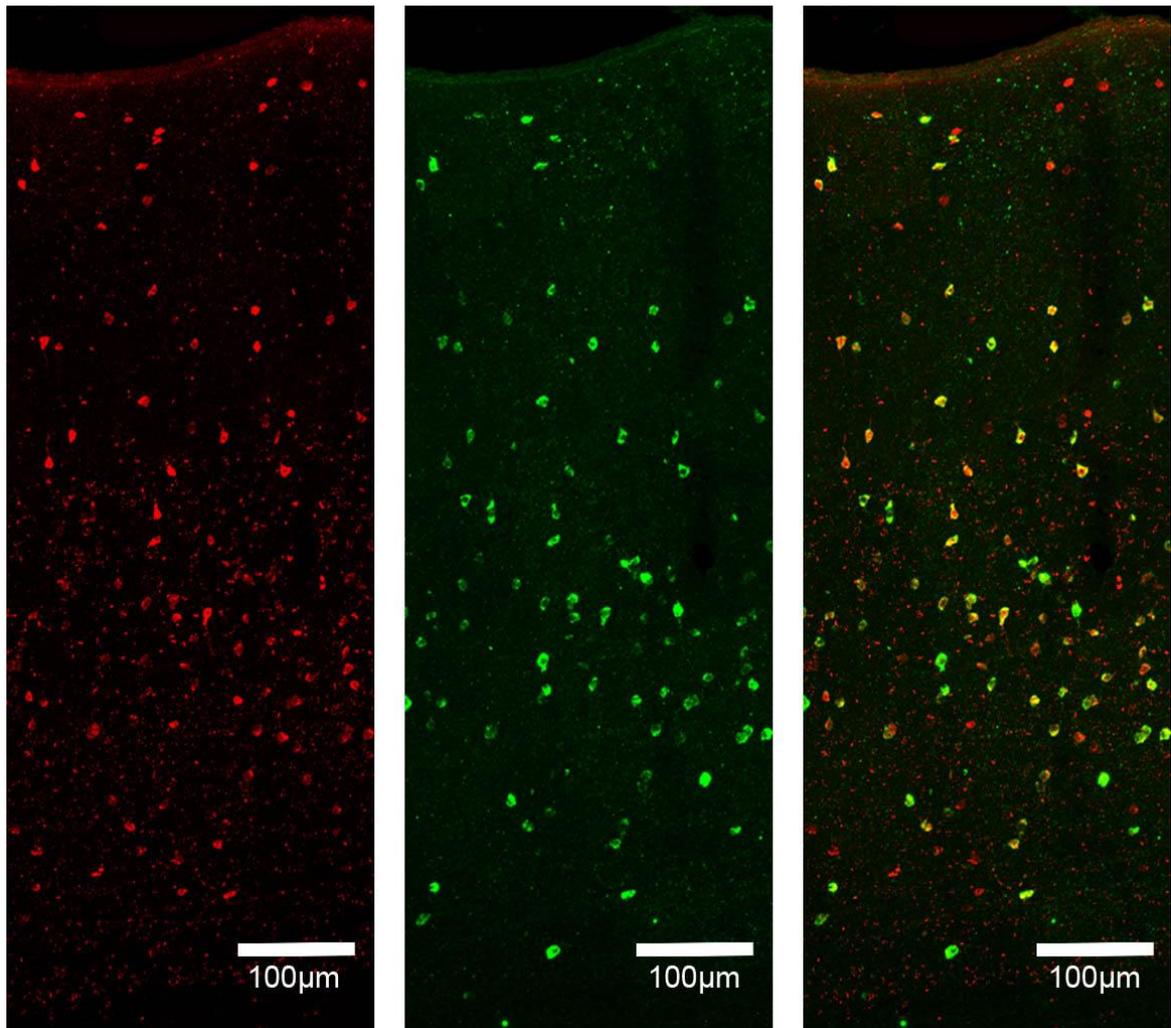


Abbildung 32: Kolumnenassoziierte Darstellung der SOM-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Der Auszug aus Abb. 31 zeigt das transgene tdTomato-Signal, welches mit α DsRed/ α RFP markiert wurde (rot), die SOM-markierten Zellen (grün) und die Kolokalisation (gelb) im Bereich einer barrelasoziierten Kolumne in der *maximum intensity projection*. In A sind die tdTomato-positiven Zellen, in B die SOM-positiven Zellen und in C die Übereinanderlagerung beider Signale dargestellt. Eine Kolokalisation des tdTomato-Signals mit den SOM-positiven Zellen wird durch die gelbe Färbung sichtbar. Maßstab: 100 μ m.

Die quantitative Analyse der markierten Neurone in der Somatostatin-Sonden-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigt, dass es Neurone gibt, die nur das tdTomato-Signal tragen und somit nicht durch die Somatostatin-Sonde markiert sind (Abb. 33 und Anhang Tab. 32). In 1 mm³ Barrel-Kortex wurden $714,7 \pm 495,2$ nur tdTomato-positive Neurone gezählt. Es gab insgesamt $5083,4 \pm 609,4$ Kolokalisationen und $56,2 \pm 113,1$ Neurone, die nur mit der SOM-Sonde markiert wurden. Die nur tdTomato-positiven Zellen kommen von Schicht II/III bis VI vor. Dabei sinkt ihre Anzahl bis Schicht Va und steigt dann wieder bis

Schicht VI, in der sie mit $274,3 \pm 194,5$ Zellen das Maximum erreicht. Ausschließlich mit der SOM-Sonde markierte Zellen kommen in den Schichten II/III bis VI in sehr geringer Zahl vor ($7,4 \pm 16,5$ bis $15,4 \pm 31,4$ Zellen). Zellen, die beide Signale aufweisen, kommen in allen Schichten des Barrel-Kortex vor. In der genaueren Aufteilung, können nur $7,4 \pm 6,5$ kolokalisierte Neurone in der Schicht I registriert werden. Die Zellzahl der Kolokalisationen ist von Schicht II/III bis Va relativ gleichmäßig mit einem leicht erhöhten Wert in der Schicht IV ($652,4 \pm 107,4$ Zellen in Schicht II/III, $740,0 \pm 116,5$ Zellen in Schicht IV und $724,4 \pm 96,2$ Zellen in Schicht Va). Das größte Vorkommen der Zellen, die tdTomato- und SOM-Positiv sind, ist in Schicht Vb zu finden, in der mit $1691,6 \pm 251,7$ Zellen über ein Drittel von ihnen liegt. Die Schicht VI hat das zweitgrößte Vorkommen der kolokalisierten Neurone mit $1267,6 \pm 205,9$ Zellen. Alle Signifikanzen sind im Anhang Tab. 33 angegeben.

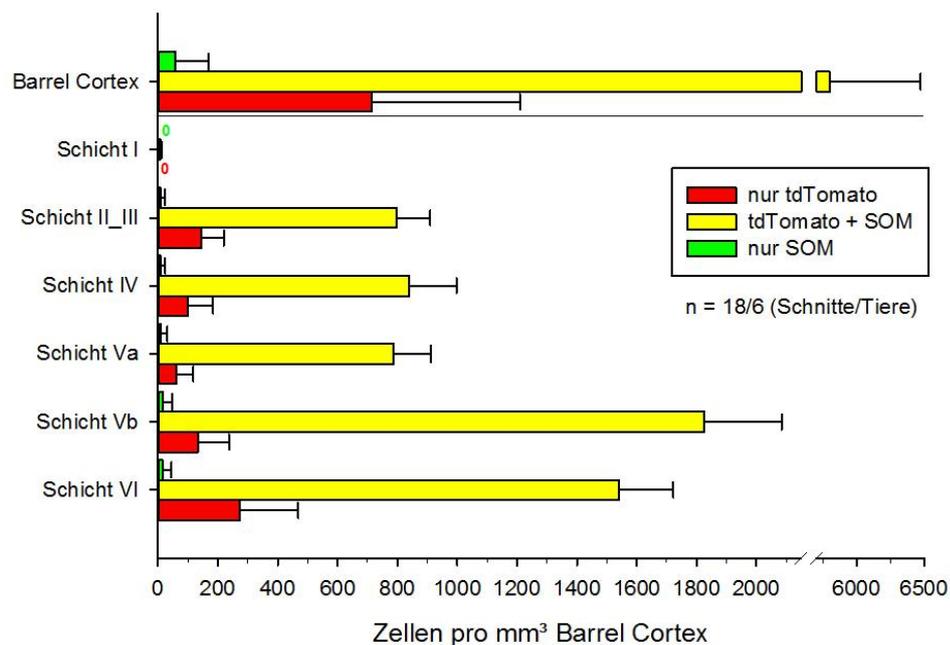


Abbildung 33: Verteilung der tdTomato-, SOM-positiven und der kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die auf 1 mm^3 Barrel-Kortex berechneten Zellzahlen für die ausschließlich tdTomato-positiven (rot), die ausschließlich SOM-positiven (grün) sowie für die mit tdTomato und SOM kolokalisierten Zellen (gelb). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der analysierten 18 Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Es gibt ausschließlich tdTomato-positive Zellen ohne SOM-Sonde. Sie kommen von Schicht II/III bis VI in geringer Anzahl vor. Die rein SOM-positiven Zellen kommen ebenfalls von Schicht II/III bis VI vor. Ihre Anzahl nimmt bis Schicht Va ab und bis Schicht VI wieder zu. Die kolokalisierten Zellen kommen in jeder Schicht häufiger als alle anderen Zellen vor. Ihre Zellzahl ist in den Schichten II/III bis Va ähnlich und hat in Schicht Vb ihr Maximum, da sich hier über $1/3$ aller kolokalisierten Zellen befindet. Die unterste Schicht VI enthält die zweithöchste Anzahl an kolokalisierten Zellen.

Bei der Betrachtung der relativen Verteilung aller tdTomato-positiven (inklusive der Kolokalisationen) und aller kolokalisierten Zellen über die kortikalen Schichten I bis VI lässt sich Folgendes festhalten. Die tdTomato-positiven Zellen kommen in allen Schichten vor. Prozentual gesehen befinden sich nur $0,1\% \pm 0,1\%$ von ihnen in der obersten kortikalen Schicht. In den folgenden Schichten II/III, IV und Va sind die tdTomato-positiven Zellen mit jeweils circa 14% annähernd gleich verteilt. Wohingegen fast ein Drittel ($31,5\% \pm 4,5\%$) aller tdTomato-Neurone in der Schicht Vb und $26,3\% \pm 3,1\%$ der Neurone in der Schicht VI lokalisiert sind (Abb. 34, rote Balken und Anhang Tab. 34). Demzufolge kommen in den Schichten Vb und VI signifikant mehr tdTomato-positive Zellen im Vergleich zu allen anderen Schichten vor (Anhang Tab. 35). Die relative Verteilung aller kolokalisierten Zellen, d.h. die gleichzeitig positiv für tdTomato- und die Somatostatin-Sonde sind (Abb. 34, gelbe Balken), zeigt eine komplett analoge Verteilung wie die ausschließlich tdTomato-positiven Zellen (Anhang Tab. 36). Der Anteil der kolokalisierten Neuronen an den tdTomato-positiven Zellen der SOMcre-Maus betrug in 1 mm^3 Barrel-Kortex $87,7\% \pm 4,5\%$ (Abb. 34, graue Balken). In der schichtenbezogenen Auswertung zeigten in der Schicht I alle Zellen ($100\% \pm 0,1\%$) eine Kolokalisation. Der geringste Anteil der kolokalisierten Zellen an den tdTomato-positiven Zellen war in der Schicht II/III mit $81,9\% \pm 0,9\%$ zu beobachten. In der Schicht V sind mit $92,1\% \pm 0,7\%$ bzw. $92,7\% \pm 1,7\%$ für die Schichten Va und Vb der höchste Anteil zu verzeichnen. Die Verteilungen innerhalb der kortikalen Schichten sind nur im Vergleich zwischen der Schicht I und den Schichten II/III bis VI signifikant unterschiedlich (Anhang Tab. 37).

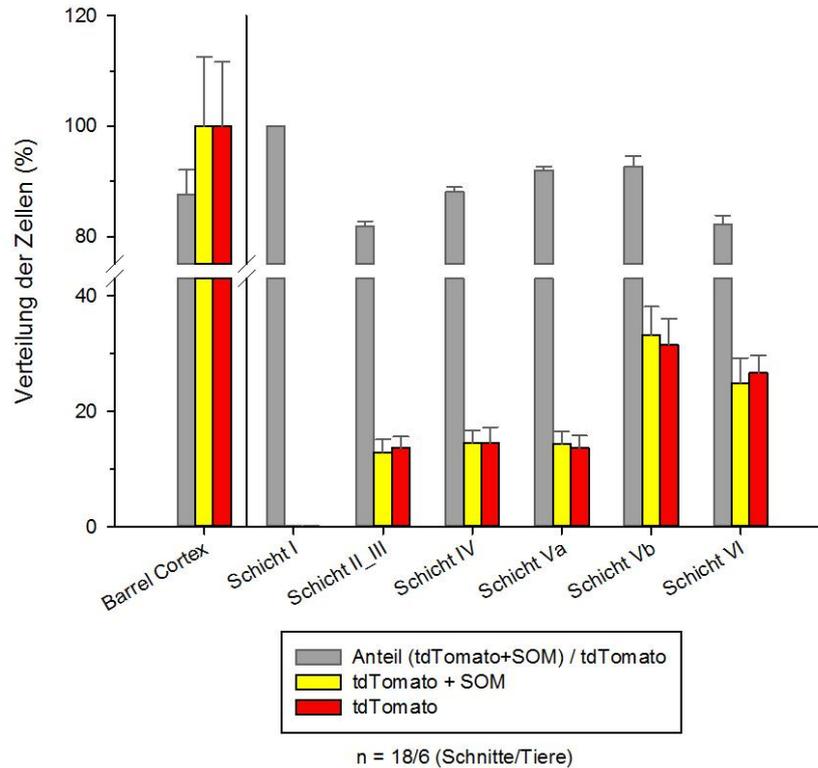


Abbildung 34: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der tdTomato-positiven und kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung aller tdTomato-positiver Zellen (rot) sowie aller mit SOM und tdTomato kolokalisierten Zellen (gelb). Des Weiteren ist der Anteil aller kolokalisierten Zellen an den SOM-positiven Neuronen abgebildet (grau). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der 18 analysierten Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Insgesamt sind etwa 88% aller tdTomato-positiven Zellen auch SOM-positiv. In der Schicht V ist der Prozentsatz der kolokalisierten Zellen mit fast 93% am höchsten, wohingegen in der Schicht II/III mit ca. 82% die geringste Überlagerung beider Signale festgestellt wurde.

3.2.3 Vergleich von IHC und FISH

Um zu ermitteln, wie viele tdTomato-positive Zellen auch α SOM, GAD1- oder SOM-positiv sind, wird ein direkter Vergleich der Kolokalisationen in der relativen Verteilung durch alle kortikalen Schichten der jeweils 18 Schnitte durchgeführt (Abb. 35). Hierbei fällt zunächst eine in Grundzügen ähnliche Verteilung der kolokalisierten Zellen sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf. In der Schicht I kommen die wenigsten kolokalisierten Zellen vor. Die ermittelten Werte liegen hier nahezu bei null. Die folgenden Schichten II/III bis Va beinhalten jeweils ungefähr 13-15% der tdTomato-Zellen, die zusätzlich mit α SOM, GAD1 oder SOM

markiert sind. Die untersten beiden Schichten enthalten die größten Mengen an doppelt markierten Zellen, wobei die Maxima mit etwa 30-33% in der Schicht Vb liegen. In der Schicht VI sind noch 25-28% aller kolokalisierten Zellen zu finden.

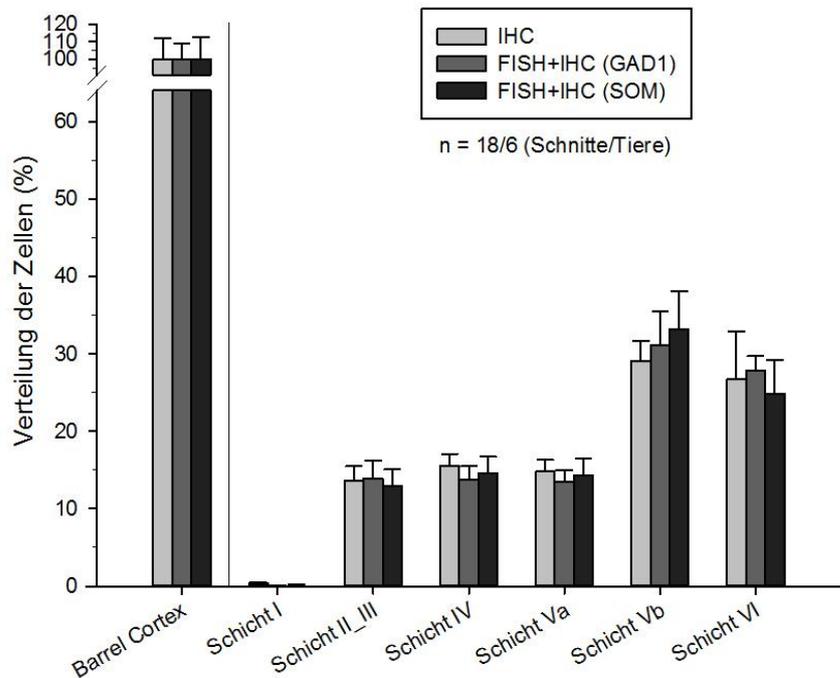


Abbildung 35: Prozentuale schichtenspezifische Verteilung der tdTomato-Zellen in Kolokalisation mit α SOM, GAD1 und SOM im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale schichtenspezifische Verteilung aller tdTomato-positiver Zellen, die in der Immunhistochemie mit α SOM (hellgrau) und in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit GAD1 (mittelgrau) oder SOM (dunkelgrau) markiert wurden. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI der jeweils 18 analysierten Schnitte von 6 Tieren dargestellt.

Kolokalisierte Zellen kommen in allen kortikalen Schichten vor. Der geringste Anteil (<1%) ist in der Schicht I lokalisiert. In den Schichten II/III bis Va liegen die Werte mit ca. 13-15% nah bei einander. Etwa 30% der doppelt markierten Zellen befinden sich in der Schicht Vb, gefolgt von Schicht VI.

3.3 Test der SOM-Sonde mit α SOM

An Schnitten einer SOMcre-Maus wurde die Spezifität der Somatostatin-Sonde überprüft. Dies geschah in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der SOM-Sonde, gefolgt von einer Immunhistochemie mit dem bereits im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Somatostatin-14-Antikörper. Es wurden drei Schnitte aus dem Bereich des primären somatosensorischen Kortex unter dem Mikroskop begutachtet und einer exemplarisch aufgenommen und ausgezählt, da alle qualitativ das gleiche Ergebnis zeigten. Die Verteilung der Zellen liegt folgendermaßen vor: Schicht I enthält kaum

Somatostatin-positive Zellen, die Schichten II/III bis Va haben eine ähnliche Zellzahl mit einem leichten Anstieg in Schicht IV. Das Maximum liegt in der Schicht Vb, gefolgt von der untersten Schicht VI. In der Abb. 36 ist deutlich zu erkennen, dass weder Neurone vorkommen, die nur mit der SOM-Sonde markiert wurden (hellgrau), noch welche, an die nur der SOM-Antikörper gebunden hat (schwarz). Somit liegen alle vorkommenden Neurone in kolokalisierter Form vor. Dadurch kann die Spezifität der Somatostatin-Sonde angenommen werden.

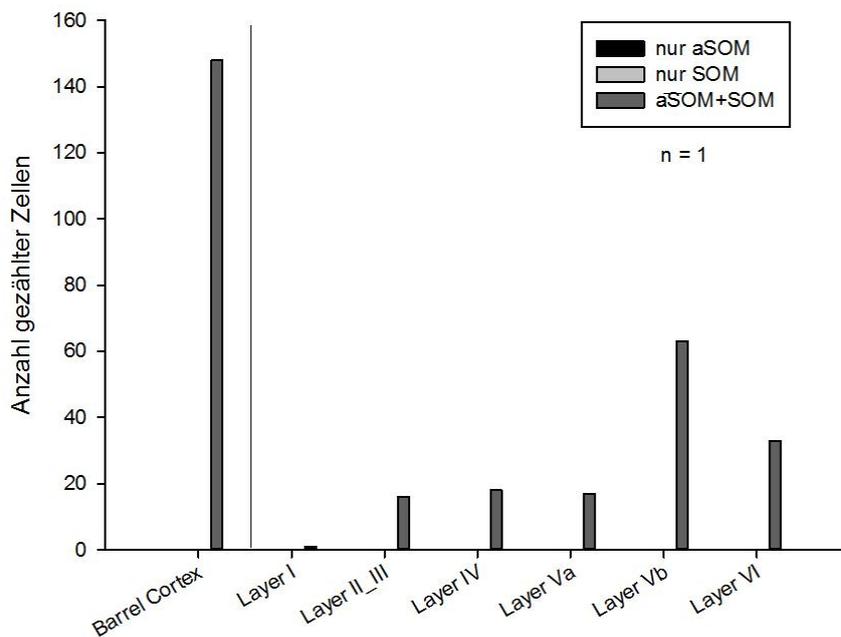


Abbildung 36: Verteilung der mit α SOM und SOM kolokalisierten Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

Die Balkendiagramme zeigen die absoluten Zellzahlen für die α SOM- und SOM-positiven Zellen. Es sind die Werte für alle Schichten (Barrel-Kortex) und für die Schichten I, II/III, IV, Va, Vb und VI des analysierten Schnittes abgebildet.

Es gibt keine α SOM-positiven Zellen ohne SOM-Sonde (100% Kolokalisation). Sie kommen in der Schicht I in sehr kleiner Zahl vor. Ihre Anzahl ist in den Schichten II/III bis Va ähnlich und hat in Schicht Vb ihr Maximum. Die unterste Schicht VI enthält die zweithöchste Menge an Kolokalisationen.

3.4 Test α DsRed (Fa. Clontech) und α RFP (Fa. Rockland)

Weiterhin wurden die beiden verwendeten primären Antikörper DsRed (Fa. Clontech) und α RFP (Fa. Rockland) gegeneinander getestet. Dabei wurde der α RFP in den Verdünnungen 1:250, 1:500 und 1:1000 eingesetzt. Der DsRed-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:

250 benutzt. Der eingesetzte sekundäre Antikörper war bei beiden gleich (siehe Material und Methoden). Die Versuche wurden im Anschluss an eine FISH durchgeführt, da während dieser Behandlung das native tdTomato-Signal komplett verloren ging. In den Aufnahmen war ein Unterschied in der Färbintensität, jedoch nicht in der Menge der angefärbten Zellen zwischen den beiden Antikörpern deutlich erkennbar. In der Abstufung vom besten zum schlechtesten Ergebnis liegt α RFP (1:250) an erster Stelle (Abb. 37), gefolgt von α RFP (1:500) und α RFP (1:1000). Das schlechteste Ergebnis liegt beim α DsRed (1:250). Da für die hier verwendeten Methoden und Versuche das Ergebnis der 1:500 Verdünnung des α RFP für ausreichend angesehen wurde, kam der Antikörper in dieser Verdünnung bei allen nachfolgenden Versuchen zum Einsatz (siehe Material und Methoden).

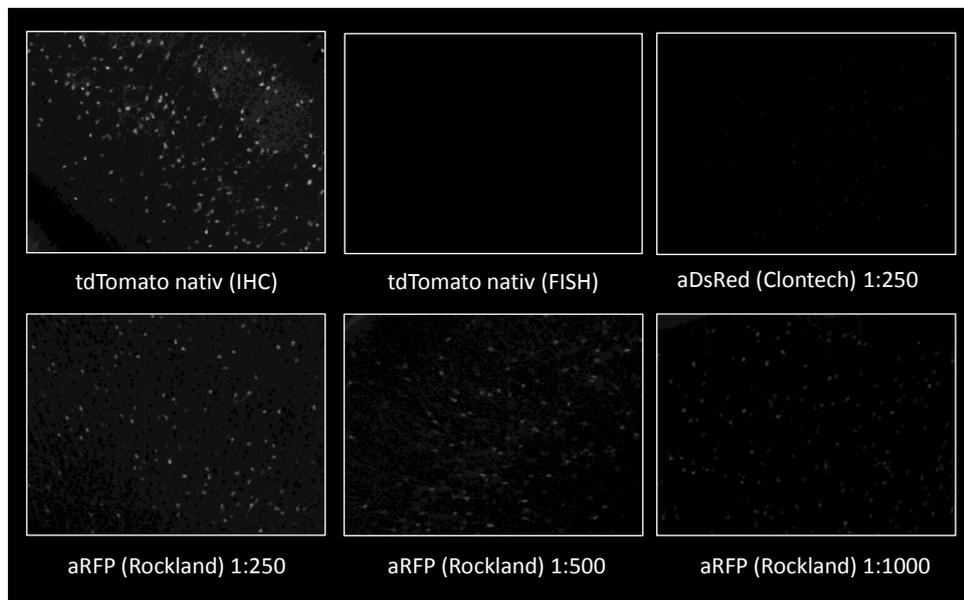


Abbildung 37: Antikörper-markierte Zellen in der SOMcre/tdTomato-Maus

Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome, 10-fache Vergrößerung, Belichtungszeit normiert auf das native tdTomato-Signal

IHC: natives tdTomato-Signal, FISH: nativ, ohne anschließende IHC, alle anderen Abbildungen erfolgten nach FISH gefolgt von einer IHC.

Verwendete Antikörper: α DsRed (Fa. Clontech) in der Verdünnung 1:250, α RFP (Fa. Rockland) in den Verdünnungen 1:250 / 1:500 / 1:1000

4 Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation war es, die transgene GIN-Mauslinie im Bereich des primären somatosensorischen Kortex mittels Immunhistochemie sowie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf neurochemischer Ebene schichtenspezifisch zu charakterisieren. Es sollten Aussagen über die Sensitivität und Spezifität der fluoreszierenden GFP-Zellen gemacht und deren Verteilung untersucht werden. Um genauere Erkenntnisse zu erlangen, wurden in der Immunhistochemie Antikörper gegen das grünfluoreszierende Protein (GFP), Somatostatin und GABA eingesetzt. In der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden zur weiteren Charakterisierung der GFP-positiven Zellen die GAD1-, SOM-, PV-, VIP- und VGLUT1-Sonden verwendet.

Eine zweite transgene Mauslinie, die SOMcre/tdTomato-Maus, wurde in die Untersuchung mit einbezogen, um eventuelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten zur GIN-Maus darzustellen, da laut Literatur in der GIN-Maus lediglich eine Subpopulation der Somatostatin-tragenden Zellen mit GFP markiert ist. Um die Vergleichbarkeit beider Mauslinien zu gewährleisten, wurden beide Verfahren, IHC und FISH, mit den oben genannten Antikörpern bzw. Sonden angewandt.

Folgende Ergebnisse konnten als Hauptaussagen nach den Untersuchungen zusammenfassend getroffen werden:

1. Die Mehrzahl GFP-positiver Neurone befindet sich in den Schichten II/III, IV und Va.
2. Alle GFP-positiven Zellen sind auch SOM-positiv. Jedoch sind nicht alle SOM-positiven Zellen auch GFP-positiv.
3. Alle GFP-positiven Zellen sind GABAerge Interneurone.
4. Eine Kolokalisation der GFP-Neurone mit PV, VIP und VGLUT1 lag nicht vor.
5. Die tdTomato-Zellen der SOMcre/tdTomato-Maus sind SOM-Zellen.
6. Die meisten SOM-Zellen befinden sich in der Schicht Vb.
7. Die tdTomato-Zellen sind alle GAD1-positiv.
8. Eine Kolokalisation der Somatostatin-positiven Zellen mit PV, VIP und VGLUT1 war nicht zu finden.

4.1 Methodische Betrachtungen

4.1.1 Schnittdicke

In dieser Dissertation wurde zunächst mit der GIN-Maus begonnen, die mit Hilfe der IHC charakterisiert werden sollte. Hier wurden Schnittdicken von 50 µm angefertigt, da diese Schnittdicken am Vibratom für immunhistochemische Verfahren in unserem Labor wie auch in anderen (Caputi et al. 2009; Kawaguchi und Kubota 1997; von Engelhardt et al. 2011) standardmäßig eingesetzt werden. Da die IHC als alleiniges Verfahren für die Charakterisierung der GIN-Maus nicht ausreichte, wurde diese durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ergänzt. Für die FISH musste experimentbedingt die Schnittdicke auf 40 µm reduziert werden. In der Literatur sind Schnittdicken von 40 µm häufig zu finden (Halabisky et al. 2006; Ma et al. 2006), jedoch werden auch Schnittdicken von 16, 25, 40 und 50 µm (Xu et al. 2006), aber auch 20 µm (Pesold et al. 1999) verwendet.

Die unterschiedliche Dicke der Schnitte bei der GIN-Mauslinie, genauer 50 µm bei der Immunhistochemie und 40 µm bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde während der Analyse vergleichbar gemacht, indem ein Korrekturfaktor zur Normierung für jeden Schnitt eingebracht wurde (siehe Material und Methoden). In nachfolgenden Experimenten, bei der Charakterisierung der SOMcre-Mauslinie, wurden die Schnittdicken für beide eingesetzten Methoden, IHC und FISH, auf ein einheitliches Maß von 40 µm eingestellt.

Ungenauigkeiten der Schnittdicken, die während des Schneideprozesses am Vibratom für die IHC und am Cryostat für die FISH entstanden sind, wurden ebenfalls durch einen Normalisierungsschritt ausgeglichen (siehe Material und Methoden). Dabei wurden Abweichungen in einem Toleranzbereich von $\pm 1-2$ µm akzeptiert und ausschließlich größere Unterschiede angeglichen.

4.1.2 IHC und FISH

In dieser Arbeit wurde die IHC eingesetzt, um für die Charakterisierung relevante Proteine in den zu untersuchenden Zellen nachzuweisen. Dabei wurden ausschließlich polyklonale Primärantikörper eingesetzt, an deren Epitope mehrere Sekundärantikörper binden

konnten. Die Sekundärantikörper waren mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und konnten anschließend unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Sekundärantikörper kam es zur Signalverstärkung der jeweiligen Markierung, wodurch eine Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses erreicht wurde. Diese Methode wird auch als indirektes immunhistochemisches Verfahren bezeichnet.

Trotz des Einsatzes dieser, im Gegensatz zur direkten Immunhistochemie, viel empfindlicheren Methode konnte beim Nachweis des Neurotransmitters GABA in GIN-Neuronen kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. In den Färbungen zeigte sich eine sehr dominante Hintergrundfärbung zusammen mit einer schlechten Penetrationstiefe (siehe 4.1.3). Um dieses Problem zu reduzieren, wurden die Tiere mit einem Gemisch aus 4% Paraformaldehyd, 15Vol% Pikrinsäure und 0,25% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer perfundiert. Eine Lösung mit 0,25% Glutaraldehyd hatte bereits Meskenaite (1997) erfolgreich bei einer GABA-IHC eingesetzt. Kawaguchi und Kubota (1996) verwendeten zunächst eine Lösung mit 2,5% Glutaraldehyd und später 0,1% Glutaraldehyd (Kawaguchi und Kubota 1997). Trotz dieser Modifikation des IHC-Protokolls konnte keine Verbesserung der Färbequalität erreicht werden. Daher war es für den Nachweis des Neurotransmitters GABA in den GFP-positiven Neuronen unumgänglich eine FISH mit der GAD1-Sonde in Kombination mit der IHC (siehe Material und Methoden) zu etablieren.

Im Gegensatz zum Proteinnachweis in der IHC wird bei der FISH die mRNA der interessierenden Gensequenzen nachgewiesen. Über eine indirekte Markierung mit Avidin und Biotin, an welche Fluorophore gebunden werden, werden die verwendeten, an die mRNA gebundenen Sonden sichtbar gemacht.

Beim Vergleich beider Verfahren, IHC und FISH, wird deutlich, dass sich sowohl die Verteilung als auch die Kollokalisierung der untersuchten Proteine bzw. mRNA mit dem nativen GFP-Signal über die verschiedenen Schichten des primären somatosensorischen Kortex entsprechen.

Für die GIN-Maus konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Mehrheit der GFP-positiven Zellen mit etwa 40% in beiden Verfahren in der Schicht II/III liegt und ihre Anzahl bis zur Schicht Vb stetig absinkt. In der Gegenüberstellung des Somatostatin-Antikörpers mit der Somatostatin-Sonde korrelieren die Ergebnisse ebenfalls

in der prozentualen schichtenspezifischen Verteilung. Für die SOMcre/tdTomato-Maus konnten analoge Befunde festgestellt werden. Durch die Anwendung zweier unterschiedlicher Verfahren können die gewonnenen Ergebnisse sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene miteinander verglichen werden. Zusätzlich wurde die Spezifität der verwendeten Somatostatin-Sonde an Schnitten der SOMcre/tdTomato-Maus mit Hilfe der FISH, gefolgt von der IHC mit dem SOM-14-Antikörper überprüft (siehe 3.3). Es kamen weder Interneurone vor, die nur mit der SOM-Sonde markiert wurden, noch welche, an die allein der SOM-14-Antikörper gebunden hat. Da alle markierten Zellen in Kolokalisation vorlagen, gilt die Spezifität der SOM-Sonde als erwiesen.

Des Weiteren wurden Versuche mit den PV-, VIP- und VGLUT1-Sonden durchgeführt, um die GFP-positiven Neurone in der GIN-Maus hinsichtlich einer Kolokalisierung mit Parvalbumin, vasoaktivem intestinalen Polypeptid und VGLUT1 zu untersuchen. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte nur qualitativ mittels mikroskopischer Betrachtung, wobei keine Kolokalisation gefunden werden konnte. Diese qualitativen Ergebnisse stehen im Einklang mit dem gegenwärtigen Konzept der Existenz von drei molekular distinkten Subgruppen von GABAergen Nervenzellen: PV-, SOM- und VIP-exprimierende Interneurone (Pfeffer et al. 2013; Rudy et al. 2011).

4.1.3 Aufnahmen

Für die Aufnahmen sowohl der immunhistologischen Schnitte als auch der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wurde die Epifluoreszenzmikroskopie mit Zuhilfenahme eines ApoTomes (siehe Material und Methoden) eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und geben Licht einer anderen Wellenlänge ab, welches durch spezielle Gitter betrachtet und aufgenommen werden kann. Das ApoTome sorgt dafür, dass nur das Licht aus der zu betrachtenden Fokusebene aufgenommen wird, während das Einfallen des Lichts aus den anderen Ebenen weitestgehend minimiert werden soll. Die Genauigkeit dieses mathematischen Verfahrens ist jedoch von der Schnittdicke des zu untersuchenden Gewebes abhängig. Weigel und Mitarbeiter (2009) stellten fest, dass ab einer Schnittdicke von 27 μm die Überstrahlung aus anderen Ebenen stark zunimmt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden weitestgehend 40 μm dicke Gehirnschnitte herangezogen. Nach dem Durchlaufen der histologischen Prozeduren hatten die Schnitte eine durchschnittliche Dicke von 20-21 μm , unabhängig

davon, ob eine IHC oder FISH durchgeführt wurde. Diese Schrumpfung wird für die hier eingesetzten Methoden als gängig angesehen. Bei der immunhistochemischen Charakterisierung der GIN-Mauslinie wurden 50 µm dicke Schnitte verwendet, die nach dem Färben eine durchschnittliche Dicke von 29 µm aufwiesen. In der Auswertung der mikroskopischen Bilder mit ApoTome konnte allerdings kein Unterschied zwischen der IHC und der FISH bei der GIN-Maus festgestellt werden. Dadurch kann abschließend festgehalten werden, dass die Epifluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Illumination ein geeignetes Verfahren für die hier durchgeführten Versuche ist. Desweiteren bietet die Methode auch die Möglichkeit die Aufnahmen in x-y-z-Ebene aufzunehmen, so dass nach Aufnahmeende ein kompletter Bildstapel des gescannten Mausgehirngebiets in allen drei Ebenen auswertbereit zur Verfügung steht.

Alternativ hätte man sich für die Aufnahmen auch der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) bedienen können, bei der abwechselnd nur ein Laser mit einer definierten Wellenlänge das Präparat rasterförmig erfasst und das abgehende Signal aufgenommen wird. Im Computer entsteht dann das vollständige Bild. Vorteil dieser Technik ist, dass im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie geringere Kachelartefakte durch Ausbleichen entstehen und ein Durchbluten der Kanäle gänzlich ausgeschlossen werden kann. Das Durchbluten tritt auf, wenn mehrere Fluoreszenzfarbstoffe mit teilweise überlappenden Exzitations- / Emissions-Wellenlängen zeitgleich angeregt und aufgenommen werden. Besonders wichtig ist es daher, dieses Phänomen bei der Fragestellung nach Kollokalisierungen möglichst auszuschalten. An je einem Schnitt pro Antikörper bzw. Sonde wurden konfokale Aufnahmen durchgeführt, um die am Epifluoreszenzmikroskop gezeigten Kollokalisationsraten zu verifizieren (Bilder nicht gezeigt). Dabei konnten alle beschriebenen Kollokalisierungen eindeutig belegt werden.

Zu Kachelartefakten kommt es dadurch, dass im Epifluoreszenzmikroskop mit ApoTome eine viel größere Fläche bestrahlt als über die Kamera detektiert wird. Dadurch werden die benachbarten Positionen der x-y-z-Aufnahmen bereits belichtet bevor sie das erste Mal aufgenommen werden. Dieser Effekt erhöht sich mit der Anzahl an ausgewählten x-y-Positionen. Trotz dieses Effekts, der in Abhängigkeit der Güte der Färbung unterschiedlich ausfiel, war es in der fertig zusammengesetzten Aufnahme jederzeit eindeutig möglich, zwischen Hintergrund und spezifischer Anfärbung zu unterscheiden.

Für die Abgrenzung der Schichten wurde die DAPI-Färbung verwendet, die ohne ApoTome-Modus aufgenommen wurden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Aufnahmen des Epifluoreszenzmikroskops mit ApoTome bei korrekter Einstellung und unter Berücksichtigung der maximalen Schnittdicke mit denen des konfokalen Mikroskops qualitativ vergleichbar sind und für eine schichtenbezogene Auswertung eine gute Wahl darstellten (Weigel et al. 2009).

4.1.4 Auszählung

Die Auszählung sowie die Einteilung der Schichten erfolgten manuell, jedoch computerunterstützt - nach den in Kapitel 1.2 und Kapitel 2.7.2 - beschriebenen Kriterien durch die Autorin. An einigen Schnitten wurden die Zählungen durch die Autorin zur Kontrolle wiederholt, insbesondere an den Schnitten, die zu Beginn der Analyse ausgezählt wurden. Zudem wurde zur Verifizierung der Zellzahlen und der Kollokalisierungen einige Schnitte von Personen ausgezählt, die nicht an der Studie beteiligt sind. Diese Kontrollpersonen kamen in 95% der Fälle auf dieselben Ergebnisse bzw. zu Abweichungen im 2-5% Bereich. Weiterhin erfolgte die Auszählung „blind“, d.h. es war der auszählenden Person nicht bekannt, um welchen Antikörper bzw. welche Sonde es sich handelte. Eine automatisierte Auszählung wurde nicht verfolgt, da derzeitige Algorithmen zu anfällig für falsch positive Kollokalisierungen sind, insbesondere in 3D-Aufnahmen. Daher hätte ohnehin eine zusätzliche manuelle Kontrollauszählung stattfinden müssen. In Zukunft soll mithilfe der in dieser Arbeit erhobenen Daten das open-source-Programm ImageJ genutzt werden, um ein Kollokalisationskript zu schreiben.

Bei der Auswertung wurde die Schicht V in Va und Vb unterteilt, aber auch als gesamte Schicht Va+b angegeben. Des Weiteren wurden die Schichten II und III als Schicht II/III zusammengefasst. Diese Einteilung spiegelt die am weitesten verbreitete Schichten-differenzierung im Kortex wider.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

GABAerge Interneurone, obgleich sie nur **20-25%** der kortikalen Neurone ausmachen, sind hauptverantwortlich für das richtige Niveau von kortikaler Erregung, insbesondere für die Kontrolle des zeitlichen Feuermusters von Pyramidenzellen (Klausberger und Somogyi

2008; Markram et al. 2004; McBain und Fisahn 2001; Pouille und Scanziani 2001; Trevelyan et al. 2006). Darüber hinaus tragen GABAerge Interneurone nicht nur zur Verarbeitung von sensibler Information bei, wie im untersuchten Barrel-Kortex, sondern sind auch an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt (Cybulska-Klosowicz et al. 2013). Veränderungen bzw. Abnormitäten in der Funktion inhibitorischer Interneurone können zu Funktionsstörungen des Gehirns, wie Epilepsie (Cossart et al. 2001), Rett Syndrom (Dani et al. 2005), Angststörung (Freund und Katona 2007) und Schizophrenie (Gonzalez-Burgos und Lewis 2008) führen. GABAerge Interneurone werden in drei neurochemisch distinkte Klassen unterteilt und weisen entweder eine Expression von Parvalbumin (PV), Somatostatin (SOM) oder dem ionotropen Serotoninrezeptor 3a (5HT3aR) auf (Rudy et al. 2011). Prozentual exprimieren **circa 30% der Interneurone SOM, 40% PV und 30% den 5HT3aR**, wobei letztere sich weiterhin nahezu zu jeweils 50% in die vasoaktiven intestinalen Polypeptid (VIP) exprimierende und die nicht VIP-exprimierende Interneurone unterteilen lassen (Pfeffer et al. 2013; Rudy et al. 2011).

4.2.1 Schichtenspezifische Verteilung der SOM-exprimierenden Interneurone

Das Neuropeptid Somatostatin wird im Neokortex von multipolaren und doppelt gebüschelten Interneuronen synthetisiert, welche hauptsächlich zu den Martinotti-Zellen gezählt werden (Kawaguchi und Kubota 1996; Ma et al. 2006; Wang et al. 2004). Zudem gehören zu der Gesamtheit der SOM-exprimierenden Interneuronen auch Nicht-Martinotti-Zellen, die vorrangig in der Schicht IV zu finden sind (Ma et al. 2006). Gemeinsam stellen sie die zweitgrößte Population GABAerger Interneurone (Gonchar et al. 2007; Lee et al. 2010; Xu et al. 2010). Sie haben ein kontinuierlich adaptierendes Feuermuster (Halabisky et al. 2006) und hemmen neben den Pyramidenzellen auch PV- und VIP-Zellen (Pfeffer et al. 2013). Sie selbst werden, laut neueren Studien, von VIP-Interneuronen (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013) und PV-Interneuronen (Walker et al. 2016) inhibiert.

GIN-Neurone

In dieser Studie wurde ein besonderes Augenmerk auf die Martinotti-Zellen gelegt. Ihre spezifische Verteilung über die kortikalen Schichten des primären somatosensorischen

Barrel-Kortex wurde anhand der GIN-Maus untersucht. Diese transgene Mauslinie trägt das verstärkte grün fluoreszierende Protein (eGFP) in einer Subpopulation Somatostatin-exprimierender Interneurone (Oliva et al. 2000). In einer Studie von 2004 wurde berichtet, dass circa 80% der SOM-exprimierenden Interneurone Martinotti-Zellen sind (Markram et al. 2004). Allerdings tragen neben den Martinotti-Zellen noch zwei weitere Unterarten der SOM-exprimierenden Neurone das transgene GFP-Signal (McGarry et al. 2010), die hier nicht näher beschrieben werden sollen.

Für 1 mm³ Barrel-Kortex der GIN-Maus lassen sich in dieser Studie $648,3 \pm 164,1$ Zellen in der IHC mit dem SOM-Antikörper, $532,0 \pm 47,3$ in der FISH mit der SOM-Sonde und $579,7 \pm 22,8$ in der FISH mit der GAD1-Sonde nachweisen. In der weiteren schichtenspezifischen Verteilung der GFP-Positiven Interneurone konnte gezeigt werden, dass das höchste Vorkommen der GFP-positiven Zellen stets in der Schicht II/III liegt. Diese enthält $39,7\% \pm 8,0\%$ aller in 1mm³ Barrel-Kortex vorkommenden GFP-exprimierenden Neurone in der IHC, $42,9\% \pm 3,1\%$ in der FISH (SOM) und $43,2\% \pm 2,2\%$ in der FISH (GAD1). Die Schicht IV enthält mit $31,6\% \pm 11,7\%$ (IHC), $36,7\% \pm 6,7\%$ (FISH, SOM) und $38,8\% \pm 6,8\%$ (FISH, GAD1) jeweils die zweithöchste Menge an α GFP-markierten Interneuronen. Die drittgrößte Anzahl GFP-exprimierender Interneurone liegt in der Schicht Va. Hier werden $24,0\% \pm 7,3\%$ (IHC), $18,7\% \pm 5,1\%$ (FISH, SOM) sowie $15,0\% \pm 2,9\%$ (FISH, GAD1) aller in 1 mm³ Barrel-Kortex vorkommender, mit dem GFP-Signal versehener Interneurone gezählt. Frühere Studien beschreiben auch, dass im Neokortex die Somata der GFP-exprimierenden Zellen hauptsächlich in den Schichten II bis IV und der oberen Schicht V liegen, aber selten ebenfalls in der tieferen Schicht V und Schicht VI gefunden werden (Gentet 2012; Markram et al. 2004; Oliva et al. 2000). In dieser Studie wird nachgewiesen, dass in der Schicht Vb nur etwa 1-5% aller α GFP-markierter Neurone liegen. Die GFP-positiven Zellen kommen in den Schichten I und VI gar nicht oder nur sehr selten vor. Abschließend lässt sich festhalten, dass die schichtenspezifische Verteilung der GFP-exprimierenden Interneurone in allen drei durchgeführten Versuchsreihen nahezu identisch ist und sich keine signifikanten Unterschiede zeigen.

In keinem einzigen der ausgewerteten Schnitte und keiner Schicht des Barrel-Kortex kommt in dieser Studie eine nur mit α GFP-markierte Zelle in der GIN-Mauslinie vor. Immer sind die Zellen entweder mit dem SOM-Antikörper in der IHC oder mit der SOM-Sonde in der FISH zusätzlich markiert und liegen somit zu 100,0% kolokalisiert vor.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass alle GFP-exprimierenden Interneurone Somatostatin koexprimieren. Bereits 2005 wurde gezeigt, dass 100% der Martinotti-Zellen in Ratten SOM-positiv waren (Toledo-Rodriguez et al. 2005). Zu dem Ergebnis, dass alle GFP-positiven Zellen auch immunopositiv für Somatostatin sind, kamen Gentet et al. (2012) ebenfalls. Andere Studien geben an, dass etwa 97% (Ma et al. 2006; Oliva et al. 2000) beziehungsweise etwa 99% (Halabisky et al. 2006) aller GFP-Neurone SOM-positiv sind.

Um Aussagen zum Anteil der GFP-positiven Neurone der GIN-Maus an den Somatostatin-exprimierenden Interneuronen zu treffen, wurden die SOM-positiven Zellen ebenfalls schichtenbezogen ausgezählt. In 1 mm³ Barrel-Kortex der GIN-Maus lassen sich in dieser Studie $3183,4 \pm 1039,1$ (IHC) beziehungsweise $5673,5 \pm 231,8$ (FISH) SOM-positiv Interneurone nachweisen. Die Mehrheit von ihnen befindet sich in der IHC in den neurokortikalen Schichten Vb und IV, wobei die Anzahl in der Schicht VI ($618,0 \pm 197,0$) nur minimal kleiner als in der Schicht IV ($628,2 \pm 188,0$) ist. In der FISH befinden sich die meisten SOM-positiven Zellen in den Schichten Vb und VI, gefolgt von der Schicht IV. Im Jahr 1997 wurde in der Ratte gezeigt, dass sich die meisten SOM-exprimierenden Neurone in der Schicht V befinden (Cauli et al. 1997). Eine weitere Studie am frontalen Rattenkortex bestätigt, dass etwa 45% der GABAergen Interneurone der Schicht V, 30% der Schicht VI sowie 26% der Schicht II/III SOM-positiv sind (Kubota et al. 1994). In der Maus wurde in der Studie von Suzuki und Bekkers (2010) die größte Anzahl SOM-exprimierender Neurone in der tieferen Schicht III gefunden. Andere Studien bestätigen dagegen, dass sich die SOM-positiven Zellen in den infragranulären Schichten befinden. So wurden die meisten SOM-positiven Zellen im visuellen und primären somatosensorischen Kortex in den Schichten IV und V, im frontalen Kortex jedoch in den Schichten V und VI (Xu et al. 2010) registriert. Im Barrel-Kortex wurden von Rudy et al. im Jahr 2011 ebenfalls die Schichten V und VI als die mit den meisten SOM-exprimierenden Neuronen beschrieben. Eine weitere Studie bestätigt das Zellmaximum der SOM-positiven Neurone in einer Entfernung von 600-650 µm von der Pia mater, was der Schicht Vb entspricht (DeFelipe et al. 2002). In dieser Studie sind insgesamt annähernd 50% der SOM-positiven Neurone in den Schichten Vb und VI lokalisiert. Die Schichten II/III, IV und Va enthalten jeweils etwa 14-20% aller SOM-exprimierenden Neurone. Die geringste Anzahl SOM-positiver Interneurone sowohl in der IHC mit $0,0\% \pm 0,0\%$ als auch in der FISH mit $0,1\% \pm 0,1\%$ wurde in der obersten

Schicht I registriert. Bereits in früheren Studien wurden für die Schicht I die wenigsten SOM-exprimierenden Neurone nachgewiesen (Pfeffer et al. 2013; Rudy et al. 2011; Xu et al. 2010).

Jedoch sind nicht alle SOM-positiven Interneurone auch GFP-positiv. Dieses Ergebnis war abzusehen, da die GFP-markierten Zellen der GIN-Tierlinie nur eine Subpopulation aller Somatostatin-positiver Neurone umfassen. Auf Proteinebene sind in der IHC in 1 mm³ Barrel-Kortex 21,3% ± 4,6% aller SOM-exprimierender Zellen zusätzlich GFP-positiv, während auf mRNA-Ebene in der FISH 9,3% ± 0,6% der SOM-positiven Neurone auch GFP-exprimieren. In beiden Verfahren ist identisch, dass sich in der Schicht II/III das größte Verhältnis der kolokalisierten an allen SOM-positiven Zellen mit 44,4% ± 5,7% (IHC) und 30,6% ± 3,4% (FISH) anfindet. In der IHC ist der Anteil GFP-positiver Zellen an allen SOM-positiven Zellen in den Schichten IV und Va mit 32,0% ± 5,6% und 35,2% ± 9,2% annähernd gleich, während dieser in der FISH mit 20,4% ± 1,1% und 10,8% ± 2,3% deutlich abnimmt. Eine Studie aus dem Jahr 2010 gibt den Anteil GFP-positiv markierter Zellen an allen SOM-positiven Zellen für die Schicht II/III mit 34,8% an, während die Schicht IV mit 26,5% und die Schichten V und VI gemeinsam mit 10,8% deklariert werden (McGarry et al. 2010). Andere fanden heraus, dass 44% aller SOM-positiver Zellen in der Schicht II/III GFP-positiv sind (Gentet et al. 2012). In Schicht I liegt in dieser Studie der Anteil in beiden Verfahren identisch bei 8,3% ± 14,4%. In den infragranulären Schichten Vb und VI ist der Anteil der GFP-positiven Zellen an den SOM-exprimierenden Interneuronen verschwindend gering.

SOMcre/tdTomato-Maus

Nimmt man die Ergebnisse der SOMcre/tdTomato-Maus zum Vergleich dazu, wird in dieser Studie weiterhin nachgewiesen, dass sowohl in der IHC als auch in der FISH die Mehrheit SOM-exprimierender Zellen ebenfalls in den Schichten Vb und VI vorkommt, gefolgt von Schicht IV. Auffällig ist jedoch, dass bei dieser transgenen Mauslinie, in welcher die SOM-exprimierenden Interneurone mit einem tdTomato-Signal versehen sind, die Anzahl SOM-exprimierender Neurone in den Schichten Vb und VI mit jeweils etwa 5-7% höher liegt als bei der GIN-Mauslinie. Dieses Ergebnis gilt gleichermaßen für beide durchgeführten Verfahren, die IHC und die FISH. So wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die höchste Anzahl der SOM-positiven Neurone in der Schicht Vb mit 29,1% ± 2,6%

in der IHC beziehungsweise $33,2\% \pm 4,9\%$ in der FISH zu finden ist. In der untersten kortikalen Schicht VI lassen sich $26,7\% \pm 6,2\%$ (IHC) bzw. $24,9\% \pm 4,3\%$ (FISH) SOM-exprimierende Neurone nachweisen. In den Schichten II/III, IV und Va liegt die Anzahl der SOM-positiven Zellen jeweils bei etwa 13-16%. Somit ist in diesen Schichten bei der SOMcre/tdTomato-Maus die prozentuale Verteilung der SOM-positiven Interneurone minimal geringer als bei der GIN-Maus. Die Schicht IV enthält bei beiden Tierlinien stets eine leicht größere Anzahl SOM-exprimierender Interneurone als die Schichten II/III und Va. Die Schicht I beinhaltet bei der SOMcre/tdTomato-Maus mit $0,3\% \pm 0,2\%$ (IHC) und $0,1\% \pm 0,1\%$ (FISH) kaum SOM-positive Neurone, was mit den Ergebnissen der GIN-Maus übereinstimmt.

Nicht immer wurden alle tdTomato-Zellen mit dem SOM-Antikörper in der IHC bzw. der SOM-Sonde in der FISH markiert. In 1mm^3 Barrel-Kortex waren von $6338,4 \pm 757,2$ tdTomato-Zellen $15,4 \pm 22,4$ Zellen nicht mit αSOM kolokalisiert. In der FISH konnte bei $714,7 \pm 495,2$ tdTomato-Zellen von insgesamt $5798,1 \pm 675,2$ tdTomato-Zellen keine Kolokalisation mit der SOM-Sonde detektiert werden. Zudem entspricht die schichtenspezifische Verteilung der tdTomato-positiven Zellen nahezu dem Verteilungsmuster der mit Somatostatin kolokalisierten tdTomato-Zellen.

Hinzu kommt, dass es auch Zellen gab, die nur mit der SOM-Sonde markiert wurden, bei denen jedoch kein tdTomato-Signal gefunden wurde. In 1mm^3 Barrel-Kortex waren von insgesamt $5139,6 \pm 646,5$ SOM-positiven Zellen $56,2 \pm 113,1$ Zellen nur mit der SOM-Sonde markiert. Jedoch konnten keine nur mit dem SOM-Antikörper markierten Zellen gefunden werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass der Anteil der SOM-exprimierenden Neurone an den tdTomato-positiven Zellen der SOMcre-tdTomato-Maus in der IHC bei $100,2\% \pm 0,4\%$ und in der FISH bei $87,7\% \pm 4,5\%$ liegt. Dabei gab es keine bevorzugte kortikale Schicht für die nicht kolokalisierten Zellen. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den für die SOMcre/tdTomato-Maus charakteristischen tdTomato-Zellen um Somatostatin-exprimierende Interneurone handelt.

4.2.2 SOM-Zellen als inhibitorische GABAerge Interneurone

Somatostatin-exprimierende Zellen werden zu den Nicht-Pyramidenzellen gezählt und gelten als GABAerge inhibitorische Interneurone. In dieser Studie sollte nachgewiesen werden, dass es sich bei den GFP-positiven Zellen in der GIN-Maus um GABAerge Zellen handelt. Der Nachweis konnte nur mittels einer GAD1-Sonde in der FISH erfolgen, da die IHC mit zwei verschiedenen GABA-Antikörpern keine zufriedenstellenden Resultate erzielte (siehe 4.1.2). Zur weiteren Untermauerung, dass alle Somatostatin-positiven Zellen GABAerg sind, wurde die SOM^{cre}/tdTomato-Maus in diese Studie einbezogen. Zusätzlich wurde in beiden Mauslinien eine VGLUT1-Sonde eingesetzt, die als Marker für exzitatorische Zellen fungiert (Liguz-Leczna und Skangiel-Kramska 2007), um nachzuweisen, dass die SOM-positiven Zellen nicht auch noch Glutamat in Sekretionsvesikel verpacken können.

Für die GIN-Maus wird in dieser Studie gezeigt, dass in jeder kortikalen Schicht des primären somatosensorischen Kortex (S1) alle GFP-markierten Zellen mit dem GAD1-Signal markiert sind. Durch diese 100%ige Kolokalisation mit der GAD1-Sonde in der FISH wurde der **Beweis** erbracht, dass die GFP-Zellen GABAerg sind. In früheren Studien an der GAD67-GFP-Maus wurden jedoch **leicht** abweichende Koexpressionsswerte von etwa **80%** im Neokortex (Tamamaki et al. 2003), 97% im Colliculus Inferior der Vierhügelplatte (Ono et al. 2005) oder 91% im vorderen piriformen Kortex (Suzuki und Bekkers 2010) angegeben. Wobei letztere die übrigen 9% ebenfalls als GABAerg ansehen, obwohl sie es durch das stark angefärbte Neuropil nicht genau beweisen konnten.

Im Gegenzug sind nicht alle GAD1-positiven Zellen auch GFP-positiv. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Sonde auch an alle anderen vorkommenden GABAergen Interneurone, wie zum Beispiel PV- oder VIP-exprimierende Neurone, gebunden hat. Der Anteil der GFP-positiven Neuronen an den GAD1-Neuronen liegt in dieser Studie bei $3,9\% \pm 0,3\%$ für 1 mm³ Barrel-Kortex.

In der schichtenspezifischen Verteilung aller markierten GAD1-positiven Interneurone lassen sich die größten Zellzahlen in den Schichten II/III ($24,3\% \pm 2,9\%$), IV ($27,0\% \pm 4,0\%$) und VI ($18,0\% \pm 1,6\%$) nachweisen. Frühere Studien fanden ebenfalls heraus, dass die GAD-positiven Zellen in größerer Anzahl in den Schichten II, IV und VI im S1 gefunden werden (Houser et al. 1983). Die geringste Anzahl aller GAD1-positiven

Interneurone wurde in der vorliegenden Studie in der obersten Schicht I mit $4,9\% \pm 0,6\%$ gezählt. Die Schichten Va und Vb enthalten $9,6\% \pm 1,2\%$ und $16,1\% \pm 1,5\%$ aller GAD1-positiver Neurone.

Für die SOMcre/tdTomato-Maus lassen sich ähnliche Befunde beschreiben. So wurde in dieser Studie für 1 mm^3 Barrel-Kortex eine Kolokalisationsrate von $100,0\% \pm 7,8\%$ zwischen den tdTomato-positiven Zellen und der GAD1-Sonde festgestellt. Damit ist erwiesen, dass die tdTomato-Zellen GABAerge Interneurone sind. Die höchste Anzahl GAD1-positiver Neurone befindet sich in der Schicht II/III ($24,2\% \pm 4,4\%$), gefolgt von den Schichten IV ($20,2\% \pm 3,2\%$) und VI ($20,3\% \pm 1,2\%$). Ebenfalls sind in der Schicht Vb mit $21,6\% \pm 1,3\%$ eine hohe Anzahl an GAD1-positiven Zellen finden, während in der Schicht Va die Werte auf $11,5\% \pm 1,2\%$ absinken. Die geringste Anzahl GAD1-positiv markierter Interneurone befindet sich in der obersten Schicht I ($2,3\% \pm 0,4\%$).

Es sind wiederum nicht alle GAD1-markierten Neurone auch tdTomato-Zellen. Der Anteil aller tdTomato-Zellen an allen GAD1-positiven Zellen in 1 mm^3 Barrel-Kortex liegt insgesamt bei $38,4\% \pm 3,5\%$.

Da in dieser Studie in keinem Schnitt der beiden untersuchten Mauslinien eine Kolokalisation zwischen der VGLUT1-Sonde und einer GFP- bzw. tdTomato-positiven Zelle festgestellt werden konnte und beide bereits als GABAerg identifiziert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Zellen um nicht exzitatorische, sondern inhibitorische Interneurone handelt.

4.2.3 Kolokalisationen der SOM-Zellen mit PV und VIP

Die größte Gruppe GABAerger Interneurone bilden die Parvalbumin-exprimierenden Interneurone (Gonchar et al. 2007; Lee et al. 2010). Ihre Population besteht aus Korb- und Chandelierzellen (Markram et al. 2004) und sie zählen zu den schnell feuernenden

Interneuronen (Cauli et al. 1997), die sich bevorzugt gegenseitig inhibieren sollen (Pfeffer et al. 2013).

Die VIP-exprimierenden Interneurone sind morphologisch zu 85-90% bipolar (Bayraktar et al. 2000; Connor und Peters 1984). Sie können aber auch als Korbzellen, Doppelbouquetzellen und doppelt gebüschelte Zellen auftreten (Markram et al. 2004). Sie weisen ein unregelmäßiges Feuermuster auf (Cauli et al. 1997) und inhibieren sowohl SOM-positive (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013) als auch PV-positive Interneurone (David et al. 2007).

In dieser Studie wurde aufgrund der Vollständigkeit rein qualitativ überprüft, ob Kollokationen zwischen den SOM-positiven Interneuronen – genauer den GFP-Zellen in der GIN-Maus sowie zum Vergleich auch den tdTomato-Zellen der SOMcre/tdTomato-Maus - und den PV - beziehungsweise VIP-Zellen vorliegen. Dieses erfolgte visuell durch Durchsicht der angefertigten Schnitte sowie deren Aufnahmen nach der durchlaufenen FISH. Es konnte jedoch keine Kollokation der SOM-exprimierenden Zellen mit PV- oder VIP-exprimierenden Neuronen nachgewiesen werden. Bereits andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass es keine Kollokationen von SOM- mit PV- oder VIP-exprimierenden Interneuronen gibt (Rudy et al. 2011; Xu und Callaway 2009). Eine weitere Studie konnte ebenfalls keine Kollokation zwischen den Populationen von SOM, PV und VIP nachweisen (Miyoshi et al. 2010). Eine Studie an GFP-Zellen zeigt, dass die GFP-Zellen kein PV exprimieren (Chittajallu et al. 2013). Für die Ratte wurde nachgewiesen, dass die Martinotti-Zellen positiv für SOM, jedoch negativ für PV und VIP sind (Wang et al. 2004). Im Gegensatz dazu liegen abweichende Ergebnisse für den primär visuellen Kortex vor, in welchem geringe Kollokationen von SOM mit PV und SOM mit VIP gezeigt werden konnten (Pfeffer et al. 2013). Im visuellen Kortex der Katze wurde PV selten mit SOM kollokaliert gefunden (Demeulemeester et al. 1991).

4.3 Relevanz der Studie

Das Ziel dieser Studie war es, die transgene GIN-Maus schichtenspezifisch im Hinblick auf die Verteilung der GFP-positiven Neurone zu charakterisieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie spezifisch und sensitiv die GFP-Markierung für Somatostatin-

exprimierende Interneurone in den Schichten I bis VI des primären somatosensorischen Kortex ist. Zum Vergleich wurde die transgene SOMcre/tdTomato-Maus hinzugezogen, um mögliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in der Verteilung der SOM-positiven Neurone herauszustellen. Bei dieser Mauslinie sollte nachgewiesen werden, dass die tdTomato-Zellen SOM-Interneurone sind.

Zusammenfassend lässt sich für die GIN-Maus feststellen, dass in dieser Studie alle GFP-positiven Zellen auch α SOM-, SOM- und GAD1-positiv sind und keine Kollokalisierung mit den Sonden PV, VIP oder VGLUT1 nachgewiesen werden konnte. Es kommen sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung keine rein GFP-positiven Zellen ohne Kollokalisierung vor. Jedoch sind nicht alle SOM- oder GAD1-positiv markierten Zellen auch GFP-positiv. Daher ist die transgene GIN-Maus für Untersuchungen an Somatostatin-exprimierenden Neuronen gut geeignet, aber nur für die Untersuchung einer Subpopulation von Martinotti-Zellen (Walker et al. 2016) in den Schichten II/III bis Va.

Die Ergebnisse der SOMcre/tdTomato-Maus **beweisen**, dass es sich bei den tdTomato-Zellen um Somatostatin-exprimierende Interneurone handelt, die ebenfalls GAD1-positiv sowie VGLUT1-negativ und dadurch GABAerg sind. Kollokalisierungen zwischen diesen SOM-positiven Neuronen und der PV- sowie VIP-Sonde konnten nicht nachgewiesen werden.

Um eine vollständige schichtenspezifische Charakterisierung der GIN-Maus und der SOMcre/tdTomato-Maus zu erhalten müsste man die genaue Verteilung der PV-, VIP- und VGLUT1-markierten GFP- und tdTomato-Zellen quantitativ erfassen. Dieses war jedoch nicht Ziel dieser Studie.

Mögliche nachfolgende Untersuchungen können nun sicher sein, dass es sich bei den GFP-Zellen und den tdTomato-Zellen um SOM-Interneurone handelt. Dadurch kann man in immunhistochemischen Verfahren weitere Antikörper oder Sonden auf ihre Sensitivität und Spezifität für SOM an diesen Neuronen sicher testen. Die an diesen Zellen forschenden Elektrophysiologen können sicher davon ausgehen, dass es sich bei den grünfluoreszierenden GIN-Zellen um SOM-exprimierende Neurone handelt, deren Verteilung hauptsächlich in den Schichten II/III bis Va liegt. Andere Forscher können mögliche Fehlverteilungen der Zellen zwischen den Schichten besser mit den hier

vorliegenden Daten gesunder Tiere vergleichen und somit Rückschlüsse auf auftretende Krankheitsbilder ziehen.

5 Zusammenfassung

Inhibitorische, GABA-freisetzende Interneurone machen 20-30% aller kortikaler Neurone aus, die sich aufgrund ihrer molekularen, anatomischen und elektrophysiologischen Eigenschaften voneinander unterscheiden lassen (Ascoli et al. 2008; Markram et al. 2004). Etwa zwei Drittel dieser Interneurone weisen entweder eine Expression von Parvalbumin (PV), vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP) oder Somatostatin (SOM) auf (Xu et al. 2010). Diese Diversität erlaubt die Generierung von transgenen Mauslinien, bei denen entweder die Expression von fluoreszierenden Proteinen direkt mit der Expression eines dieser Marker kombiniert ist oder indirekt über die Cre-/loxP-Technik.

In diesem Projekt werden die Somatostatin-exprimierenden Interneurone im Bereich des primären somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex) mittels Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) schichtenspezifisch charakterisiert. Hierfür werden zwei transgene Mauslinien, die GIN- und die SOMcre-Maus, eingesetzt.

Bei der GIN-Maus (*eGFP-expressing inhibitory neurons*) ist eine Subpopulation von Somatostatin-exprimierenden Zellen im Neokortex mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markiert (Oliva et al. 2000), zu welchen neben zwei weiteren Subtypen von Interneuronen hauptsächlich die Martinotti-Zellen (McGarry et al. 2010) zählen. Bei der SOMcre/tdTomato-Maus wird die Expression von fluoreszierenden Proteinen indirekt über das Cre/loxP-System ausgelöst. So exprimieren alle Zellen mit Cre-Rekombinaseaktivität zusätzlich das tdTomato-Protein, welches bei Anregung mit grünem Licht (550 nm) rot leuchtet.

Die Charakterisierung erfolgt mittels der Markerproteine Glutamatdecarboxylase 1 (GAD1) und Somatostatin (SOM), sowie des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA). Zusätzlich wird für die GIN-Maus das grünfluoreszierende Protein (GFP) und für die SOMcre-Maus das tdTomato-Signal in die Analyse mit einbezogen und auf Kollokalisierung mit den zellulären Markern mikroskopisch untersucht, manuell ausgezählt und statistisch ausgewertet. Weitere Versuche mit den PV-, VIP- und VGLUT1-Sonden wurden durchgeführt, um die GIN- bzw. tdTomato-Neurone hinsichtlich einer Kollokalisierung mit diesen zu untersuchen. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte nur qualitativ mittels mikroskopischer Betrachtung, wobei keine Kollokalisierung gefunden werden konnte.

Für die GIN-Maus konnte gezeigt werden, dass sich die Mehrzahl GFP-positiver Neurone in den Schichten II/III (Maximum mit etwa 40%), IV und Va befindet, wobei ihre Anzahl bis zur Schicht Vb stetig absinkt und sie in Schicht VI gänzlich fehlen. Alle GFP-exprimierenden Zellen sind für α SOM, GAD1 und SOM positiv. Jedoch sind nicht alle SOM- oder GAD1-positiven Zellen auch GFP-positiv. Vergleicht man beide Verfahren (IHC und FISH), so wird deutlich, dass sowohl die Kolokalisation der untersuchten Proteine bzw. mRNA mit dem nativen GFP-Signal als auch die Verteilung über die verschiedenen Schichten des primären somatosensorischen Kortex einander entsprechen.

Die tdTomato-Zellen der SOMcre/tdTomato-Maus sind SOM-positive Zellen mit einer Kolokalisation von 30-33% in der Schicht Vb, dicht gefolgt von der Schicht VI mit 25-28%. Die Schichten II/III bis Va beinhalten jeweils ungefähr 13-15% der mit α SOM, GAD1 oder SOM kolokalisierten tdTomato-Zellen. In der Schicht I kommen die wenigsten kolokalisierten Zellen vor. Alle tdTomato-Zellen sind GAD1-positiv. Es sind wiederum nicht alle GAD1-markierten Neurone auch tdTomato-Zellen.

In der Gegenüberstellung der Spezifität des Somatostatin-Antikörpers mit der Somatostatin-Sonde ähneln sich insgesamt die Ergebnisse in der prozentualen schichtenspezifischen Verteilung.

Somit eignet sich die GIN-Maus, besonders in den Schichten II/III bis Va, besser für Untersuchungen an den SOM-positiven Neuronen als die SOMcre/tdTomato-Maus, da man sicher davon ausgehen kann, dass alle GFP-positiven Zellen auch SOM- und GAD1-positiv sind.

6 Anhang

Tabelle 1: Eingesetzte Sonden

Dargestellt sind die für die FISH eingesetzten Sonden mit Angabe der Länge und den entsprechenden Primer-Sequenzen. Die Sequenzen der SOM-, VGLUT1- und VIP-Sonde stimmen mit den Sequenzen des *Allen Institute for Brain Science* überein. Die Sonden wurden von Dr. med. Robin Wagener hergestellt.

Gen	Länge	Forward primer	Reverse primer	Nested primer (forward)	Nested primer (reverse)
<i>GAD1</i>	320 BP	GGCACGACTGTTTACGG AGC	GCCTTGTCCTCCGGTGTCA TA	-	-
<i>PValb</i>	349 BP	TCTTCCAGATGGTGGGC CTG	CAGGAGATATCGGGGCG TTG	-	-
<i>SOM</i>	514 BP	ACGCTACCGAAGCCGTC	GGGGCCAGGAGTTAAGG A	-	-
<i>VGLU T1</i>	296 BP	CAGAGCCGGAGGAGAT GA	TTCCCTCAGAAACGCTGG	GCTGGCAGTGACGAAAG TGA	TGAGAGGGAAAGAGG GCTGG
<i>VIP</i>	367 BP	CCTGGCATTCTGATAC TCTTC	ATTCTCTGATTTAGCTC TGCC	CTGTTCTCTCAGTCGCTG GC	GCTTTCTGAGGCGGGT GTAG

Tabelle 2: absolute Zahlen der GIN-Auswertung, IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der GIN-Tierlinie, n = 24/8 (Schnitte/Tiere), Mittelwert ± Standardabweichung (SD) in der Immunhistochemie alle αGFP (nur mit αGFP markierte Zellen plus Kollokationen), αGFP (nur mit αGFP markierte Zellen), Colok (= Kollokationen, mit αGFP und αSOM markierte Zellen), αSOM (nur mit αSOM markierte Zellen), alle αSOM (nur mit αSOM markierte Zellen plus Kollokationen)

Region	alle αGFP±SD	αGFP±SD	Colok±SD	αSOM±SD	alle αSOM±SD
Barrel-Kortex	648,3±164,1	0,0±0,0	648,3±164,1	2535,1±918,8	3183,4±1039,1
Schicht I	0,8±1,5	0,0±0,0	0,8±1,5	0,0±0,0	0,8±1,5
Schicht II_III	257,2±51,8	0,0±0,0	257,2±51,8	338,1±87,3	595,3±121,0
Schicht IV	204,8±75,8	0,0±0,0	204,8±75,8	423,4±127,3	628,2±188,0
Schicht Va	155,6±47,4	0,0±0,0	155,6±47,4	351,3±218,6	507,0±259,5
Schicht Vb	29,8±33,5	0,0±0,0	29,8±33,5	803,8±343,8	833,7±343,7
Schicht V (a+b)	185,5±58,7	0,0±0,0	185,5±58,7	1155,2±543,8	1340,6±580,8
Schicht VI	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	618,0±197,0	618,0±197,0

Tabelle 3: p-Werte zur absoluten Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, IHC

Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten

α GFP + α SOM (= Kolokalisationen, mit α GFP und α SOM markierte Zellen), nur α SOM (nur mit α SOM markierte Zellen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α GFP+ α SOM zu nur α SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = 0,162					
Schicht II_III	P = 0,048*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = 0,004*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 4: relative Zahlen (%) der GIN-Auswertung, IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der GIN-Tierlinie in %, n = 24/8

(Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Immunhistochemie

alle α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen plus Kolokalisationen), α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit α GFP und α SOM markierte Zellen), alle α SOM (nur mit α SOM markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle α GFP/ Σ	α GFP/ Σ	Colok \pm SD	alle α SOM/ Σ	alle α GFP/alle α SOM pro Schicht \pm SD
	alle α GFP \pm SD	α GFP \pm SD		alle α SOM \pm SD	
Barrel-Kortex	100,0 \pm 25,3	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 32,6	21,3 \pm 4,6
Schicht I	0,1 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	8,3 \pm 14,4
Schicht II_III	39,7 \pm 8,0	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	18,7 \pm 3,8	44,4 \pm 5,7
Schicht IV	31,6 \pm 11,7	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	19,7 \pm 5,9	32,0 \pm 5,6
Schicht Va	24,0 \pm 7,3	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	15,9 \pm 8,2	35,2 \pm 9,2
Schicht Vb	4,6 \pm 5,2	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	26,2 \pm 10,8	3,5 \pm 4,2
Schicht V (a+b)	28,6 \pm 9,0	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	42,1 \pm 18,2	15,8 \pm 5,7
Schicht VI	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	19,4 \pm 6,2	0,0 \pm 0,0

Tabelle 5: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle α GFP (= alle mit α GFP markierten Zellen + Kollokationen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle αGFP (= αGFP+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,071	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,071	---	P = 0,051	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,051	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*
Schicht VI	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---

Tabelle 6: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 α SOM (= alle mit α SOM markierten Zellen + Kollokationen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle αSOM (= αSOM+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,628	P = 0,037*	P = 0,017*	P = 0,529
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,628	---	P = 0,035*	P = 0,048*	P = 1,000
Schicht Va	P = <0,001*	P = 0,037*	P = 0,003*	---	P = 0,003*	P = 0,035*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = 0,017*	P = 0,048*	P = 0,003*	---	P = 0,034*
Schicht VI	P = <0,001*	P = 0,529	P = 1,000	P = 0,035*	P = 0,034*	---

Tabelle 7: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich des Anteils an α GFP-positiven an α SOM-positiven Zellen innerhalb der Schichten
 * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: α GFP/ α SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,162
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = 0,014*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,613	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = 0,014*	P = 0,613	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*
Schicht VI	P = 0,162	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---

Tabelle 8: absolute Zahlen der GIN-Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der GIN-Tierlinie, n = 12/4 (Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
 alle α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen plus Kolokalisationen), α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit α GFP und GAD1 markierte Zellen), GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen), alle GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle α GFP \pm SD	α GFP \pm SD	Colok \pm SD	GAD1 \pm SD	alle GAD1 \pm SD
Barrel-Kortex	579,7 \pm 22,8	0,0 \pm 0,0	579,7 \pm 22,8	14419,0 \pm 1333,3	14998,7 \pm 1352,0
Schicht I	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	735,1 \pm 89,4	735,1 \pm 89,4
Schicht II_III	250,3 \pm 13,0	0,0 \pm 0,0	250,3 \pm 13,0	3397,8 \pm 427,9	3648,1 \pm 434,3
Schicht IV	225,0 \pm 39,2	0,0 \pm 0,0	225,0 \pm 39,2	3826,2 \pm 555,5	4051,2 \pm 592,8
Schicht Va	86,7 \pm 16,5	0,0 \pm 0,0	86,7 \pm 16,5	1348,5 \pm 186,1	1435,2 \pm 177,5
Schicht Vb	17,6 \pm 5,5	0,0 \pm 0,0	17,6 \pm 5,5	2404,6 \pm 227,3	2422,3 \pm 231,4
Schicht V (a+b)	104,4 \pm 15,0	0,0 \pm 0,0	104,4 \pm 15,0	3753,1 \pm 410,7	3857,5 \pm 405,9
Schicht VI	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2706,8 \pm 233,4	2706,8 \pm 233,4

Tabelle 9: p-Werte zur absoluten Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 α GFP + GAD1 (= Kolokalisationen, mit α GFP und GAD1 markierte Zellen), nur GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen), * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α GFP+GAD1 zu nur GAD1						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = <0,001*					
Schicht II_III	P = <0,001*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = <0,001*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 10: relative Zahlen (%) der GIN-Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der GIN-Tierlinie in %, n = 12/4 (Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung alle α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen plus Kolokalisationen), α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit α GFP und GAD1 markierte Zellen), alle GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle α GFP/ \sum alle α GFP \pm SD	α GFP/ \sum α GFP \pm SD	Colok \pm SD	alle GAD1/ \sum alle GAD1 \pm SD	alle α GFP/alle GAD1 Schicht \pm SD
Barrel-Kortex	100,0 \pm 3,9	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 9,0	3,9 \pm 0,3
Schicht I	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	4,9 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0
Schicht II_III	43,2 \pm 2,2	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	24,3 \pm 2,9	7,0 \pm 0,8
Schicht IV	38,8 \pm 6,8	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	27,0 \pm 4,0	5,6 \pm 0,3
Schicht Va	15,0 \pm 2,9	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	9,6 \pm 1,2	6,2 \pm 1,6
Schicht Vb	3,0 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	16,1 \pm 1,5	0,7 \pm 0,2
Schicht V (a+b)	18,0 \pm 2,6	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	25,7 \pm 2,7	2,7 \pm 0,7
Schicht VI	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	18,0 \pm 1,6	0,0 \pm 0,0

Tabelle 11: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle α GFP (= alle mit α GFP markierten Zellen + Kollokalisierungen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α GFP (= α GFP+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,007*	P = 1,000
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,436	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,436	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = 0,007*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,007*
Schicht VI	P = 1,000	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,007*	---

Tabelle 12: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 GAD1 (= alle mit GAD1 markierten Zellen + Kollokalisierungen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle GAD1 (=GAD1+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,312	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,312	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,030*
Schicht VI	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,030*	---

Tabelle 13: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich des Anteils an α GFP-positiven an GAD1-positiven Zellen innerhalb der Schichten
 * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: α GFP/GAD1						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,007*	P = 1,000
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,069	P = 0,624	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,069	---	P = 0,795	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = 0,624	P = 0,795	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = 0,007*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,007*
Schicht VI	P = 1,000	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,007*	---

Tabelle 14: absolute Zahlen der GIN-Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der GIN-Tierlinie, n = 12/4 (Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
 alle α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen plus Kolokalisationen), α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit α GFP und SOM markierte Zellen), SOM (nur mit SOM markierte Zellen), alle SOM (nur mit SOM markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle α GFP \pm SD	α GFP \pm SD	Colok \pm SD	SOM \pm SD	alle SOM \pm SD
Barrel-Kortex	532,0 \pm 47,3	0,0 \pm 0,0	532,0 \pm 47,3	5141,4 \pm 192,5	5673,5 \pm 231,8
Schicht I	1,2 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0	1,2 \pm 2,0	4,6 \pm 2,7	5,8 \pm 4,0
Schicht II_III	228,1 \pm 16,5	0,0 \pm 0,0	228,1 \pm 16,5	525,1 \pm 65,6	753,2 \pm 64,0
Schicht IV	195,1 \pm 35,5	0,0 \pm 0,0	195,1 \pm 35,5	759,5 \pm 87,7	954,5 \pm 122,4
Schicht Va	99,4 \pm 27,2	0,0 \pm 0,0	99,4 \pm 27,2	796,7 \pm 19,4	896,1 \pm 42,7
Schicht Vb	5,7 \pm 7,5	0,0 \pm 0,0	5,7 \pm 7,5	1895,2 \pm 206,4	1900,9 \pm 213,6
Schicht V (a+b)	105,1 \pm 34,6	0,0 \pm 0,0	105,1 \pm 34,6	2691,9 \pm 217,2	2797,0 \pm 250,6
Schicht VI	1,2 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0	1,2 \pm 2,0	1159,2 \pm 102,7	1160,4 \pm 101,8

Tabelle 15: p-Werte zur absoluten Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten

α GFP + SOM (= Kolokalisationen, mit α GFP und SOM markierte Zellen), nur SOM (nur mit SOM markierte Zellen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α GFP+SOM zu nur SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = 0,248					
Schicht II_III	P = <0,001*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = <0,001*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 16: relative Zahlen (%) der GIN-Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der GIN-Tierlinie in %, n = 12/4

(Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

alle α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen plus Kolokalisationen), α GFP (nur mit α GFP markierte Zellen),

Colok (= Kolokalisationen, mit α GFP und SOM markierte Zellen), alle SOM (nur mit SOM markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle α GFP/ Σ	α GFP/ Σ	Colok \pm SD	alle SOM/ Σ	alle α GFP/alle
	alle α GFP \pm SD	α GFP \pm SD		alle SOM \pm SD	SOM Schicht \pm SD
Barrel-Kortex	100,0 \pm 8,9	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 4,1	9,3 \pm 0,6
Schicht I	0,2 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	8,3 \pm 14,4
Schicht II_III	42,9 \pm 3,1	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	13,3 \pm 1,1	30,6 \pm 3,4
Schicht IV	36,7 \pm 6,7	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	16,8 \pm 2,2	20,4 \pm 1,1
Schicht Va	18,7 \pm 5,1	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	15,8 \pm 0,8	10,8 \pm 2,3
Schicht Vb	1,1 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	33,5 \pm 3,8	0,3 \pm 0,3
Schicht V					
(a+b)	19,8 \pm 6,5	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	49,3 \pm 4,4	3,7 \pm 0,8
Schicht VI	0,2 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	20,5 \pm 1,8	0,1 \pm 0,2

Tabelle 17: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle α GFP (= alle mit α GFP markierten Zellen + Kollokalisierungen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α GFP (= α GFP+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,122	P = 1,000
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,069	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,069	---	P = 0,003*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,003*	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = 0,122	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,122
Schicht VI	P = 1,000	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,122	---

Tabelle 18: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 SOM (= alle mit SOM markierten Zellen + Kollokalisierungen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle SOM (=SOM+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,009*	P = 0,040*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,009*	---	P = 0,436	P = <0,001*	P = 0,017*
Schicht Va	P = <0,001*	P = 0,040*	P = 0,436	---	P = <0,001*	P = 0,004*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*
Schicht VI	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,017*	P = 0,004*	P = <0,001*	---

Tabelle 19: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der GIN-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich des Anteils an α GFP-positiven an SOM-positiven Zellen innerhalb der Schichten, * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: Anteil alle α GFP / alle SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,208	P = 1,000
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = 0,208	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,208
Schicht VI	P = 1,000	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,208	---

Tabelle 20: p-Werte zur relativen Verteilung der α GFP-markierten Zellen in der GIN-Maus
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Anova-Tests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten alle α GFP (= alle mit α GFP markierten Zellen + Kolokalisationen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α GFP (= α GFP+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = 0,593					
Schicht II_III		P = 0,576				
Schicht IV			P = 0,597			
Schicht Va				P = 0,461		
Schicht Vb					P = 0,112	
Schicht VI						P = 0,223

Tabelle 21: p-Werte zur relativen Verteilung der Somatostatin-positiven Zellen in der GIN-Maus

Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten

alle α SOM (= alle mit α SOM markierten Zellen + Kolokalisationen), alle SOM (= alle mit SOM markierten Zellen + Kolokalisationen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle α SOM gegen alle SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = 0,041*					
Schicht II_III	P = 0,006*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = <0,001*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 22: absolute Zahlen der SOMcre-Auswertung, IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der SOMcre-Tierlinie, n = 18/6

(Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Immunhistochemie

alle tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen plus Kolokalisationen), tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit tdTomato und α SOM markierte Zellen), α SOM (nur mit α SOM markierte Zellen), alle α SOM (nur mit α SOM markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle tdTomato \pm SD	tdTomato \pm SD	Colok \pm SD	α SOM \pm SD	alle α SOM \pm SD
Barrel-Kortex	6338,4 \pm 757,2	15,4 \pm 22,4	6323,1 \pm 761,7	0,0 \pm 0,0	6323,1 \pm 761,7
Schicht I	16,6 \pm 14,8	0,0 \pm 0,0	16,6 \pm 14,8	0,0 \pm 0,0	16,6 \pm 14,8
Schicht II_III	863,3 \pm 112,7	4,5 \pm 7,7	858,8 \pm 118,3	0,0 \pm 0,0	858,8 \pm 118,3
Schicht IV	988,9 \pm 99,2	2,6 \pm 3,7	986,3 \pm 96,8	0,0 \pm 0,0	986,3 \pm 96,8
Schicht Va	933,3 \pm 97,8	0,0 \pm 0,0	933,3 \pm 97,8	0,0 \pm 0,0	933,3 \pm 97,8
Schicht Vb	1846,4 \pm 162,6	4,1 \pm 9,2	1842,3 \pm 161,4	0,0 \pm 0,0	1842,3 \pm 161,4
Schicht V (a+b)	2779,8 \pm 215,7	4,1 \pm 9,2	2775,6 \pm 217,6	0,0 \pm 0,0	2775,6 \pm 217,6
Schicht VI	1689,9 \pm 394,1	4,2 \pm 4,3	1685,8 \pm 393,8	0,0 \pm 0,0	1685,8 \pm 393,8

Tabelle 23: p-Werte zur absoluten Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten

nur tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit tdTomato und α SOM markierte Zellen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: nur tdTomato zu Colok (=tdTomato+ α SOM)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = <0,001*					
Schicht II_III	P = <0,001*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = <0,001*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 24: relative Zahlen (%) der SOMcre-Auswertung, IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der SOMcre-Tierlinie in %, n = 18/6 (Schnitte/Tiere), Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) in der Immunhistochemie tdTomato (alle tdTomato-Zellen plus Kolokalisationen), α SOM (alle mit α SOM markierten Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit tdTomato und α SOM markierte Zellen)

Region	tdTomato/ \sum tdTomato \pm SD	α SOM/ \sum α SO M \pm SD	Colok \pm SD	tdTomato/ α SOM Schicht \pm SD
Barrel-Kortex	100,0 \pm 11,9	100,0 \pm 12,0	100,0 \pm 12,0	100,2 \pm 0,4
Schicht I	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	50,0 \pm 31,9
Schicht II_III	13,6 \pm 1,8	13,6 \pm 1,9	13,6 \pm 1,9	100,5 \pm 0,8
Schicht IV	15,6 \pm 1,6	15,6 \pm 1,5	15,6 \pm 1,5	100,3 \pm 0,4
Schicht Va	14,7 \pm 1,5	14,8 \pm 1,5	14,8 \pm 1,5	100,0 \pm 0,0
Schicht Vb	29,1 \pm 2,6	29,1 \pm 2,6	29,1 \pm 2,6	100,2 \pm 0,5
Schicht V (a+b)	43,9 \pm 3,4	43,9 \pm 3,4	43,9 \pm 3,4	100,1 \pm 0,3
Schicht VI	26,7 \pm 6,2	26,7 \pm 6,2	26,7 \pm 6,2	100,3 \pm 0,3

Tabelle 25: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten alle tdTomato (mit tdTomato markierte Zellen plus Kolokalisationen), * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle tdTomato (=tdTomato+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,117	P = 0,275	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,117	---	P = 0,580	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = 0,275	P = 0,580	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,402
Schicht VI	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,402	---

Tabelle 26: absolute Zahlen der SOMcre-Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der SOMcre-Tierlinie, n = 18/6 (Schnitte/Tiere), Mittelwert ± Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung alle tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen plus Kolokalisationen), tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen), Colok (= Kolokalisationen, mit tdTomato und GAD1 markierte Zellen), GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen), alle GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen plus Kolokalisationen)

Region	alle tdTomato±SD	tdTomato ±SD	Colok±SD	GAD1±SD	alle GAD1±SD
Barrel-Kortex	6170,2±547,7	234,5±125,1	5935,7±464,0	10298,3±1331,8	16234,0±1465,2
Schicht I	3,1±3,2	0,0±0,0	3,1±3,2	366,9±61,3	369,9±60,3
Schicht II_III	854,8±139,9	66,7±42,4	788,1±119,7	3141,4±641,8	3929,5±709,5
Schicht IV	842,3±114,1	15,6±8,0	826,7±117,2	2447,1±425,9	3273,8±520,4
Schicht Va	833,4±92,6	29,5±19,4	803,9±90,1	1066,2±116,5	1870,1±189,9
Schicht Vb	1919,0±268,9	66,0±43,1	1853,0±239,1	1649,3±62,6	3502,2±205,2
Schicht V (a+b)	2752,4±274,8	95,5±59,0	2656,9±234,0	2715,5±158,6	5372,4±219,3
Schicht VI	1717,6±117,8	56,7±57,7	1660,9±91,2	1627,4±273,6	3288,4±192,9

Tabelle 27: p-Werte zur absoluten Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle tdTomato+GAD1 (= Kolokalisationen), nur GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen), * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle tdTomato+GAD1 zu nur GAD1						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = <0,001*					
Schicht II_III	P = <0,001*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = <0,001*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 28: relative Zahlen (%) der SOMcre -Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der SOMcre -Tierlinie in %, n = 18/6 (Schnitte/Tiere), Mittelwert ± Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen plus Kolokalisationen), GAD1 (nur mit GAD1 markierte Zellen plus Kolokalisationen), Colok (= Kolokalisationen, mit tdTomato und GAD1 markierte Zellen)

Region	tdTomato/ \sum tdTomato±SD	GAD1/ \sum GAD1 ±SD	Colok±SD	tdTomato/GAD1 Schicht±SD
Barrel-Kortex	100,0±8,9	100,0±9,0	100,0±7,8	38,4±3,5
Schicht I	0,0±0,1	2,3±0,4	0,1±0,1	0,9±1,1
Schicht II_III	13,9±2,3	24,2±4,4	13,3±2,0	22,4±3,7
Schicht IV	13,7±1,8	20,2±3,2	13,9±2,0	26,0±2,2
Schicht Va	13,5±1,5	11,5±1,2	13,5±1,5	45,0±1,6
Schicht Vb	31,1±4,4	21,6±1,3	31,2±4,0	54,5±4,7
Schicht V (a+b)	44,6±4,5	33,1±1,4	44,8±3,9	51,2±3,5
Schicht VI	27,8±1,9	20,3±1,2	28,0±1,5	52,7±5,5

Tabelle 29: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 tdTomato (= alle mit tdTomato markierten Zellen + Kollokationen), * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle tdTomato (=tdTomato+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,849	P = 1,000	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,849	---	P = 0,788	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = 1,000	P = 0,788	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,137
Schicht VI	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,137	---

Tabelle 30: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 GAD1 (= alle mit GAD1 markierten Zellen + Kollokationen), * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle GAD1 (=GAD1+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,026*	P = <0,001*	P = 0,110	P = 0,013*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,026*	---	P = <0,001*	P = 0,275	P = 0,825
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = 0,110	P = 0,275	P = <0,001*	---	P = 0,206
Schicht VI	P = <0,001*	P = 0,013*	P = 0,825	P = <0,001*	P = 0,206	---

Tabelle 31: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich des Anteils an tdTomato-positiven an GAD1-positiven Zellen innerhalb der Schichten, * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: tdTomato/GAD1						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,028*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,028*	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht Va	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = <0,001*	P = 0,007*
Schicht Vb	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	---	P = 0,402
Schicht VI	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = 0,007*	P = 0,402	---

Tabelle 32: absolute Zahlen der SOMcre-Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der SOMcre-Tierlinie, n = 18/6 (Schnitte/Tiere), Mittelwert ± Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung alle tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen plus Kolorisationen), tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen), Colok (= Kolorisationen, mit tdTomato und SOM markierte Zellen), SOM (nur mit SOM markierte Zellen), alle SOM (nur mit SOM markierte Zellen plus Kolorisationen)

Region	alle	tdTomato±SD	Colok±SD	SOM±SD	alle SOM±SD
	tdTomato±SD				
Barrel-Kortex	5798,1±675,2	714,7±495,2	5083,4±609,4	56,2±113,1	5139,6±646,5
Schicht I	7,4±6,5	0,0±0,0	7,4±6,5	0,0±0,0	7,4±6,5
Schicht II_III	796,6±113,0	144,2±76,3	652,4±107,4	8,1±15,2	660,6±111,1
Schicht IV	840,3±156,9	100,3±83,6	740,0±116,5	7,4±16,5	747,4±113,6
Schicht Va	786,9±124,8	62,5±55,6	724,4±96,2	10,6±20,7	735,0±111,1
Schicht Vb	1825,0±259,9	133,4±103,7	1691,6±251,7	15,4±31,4	1707,0±253,6
Schicht V (a+b)	2611,8±314,0	195,9±156,3	2416,0±285,6	26,0±51,9	2442,0±299,1
Schicht VI	1541,8±180,2	274,3±194,5	1267,6±205,9	14,7±29,7	1282,3±222,7

Tabelle 33: p-Werte zur absoluten Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle tdTomato+SOM (= Kolokalisationen), nur SOM (nur mit SOM markierte Zellen), * P < 0,05

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle tdTomato+SOM zu nur SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	P = <0,005*					
Schicht II_III	P = <0,001*					
Schicht IV	P = <0,001*					
Schicht Va	P = <0,001*					
Schicht Vb	P = <0,001*					
Schicht VI	P = <0,001*					

Tabelle 34: relative Zahlen (%) der SOMcre -Auswertung, FISH+IHC

Tabellarische Darstellung der schichtenspezifischen Auszählung der SOMcre -Tierlinie in %, n = 18/6 (Schnitte/Tiere), Mittelwert ± Standardabweichung (SD) in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung tdTomato (nur mit tdTomato markierte Zellen plus Kolokalisationen), SOM (nur mit SOM markierte Zellen plus Kolokalisationen), Colok (= Kolokalisationen, mit tdTomato und SOM markierte Zellen)

Region	tdTomato/∑ tdTomato±SD	SOM/∑SOM ±SD	Colok±SD	Colok/SOM Schicht±SD
Barrel-Kortex	100,0±11,6	100,0±12,6	100,0±12,0	87,7±4,5
Schicht I	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	100,0±0,1
Schicht II_III	13,7±1,9	12,9±2,2	12,8±2,1	81,9±0,9
Schicht IV	14,5±2,7	14,5±2,2	14,6±2,3	88,1±0,9
Schicht Va	13,6±2,2	14,3±2,2	14,3±1,9	92,1±0,7
Schicht Vb	31,5±4,5	33,2±4,9	33,3±5,0	92,7±1,9
Schicht V (a+b)	45,0±5,4	47,5±5,8	47,5±5,6	92,5±2,0
Schicht VI	26,6±3,1	24,9±4,3	24,9±4,1	82,2±1,7

Tabelle 35: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle tdTomato (= mit tdTomato markierten Zellen + Kollokationen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle tdTomato (=tdTomato+Colok)						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	$P = <0,001^*$				
Schicht II_III	$P = <0,001^*$	---	$P = 0,457$	$P = 0,874$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$
Schicht IV	$P = <0,001^*$	$P = 0,457$	---	$P = 0,517$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$
Schicht Va	$P = <0,001^*$	$P = 0,874$	$P = 0,517$	---	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$
Schicht Vb	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	---	$P = 0,033^*$
Schicht VI	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = 0,033^*$	---

Tabelle 36: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich der Verteilung innerhalb der Schichten
 alle tdTomato + SOM (= Kollokationen), * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: alle tdTomato+SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	$P = <0,001^*$				
Schicht II_III	$P = <0,001^*$	---	$P = 0,062$	$P = 0,079$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$
Schicht IV	$P = <0,001^*$	$P = 0,062$	---	$P = 0,752$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$
Schicht Va	$P = <0,001^*$	$P = 0,079$	$P = 0,752$	---	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$
Schicht Vb	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	---	$P = 0,002^*$
Schicht VI	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = <0,001^*$	$P = 0,002^*$	---

Tabelle 37: p-Werte zur relativen Verteilung der markierten Zellen in der SOMcre-Maus, FISH+IHC
 Tabellarische Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentests, Vergleich des Anteils der kolokalisierten Zellen an SOM-positiven Zellen innerhalb der Schichten, * $P < 0,05$

Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest: Colok/SOM						
	Schicht I	Schicht II_III	Schicht IV	Schicht Va	Schicht Vb	Schicht VI
Schicht I	---	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*	P = <0,001*
Schicht II_III	P = <0,001*	---	P = 0,732	P = 0,801	P = 0,801	P = 0,801
Schicht IV	P = <0,001*	P = 0,732	---	P = 0,480	P = 0,480	P = 0,480
Schicht Va	P = <0,001*	P = 0,801	P = 0,480	---	P = 0,913	P = 0,913
Schicht Vb	P = <0,001*	P = 0,801	P = 0,480	P = 0,913	---	P = 0,948
Schicht VI	P = <0,001*	P = 0,801	P = 0,480	P = 0,913	P = 0,948	---

7 Literaturverzeichnis

Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J (2000): Molecular cloning of a novel brain-type Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74, 2622-2625

Andjelic S, Gallopin T, Cauli B, Hill EL, Roux L, Badr S, Hu E, Tamas G, Lambolez B (2009): Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J Neurophysiol* 101, 641-654

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D et al. (2008): Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9, 557-568

Bayraktar T, Staiger JF, Acsady L, Cozzari C, Freund TF, Zilles K (1997): Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide, gamma-aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Res* 757, 209-217

Bayraktar T, Welker E, Freund TF, Zilles K, Staiger JF (2000): Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J Comp Neurol* 420, 291-304

Beal MF, Clevens RA, Mazurek MF (1988): Somatostatin and neuropeptide Y immunoreactivity in Parkinson's disease dementia with Alzheimer's changes. *Synapse* 2, 463-467

Bellocchio EE, Reimer RJ, Freneau RT, Jr., Edwards RH (2000): Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289, 957-960

Bloom SR, Bryant MG, Polak JM (1975): Proceedings: Distribution of gut hormones. *Gut* 16, 821

Briggs FN, Fleishman M (1965): Calcium binding by particle-free supernatants of homogenates of skeletal muscle. *J Gen Physiol* 49, 131-149

Bryant MG (1978): Vasoactive intestinal peptide (VIP). *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* 8, 63-67

Buzsaki G, Chrobak JJ (1995): Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol* 5, 504-510

Caputi A, Rozov A, Blatow M, Monyer H (2009): Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cereb Cortex* 19, 1345-1359

Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997): Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17, 3894-3906

Caviness VS, Jr. (1975): Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol* 164, 247-263

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805

Chittajallu R, Pelkey KA, McBain CJ (2013): Neurogliaform cells dynamically regulate somatosensory integration via synapse-specific modulation. *Nat Neurosci* 16, 13-15

Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32, 1212-1218

Connor JR, Peters A (1984): Vasoactive Intestinal Polypeptide-Immunoreactive Neurons in Rat Visual-Cortex. *Neuroscience* 12, 1027-1044

Conti F, Rustioni A, Petrusz P, Towle AC (1987): Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J Neurosci* 7, 1887-1901

Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2001): Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4, 52-62

Cottam JC (2009): Identifying the functional role of Martinotti cells in cortical sensory processing. *J Neurophysiol* 102, 9-11

Cybulska-Klosowicz A, Posluszny A, Nowak K, Siucinska E, Kossut M, Liguz-Leczna M (2013): Interneurons containing somatostatin are affected by learning-induced cortical plasticity. *Neuroscience* 254C, 18-25

Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB (2005): Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12560-12565

Daniels RW, Miller BR, DiAntonio A (2011): Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 41, 415-420

David C, Schleicher A, Zuschratter W, Staiger JF (2007): The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat. *Eur J Neurosci* 25, 2329-2340

DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002): Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 31, 299-316

DeFelipe J, Lopez-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larranaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairen A, Feldmeyer D et al. (2013): New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14, 202-216

Demeulemeester H, Arckens L, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW, Pochet R (1991): Calcium binding proteins and neuropeptides as molecular markers of GABAergic interneurons in the cat visual cortex. *Exp Brain Res* 84, 538-544

Dori I, Dinopoulos A, Cavanagh ME, Parnavelas JG (1992): Proportion of glutamate- and aspartate-immunoreactive neurons in the efferent pathways of the rat visual cortex varies according to the target. *J Comp Neurol* 319, 191-204

Dymecki SM, Kim JC (2007): Molecular neuroanatomy's "Three Gs": a primer. *Neuron* 54, 17-34

Emson PC, Lindvall O (1979): Distribution of putative neurotransmitters in the neocortex. *Neuroscience* 4, 1-30

Feldman ML, Peters A (1978): The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. *J Comp Neurol* 179, 761-793

Fremeau RT, Jr., Troyer MD, Pahnner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001): The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31, 247-260

Fremeau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J et al. (2002): The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14488-14493

Freund TF, Katona I (2007): Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33-42

Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001): Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 435, 379-387

Gentet LJ (2012): Functional diversity of supragranular GABAergic neurons in the barrel cortex. *Front Neural Circuits* 6, 52

Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen CC (2012): Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* 15, 607-612

Gilbert C (1984): Cerebral-Cortex, Vol 1 - Cellular-Components of the Cerebral-Cortex - Peters,a, Jones,Eg. *Science* 225, 613-614

Glassman RB (1994): Behavioral effects of SI versus SII cortex ablations on tactile orientation-localization and postural reflexes of rats. *Exp Neurol* 125, 125-133

Goldberg JH, Lacefield CO, Yuste R (2004): Global dendritic calcium spikes in mouse layer 5 low threshold spiking interneurons: implications for control of pyramidal cell bursting. *J Physiol* 558, 465-478

Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A (2007): Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* 1, 3

Gonzalez-Burgos G, Lewis DA (2008): GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 34, 944-961

Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002): A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22, 5442-5451

Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA (2006): Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96, 834-845

Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001): The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21, RC181

Hestrin S, Armstrong WE (1996): Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J Neurosci* 16, 5290-5300

Hisano S, Hoshi K, Ikeda Y, Maruyama D, Kanemoto M, Ichijo H, Kojima I, Takeda J, Nogami H (2000): Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res* 83, 34-43

Houser CR, Hendry SHC, Jones EG, Vaughn JE (1983): Morphological Diversity of Immunocytochemically Identified Gaba Neurons in the Monkey Sensory-Motor Cortex. *J Neurocytol* 12, 617-638

Kaas JH (1983): What, If Anything, Is Si - Organization of 1st Somatosensory Area of Cortex. *Physiol Rev* 63, 206-231

Kapfer C, Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M (2007): Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 10, 743-753

Kawaguchi Y, Kubota Y (1996): Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16, 2701-2715

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997): GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7, 476-486

Klausberger T, Somogyi P (2008): Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53-57

Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994): Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649, 159-173

Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B (2010): The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30, 16796-16808

Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B (2013): A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 16, 1662-1670

Lefort S, Tamm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC (2009): The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61, 301-316

Liguz-Lecznar M, Skangiel-Kramska J (2007): Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp* 67, 207-218

Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, Bjorklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F (1979): Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4, 1953-1976

Lubke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D (2000): Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J Neurosci* 20, 5300-5311

Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A (2006): Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci* 26, 5069-5082

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004): Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793-807

Marshall WH, Woolsey CN, Bard P (1937): Cortical Representation of Tactile Sensibility as Indicated by Cortical Potentials. *Science* 85, 388-390

McBain CJ, Fisahn A (2001): Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2, 11-23

McGarry LM, Packer AM, Fino E, Nikolenko V, Sippy T, Yuste R (2010): Quantitative classification of somatostatin-positive neocortical interneurons identifies three interneuron subtypes. *Front Neural Circuits* 4, 12

Mercier BE, Legg CR, Glickstein M (1990): Basal ganglia and cerebellum receive different somatosensory information in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4388-4392

Meskenaite V (1997): Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 379, 113-132

Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G (2010): Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30, 1582-1594

Morin JG, Hastings JW (1971): Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* 77, 313-318

Mountcastle VB (1957): Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20, 408-434

Mountcastle VB (1997): The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4), 701-722

Murayama M, Perez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, Larkum ME (2009): Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature* 457, 1137-1141

Mutt V, Said SI (1974): Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem* 42, 581-589

Nagy A (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109

Ni B, Rosteck PR, Jr., Nadi NS, Paul SM (1994): Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5607-5611

Nieuwenhuys R (1994): The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. *Anat Embryol (Berl)* 190, 307-337

Oliva AA, Jr., Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW (2000): Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci* 20, 3354-3368

Ono M, Yanagawa Y, Koyano K (2005): GABAergic neurons in inferior colliculus of the GAD67-GFP knock-in mouse: electrophysiological and morphological properties. *Neurosci Res* 51, 475-492

Perrenoud Q, Geoffroy H, Gauthier B, Rancillac A, Alfonsi F, Kessar N, Rossier J, Vitalis T, Gallopin T (2012): Characterization of Type I and Type II nNOS-Expressing Interneurons in the Barrel Cortex of Mouse. *Front Neural Circuits* 6, 36

Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ (1999): Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3217-3222

Peters A, Meinecke DL, Karamanlidis AN (1987): Vasoactive Intestinal Polypeptide Immunoreactive Neurons in the Primary Visual-Cortex of the Cat. *J Neurocytol* 16, 23-38

Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M (2013): Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* 16, 1068-1076

Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A (2013): Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*

Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E (1999): Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19, 5228-5235

Pouille F, Scanziani M (2001): Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293, 1159-1163

Powell TP, Mountcastle VB (1959): Some aspects of the functional organization of the cortex of the postcentral gyrus of the monkey: a correlation of findings obtained in a single unit analysis with cytoarchitecture. *Bull Johns Hopkins Hosp* 105, 133-162

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233

Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994): Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* 344, 349-382

Riddle DR, Purves D (1995): Individual variation and lateral asymmetry of the rat primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 15, 4184-4195

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011): Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71, 45-61

Ruiz-Marcos A, Valverde F (1970): Dynamic architecture of the visual cortex. *Brain Res* 19, 25-39

Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y et al. (2001): Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res* 902, 143-155

Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (2002): Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277, 50734-50748

Schubert D, Kotter R, Luhmann HJ, Staiger JF (2006): Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer va in the primary somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 16, 223-236

Shimomura O (1979): Structure of the Chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein. *FEBS Lett* 104, 220-222

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239

Silberberg G, Markram H (2007): Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 53, 735-746

Simons DJ, Woolsey TA (1984): Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat Sml cortex. *J Comp Neurol* 230, 119-132

Sohn J, Hioki H, Okamoto S, Kaneko T (2013): Preprodynorphin-expressing neurons constitute a large subgroup of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the mouse neocortex. *J Comp Neurol* 522, 1506-1526

Staiger JF, Zilles K, Freund TF (1996): Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 8, 2273-2285

Staiger JF, Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K (2000): Exploration of a novel environment leads to the expression of inducible transcription factors in barrel-related columns. *Neuroscience* 99, 7-16

Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K (2002): Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience* 109, 687-699

Staiger JF, Flagmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kotter R, Luhmann HJ (2004): Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb Cortex* 14, 690-701

Staiger JF, Bojak I, Miceli S, Schubert D (2015): A gradual depth-dependent change in connectivity features of supragranular pyramidal cells in rat barrel cortex. *Brain Struct Funct* 220, 1317-1337

Suzuki N, Bekkers JM (2010): Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers. *J Comp Neurol* 518, 1670-1687

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R (2000): Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194

Taki K, Kaneko T, Mizuno N (2000): A group of cortical interneurons expressing mu-opioid receptor-like immunoreactivity: a double immunofluorescence study in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 98, 221-231

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003): Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467, 60-79

Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y et al. (2011): A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995-1013

Toledo-Rodriguez M, Goodman P, Illic M, Wu CZ, Markram H (2005): Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J Physiol-London* 567, 401-413

Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R (2006): Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *J Neurosci* 26, 12447-12455

Van der Loos H, Woolsey TA (1973): Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science* 179, 395-398

van Noorden S, Polak JM, Bloom SR, Bryant MG (1979): Vasoactive intestinal polypeptide in the pituitary pars nervosa. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5, 149-153

von Engelhardt J, Khrulev S, Eliava M, Wahlster S, Monyer H (2011): 5-HT(3A) receptor-bearing white matter interstitial GABAergic interneurons are functionally integrated into cortical and subcortical networks. *J Neurosci* 31, 16844-16854

Walker F, Mock M, Feyerabend M, Guy J, Wagener RJ, Schubert D, Staiger JF, Witte M (2016): Parvalbumin- and vasoactive intestinal polypeptide-expressing neocortical interneurons impose differential inhibition on Martinotti cells. *Nat Commun* 7, 13664

Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H (2002): Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 12, 395-410

Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H (2004): Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561, 65-90

Weigel A, Schild D, Zeug A (2009): Resolution in the ApoTome and the confocal laser scanning microscope: comparison. *J Biomed Opt* 14, 014022

Welker C (1971): Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (Sml) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26, 259-275

Welker C, Woolsey TA (1974): Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol* 158, 437-453

Woolsey CN, Fairman D (1946): Contralateral, ipsilateral, and bilateral representation of cutaneous receptors in somatic areas I and II of the cerebral cortex of pig, sheep, and other mammals. *Surgery* 19, 684-702

Woolsey TA, Van der Loos H (1970): The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17, 205-242

Woolsey TA, Welker C, Schwartz RH (1975a): Comparative anatomical studies of the SmL face cortex with special reference to the occurrence of "barrels" in layer IV. *J Comp Neurol* 164, 79-94

Woolsey TA, Dierker ML, Wann DF (1975b): Mouse Sml cortex: qualitative and quantitative classification of golgi-impregnated barrel neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2165-2169

Xu X, Callaway EM (2009): Laminar specificity of functional input to distinct types of inhibitory cortical neurons. *J Neurosci* 29, 70-85

Xu X, Roby KD, Callaway EM (2006): Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J Comp Neurol* 499, 144-160

Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010): Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518, 389-404

Zhang ZW, Deschenes M (1997): Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling study. *J Neurosci* 17, 6365-6379

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen, die mich bei der Entstehung dieser Dissertation unterstützt haben, bedanken.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jochen Staiger danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation im Institut für Neuroanatomie im Zentrum Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, für seine kompetente Betreuung und Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt Dr. Mirko Witte, der mich stets angespornt hat und mir mit Anleitungen, Ratschlägen und Verbesserungsvorschlägen zur Seite stand. Sowohl Prof. Dr. Staiger als auch Dr. Witte gilt mein Dank für das Korrekturlesen.

Ich danke allen technischen Assistentinnen für die Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Versuche im Labor, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.