

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

# Die Verteilung von VIP-exprimierenden Interneuronen im desorganisierten Kortex der *Reeler*-Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Alina Christiane Rüppel

aus

Bad Hersfeld

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. med. J. F. Staiger

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

### **Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. med. J. F. Staiger

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

Drittreferent/in: PD Dr. S. Sennhenn-Kirchner

Datum der mündlichen Prüfung: 04.11.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Verteilung der VIP-exprimierenden Interneurone im desorganisierten Kortex der *Reeler*-Maus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die in dieser Arbeit beschriebenen Perfusionen wurden nicht von der Autorin selbst durchgeführt, sondern von Herrn Dr. Martin Möck.

Göttingen, den .....  
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Hafner G, Guy J, Witte M, Truschow P, **Rüppel A**, Sirmipilatzte N, Dadarwa R, Boretius F, Staiger JF (2021): Increased Callosal Connectivity in Reeler Mice Revealed by Brain-Wide Input Mapping of VIP Neurons in Barrel Cortex. *Cereb Cortex* 31, 1427-1443

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Neo-, Archi- und Paleokortex .....	1
1.1.1 Die verschiedenen Kortexareale und ihre Funktionen .....	2
1.1.2 Das Konzept der kortikalen Schichtung.....	2
1.2 VIP-exprimierende GABAerge Interneurone .....	5
1.3 Ursprung und Migrationswege exzitatorischer und inhibitorischer Zellen.....	8
1.4 Reelin- <i>Knock-out</i> -Maus „ <i>Reeler</i> “ .....	11
1.4.1 Reelin als Leitfaden der radialen Migration.....	11
1.4.2 Unterschiede der Desorganisation zwischen Wildtyp- und <i>Reeler</i> -Mäusen.....	15
1.5 Ziele der Studie .....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Versuchstiere.....	18
2.2 Perfusion der Versuchstiere sowie die Vorbereitung des Gewebes .....	19
2.3 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	19
2.4 Immunhistochemie (IHC).....	22
2.5 Quantifikation und Datenanalyse .....	23
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
3.1 Kolokalisation der tdTomato-Zellen mit der <i>Vip</i> -Sonde in der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> -Maus .....	28
3.1.1 Inhibitorische und exzitatorische Aktivität der VIP-positiven Zellen.....	32
3.2 Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> -Maus .....	33
3.2.1 Primärer motorischer Kortex (M1) .....	34
3.2.2 Primärer somatosensorischer ( <i>Barrel</i> -) Kortex (S1, S1BF).....	35
3.2.3 Primärer visueller Kortex (V1) .....	36
3.2.4 Vergleich der Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen zwischen M1, S1 und V1 .....	38
3.2.5 Vergleich der Kortexdicke von M1, S1 und V1 .....	39
3.3 Folgen die VIP/tdTomato-Zellen dem Verteilungsmuster der exzitatorischen RGS8-Zellen?.....	41
3.3.1 Primärer motorischer Kortex (M1) .....	44
3.3.2 Primärer somatosensorischer Kortex (S1) .....	46
3.3.3 Primärer visueller Kortex (V1) .....	48
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1 Methodische Aspekte.....	51
4.1.1 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung und Immunhistochemie .....	51

---

4.1.2	Epifluoreszenzmikroskopie .....	53
4.1.3	Auszählung im richtigen Kortextbereich .....	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	55
4.2.1	Stellt die <i>VIPcre/RosaTomato/Reeler</i> -Mauslinie ein verlässliches Mausmodell zur Untersuchung von VIP-Neuronen dar? .....	57
4.2.2	Verteilung der VIP-exprimierenden Interneurone.....	58
4.2.3	Folgen inhibitorische VIP-Zellen der Verteilung exzitatorischer RGS8-Zellen? .....	62
4.3	Funktionelle Relevanz.....	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Schichten des primären somatosensorischen Kortex (S1).....	4
<b>Abbildung 1.2:</b> Subtypen GABAerger Interneurone im Neokortex der Wildtyp-Maus .....	5
<b>Abbildung 1.3:</b> Die Verteilung von VIP-exprimierenden Zellen im <i>Barrel</i> -Kortex von <i>VIPcre/RosaTomato/WT</i> -Mäusen .....	7
<b>Abbildung 1.4:</b> Ursprung und Migrationswege inhibitorischer und exzitatorischer Neurone.	10
<b>Abbildung 1.5:</b> Laminare Schichtung der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> -Maus im <i>Barrel</i> -Kortex .....	14
<b>Abbildung 1.6:</b> Vergleich der kortikalen Schichtung zwischen der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> - Maus .....	16
<b>Abbildung 2.1:</b> Frontalschnitt eines Mausgehirns im Bereich des primären motorischen Kortex (M1) .....	24
<b>Abbildung 2.2:</b> Frontalschnitt eines Mausgehirns im Bereich des primären somatosensorischen ( <i>Barrel</i> -) Kortex (S1, S1BF) .....	24
<b>Abbildung 2.3:</b> Frontalschnitt eines Mausgehirns im Bereich des primären visuellen Kortex (V1).....	25
<b>Abbildung 2.4:</b> Bin-Size-Analyse.....	26
<b>Abbildung 3.1:</b> FISH zur Markierung der <i>VIP</i> -positiven-Zellen im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp-Maus .....	29
<b>Abbildung 3.2:</b> FISH zur Markierung der <i>VIP</i> -positiven-Zellen im Bereich des primären somatosensorischen ( <i>Barrel</i> -) Kortex (S1) der <i>Reeler</i> -Maus .....	31
<b>Abbildung 3.3:</b> Kolokalisation der tdTomato-positiven Zellen mit der <i>Vip</i> -Sonde in M1, S1 und V1 für die WT- sowie die <i>Reeler</i> -Maus .....	32
<b>Abbildung 3.4:</b> Verteilung der nativen <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen im primären motorischen Kortex (M1) der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> -Maus.....	35
<b>Abbildung 3.5:</b> Verteilung der nativen <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen im primären somatosensorischen ( <i>Barrel</i> -) Kortex (S1, S1BF) der Wildtyp- (A) und der <i>Reeler</i> -Maus (B) .....	36
<b>Abbildung 3.6:</b> Verteilung der nativen <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen im primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp- (A) und der <i>Reeler</i> -Maus (B).....	37
<b>Abbildung 3.7:</b> Anzahl der nativen ausgezählten <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen pro Hirnschnitt in M1, S1 und V1 in der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> -Maus.....	39
<b>Abbildung 3.8:</b> Vergleich der Kortexdicke ( $\mu\text{m}$ ) von M1, S1 und V1 zwischen der Wildtyp- und der <i>Reeler</i> -Maus.....	41
<b>Abbildung 3.9:</b> FISH zur Markierung der <i>Rgs8</i> -positiven-Zellen im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp-Maus .....	43
<b>Abbildung 3.10:</b> FISH zur Markierung der <i>Rgs8</i> -positiven-Zellen im Bereich des primären motorischen Kortex (M1) der <i>Reeler</i> -Maus.....	44
<b>Abbildung 3.11:</b> Verteilung der nativen <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen sowie der RGS8-Zellen im primären motorischen Kortex (M1) der Wildtyp- (A) und der <i>Reeler</i> -Maus (B) .....	46
<b>Abbildung 3.12:</b> Verteilung der nativen <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen sowie der RGS8-Zellen im primären somatosensorischen Kortex (S1) der Wildtyp- (A) und der <i>Reeler</i> - Maus (B) .....	48
<b>Abbildung 3.13:</b> Verteilung der nativen <i>VIP</i> /tdTomato-Zellen sowie der RGS8-Zellen im primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp- (A) und der <i>Reeler</i> -Maus (B) .....	50
<b>Abbildung 7.1:</b> FISH zur Markierung der <i>Gad1</i> -positiven-Zellen im Bereich des primären motorischen Kortex (M1) der <i>Reeler</i> -Maus.....	79
<b>Abbildung 7.2:</b> FISH zur Markierung der <i>Vglut1</i> -positiven Zellen im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der <i>Reeler</i> -Maus .....	80

---

<b>Abbildung 7.3:</b> Anzahl der nativen VIP/tdTomato-Zellen pro mm <sup>3</sup> Kortex für M1, S1 und V1 in der Wildtyp- und der Reeler-Maus .....	81
---	----



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> eingesetzte Sonden .....	22
<b>Tabelle 7.1:</b> Prozentuale Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in M1, S1 und V1 von WT- und <i>Reeler</i> -Mäusen .....	73
<b>Tabelle 7.2:</b> Verteilung der VIP/tdTomato Zellen in M1, S1 und V1.....	75
<b>Tabelle 7.3:</b> Ergebnisse des <i>Mann-Whitney Rank Sum</i> Tests für die absolute Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen .....	77
<b>Tabelle 7.4:</b> Ergebnisse des <i>Mann-Whitney Rank Sum</i> Tests für die Kortexdicke .....	78

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
BP	Basenpaare
CP	Kortikalisplatte, <i>cortical plate</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat, Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
<i>Etv1</i>	<i>ETS variant gene 1</i>
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure, <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>
GAD1/ <i>Gad1</i>	Glutamatdecarboxylase 1
HB	Hybridisierungspuffer, <i>hybridisation buffer</i>
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure
IHC	Immunhistochemie
LGE	laterale ganglionäre Eminenz
M1	primär motorischer Kortex, <i>primary motor cortex</i>
MGE	mediale ganglionäre Eminenz
MZ	Marginalzone
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
<i>Ndnf</i>	<i>neuron derived neurotrophic factor RIKEN cDNA A930038C07 gene</i>
PB	Phosphatpuffer, <i>phosphate buffer</i>
PBS	Phosphat-gepufferte isotonische Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
RGS8/ <i>Rgs8</i>	Regulator der G-Protein-Signalübertragung 8, <i>regulator of G-protein Signaling 8</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
<i>Rorb</i>	<i>RAR-related orphan receptor B</i>
S1	primärer somatosensorischer Kortex, <i>primary somatosensory cortex</i>
SSC	Standart-Saline-Citratpuffer
SVZ	Subventrikuläre Zone
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, <i>tris buffered saline</i>
<i>TC1460681</i>	<i>immunoglobulin heavy constant</i>
V1	primärer visueller Kortex, <i>primary visual cortex</i>
VGLUT1/ <i>Vglut1</i>	vesikulärer Glutamattransporter 1
VIP/ <i>Vip</i>	vasoaktives intestinales Polypeptid
VZ	Ventrikularzone, ventrikuläre Zone
wm	weiße Substanz, <i>white matter</i>
WT	Wildtyp, Wildtyp-Maus, <i>wild type</i>
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung



---

# 1 Einleitung

## 1.1 Neo-, Archi- und Paleokortex

Die Großhirnrinde (*Cortex cerebri*) ist ein Teil des Telencephalons (auch als Großhirn oder Endhirn bezeichnet) und wird bei gyrenzephalen Spezies von den sogenannten *Sulci* (Furchen) durchzogen. Diese trennen, unter anderem, die verschiedenen Großhirnlappen voneinander. Des Weiteren findet sich auf der Großhirnrinde noch eine weitere anatomische Struktur: die *Gyri* (Hirnwindungen), die ebenfalls durch die *Sulci* voneinander abgegrenzt werden. Der *Cortex cerebri* (Großhirnrinde) kann entwicklungsgeschichtlich in einen älteren und einen jüngeren Teil gegliedert werden. Der früher entstandene, ältere Teil des Kortex wird als Allokortex bezeichnet und kann nochmals in Archi- und Paleokortex gegliedert werden. Der Archikortex besteht hauptsächlich aus Hippocampusformationen und Teilen des limbischen Systems. Der Paleokortex wiederum stellt den phylogenetisch älteren Bereich dar und enthält Teile des Rhinencephalons (Riechhirns) sowie der Amygdala (*Corpus amygdaloideum*). Histologisch zeichnet sich der Allokortex durch eine besondere mikroskopische Rindenstruktur aus, die eine drei- bis vierschichtige Gliederung aufweist. Der Neokortex (Isokortex) zählt entwicklungsgeschichtlich zum jüngeren und größeren Teil der Großhirnrinde. Sein mikroskopischer Aufbau unterscheidet sich grundsätzlich von dem des Allokortex. Er wird in sechs spezialisierte Schichten gegliedert, die durch eine ausgeprägte Zytoarchitektur und spezifische Verschaltungsmuster gut definiert sind (Abbildung 1.1; Scheuer 2015). Diese Gliederung in sechs Schichten wird von der Hirnoberfläche (*Pia mater*) bis zur weißen Substanz (wm) hin durchnummeriert. „Die Existenz einer variablen Anzahl von Schichten, bzw. deren unterschiedliche Ausprägungen, gelten als das Hauptmerkmal der kortikalen Organisation“, trotz seiner vereinfachenden Bezeichnung „Isokortex“ (Guy und Staiger 2017). Funktionell ist der Kortex in Kolumnen bzw. Säulen gegliedert. Diese Zellsäulen gelten als die kleinste funktionelle Einheit und sind senkrecht zur Oberfläche des Kortex angeordnet. Der Neokortex, insbesondere der von Säugetieren, stellt jene Region des Gehirns dar, die für „höhere“ kognitive Leistungen entscheidend ist. Dazu zählen die Analyse sowie die bewusste Wahrnehmung von Sinnesreizen, die Planung und Regulierung zielgerichteter Bewegungen sowie das Lernen und das Gedächtnis. Die strukturellen Grundlagen der zugrundeliegenden funktionellen Prozesse gelten als miteinander verbundene Module: einzigartige kortikale Areale und die vorwiegend stereotypen kortikalen Säulen (Schubert et al. 2007; Staiger und Petersen 2021).

---

### 1.1.1 Die verschiedenen Kortexareale und ihre Funktionen

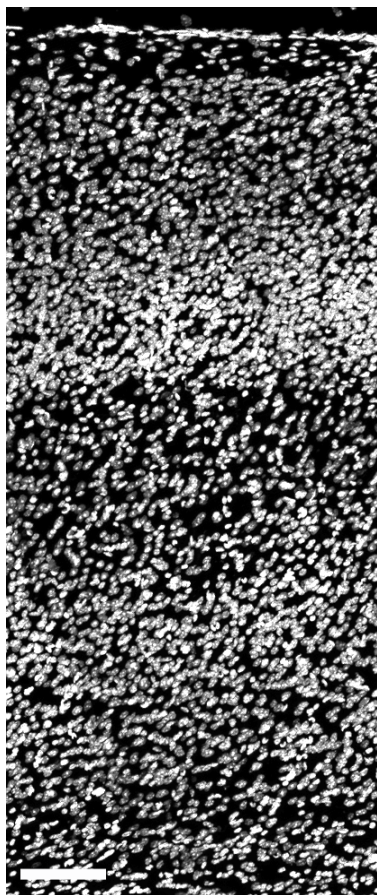
Der Kortex kann funktionell in bestimmte Areale eingeteilt werden, die unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Sensorische Informationen werden beispielsweise in den sensorischen Arealen (z. B. somatosensorischer, visueller und auditorischer Kortex) verarbeitet, während die Ausführung willkürlicher Bewegungen durch den primären motorischen Kortex (M1) kontrolliert wird. Diese Bereiche liegen entlang der anterior-posterioren Achse des Neokortex. Somit befindet sich der primäre motorische Kortex (M1) weiter anterior im Frontallappen, während der primäre visuelle Kortex (V1) weiter kaudal im Okzipitallappen zu finden ist (Kandel et al. 2013). Der dazwischen liegende primäre somatosensorische Kortex (S1) von Nagetieren enthält in Schicht 4 periodische Zellaggregate, die wegen ihres anatomischen Aussehens als „Tönnchen“ bzw. *Barrels* bezeichnet werden. Daher auch der Name *Barrel-Kortex* (S1) (Jensen und Killackery 1987; Lu und Lin 1993; Staiger et al. 1996). Dabei ist jedes *Barrel* nicht ausschließlich, aber überwiegend für die Verarbeitung einer taktilen Information aus dem entsprechend kontralateralen Schnurrhaar der Maus verantwortlich (Woolsey und van der Loos 1970; Welker 1971; Simons 1978; Ito 1985; Armstrong-James und Fox 1987).

### 1.1.2 Das Konzept der kortikalen Schichtung

Die sogenannte Molekularschicht (Schicht 1; Lamina I; *Lamina molecularis*) besteht vor allem aus Fortsätzen tiefer gelegener Neurone, die weitestgehend parallel zur Oberfläche verlaufen. Sie ist besonders durch eine äußerst geringe Zelldichte gekennzeichnet, wobei hier keinerlei Pyramidenzellen vorkommen. Schicht 2/3 setzt sich aus der äußeren Körnerzellschicht (Lamina II; *Lamina granularis externa*) und der äußeren Pyramidenzellschicht (Lamina III; *Lamina pyramidalis externa*) zusammen. Die äußere Körnerzellschicht enthält vor allem kleine Pyramiden- sowie Sternzellen und zeichnet sich durch eine hohe Zelldichte aus. Sie hat hauptsächlich assoziative Aufgaben. In der äußeren Pyramidenzellschicht befinden sich überwiegend größere Pyramidenzellen, die von der *Pia mater* in Richtung der weißen Substanz größer werden. Ihre Axone (Fortsätze) bilden den Großteil der Assoziations- und Kommissurenfasern. Die innere Körnerzellschicht (Schicht 4; Lamina IV; *Lamina granularis interna*) enthält viele kleine Pyramiden- und Sternzellen. Hier enden mit ausgiebigen Verzweigungen die thalamokortikalen Afferenzen von spezifischen thalamischen Kernen. Jene sensiblen sensorischen Kortexareale, in denen Sinnesbahnen enden, haben eine besonders gut ausgeprägte Schicht 4 (z. B. im primären somatosensorischen und im visuellen Kortex). Die innere Pyramidenzellschicht (Schicht 5; Lamina V; *Lamina pyramidalis interna*) enthält äußerst große Pyramidenzellen (die größten Zellen der Großhirnrinde). Ihre axonalen Fortsätze bilden den Hauptteil der Efferenzen zu den tieferen Hirnregionen (Basalganglien, Hirnstamm, Rückenmark). Der

primäre motorische Kortex weist eine besonders stark ausgebildete Schicht 5 auf, die dort motorische Funktionen wahrnimmt. In den anderen Kortexarealen hat sie eher assoziative Funktionen. Die multiforme Zellschicht (Schicht 6; Lamina VI; *Lamina multiformis*) enthält viele morphologisch unterschiedliche Zellen (multipolare, bipolare und spindelförmige Zellen) sowie kleine Pyramidenzellen. Ihre Axone bilden den Großteil der Efferenzen der Großhirnrinde zum Thalamus (Caviness 1975; Ayala et al. 2007). Theodor Meynert war 1867 der erste, der durch mikroskopische Untersuchungen an der Großhirnrinde von Säugetieren eine Unterteilung jener in Schichten vorschlug. Die sogenannten kortikalen Schichten sollten anhand ihrer individuellen zellulären Zusammensetzung unterteilt werden (Meynert 1867). Das Konzept einer kortikalen Schichtung wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen vermutet und ging zunächst aus Beobachtungen der Hirnrinde mit bloßem Auge hervor (Gennari 1784; Vicq d'Azyr 1786; Baillarger 1840). Die schrittweise historische Entwicklung einer Unterteilung des Kortex in Schichten ist durch eine große Variation der Anzahl an Schichten mit einer Spanne von drei bis neun gekennzeichnet (Meynert 1867). „Die Praxis, jene Schichtung durch die zelluläre Zusammensetzung zu definieren, hat bis heute Bestand und weitestgehend zu unserer heutigen Sicht der funktionellen Organisation des Neokortex beigetragen. Diese Sichtweise teilt den Neokortex in sechs Schichten ein, die durch die morphologischen Zelltypen, aus denen sie sich zusammensetzen, ihre Konnektivität, ihren Entwicklungsursprung sowie die Muster der Genexpression definiert sind“ (Guy und Staiger 2017). Dieser Konsens ist zwar relativ gut etabliert, wird aber immer noch weiter verfeinert (Zilles und Wree 1995; Skoglund et al. 1997; Lein et al. 2007; Feldmeyer 2012; Staiger 2015; Staiger et al. 2015a). „Die Tatsache, dass jede kortikale Schicht aus verschiedenen Neuronentypen mit einzigartigen Eigenschaften und spezifischer Konnektivität zusammengesetzt ist, deutet auf eine Arbeitsteilung unter ihnen hin, wobei jede Schicht einen Bruchteil der Rechenlast einer Säule trägt“ (Guy und Staiger 2017). Dabei führt jede Schicht ihre eigenen Berechnungen durch, bevor die Ergebnisse entlang einer Art Mikroschaltung an die nächste Schicht weitergegeben werden, was als so genannter kanonischer Schaltkreis bezeichnet wird (Guy und Staiger 2017). Der Thalamus projiziert bevorzugt in Schicht 4 und beginnt dort mit der kortikalen Verarbeitung sensorischer Informationen. In diesem Modell wird angenommen, dass die intrakortikale Signalverarbeitung in mehreren Schritten erfolgt. Diese umfassen eine Projektion von Schicht 4 auf Schicht 2/3 sowie von diesen supragranulären Schichten auf die infragranulären Schichten 5 und 6. Von dort aus erreichen die Projektionsneuronen dieser Schichten verschiedene kortikale und subkortikale Zielgebiete (Schubert et al. 2007). „Schicht 4 des Kortex fungiert, aufgrund der dichten reziproken Verbindungen zwischen jenen exzitatorischen Neuronen und dem Thalamus, als Überträger und Verstärker von sensorischen Informationen (Feldmeyer et al. 1999; Schubert et al. 2003). Schicht 2/3 empfängt jene sensorischen Informationen aus Schicht

4 und verwebt sie mit inhaltlichen Informationen, bereitgestellt durch Assoziationsfasern des Kortex. Dadurch wird die erste Wahrnehmung des äußeren Objektes erzeugt. Daraufhin informiert Schicht 2/3 Schicht 5 über diese Wahrnehmung. Aufgrund ihrer vielen weitreichenden Ausgänge sendet Schicht 5 den Inhalt jener Wahrnehmungen an unterschiedliche Areale im Gehirn und ruft damit relevante Erinnerungen hervor. Diese Erinnerungen sind mit der jeweiligen Wahrnehmung assoziiert aber an einer anderen Stelle im Kortex gespeichert. Schicht 6 signalisiert letztendlich dem sensorischen Thalamus zurück, dass die kortikalen Berechnungen andauern oder beendet sind“ (Guy und Staiger 2017).



**I** Lamina I: Molekularschicht (Lamina molecularis)

Lamina II: Äußere Körnerzellschicht (Lamina granularis externa)

**II/III**

Lamina III: Äußere Pyramidenzellschicht (Lamina pyramidalis externa)

**IV** Lamina IV: Innere Körnerzellschicht (Lamina granularis interna)

**V** Lamina V: Innere Pyramidenzellschicht (Lamina pyramidalis interna)

**VI** Lamina VI: Multiforme Zellschicht (Lamina multiformis)

**wm** Unterhalb der Lamina multiformis folgt die weiße Substanz (engl. *white matter*, wm)

**Abbildung 1.1: Schichten des primären somatosensorischen Kortex (S1) aus Scheuer (2015) mit freundlicher Genehmigung der Autorin**

Epifluoreszenzaufnahme eines 40  $\mu\text{m}$  dicken Frontalschnittes im Bereich des *Barrel*-Kortex einer Maus mit Darstellung der neokortikalen Schichten (*Laminae*) in der Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol). Die einzelnen Schichten sind mit römischen Buchstaben gekennzeichnet, die Namen der neokortikalen Schichten sind in Deutsch und in Latein angegeben; Maßstab: 100  $\mu\text{m}$  (Scheuer 2015)

## 1.2 VIP-exprimierende GABAerge Interneurone

Im Neokortex unterscheidet man inhibitorische (hemmende) von exzitatorischen (erregenden) Neuronen. Beide Gruppen sind an der Informationsverarbeitung beteiligt. Jedoch ist die Anzahl inhibitorischer GABAerger Neurone mit 15–20 % substantiell gering, im Vergleich zur großen Gruppe an exzitatorischen Pyramidenzellen (80–85 %; Staiger et al. 2015b). In den letzten Jahren konnten bereits mehrere Subtypen von Interneuronen anhand ihrer Morphologie, ihrer Elektrophysiologie sowie anhand ihrer molekularen Eigenschaften charakterisiert werden. Basierend auf der Expression unterschiedlicher neurochemischer Marker, ist es möglich GABAerge Interneurone in drei Subgruppen einzuteilen (Abbildung 1.2; Kawaguchi und Kubota 1993; Kawaguchi und Kubota 1996; Cauli et al. 1997; Ferezou et al. 2002; Markram et al. 2004; Somogyi und Klausberger 2005; Yuste 2005; Ascoli et al. 2008). Es wird unterschieden zwischen jener Neuronengruppe, die das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Parvalbumin (PV) exprimieren, mit ihren Korb- und Axo-axonischen Zellen, jenen Interneuronen, die das Neuropeptid Somatostation (SST) exprimieren, mit ihren Martinotti-Zellen, und jenen sehr heterogenen Neuronen, die den ionotropen Serotonin-Rezeptor 5HT3a exprimieren (Rudy et al. 2011; DeFelipe et al. 2013; Kepecs und Fishell 2014; Staiger et al. 2015b; Tremblay et al. 2016). Die 5HT3a-Untergruppe kann weiter untergliedert werden in jene Gruppe die das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) exprimiert und in jene Gruppe, die kein VIP exprimiert sowie Neurogliaforme Zellen (Rudy et al. 2011). Insgesamt exprimieren lediglich 12–17 % aller GABAergen Interneurone das vasoaktive intestinale Polypeptid VIP (Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013).

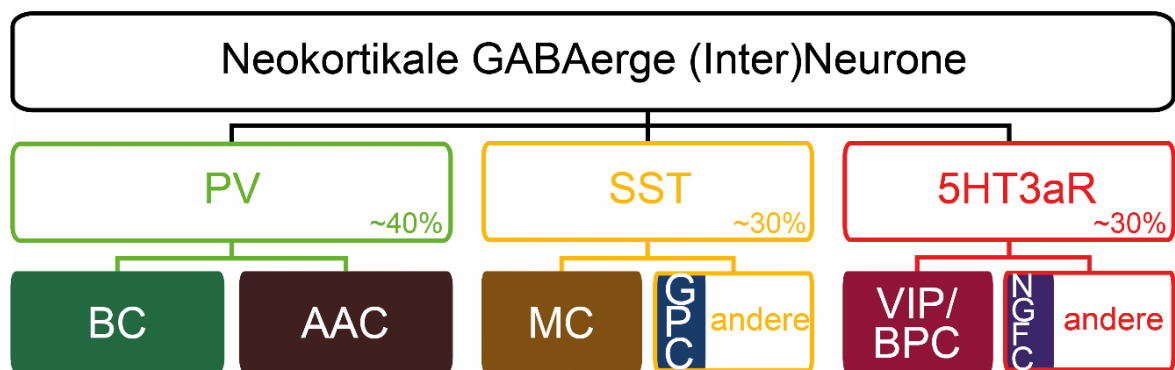
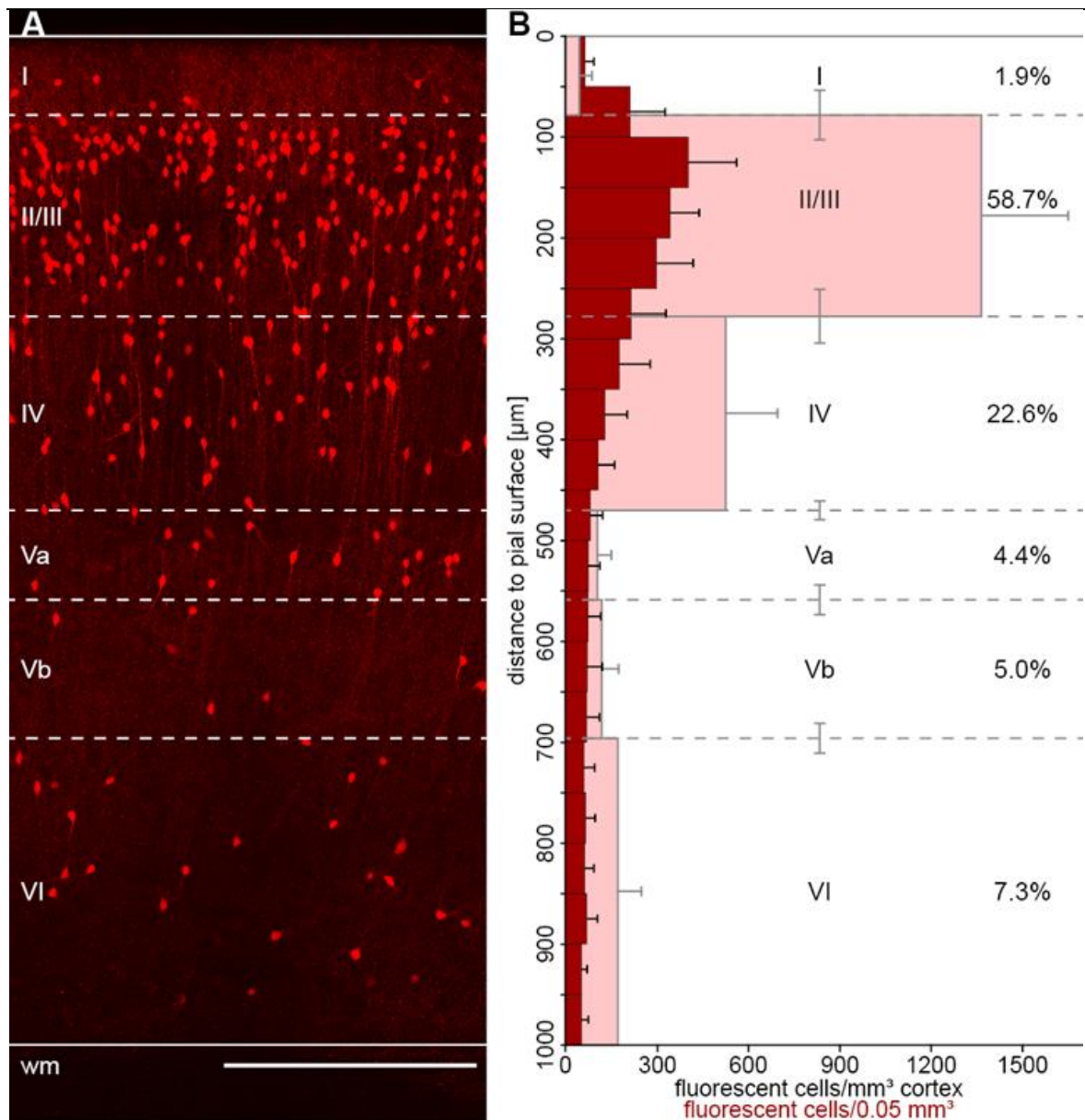


Abbildung 1.2: Subtypen GABAerger Interneurone im Neokortex der Wildtyp-Maus modifiziert nach Staiger et al. (2015b) mit freundlicher Genehmigung der Autors und des Springer Spektrum-Verlags

Bei VIP handelt es sich ursprünglich um ein Darmpeptid, dass erstmals aus dem Duodenum des Schweins isoliert wurde (Said und Mutt 1970; Said und Mutt 1972). VIP-Neurone existieren nicht nur im submukösen Plexus des Verdauungstraktes, sondern auch in vielen anderen



Organen sowie im Gehirn. Sie zeigen eine andere Verteilung als SST- und PV-produzierende Zellen, die sich vor allem in Schicht 4 und tieferen Schichten befinden (Tremblay et al. 2016; Yavorska und Wehr 2016; Almási et al. 2019). Jene Neurone, die den neurochemischen Marker VIP exprimieren kommen im gesamten Kortex vor und befinden sich hauptsächlich und zwar mit rund 60 % in Schicht 2/3 des primären somatosensorischen Kortex (S1) von Wildtyp-Mäusen. Sie sind überwiegend supragranulär lokalisiert und ihre Anzahl nimmt unterhalb von Schicht 2/3 progressiv ab (Abbildung 1.3; Prönneke et al. 2015; He et al. 2016). Außerdem exprimieren sie den inhibitorischen Marker Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*), aber niemals den exzitatorischen Marker in Form des vesikulären Glutamattransporters 1 (*Vglut1*), PV oder SST (Prönneke et al. 2015). VIP-Interneurone weisen eine mehr oder weniger bipolare dendritische Morphologie auf und projizieren zumeist auf Pyramidenzellen und andere GABAerge Interneurone (Staiger et al. 2015b). Hierbei stellen insbesondere Pyramidenzellen die bevorzugtesten Ziele für Schicht 2/3 VIP-Zellen dar (Zhou et al. 2017).



**Abbildung 1.3:** Die Verteilung von VIP-exprimierenden Zellen im *Barrel*-Kortex von *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen aus Prönneke et al. (2015) mit freundlicher Genehmigung des Autors (CC BY)

Visualisierung der nativen Fluoreszenz in einem 300  $\mu\text{m}$  dicken koronalen Schnitt im Kortex einer *VIPcre/tdTomato*-Maus, wm: weiße Substanz. (B) Balkendiagramme in einer schichtenabhängigen (hellrot in Zellen/ $\text{mm}^3$  Kortex; 12 Tiere, 150 Schnitte) und schichtunabhängigen (dunkelrot in Zellen/ $0,05 \text{ mm}^3$ ; 12 Tiere, 150 Schnitte) Zählweise. Für die schichtunabhängige Analyse wurden die Somata in 20 gleich großen Bins, die von der Oberfläche der *Pia mater* (0  $\mu\text{m}$ ) bis zum Rand der weißen Substanz (1000  $\mu\text{m}$ ; y-Achse; dunkelrote Balkengrafik) reichen, im Abstand von 50  $\mu\text{m}$  gezählt. Die Lage der Schichtgrenzen wurde durch die Identifizierung von Schichten in DAPI-Färbungen von 150 Schnitten von 12 Tieren bestimmt. Die Schichtdicke wurde senkrecht zur Oberfläche der *Pia mater* gemessen. Die Werte der resultierenden Mittelwerte werden als gestrichelte Linien in A und B dargestellt (römische Zahlen stellen Schichten dar; Fehlerbalken = SD; Skalenbalken = 150  $\mu\text{m}$ ) (Prönneke et al. 2015).

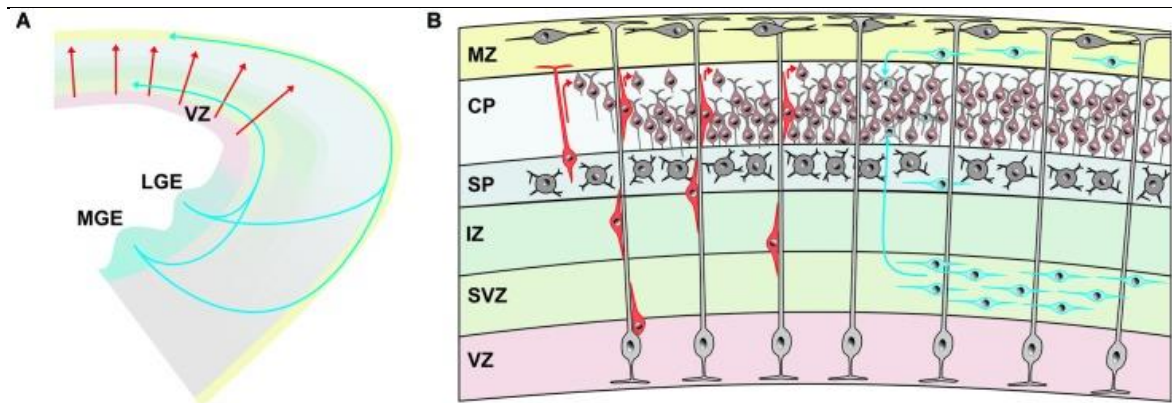
Kortikale VIP-Neurone sind Schlüsselemente bei der neurovaskulären Kopplung (Cauli et al. 2004) und spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des neuronalen Energiestoffwechsels (Magistretti et al. 1998). In Bezug auf kortikale Schaltkreise, wurde

wiederholt berichtet, dass VIP-Neurone bevorzugt auf verschiedene Klassen von hemmenden Interneuronen abzielen (Staiger et al. 2004; David et al. 2007; Pfeffer et al. 2013) und zu einer Enthemmung führen, indem sie exzitatorische Hauptneurone von der Hemmung befreien (Prönneke et al. 2015). Das Motiv des disinhibitorischen Schaltkreises mit der *VIP*-zu-*SOM*-Konnektivität wurde funktionell im visuellen (Fu et al. 2014; Zhang et al. 2014), im auditorischen (Pi et al. 2013) sowie primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (Lee et al. 2013; Walker et al. 2016) charakterisiert. *VIP<sup>cre</sup>/RosaTomato*-Mäuse sind äußerst spezifisch für VIP-exprimierende Neurone im primären somatosensorischen Kortex (S1; Prönneke et al. 2015). Bei gentechnisch hergestellten *VIP-ires-cre-Knock-in*-Mäusen (Taniguchi et al. 2011) ist die Expression der Rekombinase Cre von der Expression von VIP abhängig. Um diese sichtbar zu machen, wurden *VIP-ires-cre-Knock-in*-Mäuse (Taniguchi et al. 2011) mit tdTomato-exprimierenden Ai9-Reporterstämmen gekreuzt (Madisen et al. 2010).

### 1.3 Ursprung und Migrationswege exzitatorischer und inhibitorischer Zellen

„Der Aufbau des Neokortex wird durch eine geeignete Abfolge von Neurogenese, Migration und Positionierung während der embryonalen sowie frühen postnatalen Phasen bestimmt“ (Mingo-Moreno 2018). Es gibt zwei Hauptklassen von Neuronen im Kortex: exzitatorische und inhibitorische Neurone. Diese unterscheiden sich zum einen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer Rolle in neuronalen Netzwerken voneinander. Zum anderen zeigen sie Unterschiede im Bezug auf ihren Ursprung sowie insbesondere hinsichtlich ihrer individuellen Migrationsrouten. Inhibitorische oder GABAerge Neurone unterscheiden sich rein morphologisch deutlich voneinander, wandern tangential und stammen aus der ventrikulären Zone in der ganglionären Eminenz (GE). Exzitatorische bzw. glutamaterge Neurone zeigen eine typische pyramidale Morphologie, wandern radial und entstammen dem Vorläuferpool in der ventrikulären Zone (VZ) des dorsalen Telencephalons (Gupta et al. 2002; Marin et al. 2010). „Während der frühen Hirnentwicklung müssen neu gebildete Neurone von ihrem Entstehungsort zu ihrem endgültigen Ziel in ein bestimmtes Hirnareal und die entsprechende Subregion, z. B. in eine bestimmte Schicht an einer bestimmten Stelle der Großhirnrinde, wandern“ (Luhmann et al. 2015). Doch wie genau wandern diese Neurone und wie finden sie den richtigen Weg zu ihrer endgültigen Position im Kortex? In der frühen Entwicklungsphase des Neokortex werden die meisten exzitatorischen Neurone nahe ihrer Zielregion, in der Ventrikular (VZ)- bzw. Subventrikularzone (SVZ) des Palliums geboren und wandern radial zur Kortexoberfläche in die kortikale Platte, engl. *cortical plate* (CP) ein (Luhmann et al. 2015). Zur Fortbewegung nutzen sie die Bahn entlang radialer Gliafasern (Rakic 1972). Dabei kontrolliert das extrazelluläre

Matrixprotein Reelin, das von den sogenannten Cajal-Retzius-Zellen in der Marginalzone (MZ) bzw. Schicht 1 gebildet wird (D'Arcangelo et al. 1995; Kirischuk et al. 2014), diese radiale Migration (Valiente und Marín 2010). Rezeptoren, die durch Reelin aktiviert werden, „fungieren bei der neuronalen Migration als *GO*- oder *STOP*-Signale“ (Huang 2009). Die radiale Migration stellt auch den zentralen Mechanismus für das Entwicklungsmuster des „*inside-out*“-Modells der Großhirnrinde dar (Nadarajah et al. 2003). Dieses Modell besagt, dass später geborene exzitatorische Neurone in der Lage sind früher geborene Neuronengruppen zu durchdringen, bevor sie ihre endgültige Position in jener kortikalen Schicht, die sie bilden werden, erreichen (Cooper 2008). Da die Schichten im Laufe der Entwicklung sequentiell erzeugt werden, wird der Neokortex von innen nach außen geformt (Angevine und Sidman 1961), wobei die frühgeborenen Neuronen (z. B. Schicht-5-Zellen) tiefe Schichten besetzen und die spätgeborenen Neuronen (z. B. Schicht 2/3-Zellen) oberflächlich liegen (Angevine und Sidman 1961; Rakic 1974). Demnach bilden die älteren Neurone die unterste Schicht 6. Jüngere, später gebildete Neurone die Schichten 5, 4 sowie 3 und schließlich Schicht 2 (Cooper 2008). Die Anwesenheit von Reelin ist für die korrekte radiale Migration pyramidaler Neurone essentiell und führt letztendlich zur Bildung eines Neokortex, der in sechs Schichten gegliedert ist (Pla et al. 2006; Valiente und Marín 2010; Luhmann et al. 2015). Im Gegensatz zur großen Mehrheit der exzitatorischen Neurone wird der Großteil kortikaler GABAerge Interneurone bei Nagetieren in der medialen (MGE) und lateralen ganglionären Eminenz (LGE) des Palliums gebildet (Gelman und Marín 2010). Speziell 5HT3a-Rezeptor-positive Neurone (VIP-Neurone) werden dort in der Subventrikularzone (SVZ) generiert und wandern u. a. in die Großhirnrinde ein (Inta et al. 2008). GABAerge Interneurone wandern von ihrem Geburtsort nicht radial, sondern tangential über tiefe Bahnen und oberflächliche Schichten in die sich entwickelnde Hirnrinde ein (Marín 2013).



**Abbildung 1.4: Ursprung und Migrationswege inhibitorischer und exzitatorischer Neurone aus Luhmann et al. (2015) mit freundlicher Genehmigung des Autors (CC BY)**

(A) Schematische Darstellung des Migrationsweges der meisten exzitatorischen Neurone, die von der Ventrikularzone (VZ) des Palliums radial in die sich entwickelnde Hirnrinde wandern (rote Pfeile). Die Mehrzahl der inhibitorischen Neurone entsteht in der medialen (MGE) und lateralen ganglionären Eminenz (LGE) und erreicht ihre Endposition durch tangentielle Migration über tiefe Bahnen und oberflächliche Kortikalisschichten. (B) Exzitatorische Neurone (in verschiedenen Rottönen markiert) werden in der VZ erzeugt und wandern radial entweder durch somale Translokation oder in späteren Phasen durch Fortbewegung entlang radialer Gliazellen (hellgrau). Wenn sie die Randzone (MZ) erreichen, lösen sie sich ab und richten sich auf die zuvor erzeugten Neurone der kortikalen Platte (CP) aus, wodurch das Muster "innen zuerst - außen zuletzt" der Großhirnrinde entsteht. Die Mehrzahl der inhibitorischen Neurone (in verschiedenen Blautönen markiert) erreicht die Hirnrinde über tangentielle Wanderung in der tiefen Bahn innerhalb der subventrikulären Zone (SVZ) oder der oberflächlichen Bahn in der MZ. Einige inhibitorische Interneurone wandern auch innerhalb der Subplatte (SP); Luhmann et al. 2015).

Mehrere Indizien deuten darauf hin, dass inhibitorische Interneurone von exzitatorischen Projektionsneuronen hinsichtlich ihrer Verteilung gesteuert werden (Lodato et al. 2011). Zum Beispiel koppeln sich bevorzugt synchron erzeugte GABAerge Interneurone und Projektionsneurone, was auf vernetzte Mechanismen hinsichtlich ihrer Verteilung in den einzelnen Schichten hindeutet (Miller 1985; Fairen et al. 1986; Peduzzi 1988; Valcanis und Tan 2003; Pla et al. 2006). Darüber hinaus dringen Interneurone erst nach ihren jeweiligen „Projektionsneuronen-Partnern“ in die Kortikalisplatte ein, was möglicherweise auf einen Bedarf an Signalen von entsprechend lokalisierten Projektionsneuronen bzw. auf eine Art Abhängigkeit von diesen hinweist (Lopez-Bendito et al. 2008). Projektionsneurone und Interneurone mit ähnlichem Geburtsdatum bevölkern bevorzugt die gleichen Kortikalisschichten (Miller 1985; Fairen et al. 1986; Valcanis und Tan 2003; Pla et al. 2006). Dabei scheinen Projektionsneurone die laminare Verteilung von Interneuronen in der Großhirnrinde zu kontrollieren. Unterschiedliche Subtypen von Projektionsneuronen versorgen allem Anschein nach unterschiedliche Interneuronenpopulationen mit spezifischen Positionsinformationen. Somit spielen Projektionsneurone eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Verteilung von GABAergen Interneuronen (Lodato et al. 2011).

---

## 1.4 Reelin-*Knock-out*-Maus „*Reeler*“

### 1.4.1 Reelin als Leitfaden der radialen Migration

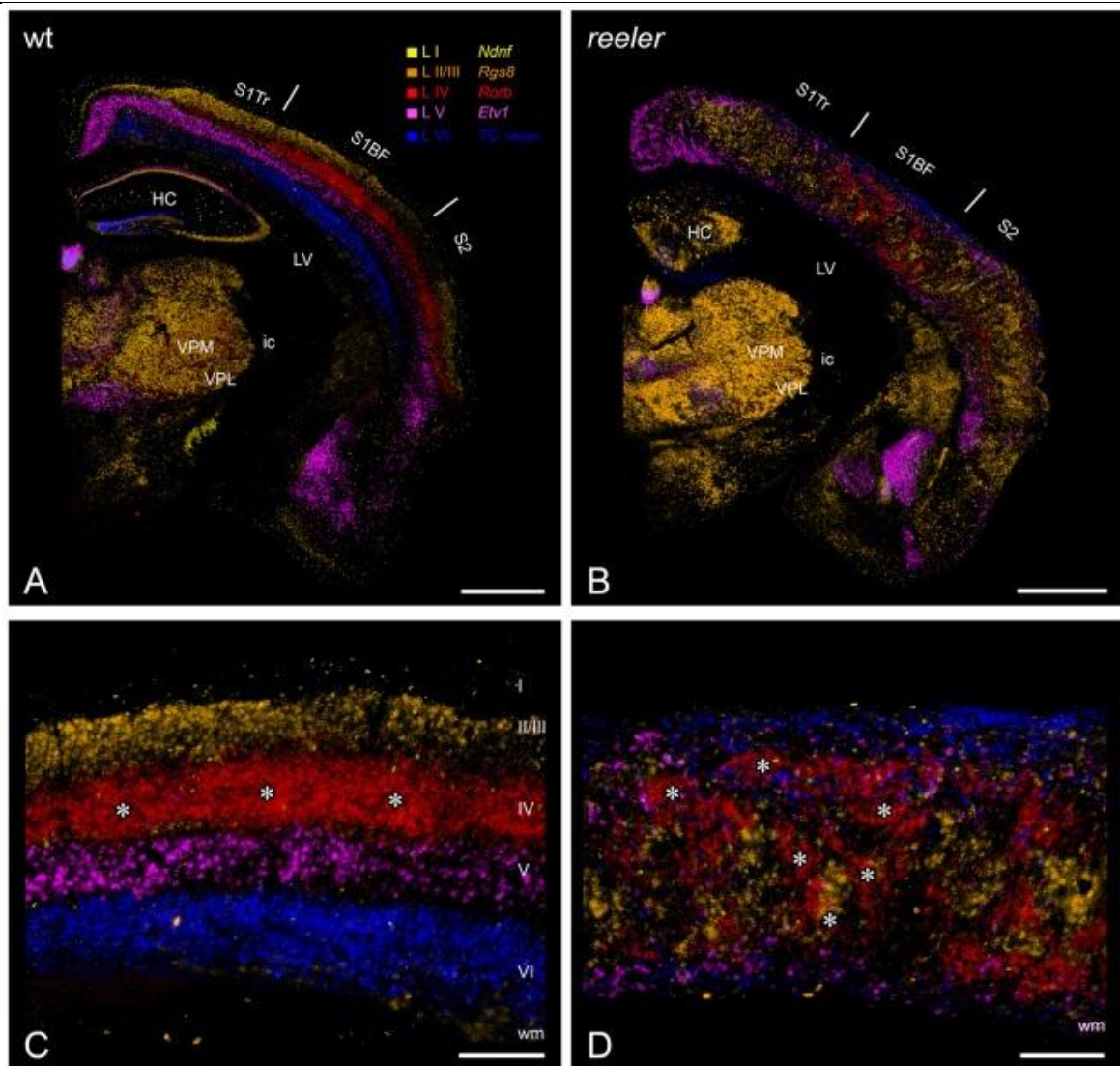
Die radiale Migration exzitatorischer Neurone wird durch eine große Anzahl von Signalwegen präzise reguliert, die hauptsächlich durch sezernierte extrazelluläre Moleküle gesteuert werden (Ohtaka-Maruyama und Okado 2015). Unter diesen steht das große extrazelluläre Matrix-Glykoprotein Reelin zweifellos als Schlüsselakteur im Vordergrund (Marín et al. 2010). Reelin wird durch das Reelin (Reln)-Gen kodiert (D'Arcangelo et al. 1995). Bei Mäusen hat es eine relative Molekülmasse von ca. 385 kDa und ist auf der Ebene der Aminosäuren zu 95 % identisch mit dem beim Menschen vorkommenden Protein (D'Arcangelo et al. 1997). Es wird während der embryonalen Hirnentwicklung von Cajal-Retzius-Zellen, die sich in der Marginalzone des Neokortex und im Hippocampus befinden (D'Arcangelo et al. 1995; Ogawa et al. 1995; Alcántara et al. 1998; Frotscher et al. 2009; Lee und D'Arcangelo 2016), sowie von Körnerzellen der äußeren Körnerschicht im Kleinhirn (Miyata et al. 1996; Alcántara et al. 1998) exprimiert und sezerniert. Bei Wildtyp-Mäusen wandern Neurone an ihren Vorgängern vorbei, wobei sie die reelinhaltige Randzone anstreben. Bei Abwesenheit von Reelin, was in der *Reeler*-Maus der Fall ist, sind später geborene Neurone nicht in der Lage ihre Vorgänger zu umgehen und sammeln sich unterhalb dieser an (Tabata und Nakajima 2002). Reelin spielt demnach eine Schlüsselrolle bei der Wanderung und Positionierung von Neuronen im Rahmen der kortikalen Entwicklung. Es steuert die Migration neugeborener Neurone und dirigiert somit die Entwicklung kortikaler Schichten. Durch das Fehlen von Reelin kommt es höchstwahrscheinlich zu einer gestörten neuronalen Migration der Nervenzellen, was zu schweren Anomalien in der kortikalen Laminierung führt (D'Arcangelo et al. 1999; Hiesberger et al. 1999; Howell et al. 1999; Keshvara et al. 2001; Bock und Herz 2003). Die *Reelin-Knock-out*-Maus „*Reeler*“ wurde erstmals 1991, als eine spontane Mutation der Hausmaus beschrieben (Falconer et al. 1991). Durch einen homozygoten Funktionsverlust des Reln-Gens kommt es zu einem Verlust des oben beschriebenen Matrix-Glykoproteins Reelin, was eine desorganisierte Anordnung des Kortex zur Folge hat (D'Arcangelo et al. 1999; Hiesberger et al. 1999; Howell et al. 1999; Keshvara et al. 2001; Bock und Herz 2003). „Der Neokortex, der Hippocampus sowie das Kleinhirn stellen jene Gehirnstrukturen dar, die am meisten vom Reelin-Mangel betroffen sind. Sie haben im Laufe der letzten Jahre erhebliche Aufmerksamkeit erhalten“ (Guy und Staiger 2017). Mehrere Studien belegen, dass alle Zelltypen, die normalerweise in diesen Regionen zu finden sind, auch in „*Reeler*“ existieren (Caviness und Sidman 1973; Stanfield und Cowan 1979). Rein makroskopisch zeigt die *Reeler*-Maus eine Verkleinerung ihres gesamten Hirnvolumens und eine Vergrößerung der Ventrikel (Badea et al. 2007) sowie eine signifikante

Atrophie des Kleinhirns, was als Ursache für ihren ataktischen Gang gilt (Mariani et al. 1977). Erst mikroskopisch fällt das charakteristischste Merkmal dieses Maustyps auf: die abnorme Zytoarchitektur der laminierten Strukturen, einschließlich des Kleinhirns, des Hippocampus und vor allem des Neokortex. Alle wichtigen kortikalen Strukturen des Gehirns sind jedoch vorhanden (Caviness 1976) und *Reeler*-Mäuse zeigen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Pendants ein überraschend normales Verhalten (Guy und Staiger 2017). Sie weisen bis auf eine schwankende Gangart sowie einen Tremor und Ataxie keinerlei offenkundige Verhaltensdefizite auf (Hamburgh 1960). Die Organisation sowie die Funktionalität der wichtigsten neuronalen Schaltkreise bleiben in dieser mutierten Maus ebenfalls erhalten (Caviness 1976; Silva et al. 1991; Wagener et al. 2010; Pielecka-Fortuna et al. 2015; Wagener et al. 2016; Guy et al. 2017). Die *Reeler*-Maus stellt ein Modell für einen entwicklungsbedingten, induzierten Verlust der kortikalen Schichtung dar. Diese Maus dient als Basis zur Erkenntnis, „was eine intakte Schichtung dem Kortex an Funktionalität hinzufügt“ (Guy und Staiger 2017). Obwohl der *Reeler*-Phänotyp seit mehr als 50 Jahren untersucht wird, gibt er den Neuroentwicklungsbiologen immer noch Rätsel auf (D'Arcangelo 2014). Reelin-defiziente Mäuse wurden häufig zur Erforschung des Reelin-Signalwegs und seiner Rolle während der kortikalen Entwicklung verwendet (Rice und Curran 2001; D'Arcangelo 2005), „aber kein bisher vorgeschlagenes Modell deckt seine ganze Komplexität vollkommen ab“ (Mingo-Moreno 2018). Der *Reeler*-Neokortex wird oft als ein Modell beschrieben, bei dem Projektionsneuronen abnormal in einem *Outside-in*- oder invertierten Muster angeordnet sind (Caviness und Sidman 1973; Caviness 1982b; Rice und Curran 2001; Cooper 2008; Sekine et al. 2012). Diese Hypothese sollte jedoch als eine zu starke Vereinfachung betrachtet werden (Dekimoto et al. 2010; Boyle et al. 2011). Eine weitere Hypothese besagt, dass die Migration jüngerer Neurone in *Reeler* durch ältere Neurone verhindert wird (Pinto Lord und Caviness 1979). Ein entscheidendes Experiment zur Bestimmung des Zell-Geburtsdatums, welches 1982 von Caviness durchgeführt wurde, zeigte, dass im Kortex der mutierten Maus frühgeborene Neurone in den oberen Schichten liegen, während spätgeborene Neurone die unteren Kortexebenen besetzen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass der *Reeler*-Kortex umgekehrt oder nach außen gekehrt geformt sei (Caviness 1982a). Die Beschreibung des *Reeler*-Kortex als invertiert wurde von der wissenschaftlichen Gemeinschaft weitgehend verwendet und ist, mit kleinen Ausnahmen (Dekimoto et al. 2010; Wagener et al. 2010; Boyle et al. 2011), auch heute noch vorherrschend (Gupta et al. 2002; Tissir et al. 2002; Cooper 2008; Chai und Frotscher 2016; Jiang und Nardelli 2016). Guy und Staiger konnten 2017 jedoch zeigen, dass der *Reeler*-Neokortex keine Inversion der kortikalen Schichten zeigt, sondern vielmehr eine schwere Desorganisation, die im primären somatosensorischen Kortex zum vollständigen Verlust der Schichten führt (Abbildung 1.5). Durch eine Vielzahl anderer Studien konnte gezeigt werden, dass in *Reeler* weitestgehend

---

unorganisierte Muster der Zellverteilung auftreten. „Ungeachtet ihrer kortikalen Tiefe sind jene Neurone auf chaotische Weise miteinander vermischt“ (Guy und Staiger 2017) und bilden Muster, die sich in Bezug auf die jeweilige kortikale Region unterscheiden (Dekimoto et al. 2010; Wagener et al. 2010; Boyle et al. 2011; Pielecka-Fortuna et al. 2015; Mingo- Moreno 2018).





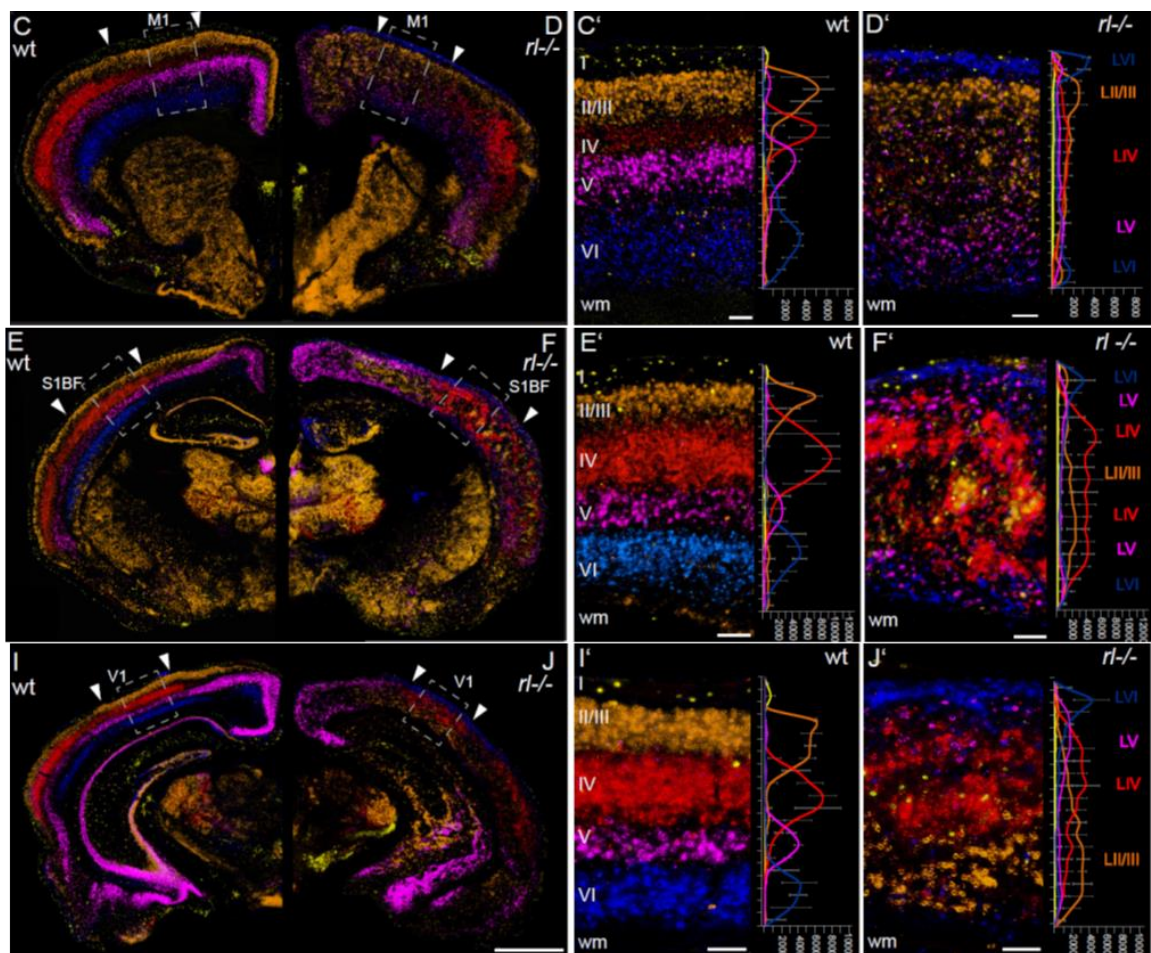
**Abbildung 1.5: Laminare Schichtung der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus im *Barrel*-Kortex** aus Guy und Staiger (2017) mit freundlicher Genehmigung der Autoren (CC BY)

Laminare Schichtenmarker (Lamina-Fate-Marker) zeigen die dramatische Desorganisation der kortikalen Schichten im *Reeler*-Gehirn. **(A,B)** Koronale Hemisektionen durch das Gehirn bei einer Wildtyp **(A)** und einer *Reeler*-Maus **(B)**, auf der Ebene des primären somatosensorischen (*Barrel*) Kortex. Laminare Schichtenmarker (beschriftet in A) wurden durch *in-situ*-Hybridisierung in seriellen Schnitten angefärbt, falsch gefärbt und überlagert, um einen umfassenden Eindruck zu erhalten (modifiziert von Wagener et al. 2016). Die Übersicht zeigt, dass die allgemeine anatomische Anordnung des Gehirns in Form von subkortikalen Kernen und kortikalen Arealen grundsätzlich normal ist. **(C, D)** Eine höhere Vergrößerung durch den *Barrel*-Kortex zeigt eine typische Schichtung eines granulären Kortex **(C)**, mit einer tonnenförmig gehäufteten Schicht 4 (Sternchen). In der *Reeler*-Mutante **(D)** sind die meisten Zelltypen überall in der kortikalen Tiefe zu finden, wobei auch Schicht 4-Zellen Cluster bilden, die tonnenförmige Äquivalente (Sternchen) genannt werden. Römische Ziffern markieren kortikale Schichten, HC: Hippocampus, ic: innere Kapsel, LV: lateraler Ventrikel, S1BF: Tonnenfeld des primären somatosensorischen Kortex, S1Tr: Rumpffregion des primären somatosensorischen Kortex, S2: sekundärer somatosensorischer Kortex, VPL: *Nucleus ventralis posterolateralis*, VPM: *Nucleus ventralis posteromedialis*. Skalenbalken: **(A, B)** 1000  $\mu\text{m}$ ; **(C, D)** 250  $\mu\text{m}$  (Guy und Staiger 2017)

### 1.4.2 Unterschiede der Desorganisation zwischen Wildtyp- und *Reeler*-Mäusen

Die Subregionen des Neokortex sind an verschiedenen kognitiven Prozessen, wie z. B. der bewussten Sinnesverarbeitung, beteiligt (Mingo- Moreno 2018). Die Gliederung des Neokortex in sechs Schichten wurde in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe sogenannter Lamina-Fate-Marker bzw. Schichtenmarkern untersucht. Dabei handelt es sich um Gene exzitatorischer Neurone, deren Expression auf bestimmte Schichten beschränkt ist. Die Expression von *Ndnf* (*neuron derived neurotrophic factor RIKEN cDNA A930038C07 gene*), *Rgs8* (*regulator of G-protein Signaling 8*), *Rorb* (*RAR-related orphan receptor B*), *Etv1* (*ETS variant gene 1*) und *TC1460681* (*immunoglobulin heavy constant*) wurde durch eine chromogene *In-situ*-Hybridisierung (ISH) in koronalen Kortex-Schnitten von adulten Wildtyp- und *Reeler*-Mäusen nachgewiesen (Mingo-Moreno 2018). Die Schichtenmarker zeigen im Wildtyp eine starke und einzigartige regionale Anordnung, die eine genaue Abgrenzung der Kortikalisschichten in M1, S1 und V1 erlaubt (Abbildung 1.6 C, C', E, E', I, I'; Mingo-Moreno 2018). Dabei definiert *TC146068*, in Blau dargestellt, jene Zellen in der polymorphen Schicht 6 und *Etv1* repräsentiert in Rosa Schicht 5a. Der Lamina-Fate-Marker *Rorb* in Rot markiert Zellen der granulären Schicht 4. *Rgs8*-positive Zellen sind orange angefärbt und markieren Schicht 2/3. *Ndnf* visualisiert schließlich Zellen, die sich unmittelbar unter der *Pia mater* befinden, entsprechend Schicht 1. Somit kann hier die gut geordnete Laminierung des Wildtyp-Kortex gezeigt werden, in dem frühgeborene Neurone (Schicht 6- und Schicht 5-Zellen) auf die unteren Schichten beschränkt sind und spätgeborene Neurone (Schicht 4- und Schicht 2/3-Zellen) oberflächlich lokalisiert sind. (Mingo-Moreno 2018). Vergleicht man nun die einzelnen sauber geordneten, neokortikalen Bereiche des Wildtyps mit denselben der *Reeler*-Maus, werden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Form der Desorganisation in „*Reeler*“ sichtbar. Die Daten der mutierten Mäuse zeigen, dass die zytoarchitektonische Organisation des *Reeler*-Kortex zwar stark gestört, aber zweifellos nicht einfach invertiert ist. Stattdessen zeigt der Neokortex von „*Reeler*“ große und einzigartige Arealunterschiede (Abbildung 1.6 D, D', F, F', J, J'; Mingo-Moreno 2018). Im primären motorischen Kortex (M1) sind die Zellen der Schichten 2/3, 4 und 5 massiv miteinander vermischt, bleiben aber in etwa in ihrer korrekten relativen Reihenfolge. Im primären somatosensorischen Kortex (S1) sind Schicht 2/3- und Schicht 4-Neurone sandwichartig zwischen Schicht 5- und Schicht 6-Neuronen eingeschlossen. Eine zumindest annähernde Tendenz zur Inversion zeigt die Verteilung der laminaren Zellen im primären visuellen Kortex (V1). So sind in dem am kaudalsten gelegenen untersuchten Bereich die früher gebildeten Zellen (*TC1460681*- und *Etv1*-exprimierende Zellen) an einer oberflächlichen Stelle angesiedelt, während die spätgeborenen Neurone (*Rgs8*-Neuronen) darunter zu finden sind (Abbildung 1.6; Mingo-Moreno 2018). Diese Experimente belegen, dass es eindeutig Unterschiede in der Verteilung exzitatorischer Neurone in den einzelnen

Kortexbereichen M1, S1 und V1 in der *Reeler*-Maus gibt (Mingo-Moreno 2018). Bislang noch unerforscht blieb die Verteilung GABAerger Interneurone in der mutierten *Reeler*-Maus.



**Abbildung 1.6: Vergleich der kortikalen Schichtung zwischen der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus aus Mingo-Moreno (2018) mit freundlicher Genehmigung der Autorin**

Expression von *Ndnf* (Lamina I; gelb), *Rgs8* (Lamina II/III; orange), *Rorb* (Lamina IV; rot), *Etn1* (Lamina V; violett) und *TC1460681* (Lamina VI; blau) wurden durch chromogene *in situ*-Hybridisierungen visualisiert. Die Dichteplots repräsentieren die unterschiedliche räumliche Verteilung der verschiedenen neuronalen Populationen. Der Wildtypkortex reproduziert die bekannte horizontale Schichtung des Kortex (römische Zahlen), während der *Reeler*-Kortex unterschiedliche Muster horizontaler zytoarchitektonischer Desorganisation aufweist; wm (weiße Substanz). Skalenbalken: 1000  $\mu\text{m}$  (C, E, I), 200  $\mu\text{m}$  (C', E', I') (Mingo-Moreno 2018).

## 1.5 Ziele der Studie

Inhibitorische GABAerge Neurone sind mit ca. 15–20 % (Staiger et al. 2015b) den exzitatorischen Nervenzellen zahlenmäßig deutlich unterlegen. Mit Hilfe transgener Mauslinien konnten in den letzten Jahren mehrere Subtypen inhibitorischer Neurone charakterisiert werden (Staiger et al. 2015b). Lediglich ca. 12–17 % dieser GABAergen Neurone exprimieren den neurochemischen Marker VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid; Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013) und kommen mit etwa 60 % vorwiegend in Schicht 2/3 des Neokortex vor. Dennoch

sind sie maßgeblich an der Funktion neuronaler Schaltkreise sowie an der Generierung von zielgerichtetem Verhalten beteiligt und rücken daher immer stärker in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten (Prönneke et al. 2015). Bisher ging man davon aus, dass eine Gliederung des Neokortex in sechs Schichten essentiell für dessen Funktionen sei. Die *Reeler*-Maus, welche keine sechsschichtige Gliederung ihres Neokortex besitzt, weist trotz einiger motorischer Defekte, keine schweren Verhaltensauffälligkeiten auf (Hamburgh 1960; Guy et al. 2017). Um den Grund dafür besser nachvollziehen zu können, und inwieweit GABAerge Interneurone dabei eine Rolle spielen, ist es hilfreich eine genaue Analyse des Neokortex der *Reeler*-Maus für GABAerge Interneurone durchzuführen. Für die folgende Studie wurden transgene *VIPcre/tdTomato/WT*- und *VIPcre/tdTomato/Reeler*-Mäuse verwendet. Die VIP-exprimierenden Zellen sind in diesen Mäusen mit dem fluoreszierenden Protein *tdTomato* markiert. Die VIP-exprimierenden Interneurone sollen im primären motorischen Kortex (M1), im primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1) sowie im primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus untersucht werden. Für die Charakterisierung mittels einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung werden folgende Proteine verwendet: das vasoaktive intestinale Polypeptid (*Vip*), die Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*), der vesikuläre Glutamatttransporter 1 (*Vglut1*) und der Regulator der G-Protein-Signalübertragung 8 (*Rgs8*). Das primäre Ziel ist es, Aussagen über die Verteilung von VIP-exprimierenden GABAergen Interneuronen in den verschiedenen Regionen des Wildtyp- und des *Reeler*-Kortex schichtenunabhängig treffen zu können. Außerdem sollen Aussagen über die Spezifität und Sensitivität der markierten Interneurone in der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus getroffen werden. Des Weiteren soll mit Hilfe der *Rgs8*-Sonde untersucht werden, inwiefern tangential wandernde inhibitorische VIP-Zellen den radial aufsteigenden exzitatorischen Zellen in der Endphase ihrer Entwicklung im Kortex folgen. Dazu wurden Hirnschnitte im Bereich des primären motorischen, des primären somatosensorischen und des primären visuellen Kortex angefertigt und mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) sowie Immunhistochemie (IHC) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Epifluoreszenzmikroskop digitalisiert und quantitativ, qualitativ sowie statistisch ausgewertet. Mit den Ergebnissen dieser Dissertation soll die Verteilung GABAerger Neurone, insbesondere der VIP-Interneurone im Kortex der *Reeler*-Maus, besser verstanden werden. Des Weiteren sollen die gewonnenen Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis der Rolle von GABAergen Neuronen in neuronalen Schaltkreisen beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

GABAerge Interneurone exprimieren unterschiedliche molekulare Marker und können aufgrund dessen in verschiedene Subtypen eingeteilt werden. Zur Untersuchung dieser Subtypen werden transgene Mauslinien verwendet, bei denen die Gensequenz von zelltypspezifischen Proteinen genutzt wird, um fluoreszierende Marker in den Zellen zu exprimieren. Dadurch ist es möglich, die Lokalisation einzelner Subtypen von GABAergen Interneuronen im Kortex mittels Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren und deren Eigenschaften zu untersuchen. Der Einbau der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Sequenz, die zur Expression des transgenen Fluoreszenzsignals führt, erfolgt mit Hilfe des Cre-lox-P-Systems (Dymecki et al. 2010; Taniguchi et al. 2011). Hierbei handelt es sich um ein Rekombinationssystem, welches bereits in den 1980er Jahren von Dr. Brian Sauer entwickelt wurde (Sauer und Henderson 1988). Cre beschreibt, dass aus dem Bakteriophagen P1 stammende Integraseenzym (Rekombinase) (van Duyne et al. 2015). Da es sich bei der Cre-Rekombinase um eine Tyrosinkinase handelt (Birling et al. 2009), vollzog sich die Rekombination der DNA-Abschnitte über einen nukleophilen Angriff einer Tyrosin-Hydroxylgruppe auf die Phosphodiesterbindung unter Ausbildung eines Holliday-Intermediats (Grindley et al. 2006). Mit Hilfe einer lox-P-Stelle (*locus of crossing over* (x) in P1) konnte der zu verändernde DNA-Abschnitt markiert werden. Dabei wird ein Bereich auf der DNA, der von zwei lox-P-Stellen begrenzt wird, als gefloxt bezeichnet (Lewandoski 2001). Eine lox-P-Stelle ist dabei immer 34 BP (Basenpaare) lang (Sternberg und Hamilton 1981). Von der Orientierung der lox-P-Stelle hängt ab, welche Reaktion abläuft. Orientieren sich beide lox-P-Stellen in dieselbe Richtung, erfolgt eine Exzision mit anschließender Fusion. Sind beide lox-P-Stellen in entgegengesetzte Richtungen orientiert, findet eine Inversion, also eine Drehung des Genabschnitts mit nachfolgender Fusion statt (Mansour et al. 1988).

Zur Generierung der *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus wurden die Reportermaus Ai9 (Madisen et al. 2010; B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup>, The Jackson Laboratory) und die *VIPcre*-Maus (*Vip-ires-cre; VIP<sup>tm1(cre)Zjh</sup>*, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) jeweils mit der *Reeler*-Maus (B6C3Fe rl<sup>-/-</sup> mice) gekreuzt. Deren Nachkommen wurden verpaart, um die *VIPcre/RosaTomato/Reeler* Mutanten- und Wildtyp-Mäuse zu erhalten. Die Cre-Rekombinase bindet, entsprechend des lox-P-Systems, hinter die Promotorregion des Gens, welches für VIP codiert. Erst durch die Verpaarung mit der Reportermaus, die die Information für das rot

fluoreszierende tdTomato-Protein trägt, kommt es zur Expression des fluoreszierenden Signals in VIP-exprimierenden Neuronen.

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt fünf *VIPcre/RosaTomato/Reeler-WT*-Mäuse, im Folgenden als *VIPcre/RosaTomato/WT* bezeichnet, und sechs *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäuse verwendet. Es handelte sich um homozygote Mäuse. Bis auf eine weibliche *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus waren die restlichen Tiere männlichen Geschlechts. Alle Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen aufgezogen und mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Vorbereitung der Mäuse zur Entnahme des Gehirns erfolgte unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (Stand 2013). Das Leiden der Tiere wurde dabei minimiert und die Anzahl der Versuchstiere wurde auf das Nötigste beschränkt.

## 2.2 Perfusion der Versuchstiere sowie die Vorbereitung des Gewebes

Durch eine Injektion von Ketamin in die Peritonealhöhle wurden die Mäuse betäubt (0,1 ml pro 10 g Körpergewicht). Vor der Eröffnung des Thorax und der darauffolgenden Darstellung des Herzens erfolgte eine Überprüfung der Reflexe. Erst als diese negativ ausfielen, wurde die Maus auf der Unterlage fixiert und der Brustkorb eröffnet. Die Perfusion der Versuchstiere erfolgte über den linken Ventrikel mit Hilfe einer stumpfen Kanüle, die zuvor Richtung Aorta eingebracht wurde. Durch eine Arterienklemme wurde die Position beibehalten. Vor der Fixierung erfolgte eine Spülung des Blutes mit 20 ml einer 10 % wässrigen Sukroslösung aus den Gefäßen. Das Ausbluten wurde durch einen kleinen Schnitt im rechten Vorhof gewährleistet. Zur Fixierung wurden 250 ml 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) verwendet. Anschließend wurde das Gehirn aus dem Schädel herauspräpariert und für 2 h bei 4 °C mit 4 % PFA in 0,1 M PB nachfixiert. Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde es über Nacht in 20 % Sukroslösung in 0,1 M PB mit 0,9 % NaCl (Natriumchlorid, pH 7,4) bei 4 °C gelagert. Danach wurde das Gewebe in Isopenthan bei -40 °C vorgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

## 2.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Durch die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung kann an fixiertem Gewebe eine Genexpressionsanalyse von Zellen durchgeführt werden. In dieser Studie wurde die Transkription der Gene für das vasoaktive intestinale Polypeptid (*Vip*), die Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*), den vesikulären Glutamatttransporter 1 (*Vglut1*) und den Regulator der G-Protein-Signalübertragung 8 (*Rgs8*) nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte

mittels spezifischer RNA (Ribonukleinsäure)-Sonden (Tabelle 2.1), die durch den vorherigen Einbau eines mit Digoxigenin (DIG) markierten Nukleotids indirekt markiert wurden. Die Hybridisierung funktionierte aufgrund der Spezifität der Basenpaarung und vollzog sich zwischen der Sonden-RNA und der mRNA des nachzuweisenden Gens. Die Waschungen nach der Hybridisierung dienten der Entfernung von ungebundenen Sonden. Durch eine Temperaturerhöhung um 10 °C wurden Sonden entfernt, die nur teilweise gebundenen hatten. Zur Detektion der vollständig gebundenen Sonden wurde der Antikörper anti-Digoxigenin-POD hinzugegeben, der an die zuvor DIG-markierten Sonden band. Nach Abschluss der FISH konnten die Sonden-Polynukleotide, die an die spezifische mRNA gebunden hatten, im Epifluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Eine wichtige Voraussetzung für Experimente mit RNA ist die Einhaltung von RNase-Freiheit. RNase ist ein Enzym, das die Degeneration von RNA katalysiert und unter anderem im Schweiß oder auch der Atemluft vorkommt. Daher wurde mit RNase-freien Materialien gearbeitet. Die RNase-Freiheit wurde durch ein Erhitzen der verwendeten Materialien auf 180 °C gewährleistet. Einwegartikel wurden bereits RNase-frei gekauft und Lösungen wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC,  $C_6H_{10}O_5$ ) behandelt, sowie am nächsten Tag bei 121 °C autoklaviert. An Tag 1 musste zum Schutz der mRNA komplett RNase-frei gearbeitet werden. Die RNase-Freiheit wurde durch das Tragen von Handschuhen und Mundschutz sowie der vorherigen Erhitzung der Glasmaterialien auf 180 °C für 8 h gewährleistet. Alle Oberflächen, der Kryostat sowie die verwendeten Handschuhe wurden zuvor mit RNase-AWAY® (Thermo Scientific™ Molecular BioProducts) behandelt, um eine Oberflächendekontamination zu erzielen. Alle Pufferlösungen und wasserhaltigen Reagenzien wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. Die zuvor fixierten und bei -80 °C gelagerten Gehirne der Mäuse wurden an Tag 1 mit Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet. Unter Zuhilfenahme des Kryostaten-Mikrotoms (Leica CM3050S, Wetzlar, Deutschland) wurden 40 µm dicke Schnitte in frontaler Orientierung im Bereich des primären motorischen Kortex (M1), des primären somatosensorischen (Barrel-) Kortex (S1, S1BF) und des primären visuellen Kortex (V1) bei -20 °C geschnitten. Die koronalen Schnitte, die den entsprechenden Bereich enthielten, wurden basierend auf dem Maus-Hirn Atlas (Paxinos und Franklin 2001) ausgewählt. Sie wurden in Well-Platten in 0,1 M Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung (PBS, 0,1 M, pH 7,4) gesammelt. Danach wurden die Hirnschnitte für 15 min in PBS gespült. Die erste Vorbehandlung wurde mit 1 %  $H_2O_2$  in Methanol für 20 min bei Raumtemperatur zur Blockierung der Peroxidase durchgeführt. Methanol sorgte für die Permeabilisierung des Gewebes und ermöglichte eine bessere Zugänglichkeit zu intrazellulären Strukturen. Mit 0,2 M Salzsäure (HCl) erfolgte ein Quenching für 8 min, sowie ein Andauen der Schnitte mit Proteinase K (10 µg/ml) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 5 mM EDTA (pH 8) für 10 min.

Zwischen diesen drei Schritten wurden die Hirnschnitte jeweils zweimal 2 min in PBS gespült. Nach abgeschlossener erster Vorbehandlung wurde das Gewebe bei 0 °C auf Eis 20 min in 4 % PFA in 0,1 M PB fixiert. Die dadurch entstandenen Vernetzungsbindungen zwischen den Molekülen wurden durch ein zweites Quenching entfernt. Dieses erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur mit Triethanolamin-Gebrauchslösung (0,1 M Triethanolamin in HCl, pH 8) und Essigsäureanhydrid (2,4 µl/ml). Nach dreiminütiger Einwirkzeit wurden erneut 2,4 µl/ml Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Das Gemisch wurde insgesamt für 10 min inkubiert. Im Anschluss folgten Spülungen bei Raumtemperatur: dreimal 15 min in PBS und 15 min in 2x Standard-Saline-Citratpuffer (1xSSC = 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,1). Durch die Salze wurde eine Erhöhung der Stringenz der Hybridisierung erzielt. Um die Hirnschnitte auf die Hybridisierung vorzubereiten und eine Verringerung des unspezifischen Hintergrunds zu erzielen, wurden sie bei Raumtemperatur in 1:1 2xSSC + Hybridisierungspuffer (HB = 50 % deionisiertes Formamid, 4xSSC, 5 % Dextransulfat, 250 µg/ml DNA aus Fischsperma, 100 µg/ml t-RNA aus Hefe und Denhardts-Reagenz) für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Prähybridisierung der Schnitte bei 55 °C in 900 µl purem Hybridisierungspuffer für 60 min. Die RNA-Sonden (200 ng Sonde pro 1 ml HB, Tabelle 2.1) wurden für die Hybridisierung aus dem -80 °C Tiefkühlschrank genommen und in 100 µl Hybridisierungspuffer angesetzt. Als Sonden dienten die komplementären mRNA-Sequenzen der Gene für *Vip*, *Gad1*, *Vglut1* und *Rgs8* (Tabelle 2.1). Die Sonden wurden im Vorfeld durch den Einbau eines mit Digoxigenin markierten Nukleotids indirekt markiert. Um eventuell aufgetretene Sekundärstrukturen der RNA zu lösen, wurde das Gemisch 2 min bei 95 °C hitzegeschockt. Im Anschluss wurden die Sonden zu den Schnitten hinzugegeben und die Hybridisierung bei 55 °C im Hybridisierungsöfen über Nacht mit Hybridisierungspuffer und Sonde durchgeführt. Um die Eintrocknungsgefahr zu minimieren, wurden die Well-Platten mit Parafilm M® (Bemis, Neenah, Wisconsin) versiegelt. Nach Abschluss des Hybridisierungsprozesses am Tag 2, wurden mehrere Waschungen der Schnitte durchgeführt: zweimal 15 min in 2xSSC bei Raumtemperatur, zweimal 30 min in 2xSSC/50 % Formamid (FA) bei 65 °C und zweimal 5 min in 2xSSC bei 65 °C. Damit Reste, die eventuell nicht an die verwendete Sonde gebunden hatten, entfernt werden konnten, wurden die Schnitte mit RNase A (4 mg/ml) in 2xSSC für 35 min bei 37 °C behandelt. Anschließend wurde das Gewebe erneut gewaschen: bei Raumtemperatur für 5 min in 2xSSC und für 30 min in 2xSSC/50 % FA, bei 65 °C für 30 min in 2xSSC/50 % FA und für 15 min in 0,1 x SSC/50 % FA, sowie für zweimal 15 min in 0,1xSSC, ebenfalls bei 65 °C und bei Raumtemperatur für zweimal 10 min in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS, 0,05 M, pH 7,5). Darauf folgte eine 60-minütige Blockierung mit 4 % Schaf-Serum in TBS bei Raumtemperatur. Danach wurden die Hirnschnitte dreimal 2 min in TBS gewaschen und im Anschluss für 60 min in 0,5 % Blockier-



Reagenz aus TSA Biotin Kit gelagert. Um die hybridisierten Sonden detektieren zu können, wurden die Schnitte mit dem Antikörper Anti-Digoxigenin-POD (1:2000 in 0,5 % Blockier-Reagenz) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Antikörpers wurden die Hirnschnitte ab jetzt abgedunkelt bearbeitet. An Tag 3 wurde eine erneute Waschung für dreimal 10 min in TBS bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die Detektion zu verstärken, erfolgte eine Biotinylierung mit einem Biotin Tyramid (=Working Solution, mind. 200 µl pro Schnitt und Well) für 2 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Schnitte für dreimal 10 min in TBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte die Konjugation mit AlexaFluor Streptavidin 488 (5 µg/ml) in TBS für 15 min bei Raumtemperatur. Dadurch kam es zur Bindung des Fluorophors, der zuvor an Biotin und Streptavidin gebunden hatte (AlexaFluor Streptavidin 488). Infolgedessen konnten die zuvor indirekt markierten Sonden-Polynukleotide, die an die spezielle mRNA gebunden hatten, über die Bindung des Antikörpers und des Fluorophors visualisiert werden. Zum Schluss wurde eine Waschung und somit ein Stoppen der Konjugation für dreimal 10 min in TBS bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche Waschungen und Zwischenschritte erfolgten auf einem Rotationsschüttler.

**Tabelle 2.1: eingesetzte Sonden**

Diese Tabelle zeigt die für die FISH eingesetzten Sonden mit Angabe der Länge und den entsprechenden Primer-Sequenzen.

Gen	Länge	Forward primer	Reverse primer
<i>Gad1</i>	320 BP	GGCACGACTGTTTACGGAGC	GCCTTGTCCTCCCGGTGTCATA
<i>Vglut1</i>	296 BP	GCTGGCAGTGACGAAAGTGA	TGAGAGGGAAAGAGGGCTGG
<i>Vip</i>	367 BP	CTGTTCTCTCAGTCGTCGGC	GCTTTCTGAGGCGGGTGTAG
<i>Rgs8</i>	768 BP	CAGGGGAGCATTAAGAAACAAC	AGAAAGCACCCAGAAAACAGAGC

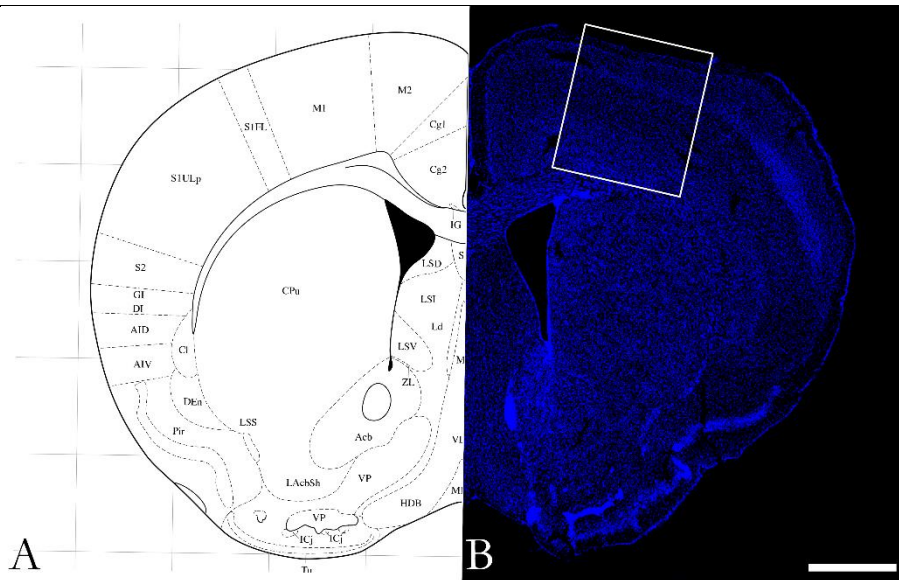
## 2.4 Immunhistochemie (IHC)

Um die Kolokalisation von Zelle und Sondenmolekülen zu überprüfen, wurden zusätzlich die mit dem tdTomato-Signal markierten Zellen wieder angefärbt, da das native Signal durch die FISH verloren ging. Zur Visualisierung der tdTomato-positiven Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung direkt im Anschluss an die FISH durchgeführt. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Antikörpers wurden die Proben abgedunkelt bearbeitet. Bei der IHC kam es zu einer Antigen (AG)-Antikörper (AK)-Reaktion, im Sinne einer indirekten Immunreaktion. Die AG-AK-Komplexe wurden durch Fluoreszenzdetektion mittels eines Epifluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht. Auch hier erfolgten sämtliche Waschungen und Zwischenschritte auf einem Rotationsschüttler. Um die Bindung unspezifischer Antigene zu verhindern, erfolgte eine Blockierung durch 10 % normales Ziegen Serum (Normal Goat Serum, NGS) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung für 90 min bei Raumtemperatur. Die

Hirnschnitte wurden mit dem primären Antikörper (Anti-RFP rabbit, 1:250, Rockland, Limerick, PA, USA) für 72 h in TBS mit 1 % NGS bei 4 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Bindung des primären Antikörpers an das Antigen tdTomato-Protein. Darauf folgte eine Waschung mit TBS für dreimal 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (AlexaFluor 594 Goat Anti Rabbit, Verdünnung 1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) für 4 h in TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Waschung in TBS für dreimal 10 min bei Raumtemperatur vorgenommen. Danach wurden die Zellkerne mit Hilfe von 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, Verdünnung 1:1000), einem Fluoreszenzfarbstoff, in TBS für 5 min bei Raumtemperatur angefärbt. Darauf folgten Waschungen in TBS für dreimal 15 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4-8 °C in TBS gelagert. Am nächsten Tag wurden sie auf einen Objektträger aufgezogen und mit Aqua-Poly-Mount und Deckgläsern eingedeckt. Insgesamt wurde das in 2.3 und 2.4 beschriebene Prozedere an 54 Schnitten von drei *VIPcre/RosaTomato/WT*- und an 72 Schnitten von vier *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäuse angewandt.

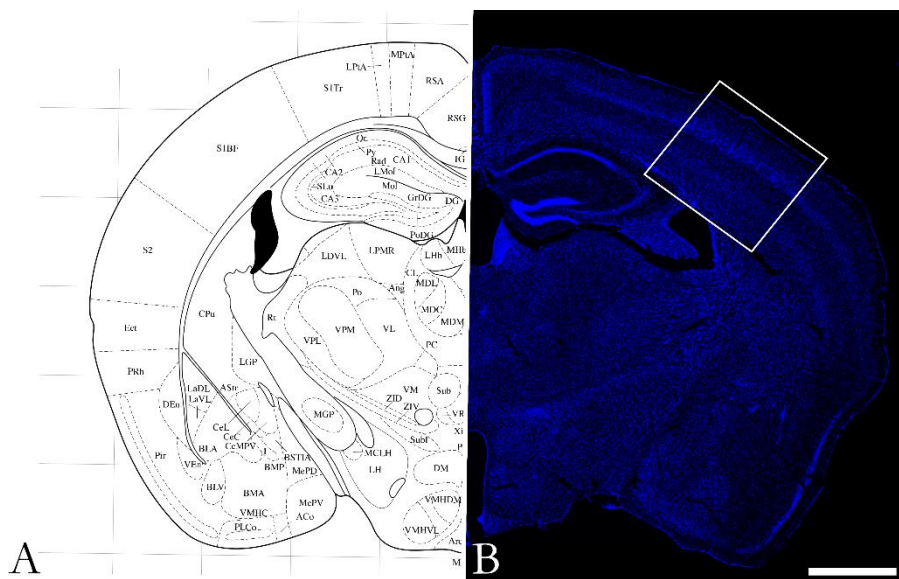
## 2.5 Quantifikation und Datenanalyse

Für jedes Mausgehirn wurden die Sonden *Vip*, *Rgs8*, *Gad1* sowie *Vglut1* verwendet. Pro Sonde und Kortexareal wurden drei Hirnschnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Die gefärbten Hirnschnitte wurden mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops (Axioimager, Zeiss, Jena, Deutschland) und dem Programm Neurolucida 2017 (MBF Bioscience, Willston, Vermont) computerunterstützt ausgewertet. Von jeder verwendeten Sonde eines Kortexareals wurde der beste Schnitt ausgewählt. Davon wurde eine Übersichtsaufnahme mit zehnfacher Vergrößerung in einer Ebene angefertigt. Für die quantitative Analyse wurden von jenen Schnitten mit den Sonden *Vip* und *Rgs8* „dreidimensionale“ Kachel-Aufnahmen jeweils im Bereich des primären motorischen Kortex (M1; Abbildung 2.1), des primären somatosensorischen (Barrel-) Kortex (S1, S1BF; Abbildung 2.2) und des primären visuellen Kortex (V1; Abbildung 2.3) mit 25-facher Vergrößerung angefertigt. Die Bestimmung des korrekten Bereichs von M1, S1 und V1 erfolgte mit Hilfe des Maus-Hirn-Atlas (Paxinos und Franklin 2001).



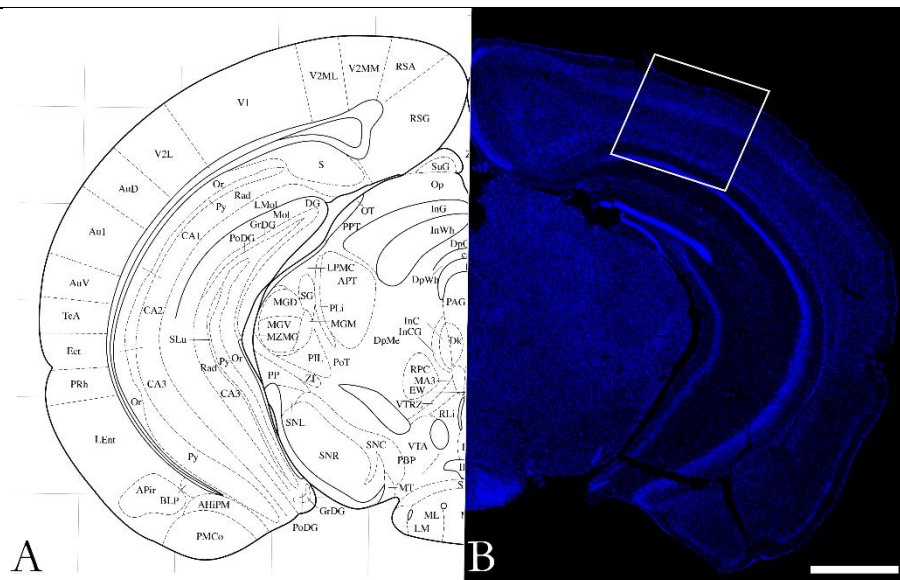
**Abbildung 2.1: Frontalschnitt eines Mausgehirns im Bereich des primären motorischen Kortex (M1)**

**A** zeigt die Abbildung des Paxinos Maus-Hirn-Atlas (Paxinos und Franklin 2001), anhand derer die Region M1 ausgewählt wurde. **B** zeigt eine Übersichtsaufnahme in zehnfacher Vergrößerung, die mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops aufgenommen wurde. Zu sehen ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären motorischen Kortex (M1). Die Zellkerne sind in Blau (DAPI) dargestellt. Das weiße Rechteck verdeutlicht die Lage des primären motorischen Kortex; Maßstab: 1000 µm



**Abbildung 2.2: Frontalschnitt eines Mausgehirns im Bereich des primären somatosensorischen (Barrel-) Kortex (S1, S1BF)**

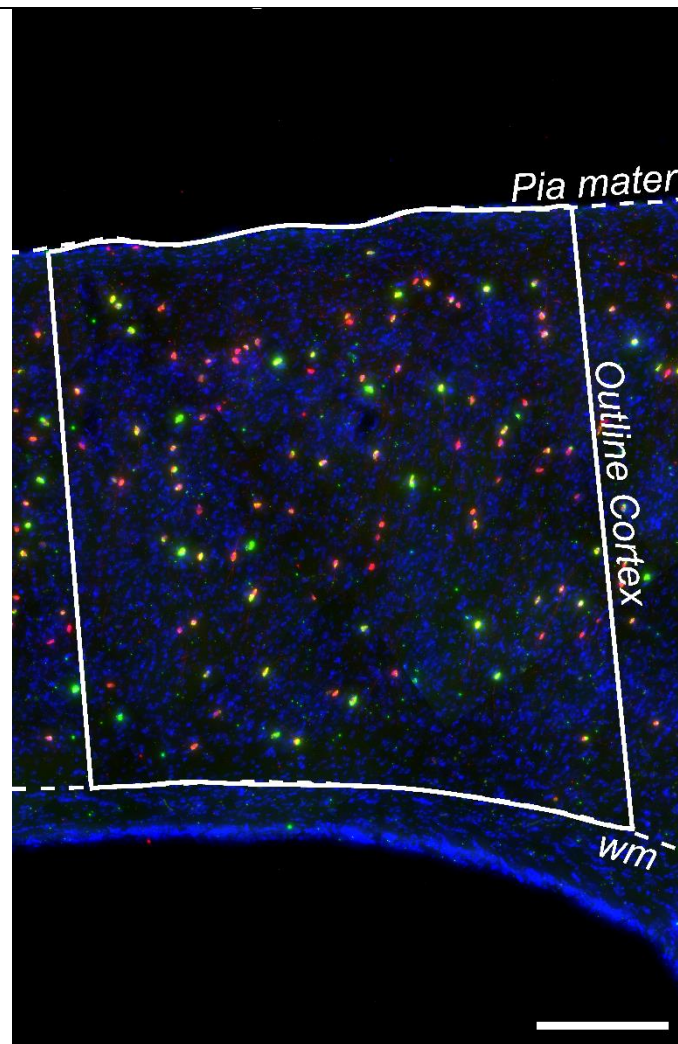
**A** zeigt die Abbildung des Paxinos Maus-Hirn-Atlas (Paxinos und Franklin 2001), anhand derer die Region S1 (S1BF) ausgewählt wurde. **B** zeigt eine Epifluoreszenzaufnahme in zehnfacher Vergrößerung. Zu sehen ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF). In Blau sieht man die Zellkerne (DAPI). Das weiße Rechteck verdeutlicht die Lage des primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex; Maßstab: 1000 µm



**Abbildung 2.3: Frontalschnitt eines Mausgehirns im Bereich des primären visuellen Kortex (V1)**

**A** zeigt die Abbildung des Paxinos Maus-Hirn-Atlas (Paxinos und Franklin 2001), anhand derer die Region V1 ausgewählt wurde. **B** zeigt eine Epifluoreszenzaufnahme in zehnfacher Vergrößerung. Abgebildet ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären visuellen Kortex (V1). Die Zellkerne sind in Blau (DAPI) dargestellt. Das weiße Rechteck verdeutlicht die Lage des primären visuellen Kortex; Maßstab: 1000  $\mu\text{m}$

Der Scanbereich wurde so ausgewählt, dass der gesamte Bereich von *Pia mater* bis zur weißen Substanz erfasst wurde (Abbildung 2.4). Abhängig von der Qualität des einzelnen Schnittes, wurde entweder die rechte oder linke Hemisphäre als Aufnahme-region ausgewählt. Die Aufnahmen wurden in Fokusebenen mit einem Abstand von 1  $\mu\text{m}$  (z-Ebene) angefertigt. Im Anschluss an die Scans wurden die Bildstapel mit Hilfe der Software Zen 2.6 blue edition (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) prozessiert. Mit Hilfe des Computerprogramms NeuroLucida 2017 (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) wurden die Bildstapel im Bereich des primären motorischen (M1), des primären somatosensorischen (S1) und des primären visuellen Kortex (V1) ausgewertet. Der zu analysierende Bereich wurde durch eine Kontur für *Pia mater* und eine Kontur für die weiße Substanz sowie einer Breite von circa 1000  $\mu\text{m}$  festgelegt. Das sich ergebende Rechteck wurde als *Outline Cortex* bezeichnet (Abbildung 2.4). Folgendes wurde im gekennzeichneten Bereich gezählt: Zellen, die ausschließlich das tdTomato-Signal trugen, kolokalisierte Zellen sowie einzeln vorliegendes *Vip*-Sondensignal. Eine Kolokalisation wurde gezählt, wenn die Zelle neben dem tdTomato-Signal zusätzlich das Signal der eingesetzten Sonde aufwies. Das Markieren der entsprechenden Zellen mit unterschiedlichen Symbolen erfolgte manuell. Die anschließende Auszählung erfolgte mit dem NeuroLucida Explorer 2017 (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA). Zusätzlich wurde rein qualitativ überprüft, ob das tdTomato-Signal mit den *Gad1*- oder *Vglut1*-positiven Zellen kolokalisiert ist.



**Abbildung 2.4: Bin-Size-Analyse**

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der *Vip*-Sonde an einem frontalen Hirnschnitt einer *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus im Bereich des primären somatosensorischen (*Barrel*-)Kortex (S1, S1BF). Dieser Ausschnitt zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal, in Grün das *Vip*-Sondensignal und in Gelb die mit der *Vip*-Sonde kolokalisierten tdTomato-Zellen, sowie in Blau alle Zellkerne (DAPI). Das weiße Rechteck stellt die Abgrenzung des Arbeitsfeldes für die Bin-Size-Analyse dar; Maßstab 250  $\mu\text{m}$

Die weitere Analyse erfolgte schichtenunabhängig durch eine gleichmäßige Unterteilung (*Binning*) des ausgewählten Kortexbereichs. Dazu wurde das markierte Kortexareal in 20 gleich große Bereiche (Bins) unterteilt, wobei sich Bin 1 an der Gehirnoberfläche (*Pia mater*) befand. Innerhalb dieser Bins errechnete das Programm Neurolucida Explorer 2017 den Abstand der jeweiligen Zelle zur *Pia mater*, sowie die Gesamtzahl an Zellen. Die Verteilung der jeweiligen Zellen über den Neokortex und die Dichte innerhalb der einzelnen Bins wurde mit selbstgeschriebenen Skripten (erstellt von Georg Hafner und Pavel Truschow) im Programm RStudio berechnet. Neben den Absolutzahlen pro Bin wurden ebenfalls die relativen Prozentwerte wie folgt ermittelt:

$$\text{prozentuale Verteilung} = \frac{\text{Anzahl an Zellen pro Bin} \times 100}{\text{Gesamtzahl an Zellen pro Schnitt}}$$

Zusätzlich zu den selbst angefertigten und gefärbten Schnitten stellte mir Julien Guy 18 Schnitte von zwei *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen und 17 Schnitte von zwei *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäusen zur Verfügung. Insgesamt wurden 72 Schnitte von fünf *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen und 89 Schnitte von sechs *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäusen in der Analyse verwendet. Sämtliche Schnitte einer Kortexregion (M1, S1, V1) wurden zuerst auf die jeweilige Maus gemittelt und anschließend erneut für die Kortexregion. Um die Varianz der Zellzahlen besser darzustellen wurden die Abweichungen als Standardabweichung (SD) und nicht als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Schnitte von Julien Guy wiesen eine Dicke von 50 µm auf und wurden daher auf die sonst verwendete Dicke von 40 µm wie folgt normiert: Jene Schnitte die anstelle von 40 µm 50 µm dick geschnitten waren, wurden auf 40 µm gemittelt.

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Zellzahlen (50µm Schnitte)} \times 40}{50}$$

An den Schnitten, die mit der *Rgs8*-Sonde behandelt wurden, wurde nach der Auszählung der tdTomato-positiven Zellen ein Fluoreszenzplot mit Hilfe des Computerprogramms Zeiss Zen 2.6 blue edition (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) erstellt. Dafür wurden die Bildstapel eines jeden Schnittes in der „*maximum intensity projection*“ (Projektion maximaler Intensität) dargestellt. In dem Bereich von *Pia mater* bis zur weißen Substanz und einer kortikalen Breite von 400 µm wurde ein Fluoreszenzplot erstellt, d. h. der Intensitätsverlauf der RGS8-Fluoreszenz für die *Reeler*- und Wildtyp-Schnitte der drei Kortexareale ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden nach MS Excel exportiert und umfassten ca. 5000 Einzelwerte. Die anschließende Auswertung inklusive einer Normierung auf die jeweilige Kortexdicke von M1, S1 und V1 wurde in RStudio und selbstgeschriebenen Skripten (erstellt von Pavel Truschow) durchgeführt. Für die Ermittlung der Zellverteilung der tdTomato-positiven Zellen im WT und in der *Reeler*-Maus wurden die Zellzahlen von den *Vip*- und *Rgs8*-Färbungen zusammengefasst. Dadurch konnte eine fundierte Aussage über die Zellverteilung pro Bin sowie für die Anzahl der Zellen innerhalb der drei verschiedenen Kortexareale M1, S1 und V1 getroffen werden. Sämtliche Daten wurden in Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) gesammelt und zusammengestellt. Die Diagramme sowie die statistische Analyse wurde in Sigma Plot 13 (Systac Software, San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney Rank Sum* Test getestet, da die gemittelten Zellzahlen für die verwendeten Mäuse in der Regel nicht normalverteilt vorlagen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P < 0,05$  gesetzt. Alle signifikanten Werte sind in den Tabellen in fett dargestellt. Die Grafiken wurden mittels Adobe Photoshop CS6 und Adobe Illustrator CS6 erstellt.

### 3 Ergebnisse

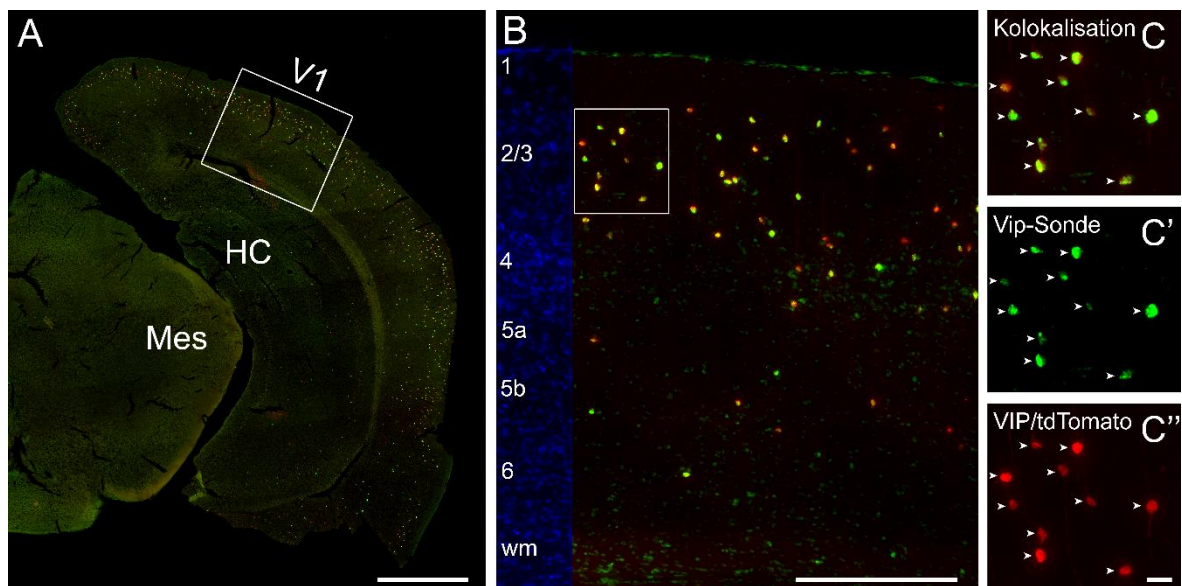
Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung VIP-exprimierender GABAerger Neurone in verschiedenen Regionen des *Reeler*- und des Wildtyp (WT)-Mauskortex schichtenunabhängig zu untersuchen. Die VIP-Neurone konnten durch die Verwendung der *VIPcre/RosaTomato*-Maus, sowie deren Verpaarung mit der *Reeler*-Mutante, anhand ihres nativen tdTomato-Fluoreszenzsignals identifiziert werden. Die Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen wurde in dieser Studie im primären motorischen Kortex (M1), im primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF) und im primären visuellen Kortex (V1) analysiert. In diesem Zusammenhang wurden außerdem Aussagen über die Sensitivität sowie die Spezifität der tdTomato-positiven Zellen für VIP-exprimierende Interneurone in allen drei Kortexarealen der WT- und der *Reeler*-Maus mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) getroffen. Neben dem Einsatz der *Vip*-Sonde gaben die *Gad1*- und die *Vglut1*-Sonde Rückschlüsse hinsichtlich der inhibitorischen und exzitatorischen Eigenschaften von VIP/tdTomato-Zellen. In einem weiteren Teilprojekt wurde untersucht, inwieweit tangential wandernde inhibitorische VIP-Zellen den radial aufsteigenden exzitatorischen Zellen in der Endphase ihrer Entwicklung folgen. Da etwa 60 % der Somata von VIP-Zellen in Schicht 2/3 lokalisiert sind (Prönneke et al. 2015), wurde deren Verteilung in der *Reeler*-Maus (mit ihrem nahezu ungeschichteten Kortex) in Beziehung zu den die Schicht 2/3 repräsentierenden RGS8-exprimierenden Zellen (*Rgs8*-Sonde) gesetzt. Hierbei wurde überprüft, inwieweit die tdTomato-positiven Zellen den *Rgs8*-Sonde tragenden Zellen im *Reeler*-Kortex folgen. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Verteilung GABAerger Neurone im Neokortex der *Reeler*-Maus besser zu verstehen. Außerdem sollen die gewonnenen Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis der Rolle von GABAergen Neuronen in neuronalen Schaltkreisen führen. In den nächsten Jahren wird eine Charakterisierung weiterer Subtypen GABAerger Neurone (PV- und SST-exprimierender) im *Reeler*-Kortex angestrebt.

#### 3.1 Kolokalisation der tdTomato-Zellen mit der *Vip*-Sonde in der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus

Um die Spezifität und die Sensitivität der tdTomato-Zellen für VIP-Interneurone in den drei zu untersuchenden Kortexregionen zu belegen, wurden 18 Schnitte von zwei *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen und 36 Schnitte von vier *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäusen untersucht. Mittels FISH und der verwendeten *Vip*-Sonde konnten die VIP-exprimierenden Zellen markiert und deren Kolokalisation mit dem nativen tdTomato-Signal ausgewertet werden

(Sensitivität). Um Aussagen zur Spezifität zu treffen, wurde die Kolokalisationsquote der tdTomato-Zellen mit der *Vip*-Sonde analysiert.

In allen 18 analysierten Schnitten der WT-Mäuse lassen sich deutliche Anfärbungen von Zellen mit der *Vip*-Sonde (grün) sowohl in M1, S1 als auch in V1 erkennen. Bereits in der zehnfachen Übersichtsaufnahme eines frontalen Hirnschnittes in der V1-Region (Abbildung 3.1 A) sind insbesondere im Neokortex sowie in subkortikalen Regionen, wie dem Hippocampus (HC), grün markierte Zellen zu erkennen. Es fällt auf, dass die meisten Zellen gelb erscheinen, was für eine hohe Kolokalisationsrate spricht. In der 25-fachen Vergrößerung wird die überwiegende Kolokalisation der nativen tdTomato-Zellen mit den grünen *Vip*-Sonde tragenden Zellen im Bereich, der hier exemplarisch ausgewählten Region des primären visuellen Kortex deutlich (Abbildung 3.1 B). In den Herausvergrößerungen (Abbildung 3.1 C-C'') kann die eindeutige Überlagerung beider Signale zweifelsfrei belegt werden. Die resultierende Gelbfärbung (Abbildung 3.1 C) kommt durch eine Überlagerung des roten tdTomato-Signals (Abbildung 3.1 C') mit dem grünen *Vip*-Sondensignal zustande (Abbildung 3.1 C''). Vereinzelt lassen sich ausschließlich rot- sowie grün-markierte Zellen identifizieren.



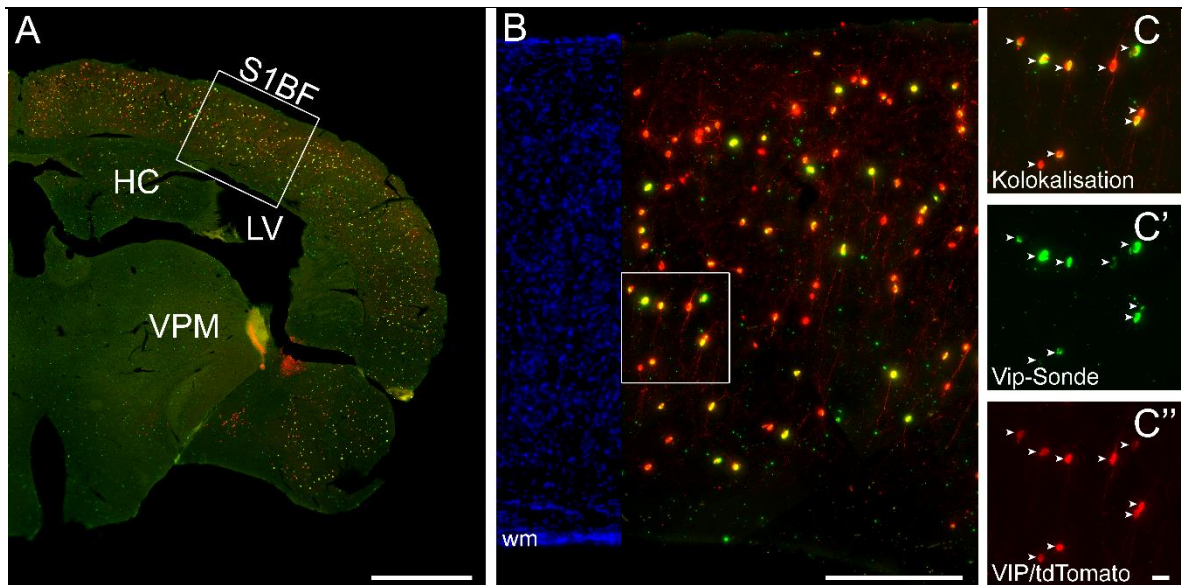
**Abbildung 3.1: FISH zur Markierung der VIP-positiven-Zellen im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp-Maus**

Die FISH der *Vip*-Sonde an einem 40  $\mu\text{m}$  dicken frontalen Hirnschnitt einer *VIPcre/tdTomato/WT*-Maus zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal, in Grün das *Vip*-Sondensignal und in Gelb die kolokalisierten VIP-positiven Zellen. **A** zeigt eine Übersichtsaufnahme in zehnfacher Vergrößerung, die mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops aufgenommen wurde. Zu sehen ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären visuellen Kortex (Rechteck; V1). Als weitere anatomische Strukturen erkennt man den Hippocampus (HC) und das Mittelhirn (Mes); Maßstab: 1000  $\mu\text{m}$ . **B** zeigt eine *maximum intensity projection* des primären visuellen Kortex. Auf der linken Seite sind in Blau die Zellkerne (DAPI) dargestellt sowie die Einteilung in Schichten. Jene Schichten sind mit arabischen Zahlen markiert. Die rechte Seite zeigt die mit der *Vip*-Sonde kolokalisierten tdTomato-Zellen; Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . In **C'-C''** sind Vergrößerungen des umrahmten Bereichs aus B dargestellt. Dabei sind in diesem Ausschnitt durchgängig Kolokalisationen (C) des nativen tdTomato-Signals (C') mit den VIP-positiven Zellen (C'') zu erkennen; Maßstab: 20  $\mu\text{m}$



In der quantitativen Analyse konnte gezeigt werden, dass im Bereich von V1  $98,5 \pm 2,7$  % der nativen tdTomato-Zellen ein positives Signal in Bezug auf die *Vip*-Sonde tragen (Abbildung 3.3). Analog dazu wurden ebenso die Kortexregionen M1 und S1 hinsichtlich ihrer Kolokalisation untersucht. In M1 beträgt die Kolokalisationsrate  $98,9 \pm 1,7$  % und in S1  $99,6 \pm 0,5$  % (Abbildung 3.3). Insgesamt zeigen  $99,0 \pm 1,8$  % aller tdTomato-Zellen in allen 18 ausgewerteten Schnitten von zwei WT-Mäusen eine Kolokalisation mit der *Vip*-Sonde. Betrachtete man nun die mit der *Vip*-Sonde markierten Zellen, so lässt sich dabei eine  $99,3 \pm 1,4$  %ige Überlagerung mit dem tdTomato-Signal feststellen. Demzufolge konnte für die Kortexregionen M1, S1 und V1 in der Wildtyp-Maus eine sehr hohe Spezifität sowie Sensitivität der tdTomato-Zellen für VIP-exprimierende Interneurone in allen drei Kortexregionen nachgewiesen werden.

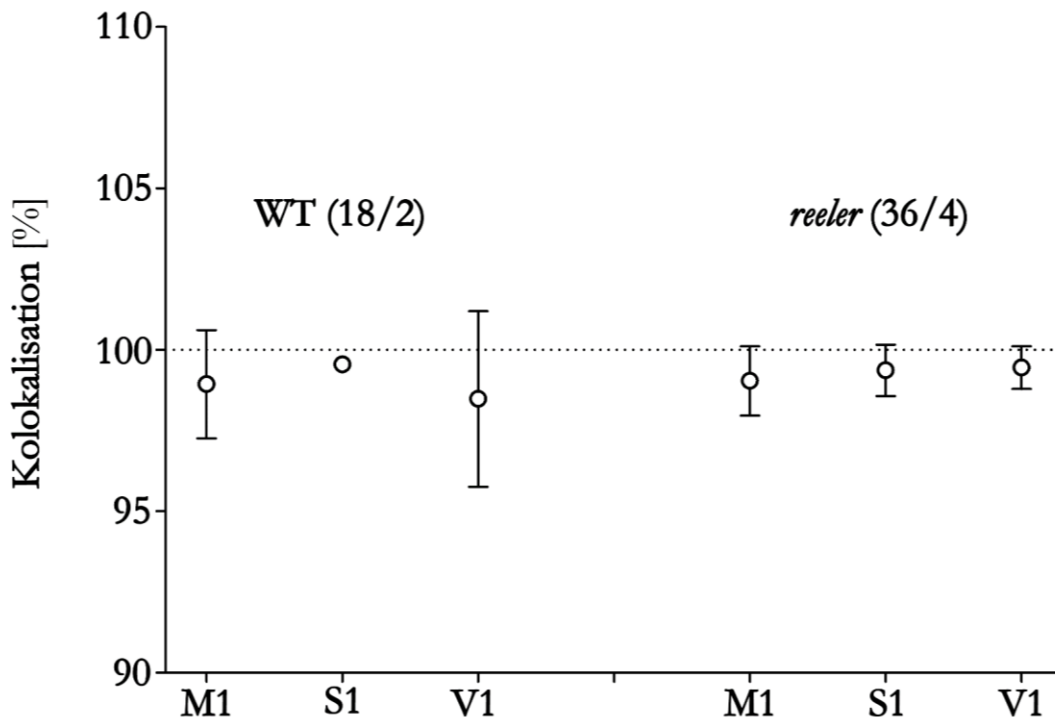
Analoge Versuche wurden ebenfalls an vier *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäusen durchgeführt. Insgesamt wurden 36 Schnitte in den Kortexregionen M1, S1 und V1 gefärbt und ausgewertet. In der zehnfach vergrößerten Übersichtsaufnahme eines frontalen Hirnschnittes im Bereich von S1 können sowohl im Neokortex als auch im Hippocampus (HC) größtenteils grün markierte Zellen nachgewiesen werden, die somit positiv für die *Vip*-Sonde sind (Abbildung 3.2 A). In der 25-fachen Vergrößerung der exemplarisch ausgewählten S1-Region einer *Reeler*-Maus lassen sich überwiegend gelb erscheinende Somata erkennen, was analog zum Wildtyp für eine klare Überlagerung des nativen tdTomato-Signals mit dem grünen Signal der *Vip*-Sonde spricht (Abbildung 3.2 B). Die eindeutige Kolokalisation (Abbildung 3.2 C) des nativen tdTomato-Signals (Abbildung 3.2 C') mit dem grünen *Vip*-Sondensignal (Abbildung 3.2 C') kann in den jeweils vergrößerten Ausschnitten eindeutig nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.2: FISH zur Markierung der VIP-positiven-Zellen im Bereich des primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1) der *Reeler*-Maus**

Die FISH der *Vip*-Sonde an einem 40 µm dicken frontalen Hirnschnitt einer *VIPcre/tdTomato-Reeler*-Maus zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal, in Grün das *Vip*-Sondensignal und in Gelb die kolokalisierten VIP-positiven Zellen. **A** zeigt eine Übersichtsaufnahme in zehnfacher Vergrößerung, die mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops aufgenommen wurde. Zu sehen ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären somatosensorischen Kortex (Rechteck; S1BF). Als weitere anatomische Strukturen, sind der Hippocampus (HC), der laterale Ventrikel (LV) und der *Nucleus ventralis posteromedialis* (VPM) markiert; Maßstab: 1000 µm. **B** zeigt eine *maximum intensity projection* des primären somatosensorischen Kortex. Auf der linken Seite sind in Blau die Zellkerne (DAPI) dargestellt. Die rechte Seite zeigt jene mit der *Vip*-Sonde kolokalisierten tdTomato-Zellen; Maßstab: 250 µm. **C-C''** stellen die Vergrößerung des umrahmten Bereichs aus B dar. Dabei sind in diesem Ausschnitt durchgängig Kolokalisationen (C) des nativen tdTomato-Signals (C') mit den VIP-positiven Zellen (C'') zu erkennen; Maßstab: 20 µm

Die quantitative Analyse von 12 Schnitten in der S1-Region bestätigte den visuellen Befund mit einer Kolokalisation von  $99,4 \pm 0,8 \%$  zwischen den nativen tdTomato-Zellen und der *Vip*-Sonde (Abbildung 3.3). Für M1 und V1 beträgt die Kolokalisationsrate  $99,0 \pm 1,1 \%$  bzw.  $99,4 \pm 0,7 \%$  in jeweils 12 Schnitten (Abbildung 3.3). Insgesamt weisen  $99,3 \pm 0,9 \%$  der tdTomato-Zellen in den 36 ausgewerteten Schnitten der Regionen M1, S1 und V1 von vier *Reeler*-Mäusen eine Kolokalisation mit der *Vip*-Sonde auf. In der Gegenprobe tragen  $99,3 \pm 1,3 \%$  der mit der *Vip*-Sonde markierten Zellen das native tdTomato-Signal. Für die *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus konnte demzufolge eine entsprechend hohe Spezifität und Sensitivität der tdTomato-Zellen für VIP-Interneurone nachgewiesen werden, wie für den Wildtyp. Die hohen Kolokalisationsraten in allen drei kortikalen Arealen (M1, S1, V1) für WT- und *Reeler*-Mäuse ließen nun den Schritt zu, die Verteilung der VIP-Interneurone im Kortex ausschließlich über die Verteilung der tdTomato-Zellen zu bestimmen (Abschnitt 3.2).



**Abbildung 3.3: Kokalisation der tdTomato-positiven Zellen mit der *Vip*-Sonde in M1, S1 und V1 für die WT- sowie die *Reeler*-Maus**

Darstellung der Kokalisation der nativen tdTomato-Zellen und der *Vip*-Sonde in den kortikalen Regionen M1, S1 und V1 für WT- und *Reeler*-Mäuse. Die *Vip*-Sonde zeigt eine nahezu vollständige Kokalisation mit dem tdTomato-Signal für jedes Kortexareal und unabhängig vom Maustyp. Insgesamt wurden 18 Schnitte von zwei Wildtyp-Mäusen (drei je Region und Maus), sowie 36 Schnitte von vier *Reeler*-Mäusen (drei je Region und Maus) ausgewertet.

### 3.1.1 Inhibitorische und exzitatorische Aktivität der VIP-positiven Zellen

In weiteren Experimenten wurden die Eigenschaft der tdTomato-Zellen inhibitorische oder exzitatorische Neurone zu sein, mit Hilfe der *Gad1*- und *Vglut1*-Sonde qualitativ untersucht. Durch das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) wird aus dem exzitatorischen Transmitter Glutamat der inhibitorische Transmitter GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) synthetisiert. Daher wurde die *Gad1*-Sonde als Marker für den Nachweis inhibitorischer (GABAerger) Neurone herangezogen. Der exzitatorische Transmitter Glutamat wird durch den vesikulären Glutamattransporter VGLUT1 in Vesikel verpackt. Daher konnte die *Vglut1*-Sonde zum Nachweis der exzitatorischen Identität von Neuronen verwendet werden. Die *Gad1*- und die *Vglut1*-Sonden wurden jeweils an sechs Schnitten von zwei WT- sowie an 12 Schnitten von vier *Reeler*-Mäusen untersucht. In der zehnfachen Vergrößerung können im Neokortex der frontalen Hirnschnitte sowohl in M1, S1 und V1 im WT sowie in *Reeler* *Gad1*-positive Zellen visuell nachgewiesen werden. Als Darstellung wurde hier exemplarisch die M1-Region einer *Reeler*-Maus verwendet (Anhang; Abbildung 7.1 A) In der 25-fachen Vergrößerung stellt sich eine

gleichmäßige Verteilung der *Gad1*-positiven Zellen über den gesamten Neokortex dar. Man kann gelbe Zellkörper, die für eine Überlagerung des nativen tdTomato-Signals mit dem grünen Signal der *Gad1*-Sonde sprechen, deutlich erkennen (Anhang; Abbildung 7.1 B). Die Herausvergrößerungen beweisen die Kolo-kalisation (Anhang; Abbildung 7.1 C) zwischen den nativen VIP/tdTomato-Zellen (Anhang; Abbildung 7.1 C') und den grünen *Gad1*-Sonde tragenden Zellen (Anhang; Abbildung 7.1 C). Somit ließ sich schlussfolgern, dass es sich bei den mit dem tdTomato-Signal markierten Zellen ausschließlich um inhibitorische Zellen handelt. Die *Vglut1*-Sonde zeigt in allen analysierten Schnitten, sowohl in der Wildtyp- als auch der *Reeler*-Maus, eine durchgehend gute Markierung. Die exzitatorischen Zellen zeigen eine breite gleichmäßige Verteilung über den Neokortex der Wildtyp- sowie der *Reeler*-Maus hinweg. Bereits in der zehnfachen wie auch der 25-fachen Vergrößerung wird deutlich, dass augenscheinlich keine Kolo-kalisation zwischen VIP/tdTomato-Zellen und *Vglut1*-Sonde tragenden Zellen besteht. Als exemplarisches Beispiel wurde hier der primäre visuelle Kortex einer *Reeler*-Maus als mikroskopische Darstellung herangezogen (Anhang; Abbildung 7.2 A, B). Auch in der Herausvergrößerung kann augenscheinlich keine Kolo-kalisation (Anhang; Abbildung 7.2 C) zwischen den nativen tdTomato-Zellen (Anhang; Abbildung 7.2 C') und der *Vglut1*-Sonde (Anhang; Abbildung 7.2 C) nachgewiesen werden. Somit konnte eine exzitatorische Aktivität der tdTomato-positiven Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden.

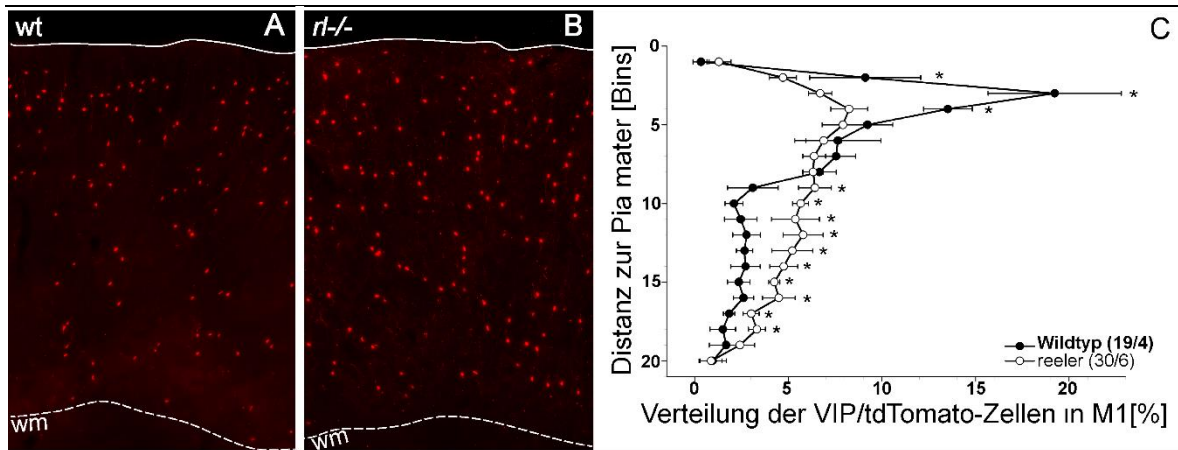
### **3.2 Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus**

Der Neokortex von Wildtyp-Mäusen lässt sich in sechs Schichten unterteilen, in dem jede Schicht andere Größenverhältnisse und auch andere Zellverteilungsmuster zeigt. In der *Reeler*-Maus ist jedoch keine klare Abgrenzung des Kortex in Schichten zu sehen (Mingo-Moreno 2018). Um die Zellverteilung beider Genotypen miteinander vergleichen zu können, erfolgte die Analyse der prozentualen Zellverteilung schichtenunabhängig mit Hilfe der Bin-Size-Analyse. Die Breite des Kortexareals, in dem die Zählung der VIP/tdTomato-Zellen erfolgte, wurde auf ca. 1000  $\mu\text{m}$  festgelegt. Die obere und untere Begrenzung bilden die *Pia mater* und die weiße Substanz (wm). Die Zellverteilung der VIP/tdTomato-Zellen wurde sowohl in der Wildtyp- als auch der *Reeler*-Maus untersucht. Für die Analyse wurden der primäre motorische Kortex (M1), der primäre somatosensorische (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF) und der primäre visuelle Kortex (V1) herangezogen. Insgesamt wurden 63 Schnitte von fünf verschiedenen Wildtyp-Mäusen und 89 Schnitte von sechs verschiedenen *Reeler*-Mäusen untersucht. Die erhobenen Zellzahlen wurden auf die Dimensionen des jeweiligen Schnitts normiert und pro Tier und Genotyp gemittelt (siehe Material und Methoden).

### 3.2.1 Primärer motorischer Kortex (M1)

Um Aussagen über die Verteilung der VIP-exprimierenden Interneurone im primären motorischen Kortex (M1) treffen zu können, wurden in 19 Schnitten von vier Wildtyp-Tieren und in 30 Schnitten von sechs *Reeler*-Tieren die tdTomato-positiven Zellen gezählt. Die VIP/tdTomato-Zellen der Wildtyp-Maus zeigen eine eindeutige Präferenz zu den supragranulären Schichten, wobei sie in deutlich geringerer Zahl auch in tieferen Regionen von M1 vorkommen (Abbildung 3.4 A). Im Gegensatz dazu scheinen die tdTomato-positiven Zellen in der *Reeler*-Maus über den gesamten Neokortex von M1 nahezu gleichmäßig verteilt zu sein (Abbildung 3.4 B). Mit Hilfe der Normierung eines jeden ausgewerteten Schnittes lässt sich eine prozentuale Verteilung in Abhängigkeit des Abstands von der *Pia mater* berechnen. In M1 von Wildtyp-Mäusen sind die meisten VIP/tdTomato-Zellen in Bin 3 ( $19,2 \pm 3,6\%$ ) lokalisiert, gefolgt von denen in Bin 4 ( $13,5 \pm 1,3\%$ ), Bin 5 ( $9,2 \pm 1,3\%$ ) und Bin 2 ( $9,1 \pm 3,0\%$ ). Damit sind mehr als 50 % der tdTomato-Zellen im oberen Viertel von M1 lokalisiert (Abbildung 3.4 C). Die restlichen 50 % verteilen sich von Bin 6 bis Bin 20, wobei die Anzahl der Zellen dabei stetig in Richtung der weißen Substanz (wm) abnimmt (Bin 6 mit  $7,7 \pm 2,3\%$  und Bin 20 mit  $1,0 \pm 0,7\%$ ). Alle prozentualen Angaben sind in Tabelle 7.1 (Anhang) aufgeführt.

In den *Reeler*-Mäusen lässt sich dagegen eine vermehrte Gleichverteilung der VIP/tdTomato-Zellen in M1 über die kortikale Fläche beobachten. Zwar lassen sich in Bin 4, mit  $8,2 \pm 1,0\%$  aller VIP/tdTomato-Zellen, die meisten Zellen auffinden, jedoch ist dieser Maximalwert nicht so prominent im Vergleich zum Wildtyp-Kortex (Abbildung 3.4 C). Die Verteilung steigt von Bin 1 ( $1,3 \pm 0,6\%$ ) über Bin 3 ( $6,7 \pm 0,6\%$ ) bis Bin 4 stetig an, um anschließend weitaus geringer von Bin 5 mit  $7,9 \pm 1,1\%$  über Bin 10 mit  $5,7 \pm 0,4\%$  bis Bin 20 mit  $0,9 \pm 0,6\%$  abzufallen. Die ausgeprägte Gleichverteilung der VIP/tdTomato-Zellen in *Reeler* ist besonders daran zu erkennen, dass im Wildtyp lediglich 7 Bins mehr als 4 % der tdTomato-Zellen aufweisen, wohingegen es in *Reeler* 15 Bins sind (Anhang; Tabelle 7.1). Der Vergleich der Zellverteilung der Genotypen untereinander zeigt, dass der *Reeler*-Kortex in M1 in den Bins 2 bis 4 eine signifikant geringere und in den Bins 9 bis 18 eine signifikant höhere prozentuale Zellverteilung aufweist als der Kortex der WT-Maus in M1 (Anhang; Tabelle 7.1).



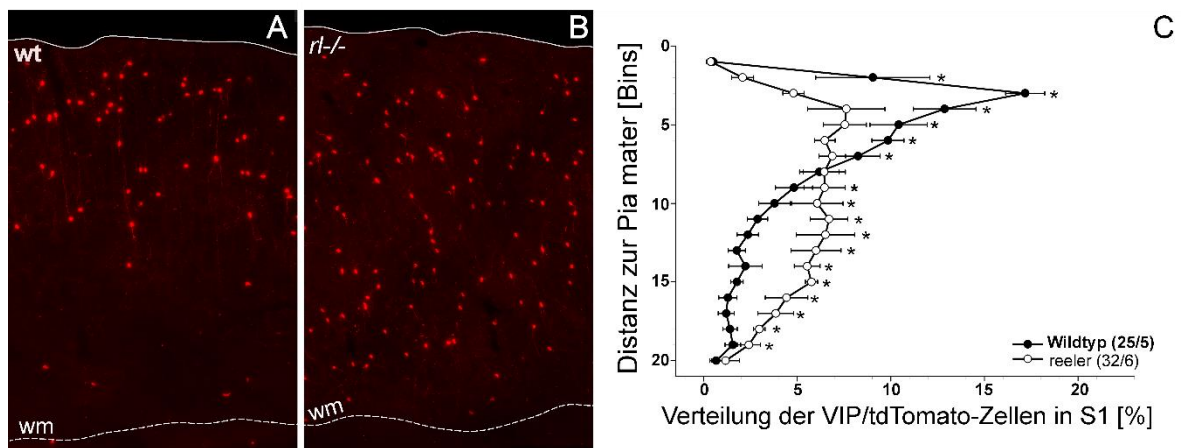
**Abbildung 3.4: Verteilung der nativen VIP/tdTomato-Zellen im primären motorischen Kortex (M1) der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus**

**A/B** zeigen frontale Epifluoreszenzaufnahmen im Bereich des primären motorischen Kortex (M1) in einer 25-fachen Vergrößerung. Durch das native tdTomato-Signal, sind die VIP-exprimierenden Interneurone in Rot in der *maximum intensity projection* gut sichtbar. **A** zeigt einen Ausschnitt des primären motorischen Kortex einer *VIPcre/RosaTomato/WT*-Maus. Dort sind die meisten Zellen in den oberflächlichen Regionen lokalisiert. In **B** ist ein Ausschnitt einer *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus dargestellt, in dem die tdTomato-positiven Zellen mehr oder weniger über die gesamte Fläche des Neokortex gleichverteilt vorliegen; Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . **C** zeigt die prozentuale Verteilung der VIP-exprimierenden Neurone in M1. Hier lässt sich die klare Präferenz der tdTomato-Zellen der Wildtyp-Maus nahe der *Pia mater* (Bin 3) erkennen. Wohingegen in der *Reeler*-Maus keine so prominente Lage zu sehen ist, da in den Bins 2 bis 16 jeweils 4–7 % der Zellen vorkommen.

### 3.2.2 Primärer somatosensorischer (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF)

Die Verteilung der VIP-exprimierenden Neurone im primären somatosensorischen Kortex (S1) wurde durch die Zählung der tdTomato-positiven Zellen in 25 Schnitten von fünf Wildtyp-Mäusen sowie 32 Schnitten von sechs *Reeler*-Mäusen analysiert. Ähnlich wie in M1 zeigen die VIP/tdTomato-Zellen der Wildtyp-Maus eine Tendenz zur Anordnung in den supragranulären Schichten. Lediglich in geringerer Anzahl sind diese Zellen auch in tieferen Bereichen von S1, nahe der weißen Substanz (wm), zu finden (Abbildung 3.5 A). Die VIP/tdTomato-Zellen in der *Reeler*-Maus zeigen dagegen eine scheinbar gleichmäßige Verteilung über die gesamte Dicke des Neokortex im Bereich von S1 (Abbildung 3.5 B). Für die prozentuale Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in Abhängigkeit des Abstands zur *Pia mater* können folgende Aussagen getroffen werden: Im primären somatosensorischen Kortex (S1) der Wildtyp-Maus sind die meisten VIP/tdTomato-Zellen mit  $17,2 \pm 1,0$  % in Bin 3 lokalisiert. Daran schließt sich Bin 4 ( $12,9 \pm 1,7$  %) direkt an, gefolgt von Bin 5 ( $10,4 \pm 1,5$  %) und Bin 6 ( $9,8 \pm 0,9$  %). Insgesamt sind knapp 60 % der VIP-Zellen in S1 im ersten Drittel des Kortexes (Bin 1–6) lokalisiert (Abbildung 3.5 C). Die restlichen 40 % der Zellen verteilen sich zwischen Bin 7 und Bin 20, wobei ihre Anzahl von Bin 7 mit  $8,2 \pm 1,2$  % bis Bin 20 ( $0,7 \pm 0,3$  %) stetig abnimmt (Abbildung 3.5 C). Alle prozentualen Werte sind in Tabelle 7.1 (Anhang) zu finden. In der *Reeler*-Mutante konnte in S1 eine weitestgehende Gleichverteilung der VIP/tdTomato-Zellen über die

20 Bins hinweg nachgewiesen werden. Die höchste Zellanzahl findet sich mit  $7,6 \pm 2,1 \%$  in Bin 4 (wie in M1) (Abbildung 3.5 C). Die Zellverteilung steigt über Bin 2 ( $2,1 \pm 0,6 \%$ ) und Bin 3 ( $4,8 \pm 0,6 \%$ ) bis Bin 4 kontinuierlich an. Anschließend fallen die prozentualen Werte von Bin 5 mit  $7,5 \pm 1,2 \%$  bis Bin 15 ( $5,8 \pm 0,3 \%$ ) lediglich geringfügig ab. Erst ab Bin 16 ( $4,8 \pm 1,1 \%$ ) kommt es zu einer klaren Reduktion der Zellanzahl bis hin zu Bin 20 ( $1,2 \pm 0,7 \%$ ). Im Wildtyp von S1 weisen nur 8 Bins mehr als 4 % der VIP-Zellen auf, wohingegen dies in *Reeler* in 14 Bins der Fall ist. Daran wird die vorherrschende Gleichverteilung der VIP/tdTomato-Zellen in der *Reeler*-Maus besonders deutlich. Der statistische Vergleich beider Genotypen zeigt gewisse Analogien zur prozentualen Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in M1. Im S1-Kortex der *Reeler*-Maus lassen sich in den Bins 2 bis 7 signifikant geringere und in den Bins 9 bis 19 signifikant höhere prozentuale Werte als in der WT-Maus nachweisen (Anhang; Tabelle 7.1).



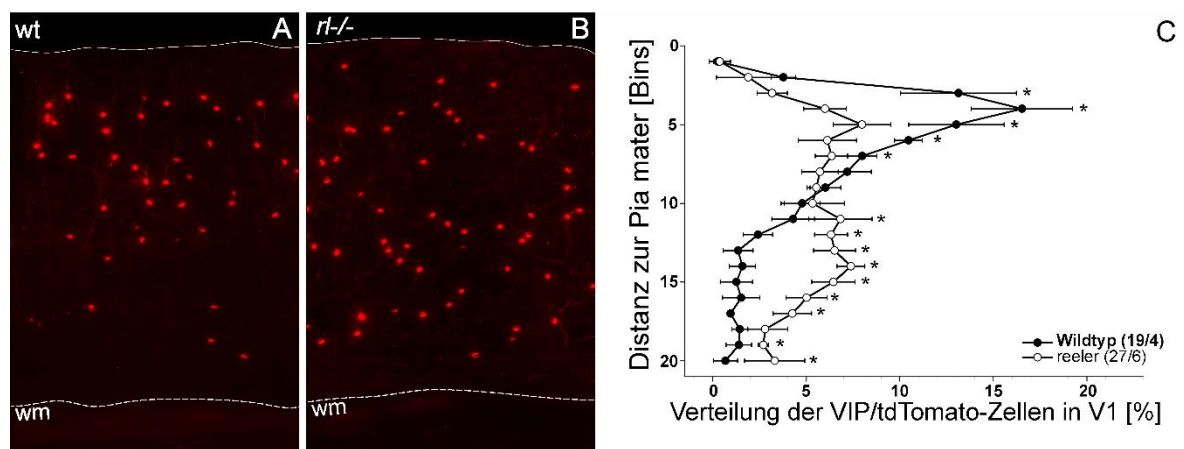
**Abbildung 3.5: Verteilung der nativen VIP/tdTomato-Zellen im primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF) der Wildtyp- (A) und der *Reeler*-Maus (B)**

A/B zeigen frontale Epifluoreszenzaufnahmen in einer 25-fachen Vergrößerung im Bereich des primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF) der Wildtyp- sowie der *Reeler*-Maus. Die VIP-exprimierenden Interneurone sind durch das native tdTomato-Signal in einer *maximum intensity projection* zu erkennen. A zeigt einen Ausschnitt der S1-Region einer *VIPcre/RosaTomato/WT*-Maus. Dort sind die meisten Zellen in den supragranulären Regionen lokalisiert. In B sieht man den primären somatosensorischen Kortex einer *VIPcre/tdTomato/Reeler*-Maus. Die tdTomato-Zellen sind hier über die gesamte Kortexfläche verteilt angeordnet; Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . C stellt die prozentualen Verteilungen der VIP-exprimierenden Neurone in S1 dar. Im WT lässt sich eine klare Tendenz der tdTomato-Zellen nahe der *Pia mater* (Bin 3) erkennen. Dagegen sind in der *Reeler*-Maus mehr als 4 % der Zellen in den Bins 3 bis 16 lokalisiert und zeigen keine eindeutige Präferenz.

### 3.2.3 Primärer visueller Kortex (V1)

Zur Untersuchung der Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen im primären visuellen Kortex (V1) wurden insgesamt 19 Schnitte von vier Wildtyp-Mäusen sowie 27 Schnitte von sechs *Reeler*-Mäusen ausgezählt. Die VIP/tdTomato-Zellen in der Wildtyp-Maus kommen analog zu M1 und S1 vermehrt in den supragranulären Schichten nahe der *Pia mater* vor und sind auch in geringerem Maße in den unteren Schichten von V1 zu finden (Abbildung 3.6 A). Die VIP/tdTomato-Zellen in der *Reeler*-Maus sind dagegen, wie bereits für M1 und S1 beschrieben,

über nahezu die gesamte Kortexdicke von V1 gleichverteilt (Abbildung 3.6 B). Diese Beobachtung lässt sich anhand der prozentualen Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen belegen (Abbildung 3.6 C). In V1 der WT-Maus findet sich der größte Prozentsatz an VIP/tdTomato Zellen mit  $16,5 \pm 2,7 \%$  in Bin 4, gefolgt von denen in Bin 3 ( $13,1 \pm 3,1 \%$ ), Bin 5 ( $13,0 \pm 2,5 \%$ ) und Bin 6 ( $10,5 \pm 0,7 \%$ ). Daher ist es keine Überraschung, dass ebenfalls in V1 über 57 % aller VIP-Zellen im ersten Drittel des Kortexes lokalisiert sind (Abbildung 3.6 C). Von Bin 7 mit  $8,0 \pm 0,8 \%$  nimmt die Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen kontinuierlich bis hin zu Bin 20 ( $0,7 \pm 0,6 \%$ ) ab. Im visuellen Kortex der *Reeler*-Maus zeigt sich eine leicht andere Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen als in M1 und S1. Generell gesehen, sind die VIP/tdTomato-Zellen von Bin 4 ( $6,0 \pm 1,1 \%$ ) bis Bin 15 ( $6,4 \pm 1,2 \%$ ) annähernd gleich verteilt, mit jeweils über 5 % in den einzelnen Bins. Allerdings lassen sich zwei Maximalpunkte in Bin 5 und Bin 14 (mit jeweils  $8,0 \pm 1,5 \%$ ) beobachten, wobei sie sich statistisch nicht von jenen in den Bins 2 bis 15 unterscheiden (Abbildung 3.6 C; Anhang, Tabelle 7.1). Sämtliche prozentuale Angaben sind in Tabelle 7.1 (Anhang) aufgeführt. Im statistischen Vergleich der Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in der Wildtyp- und *Reeler*-Maus weisen Bin 3 bis Bin 7 signifikant niedrigere und Bin 11 bis Bin 17 sowie Bin 19 und 20 signifikant höhere Prozentwerte in der *Reeler*-Maus gegenüber der WT-Maus auf (Anhang, Tabelle 7.1).



**Abbildung 3.6: Verteilung der nativen VIP/tdTomato-Zellen im primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp- (A) und der *Reeler*-Maus (B)**

**A/B** zeigen frontale Epifluoreszenzaufnahmen in einer 25-fachen Vergrößerung im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp- und *Reeler*-Maus. Die VIP-exprimierenden Interneurone sind durch das native tdTomato-Signal in der *maximum intensity projection* klar zu erkennen. **A** zeigt einen Bereich der V1-Region einer *VIPcre/RosaTomato/WT*-Maus. Hier sind die meisten Zellen in den oberen Regionen lokalisiert. In **B** sieht man einen Ausschnitt der V1-Region einer *VIPcre/tdTomato/Reeler*-Maus. Im Gegensatz zum WT (**A**) sind hier die tdTomato-Zellen zum Großteil über das gesamte Kortexareal verteilt; Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . **C** zeigt die prozentualen Verteilungen der VIP-exprimierenden Neurone in V1. Dort lässt sich eine klare Präferenz der tdTomato-Zellen nahe der *Pia mater* (Bin 4) in der Wildtyp-Maus erkennen. Gegensätzlich dazu sind in der *Reeler*-Maus mehr als 4 % der Zellen in den Bins 4 bis 17 verteilt, was auf keine klare Präferenz in der Zelllokalisierung der VIP-Zellen hindeutet.



### 3.2.4 Vergleich der Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen zwischen M1, S1 und V1

In den bisherigen Analysen wurde lediglich die prozentuale Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in den kortikalen Arealen M1, S1 und V1 zwischen der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus betrachtet. In diesem Abschnitt sollen nun die absolut vorkommenden und ausgezählten VIP/tdTomato-Zellen betrachtet und zwischen den Kortexregionen verglichen werden. Das ausgezählte Gebiet umfasste: in der medio-laterale Breite 1000  $\mu\text{m}$  (auf Höhe von Schicht 4), in der Höhe den Abstand der *Pia mater* bis zur weißen Substanz und eine Schnittdicke von 40  $\mu\text{m}$ . Es wurden die Zellzahlen von 19 Schnitten aus M1 (4 Tiere), 25 Schnitten aus S1 (5 Tiere) und 19 Schnitten aus V1 (4 Tiere) von Wildtyp-Mäusen sowie von 30 Schnitten aus M1, 32 Schnitten aus S1 und 27 Schnitten aus V1 von jeweils sechs *Reeler*-Mäusen analysiert. Im primären motorischen Kortex (M1) der Wildtyp-Maus kommen im Mittel  $113,5 \pm 6,7$  VIP/tdTomato-Zellen in den ausgezählten Schnitten vor. Im primären somatosensorischen Kortex (S1) sind es im WT im Durchschnitt  $106,1 \pm 8,7$  und im primären visuellen Kortex (V1)  $103,9 \pm 6,5$  VIP/tdTomato-Zellen (Abbildung 3.7). Zwischen M1, S1 und V1 konnte im Wildtyp kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der absoluten Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen festgestellt werden (Anhang, Tabelle 7.3). In der *Reeler*-Maus wurden im Mittel  $147,0 \pm 11,0$  VIP/tdTomato-Zellen in M1,  $109,3 \pm 11,9$  VIP-Zellen in S1 und  $107,9 \pm 13,9$  Zellen in V1 gezählt (Abbildung 3.7). Zwischen dem primären somatosensorischen und dem primären visuellen Kortex der *Reeler*-Maus konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen nachgewiesen werden (Anhang, Tabelle 7.3). Der primäre motorische Kortex der *Reeler*-Maus weist dagegen signifikant mehr VIP/tdTomato-Zellen auf als der primäre somatosensorische und der primäre visuelle Kortex der *Reeler*-Mutante (Anhang, Tabelle 7.3). Der Vergleich der Zellzahlen zwischen WT- und *Reeler*-Mäusen in den gleichen kortikalen Regionen zeigt in S1 und V1 keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an VIP-Zellen. Das bedeutet in S1 bzw. V1 der WT-Maus kommen durchschnittlich genauso viele VIP-Zellen vor wie in S1 bzw. V1 der *Reeler*-Maus. Im primären motorischen Kortex der *Reeler*-Maus kommen dagegen signifikant mehr VIP/tdTomato-Zellen vor als im primären motorischen Kortex der Wildtyp-Maus (Abbildung 3.7; Anhang, Tabelle 7.3).

Neben den hier angegebenen gezählten Zellzahlen wurde zusätzlich eine normierte Zellzählung pro  $1\text{mm}^3$  Kortex analog zu Prönneke et al. 2015 durchgeführt (Anhang, Abbildung 7.3). Dafür wurden die tatsächlich vorkommenden VIP-Zellen in dem ausgezählten Gebiet (1000  $\mu\text{m}$  Breite, von *Pia mater* zur weißen Substanz und 40  $\mu\text{m}$  Dicke) auf  $1\text{mm}^3$  Kortex extrapoliert. Aufgrund der kortikalen Krümmung, sowie einer unterschiedlichen kortikalen Dicke zwischen den drei Regionen (Abbildung 3.8) wurde die tatsächliche Anzahl an VIP-Zellen von rostral nach kaudal unterschiedlich stark hochgerechnet und führte zu komplett anderen Ergebnissen.

In Anbetracht des Vergleiches unterschiedlicher kortikaler Regionen, sowie das die tatsächlichen Zellzahlen eher den Anteil der VIP-Zellen in der Funktionseinheit des Kortex, der kortikalen Kolumne, entsprachen, wurden die extrapolierten Zellzahlen auf ein Kortextvolumen nicht in der Auswertung berücksichtigt.

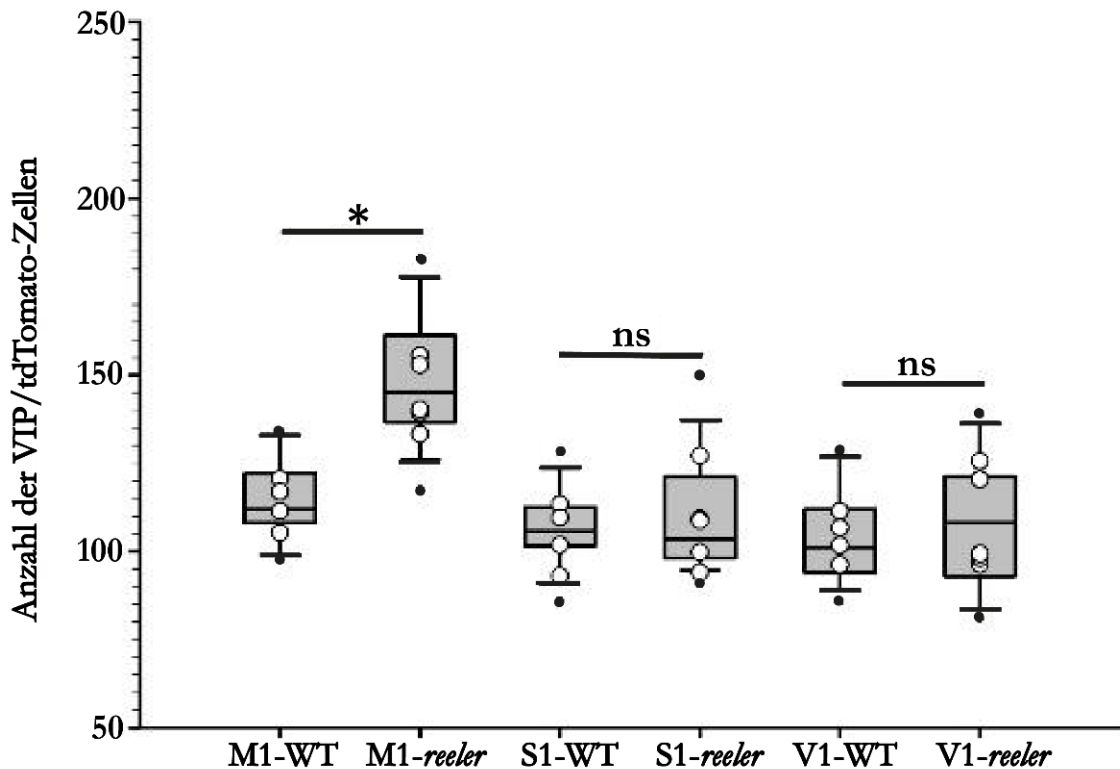


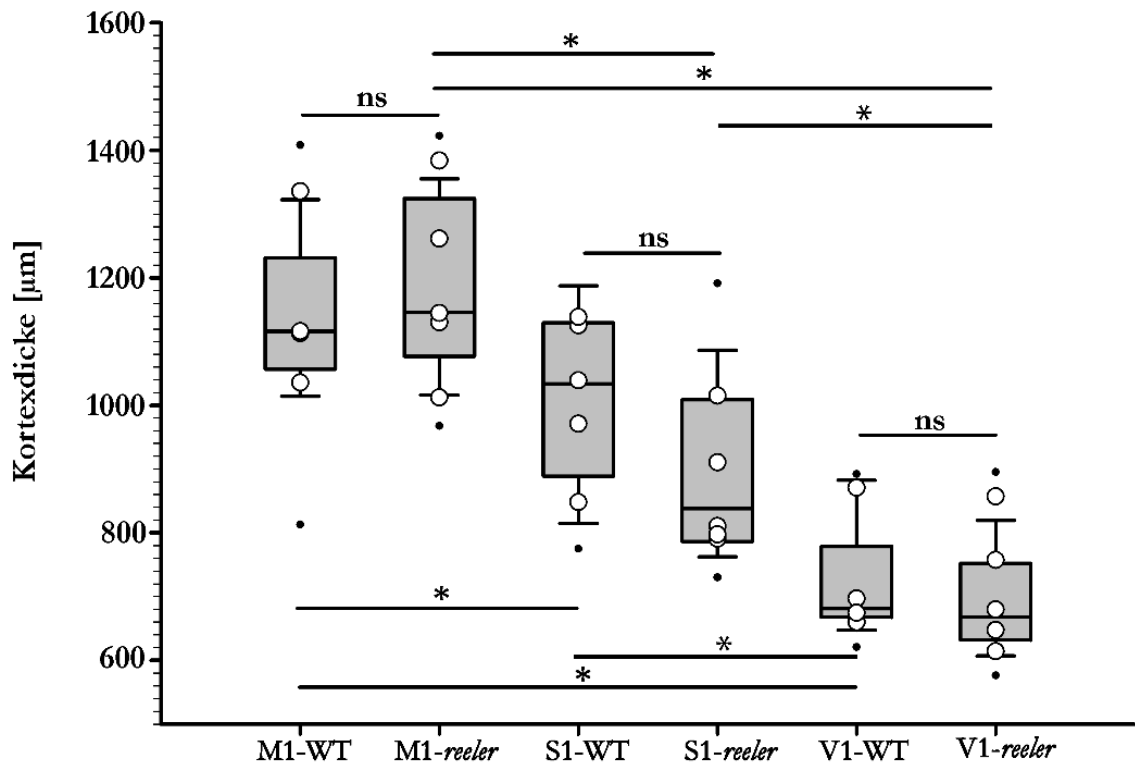
Abbildung 3.7: Anzahl der nativen ausgezählten VIP/tdTomato-Zellen pro Hirnschnitt in M1, S1 und V1 in der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus

Das Boxplot-Diagramm in Kombination mit einem Punktdiagramm stellt die Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen in den drei verschiedenen Kortextarealen (M1, S1, V1) von der *Pia mater* bis zur weißen Substanz innerhalb einer Breite von 1000  $\mu\text{m}$  (Höhe Schicht IV) und einer Schnittdicke von 40  $\mu\text{m}$  dar. Die Ergebnisse pro Schnitt wurden zum einen pro Tier und pro Region gemittelt (weiße Kreise). Zum anderen wurden die Schnitte individuell pro Region und Genotyp betrachtet und als Boxplots mit Median, 25–75 % Quartile, 95 % Perceptile und Ausreißer dargestellt. Im Mittel kommen ca. 100 bis 120 tdTomato-Zellen in den Arealen M1, S1 und V1 im WT sowie in S1 und V1 von *Reeler* vor. Hier zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zellzahl. In der M1-Region von *Reeler* finden sich signifikant mehr VIP/tdTomato-Zellen als in den anderen Kortextarealen sowohl vom WT als auch von *Reeler* mit  $147,0 \pm 11,0$  VIP/tdTomato-Zellen im Durchschnitt. Signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

### 3.2.5 Vergleich der Kortextdicke von M1, S1 und V1

Wie bereits bei der Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen (3.2.4) angedeutet, kann eine unterschiedliche Kortextdicke einen erheblichen Einfluss auf die Zellzahlen besitzen. Daher wurden parallel zu den VIP/tdTomato-Zellen auch die Kortextdicken des primären motorischen (M1), des primären somatosensorischen (S1) und des primären visuellen (V1) Kortext in der Wildtyp-Maus und der *Reeler*-Maus bestimmt sowie miteinander verglichen. Dazu wurden die Dicken von 19 Schnitten aus M1 (4 Tiere), 25 Schnitten aus S1 (5 Tiere) und 19 Schnitten aus

V1 (4 Tiere) von Wildtyp-Mäusen, sowie von 30 Schnitten aus M1, 32 Schnitten aus S1 und 27 Schnitten aus V1 von jeweils sechs *Reeler*-Mäusen ausgemessen und analysiert. Der primäre motorische Kortex (M1) der Wildtyp-Maus weist im Mittel eine Dicke von  $1136,4 \pm 135,0 \mu\text{m}$  auf, der primäre somatosensorische Kortex (S1) von  $1037,4 \pm 206,8 \mu\text{m}$  und der primäre visuelle Kortex (V1) von  $720,4 \pm 85,8 \mu\text{m}$  (Abbildung 3.8, Anhang, Tabelle 7.2). Dabei konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Dicke der drei kortikalen Bereiche M1, S1 und V1 in der Wildtyp-Maus festgestellt werden. Der primäre motorische Kortex (M1) der WT-Maus ist signifikant dicker als der primäre somatosensorische (S1) sowie der primäre visuelle (V1) Kortex. Außerdem ist auch S1 signifikant dicker als V1 (Abbildung 3.8; Anhang, Tabelle 7.4). Der Kortex der *Reeler*-Maus weist in der Region M1 eine Dicke von  $1181,4 \pm 137,5 \mu\text{m}$ , in S1  $888,9 \pm 134,4 \mu\text{m}$  und in V1 von  $694,8 \pm 84,5 \mu\text{m}$  auf (Abbildung 3.8; Anhang, Tabelle 7.2). Ebenfalls in der *Reeler*-Maus ist der primäre motorische Kortex (M1) signifikant dicker als der primäre somatosensorische Kortex (S1) sowie der primäre visuelle Kortex (V1), ebenso ist S1 signifikant dicker als V1 (Anhang, Tabelle 7.4). Der Vergleich der Kortexdicken zwischen der WT- und *Reeler*-Maus in den gleichen kortikalen Regionen zeigte keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich der Dicke (Anhang, Tabelle 7.4).



**Abbildung 3.8:** Vergleich der Kortexdicke ( $\mu\text{m}$ ) von M1, S1 und V1 zwischen der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus

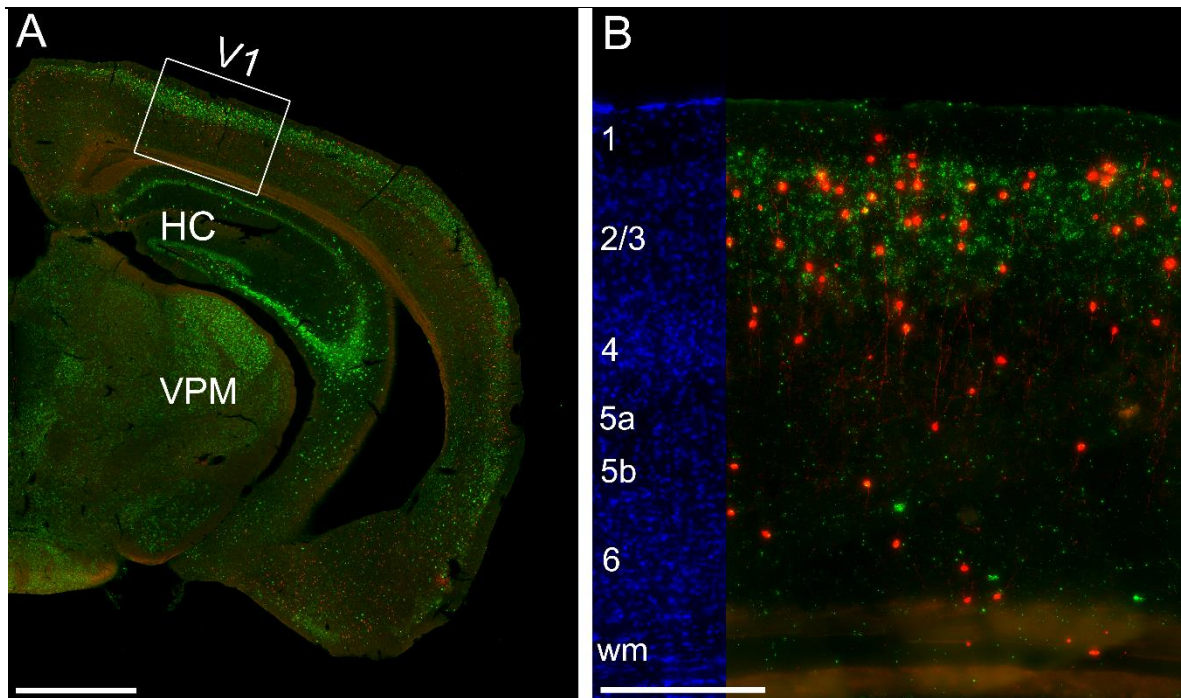
Das Boxplot-Diagramm in Kombination mit einem Punktdiagramm stellt die Dicke der drei verschiedenen Kortexareale (M1, S1, V1) von der *Pia mater* bis zur weißen Substanz mit einer Schnittdicke von  $40\ \mu\text{m}$  dar. Zum einen wurden die Ergebnisse pro Schnitt je Tier und je Region gemittelt (weiße Kreise). Zum anderen wurden die Schnitte individuell pro Region und Genotyp betrachtet und als Boxplots mit Median, 25–75 % Quartile, 95 % Perzentile sowie Ausreißer dargestellt. Der primäre motorische Kortex (M1) der Wildtyp- bzw. *Reeler*-Maus weist im Mittel eine Dicke von  $1136,4 \pm 135,0\ \mu\text{m}$  bzw.  $1181,4 \pm 137,5\ \mu\text{m}$  auf. Damit ist er signifikant dicker als der primäre somatosensorische Kortex mit  $1037,4 \pm 206,8\ \mu\text{m}$  bzw.  $888,9 \pm 134,4\ \mu\text{m}$  und der primäre visuelle Kortex mit  $720,4 \pm 85,8\ \mu\text{m}$  bzw.  $694,8 \pm 84,5\ \mu\text{m}$ . Signifikante Unterschiede (mit \* gekennzeichnet,  $P < 0,05$ ) zwischen WT- und *Reeler*-Maus in derselben kortikalen Region treten nicht auf.

### 3.3 Folgen die VIP/tdTomato-Zellen dem Verteilungsmuster der exzitatorischen RGS8-Zellen?

Um zu untersuchen, inwiefern zunächst tangential wandernde inhibitorische VIP-Zellen dem Profil der radial aufsteigenden exzitatorischen Zellen in ihrer Entwicklung folgen (um dann lokale kortikale synaptische Schaltkreise aufzubauen), wurden insgesamt 27 Schnitte von drei *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen und 36 Schnitte von vier *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäusen analysiert. Es wurden der primäre motorische Kortex (M1), der primäre somatosensorische (*Barrel*-)Kortex (S1, S1BF) sowie der primäre visuelle Kortex (V1) getrennt voneinander betrachtet. Da der Großteil der VIP-Neurone in Schicht 2/3 des Neokortex von WT-Mäusen

vorkommt (Prönneke et al. 2015), wurde die räumliche Beziehung zwischen exzitatorischen Zellen, die für die Schicht 2/3 determiniert sind, und den VIP-Zellen mit Hilfe einer zusätzlichen Färbung des Schichtenmarkers RGS8 untersucht. Bei Schichtenmarkern (Lamina-Fate-Markern) handelt es sich um Gene exzitatorischer Neurone, deren Expression auf bestimmte Schichten der adulten Großhirnrinde beschränkt ist. Die Laminierung der Großhirnrinde wurde sowohl bei Wildtyp- als auch *Reeler*-Mäusen unter Ausnutzung von Schichtenmarkern bereits ausgiebig untersucht (Mingo-Moreno 2018). Die sog. Lamina-Fate-Marker zeigen im Wildtyp eine starke und einzigartige regionale Anordnung, die eine genaue Abgrenzung der sechs Schichten der Großhirnrinde erlaubt (vgl. 1.4). Dabei ist der Schichtenmarker RGS8 charakteristisch für exzitatorische Zellen in Schicht 2/3 (Mingo-Moreno 2018). Die Expression von *Rgs8*-positiven Zellen wurde durch eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mittels einer *Rgs8*-Sonde nachgewiesen. Die Verteilung der nativen tdTomato-markierten VIP-Zellen ist in Abschnitt 3.2 beschrieben und die hier auch für RGS8-Darstellung verwendeten Schnitte wurden dort bereits mit ausgewertet.

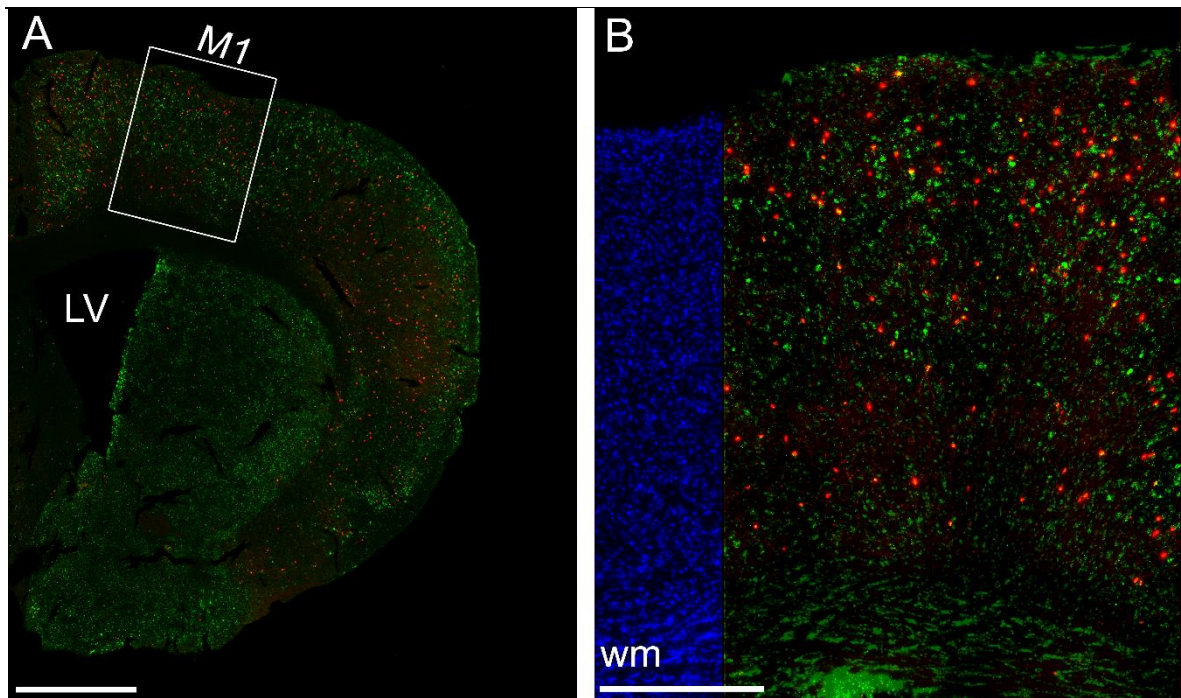
In allen 27 analysierten Schnitten der WT-Mäuse lassen sich deutliche Anfärbungen von Zellen mit der *Rgs8*-Sonde (grün) sowohl in M1, S1 als auch V1 detektieren. In der zehnfachen Übersichtsaufnahme eines frontalen Hirnschnittes der Wildtyp-Maus, in der hier exemplarisch ausgewählten V1-Region (Abbildung 3.9 A), sind im oberen Drittel des Neokortex, sowie in anderen Regionen, wie dem archikortikalen Hippocampus (HC) grün markierte Zellen zu erkennen. Da das G-Protein RGS8 ausschließlich exzitatorische Zellen markiert, wurde keine Kollokalisierung mit den VIP/tdTomato-Zellen erwartet und beobachtet. In der 25-fachen Vergrößerung sind ebenfalls keine Kollokalisierungen der nativen tdTomato-Zellen mit den grünen *Rgs8*-Sonde-tragenden Zellen im hier exemplarisch ausgewählten Ausschnitt zu erkennen. Die *Rgs8*-positiven Zellen sind überwiegend im oberen Drittel, sprich im Bereich von Schicht 2/3, angeordnet (Abbildung 3.9 B).



**Abbildung 3.9:** FISH zur Markierung der *Rgs8*-positiven-Zellen im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp-Maus

Die FISH der *Rgs8*-Sonde an einem 40 µm dicken frontalen Hirnschnitt einer *VIPcre/RosaTomato/WT*-Maus zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal und in Grün das *Rgs8*-Sondensignal. **A** zeigt eine Übersichtsaufnahme in zehnfacher Vergrößerung, die mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops aufgenommen wurde. Zu sehen ist die linke Hemisphäre als Einzel Ebene im Bereich des primären visuellen Kortex. Als weitere anatomische Strukturen, erkennt man z. B. den Hippocampus (HC) sowie den lateralen Ventrikel (LV); Maßstab: 1000 µm. **B** zeigt eine *maximum intensity projection* des primären visuellen Kortex. Auf der linken Seite sind in blau die Zellkerne (DAPI) dargestellt sowie die Einteilung in jene sechs Schichten des Kortex. Die einzelnen Schichten sind durch arabische Buchstaben gekennzeichnet. Die rechte Seite zeigt die roten VIP/tdTomato-Zellen, die größtenteils auf Höhe von Schicht 2/3 lokalisiert sind. Die grünen exzitatorischen RGS8-Zellen sind ebenfalls fast ausschließlich in Schicht 2/3, sprich im oberen Drittel des Kortex, lokalisiert. Eine Kolokalisation von VIP- und RGS8-Zellen konnte nicht beobachtet werden; Maßstab: 250 µm

Die qualitative Analyse aller 36 Schnitte der vier *Reeler*-Mäuse zeigt ebenfalls in allen drei kortikalen Arealen (M1, S1, V1) eine deutliche Anfärbung von *Rgs8*-positiven Zellen (grün). In der zehnfachen Übersichtsaufnahme eines frontalen Hirnschnittes sind in der exemplarisch ausgewählten Region des primären motorischen Kortex (Abbildung 3.10 A) grün markierte Zellen zu erkennen, die über den gesamten Kortex verteilt vorliegen. Hier gibt es ebenfalls keinen Hinweis auf eine Kolokalisation der grünen *Rgs8*-Sonde-tragenden-Zellen mit den roten tdTomato-Zellen. In der 25-fachen Vergrößerung ist keine Kolokalisation der nativen tdTomato-Zellen mit den *Rgs8*-Sonde tragenden Zellen im Bereich von M1 zu erkennen. Die RGS8-Zellen scheinen keine bestimmte Lokalisation zu haben, sondern verteilen sich eher zufällig und weitestgehend gleichmäßig über die ganze Kortexdicke (Abbildung 3.10 B).



**Abbildung 3.10: FISH zur Markierung der *Rgs8*-positiven-Zellen im Bereich des primären motorischen Kortex (M1) der *Reeler*-Maus**

Die FISH der *Rgs8*-Sonde an einem 40  $\mu\text{m}$  dicken frontalen Hirnschnitt einer *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal und in Grün das *Rgs8*-Sondensignal. **A** zeigt eine Übersichtsaufnahme in zehnfacher Vergrößerung, die mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops aufgenommen wurde. Zu sehen ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären motorischen Kortex. Als weitere anatomische Strukturen erkennt man den lateralen Ventrikel (LV); Maßstab: 1000  $\mu\text{m}$ . **B** zeigt eine *maximum intensity projection* des primären visuellen Kortex. Auf der linken Seite sind in blau die Zellkerne (DAPI) dargestellt. Zu sehen ist ein desorganisierter Kortex, in dem eine Einteilung in Schichten nicht möglich ist. Die rechte Seite zeigt die roten VIP/tdTomato-Zellen, die sich mehr oder weniger über die gesamte Fläche des Neokortex verteilen. Ebenso weisen die grünen RGS8-Zellen keine präferierte Lage auf und sind gleichmäßig über den Kortex hinweg verteilt. Eine Kolokalisation zwischen VIP- und RGS8-Zellen konnte nicht beobachtet werden; Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ .

Im Folgenden werden die untersuchten kortikalen Regionen: der primäre motorische Kortex, der primäre somatosensorische Kortex und der primäre visuelle Kortex zwischen der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus separat verglichen.

### 3.3.1 Primärer motorischer Kortex (M1)

Die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen im primären motorischen Kortex (M1) wurde anhand von neun Schnitten von drei Wildtyp-Tieren und 12 Schnitten von vier *Reeler*-Tieren untersucht. Dafür wurden Fluoreszenzplots (Abschnitt 2.5) über die kortikale Dicke der *Rgs8*-positiven Zellen im Bereich von M1 erstellt. Alle ausgewerteten Schnitte wurden normiert und in Verbindung mit der absoluten Anzahl an tdTomato-positiven Zellen im Bereich von M1 gesetzt. Die durchschnittliche Anzahl der absolut vorkommenden VIP/tdTomato-Zellen

wurde anhand von 19 Schnitten von vier WT-Tieren und 30 Schnitten von sechs *Reeler*-Tieren ermittelt. Die ausgezählten VIP/tdTomato-Zellen wurden pro Bin angegeben.

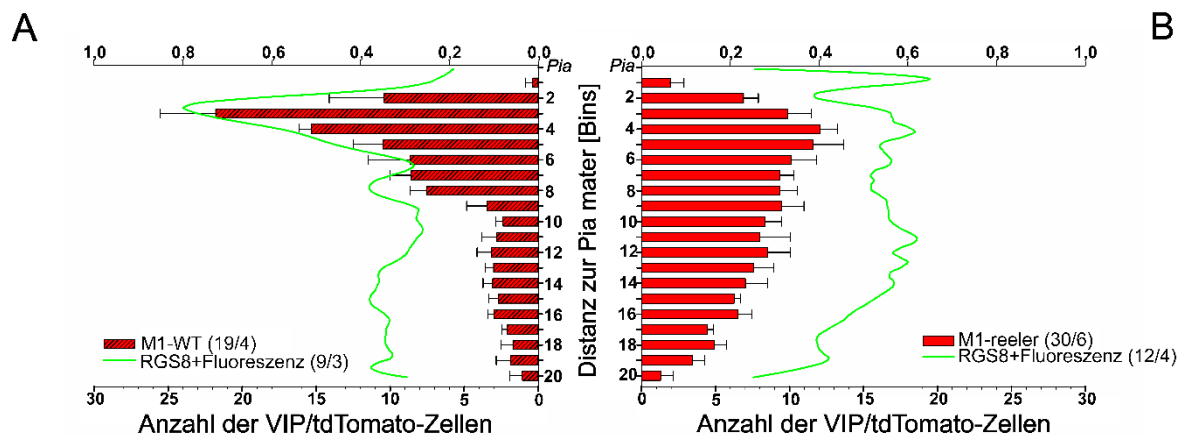
Die absolute Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen im WT zeigt, wie bereits im Abschnitt 3.2.1 für die prozentuale Verteilung beschrieben, eine eindeutige Präferenz zu den supragranulären Schichten. Jedoch kommen die VIP-Zellen in deutlich geringerer Anzahl auch in den tieferen Regionen von M1 vor (Abbildung 3.11 A). Im primären motorischen Kortex der Wildtyp-Mäuse sind die meisten VIP-Zellen in Bin 3 ( $21,8 \pm 3,7$ ) zu finden, gefolgt von Bin 4 ( $15,3 \pm 0,8$ ), Bin 5 ( $10,5 \pm 2,0$ ) und Bin 2 ( $10,4 \pm 3,7$ ). Somit sind mehr als die Hälfte der VIP-Zellen im ersten Viertel von M1 lokalisiert (Abbildung 3.11 A). Die andere Hälfte der Zellen verteilt sich von Bin 6 ( $8,6 \pm 2,8$ ) bis Bin 20 ( $1,1 \pm 0,8$ ), wobei die Anzahl der VIP-Zellen dabei stetig in Richtung der weißen Substanz abnimmt. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen lässt sich in den *Reeler*-Mäusen eine vermehrte Gleichverteilung der VIP-Zellen über die Kortexdicke von M1 hinweg beobachten (Abbildung 3.11 B). In Bin 4 ( $12,1 \pm 1,2$ ) sind zwar die meisten aller VIP-Zellen zu finden, jedoch ist dieser Maximalwert weniger prominent als beim WT (Abbildung 3.11 B). Die Zellzahl steigt von Bin 1 mit  $1,9 \pm 0,9$  über Bin 3 ( $9,9 \pm 1,6$ ) bis Bin 4 ( $12,1 \pm 1,2$ ) stetig an, um anschließend weitaus geringer von Bin 5 ( $11,6 \pm 2,1$ ) über Bin 10 ( $8,4 \pm 1,1$ ) bis Bin 20 ( $4,4 \pm 0,4$ ) abzufallen. Damit ergibt sich eine ausgeprägte Gleichverteilung der VIP-Zellen im M1 *Reeler*-Kortex. Alle Gesamtzahlen sind in Tabelle 7.2 (Anhang) aufgeführt.

Die Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen wurde nun mit dem Verlauf des Fluoreszenzplots für die *Rgs8*-positiven Zellen in M1 verglichen. Dieser repräsentiert die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen über einen 400  $\mu\text{m}$  breiten Bereich des primären motorischen Kortex hinweg. Je höher die Fluoreszenzintensität gemessen wurde, desto mehr *Rgs8*-positive Zellen befinden sich im jeweiligen Bin. Bei RGS8 handelt es sich um einen sog. Schichtenmarker (Lamina-Fate-Marker), der exzitatorische Zellen in Schicht 2/3 markiert. Der Graph der *Rgs8*-positiven Zellen zeigt im WT analog zur Verteilung der VIP-Zellen eine eindeutige Präferenz zu den supragranulären Schichten und ein gleichbleibend niedriges Niveau (Wert von ca. 0,3) von Bin 6 zu Bin 20. Aufgrund der Originalbilder (Abbildung 3.10) kann dieses Niveau von ca. 0,3 als Hintergrundfluoreszenz gewertet werden, so dass die *Rgs8*-positiven Zellen nahezu ausschließlich in den Bins 2 bis 5 vorkommen (Abbildung 3.11 A).

Der Fluoreszenzplot der RGS8-Zellen im M1 *Reeler*-Kortex weist dagegen einen fast doppelt so hohen Fluoreszenzwert von 0,5 bis 0,6 über die nahezu gesamte Kortexdicke auf (Abbildung 3.11 B). Das spiegelt die bereits beobachtete gleichmäßige Verteilung der RGS8-Zellen aus Abbildung 3.10 im *Reeler*-Kortex wider. Direkt unterhalb der *Pia mater* kommt es in allen ausgewerteten *Reeler*-Kortexschnitten zu einem steilen *Peak* der RGS8-Kurve (Abbildung 3.11/Abbildung 3.12/Abbildung 3.13 B). Dieser beruht auf einer starken (und unspezifischen)



Hintergrundfärbung im Bereich der *Pia mater*. Denn bei genauerer Betrachtung sind dort keine *Rgs8*-positiven Zellen zu finden. Demnach sind die *Rgs8*-positiven Zellen analog zu den VIP/tdTomato-positiven Zellen gleichmäßig über die Kortexdicke in M1 *Reeler*-Mäusen verteilt. Aufgrund der Überlappung der Fluoreszenzplots der RGS8-Zellen und der Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen, sowohl im WT als auch im *Reeler*-Kortex, kann vermutet werden, dass die VIP-Zellen sich nicht wahllos im primären motorischen Kortex anordnen, sondern sich an den supragranulär vorkommenden exzitatorischen Zellen orientieren.



**Abbildung 3.11: Verteilung der nativen VIP/tdTomato-Zellen sowie der RGS8-Zellen im primären motorischen Kortex (M1) der Wildtyp- (A) und der *Reeler*-Maus (B)**

Die Fluoreszenzplots repräsentieren die unterschiedliche Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen in der Wildtyp- (A) sowie der *Reeler*-Maus (B) im primären motorischen Kortex (M1) über einen 400  $\mu\text{m}$  breiten Bereich hinweg. Je größer der Wert der Fluoreszenzintensität gemessen wurde, desto mehr *Rgs8*-positive Zellen befinden sich im jeweiligen Bin. Die Balkendiagramme stellen die absoluten Zahlen der VIP/tdTomato-Zellen in den jeweiligen Bins von der *Pia mater* bis zur weißen Substanz innerhalb einer Breite von 1000  $\mu\text{m}$  (Höhe Schicht IV) und einer Schnittdicke von 40  $\mu\text{m}$ , im Wildtyp- (A) und im *Reeler*-Mauskortex (B) dar. Im WT zeigt die absolute Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen eine eindeutige Präferenz zu den supragranulären Schichten, nahe der *Pia mater*. Über 50 % aller VIP-Zellen sind im ersten Viertel von M1 lokalisiert. Die RGS8-Fluoreszenz ist ebenfalls in dieser Region am größten (A). In *Reeler* wird eine Gleichverteilung der VIP-Zellen und eine annähernd gleichhohe RGS8-Fluoreszenz über die Kortexdicke hinweg beobachtet (B).

### 3.3.2 Primärer somatosensorischer Kortex (S1)

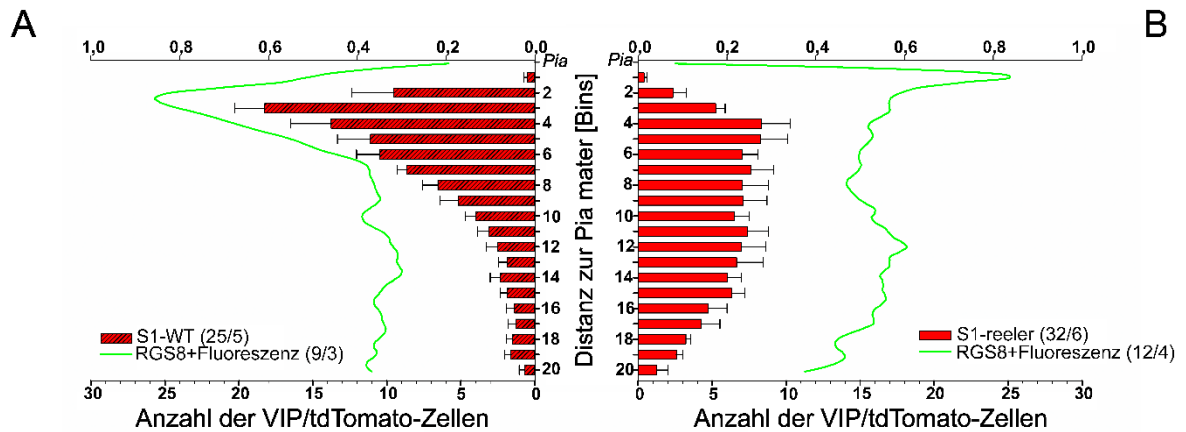
Analog zu M1 erfolgte die Auswertung im primären somatosensorischen Kortex (S1). Die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen mittels Fluoreszenzplots wurde in neun Schnitten von drei Wildtyp-Tieren und in 12 Schnitten von vier *Reeler*-Tieren untersucht. Die absolut vorkommenden VIP/tdTomato-Zellen wurden in Bins, infolge einer Analyse von 25 Schnitten von fünf WT-Mäusen und 32 Schnitten von sechs *Reeler*-Mäusen, ermittelt. Ähnlich der Verteilung in M1, zeigt die absolute Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen der Wildtyp-Maus in S1 eine Tendenz zur Anordnung in den supragranulären Schichten, wie zuvor im Abschnitt 3.2.2 für die prozentuale Verteilung beschrieben. In deutlich geringer Anzahl sind die VIP-

Zellen auch in den tieferen Regionen von S1, nahe der weißen Substanz, zu finden (Abbildung 3.12 A). Die meisten VIP-Zellen sind im primären somatosensorischen Kortex der WT-Maus mit  $18,3 \pm 2,0$  in Bin 3 lokalisiert. Daran schließt sich direkt Bin 4 ( $13,8 \pm 2,7$ ) an, gefolgt von Bin 5 ( $11,1 \pm 2,2$ ) und Bin 6 ( $10,5 \pm 1,5$ ). Damit ist etwa die Hälfte der VIP-Zellen im WT im ersten Viertel von S1 angeordnet (Abbildung 3.12 A). Ab Bin 7 ( $8,6 \pm 0,7$ ) nimmt die Anzahl der VIP-Neurone bis Bin 20 ( $1,3 \pm 0,5$ ) stetig ab. Die VIP-Zellen der *Reeler*-Maus zeigen dagegen eine weitestgehende Gleichverteilung über die Dicke des Neokortex im Bereich von S1 hinweg (Abbildung 3.12 B). Die höchste Anzahl an Zellen findet sich mit  $8,3 \pm 2,0$  in Bin 4 (wie in M1; Abbildung 3.12 B). Dieser Maximalwert ist jedoch im Vergleich zum WT wenig prominent. Die Verteilung der VIP-Zellen steigt über Bin 2 ( $2,3 \pm 0,9$ ) und Bin 3 ( $5,3 \pm 0,6$ ) bis Bin 4 kontinuierlich an. Anschließend fallen die Werte von Bin 5 mit  $8,3 \pm 1,8$  bis Bin 15 ( $1,9 \pm 0,4$ ) nur geringfügig ab. Ab Bin 16 ( $4,8 \pm 1,2$ ) kommt es zu einer klaren Reduktion der Zellzahl bis hin zu Bin 20 auf  $1,3 \pm 0,8$ . Die vorherrschende Gleichverteilung der VIP-Zellen in S1 der *Reeler*-Maus wird sowohl anhand der Grafik (Abbildung 3.12 B) als auch durch die tabellarische Auflistung aller Werte in Tabelle 7.2 (Anhang) deutlich.

Die Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen wurde hier wie in M1 mit dem Verlauf des Fluoreszenzplots für die *Rgs8*-positiven Zellen in S1 verglichen. Der Fluoreszenzplot repräsentiert die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen über einen 200  $\mu\text{m}$  breiten Bereich des primären somatosensorischen Kortex hinweg. Je höher die Fluoreszenzintensität gemessen wurde, desto mehr *Rgs8*-positive Zellen befinden sich im jeweiligen Bin. Der Graph der *Rgs8*-positiven Zellen zeigt im WT analog zur absoluten Zellverteilung der VIP-Zellen eine eindeutige Tendenz zu den supragranulären Schichten und ein in etwa gleichbleibendes Niveau (Wert von ca. 0,3) von Bin 6 bis zu Bin 20 (analog zu M1). Auch hier kann das Niveau von ca. 0,3 als Hintergrundfluoreszenz gewertet werden, sodass *Rgs8*-positive Zellen überwiegend in den Bins 2 bis 5 vorkommen (Abbildung 3.12 A).

Der Fluoreszenzplot der RGS8-Zellen im S1-*Reeler*-Kortex zeigt im Gegensatz zum WT einen fast doppelt so hohen Fluoreszenzwert von 0,5 bis 0,6 beinahe über die vollständige Kortexdicke hinweg (Abbildung 3.12 B). Dies spiegelt, wie schon in M1 beobachtet, die gleichmäßige Verteilung der RGS8-Zellen im *Reeler*-Kortex wider. Auch in S1 kommt es unmittelbar unterhalb der *Pia mater* in *Reeler* zu einem steilen *Peak* der RGS8-Kurve (Abbildung 3.11/Abbildung 3.12/Abbildung 3.13 B). Dieser beruht auch hier auf einem starken Hintergrund im Bereich der *Pia mater*, der in allen *Reeler*-Tieren zu beobachten ist. Er spiegelt nicht die Verteilung der RGS8-Zellen wider, denn bei genauerer Betrachtung sind dort keine Zellen markiert. Die *Rgs8*-positiven Zellen sind analog zu den VIP/tdTomato-positiven Zellen gleichmäßig über die Kortexdicke von S1-*Reeler*-Mäusen verteilt. Durch die Überlappung der

Fluoreszenzplots der RGS8-Zellen und die Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen im WT als auch in *Reeler* kann angenommen werden, dass die VIP-Zellen sich nicht beliebig im primären somatosensorischen Kortex anordnen, sondern sich an den supragranulär vorkommenden exzitatorischen Zellen orientieren.



**Abbildung 3.12: Verteilung der nativen VIP/tdTomato-Zellen sowie der RGS8-Zellen im primären somatosensorischen Kortex (S1) der Wildtyp- (A) und der *Reeler*-Maus (B)**

Die Fluoreszenzplots repräsentieren die unterschiedliche Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen in der Wildtyp- (A) sowie der *Reeler*-Maus (B) im primären somatosensorischen Kortex (S1) über einen 400  $\mu\text{m}$  breiten Bereich hinweg. Je größer der Wert der Fluoreszenzintensität gemessen wurde, desto mehr *Rgs8*-positive Zellen befinden sich im jeweiligen Bin. Die Balkendiagramme stellen die absoluten Zahlen der VIP/tdTomato-Zellen von der *Pia mater* bis zur weißen Substanz innerhalb einer Breite von 1000  $\mu\text{m}$  (Höhe Schicht IV) und einer Schnittdicke von 40  $\mu\text{m}$ , innerhalb der einzelnen Bins, im Wildtyp- (A) sowie im *Reeler*-Mauskortex (B) dar. Im WT zeigt die absolute Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen eine eindeutige Tendenz zu den supragranulären Bereichen, nahe der *Pia mater*. Etwa 50 % aller VIP-Zellen sind im ersten Viertel von S1 lokalisiert. Dort ist ebenfalls die Ausprägung der RGS8-Fluoreszenz am größten. (A). In *Reeler* beobachtet man eine weitestgehende Gleichverteilung der VIP-Zellen über die Dicke des Kortex hinweg verbunden mit einer verhältnismäßig gleich ausgeprägten RGS8-Fluoreszenz über die kortikale Dicke hinweg (B).

### 3.3.3 Primärer visueller Kortex (V1)

Die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen im primären visuellen Kortex (V1) wurde in neun Schnitten von drei Wildtyp-Tieren und in 12 Schnitten von vier *Reeler*-Tieren untersucht. Sämtliche *Rgs8*-positive Zellen wurden angesichts ihrer Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzplots im Bereich von V1 ausgewertet. Alle ausgewerteten Schnitte wurden normiert und mit der absoluten Anzahl an tdTomato-positiven Zellen im Bereich von V1 verglichen. Die durchschnittliche Anzahl der absolut vorkommenden VIP/tdTomato-Zellen wurde anhand der Auszählung von 19 Schnitten von vier WT-Tieren und 27 Schnitten von sechs *Reeler*-Tieren ermittelt. Die ausgezählten VIP/tdTomato-Zellen wurden pro Bin angegeben.

Analog zu M1 und S1 kommen die VIP-Zellen im primären visuellen Kortex der WT-Maus vermehrt in den supragranulären Regionen, nahe der *Pia mater* vor (Abbildung 3.13 A). Jedoch

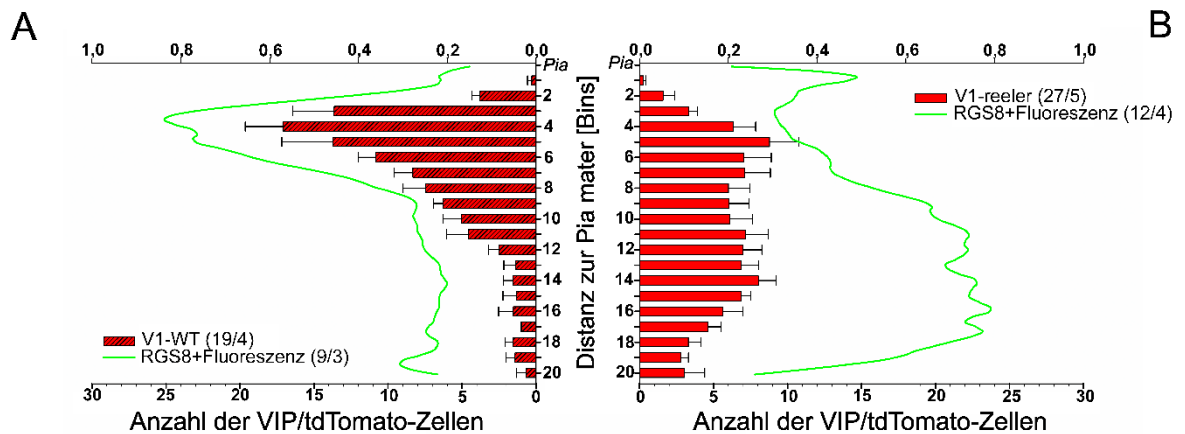
ist der Anstieg der absoluten Zellzahl im Vergleich zu M1 und S1 um einen Bin versetzt. Im primären visuellen Kortex der Wildtyp-Maus ist die größte Anzahl an VIP-Zellen erst in Bin 4 ( $17,1 \pm 2,5$ ) zu finden, gefolgt von Bin 3 ( $13,6 \pm 2,8$ ), Bin 5 ( $13,7 \pm 3,5$ ) und Bin 6 ( $10,8 \pm 1,2$ ). Bin 2 weist in V1 deutlich weniger VIP-Zellen ( $3,8 \pm 0,5$ ) im Vergleich zu M1 und S1 auf. Ab Bin 7 ( $8,3 \pm 1,3$ ) nimmt die Anzahl der VIP-Zellen kontinuierlich bis hin zu Bin 20 ( $0,7 \pm 0,6$ ) ab.

Wie schon für den *Reeler*-Kortex in M1 und S1 beschrieben, sind die VIP-Zellen im primären visuellen Kortex der *Reeler*-Maus über die gesamte Kortexfläche nahezu gleichverteilt (Abbildung 3.13 B). So sind in den Bins 4 bis 15 jeweils durchschnittlich über sechs VIP-Zellen lokalisiert. Allerdings ist in V1 keine kontinuierliche Reduktion der Anzahl von VIP-Zellen vom Maximalwert zur weißen Substanz zu beobachten. Die meisten VIP-Zellen kommen in Bin 5 mit  $8,8 \pm 2,0$  und in Bin 14 mit  $8,0 \pm 1,2$  vor. Damit gibt es zwei tendenzielle *Peaks* am Rande eines Plateaus von VIP-Zellen in V1 der *Reeler*-Maus. Sämtliche Angaben zu den absoluten Zellzahlen sind in Tabelle 7.2 (Anhang) zu finden.

Die Verteilung der fluoreszierenden *Rgs8*-positiven Zellen in V1 wurde wie in M1 sowie S1 mit Hilfe eines Fluoreszenzplots analysiert. Der Fluoreszenzplot der *Rgs8*-positiven Zellen zeigt im WT analog zur absoluten Zellverteilung eine deutliche Präferenz zu den supragranulären Schichten und ein gleichbleibendes Plateau ab Bin 9 (Abbildung 3.13 A). Demzufolge scheinen die *Rgs8*-positiven Zellen vorwiegend in den Bins 2 bis 8 vorzukommen. Diese Vermutung wird durch die Originalbilder (Abbildung 3.9) für den primären visuellen Kortex in der WT-Maus klar bestätigt. Vergleicht man den Verlauf mit den Fluoreszenzplots in M1 und S1, so fällt der *Peak* in V1 tendenziell breiter aus. Der Fluoreszenzplot der RGS8-Zellen in V1 im *Reeler*-Kortex ist dagegen eindeutig zu tieferen kortikalen Regionen verschoben. Ein Anstieg der Fluoreszenz ist erst ab Bin 8 zu beobachten, die anschließend bis Bin 19 nahezu konstant bleibt. Damit sind die *Rgs8*-positiven Zellen vorwiegend in den tieferen Regionen von V1 im *Reeler*-Kortex lokalisiert.

Vergleicht man den Verlauf der Fluoreszenzplots in V1 in der WT- und in der *Reeler*-Maus mit der Verteilung der VIP/*tdTomato* Zellen, so lassen sich folgende Erkenntnisse gewinnen: Im V1 WT-Kortex ist, analog zu M1 und S1, eine gute Überlappung der Fluoreszenzplots der RGS8-Zellen mit den VIP-Zellen zu beobachten. Dabei sind zum einen der Fluoreszenzplot als auch die VIP-Zellen um einen Bin zur weißen Substanz in V1, gegenüber M1 und S1, verschoben und zum anderen zeigen die RGS8-Zellen in V1 eine tendenziell breitere Verteilung um etwa ein bis zwei Bins. Dagegen ist die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen in der *Reeler*-Maus im Vergleich zum WT nahezu gegensätzlich und vorwiegend auf den unteren V1 Bereich beschränkt. Die VIP-Zellen in V1 im *Reeler*-Kortex sind allerdings weiterhin, ähnlich zu M1 und

S1, über die gesamte Kortexdicke verteilt, weisen jedoch einen zweiten *Peak* im Fluoreszenzplateau der *Rgs8*-positiven Zellen auf. Demzufolge scheinen sich die VIP-Zellen, analog zur Vermutung in M1 und S1, an den supragranulären vorkommenden exzitatorischen Zellen zu orientieren. Jedoch führt eine Invertierung der *Rgs8*-positiven Zellen im primären visuellen Kortex von *Reeler* nicht zu einer Invertierung der Lage der VIP-Zellen. Es müssen weitere Mechanismen vorhanden sein, die die Lokalisation der VIP-exprimierenden GABAergen Interneurone im sich entwickelnden Neokortex beeinflussen.



**Abbildung 3.13: Verteilung der nativen VIP/tdTomato-Zellen sowie der RGS8-Zellen im primären visuellen Kortex (V1) der Wildtyp- (A) und der *Reeler*-Maus (B)**

Die Fluoreszenzplots repräsentieren die unterschiedliche räumliche Verteilung der RGS8-positiven Zellen in der Wildtyp- (A) sowie der *Reeler*-Maus (B) im primären visuellen Kortex. Die Balkendiagramme stellen die absoluten Zahlen der VIP/tdTomato-Zellen von der *Pia mater* bis zur weißen Substanz innerhalb einer Breite von 1000  $\mu\text{m}$  (Höhe Schicht IV) und einer Schnittdicke von 40  $\mu\text{m}$ , verteilt auf die einzelnen Bins im Wildtyp- (A) sowie im *Reeler*-Mauskortex (B) dar. Im WT zeigt die absolute Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen eine eindeutige Präferenz zu den supragranulären Schichten, nahe der *Pia mater*. Knapp unter 50 % aller VIP-Zellen sind im ersten Viertel von V1 lokalisiert. In diesem Bereich ist die RGS8-Fluoreszenz ebenfalls am größten. (A). In *Reeler* beobachtet man eine Gleichverteilung der VIP-Zellen über die Kortexdicke hinweg. Die RGS8-Fluoreszenz reichert sich hier eher in den tieferen Bereichen des Kortex an (B).

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung VIP-exprimierender GABAerger Interneurone im primären motorischen Kortex (M1), im primären somatosensorischen (*Barrel*-) Kortex (S1, S1BF) sowie im primären visuellen Kortex (V1) von Mäusen zu untersuchen. Die Verteilung wurde schichtenunabhängig mit Hilfe der Methodik der Bin-Size-Analyse im Wildtyp-Kortex von *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen und im desorganisierten Kortex von *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mäusen analysiert und gegenübergestellt. Außerdem sollten sowohl Aussagen über die Spezifität als auch die Sensitivität der transgen markierten VIP-Neurone, insbesondere in der *Reeler*-Maus, getroffen werden. Des Weiteren wurde in dieser Studie der Frage nachgegangen, inwiefern tangential wandernde inhibitorische VIP-Neurone den radial aufsteigenden exzitatorischen Pyramidenzellen der Schicht 2/3 in der Endphase ihrer Entwicklung folgen. Die entscheidenden Färbungen erfolgten mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. Dabei wurden für die Spezifität und Sensitivität die Marker *Vip*, *Gad1* (inhibitorischer Marker) und *Vglut1* (exzitatorischer Marker) sowie zur Markierung der Schicht 2/3 Pyramidenzellen *Rgs8* verwendet. Anhand der Ergebnisse dieser Studie können folgende Hauptaussagen getroffen werden:

1. Bei den fluoreszierenden tdTomato-Zellen in der *VIPcre/RosaTomato/WT*- und der *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus handelt es sich um inhibitorische VIP-Zellen.
2. In der Wildtyp-Maus gibt es keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung und der Anzahl der VIP-exprimierenden Neurone zwischen M1, S1 und V1.
3. In der *Reeler*-Maus gibt es keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der VIP-exprimierenden Neurone zwischen M1, S1 und V1. Dagegen kommen in M1 der *Reeler*-Maus signifikant mehr VIP-Zellen vor.
4. Es lassen sich klare Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der VIP-Zellen zwischen der Wildtyp- und der *Reeler*-Maus in allen drei kortikalen Regionen (M1, S1 und V1) feststellen.
5. Die tangential wandernden VIP-Neurone scheinen sich an den exzitatorischen Schicht 2/3 Pyramidenzellen zu orientieren und deren räumliche Nähe in M1, S1 und V1 zu suchen.

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie

Bei der in dieser Studie verwendeten FISH wird die mRNA der ausgewählten Gene (*Gad1*, *Vglut1*, *Rgs8*, *Vip*) in den Zielzellen nachgewiesen. Sie arbeitet auf Grundlage der Spezifität der Basenpaarung. Es paaren sich zwei komplementäre Basen auf zwei Nukleinsäure-Einzelsträngen. Dabei gehört ein Nukleinsäure-Einzelstrang zur vorher synthetisierten Sonden-RNA und der andere zu jener mRNA des ausgewählten Gens in der Zielzelle. Der Nachweis

der Zielsequenz wird erbracht, indem über eine indirekte Markierung mit Biotin und Streptavidin Fluorophore an den jeweiligen mRNA-Abschnitt binden. Jene Fluorophore visualisieren die verwendeten, an die mRNA gebundenen Sonden. Die *in-situ*-Hybridisierung stellt eine weitverbreitete Methode der Proteinsynthese dar und wurde bereits im Vorfeld dieser Studie in unserer Arbeitsgruppe für die Gene *Gad1*, *Vglut1*, *Rgs8* und *Vip* etabliert (Hafner et al. 2019; Hafner et al. 2021; Mingo-Moreno 2018; Prönneke et al. 2015; Wagener et al. 2016).

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Proteinen (GAD1, VGLUT1, RGS8, VIP) stellt eine immunhistochemische Färbung dar. Dabei kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion, im Sinne einer indirekten Immunreaktion. Im ersten Schritt bindet der Primärantikörper an die Epitope in den Zielzellen. Daraufhin bindet der mit dem Farbstoff gekoppelte Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Ein Vorteil der indirekten Immunmarkierung stellt die Tatsache dar, dass mehrere Sekundärantikörper in der Lage sind an einen Primärantikörper zu binden, was dann letztendlich zu einer Signalverstärkung führt. Der Unterschied zwischen der *in-situ* Hybridisierung (ISH) und der immunhistochemischen Färbung (IHC) besteht im „Zeitpunkt“ der Proteinsynthese. Die ISH markiert die mRNA, die im Transkriptionsschritt der Proteinbiosynthese gebildet wird und welche später in ein Protein translatiert wird. Das bedeutet, die mRNA stellt das Zwischenprodukt dar, was als eine Bauanleitung für das spätere Protein dient. Das fertige Protein kann mittels Epitopbindung von Protein und Antikörper in der IHC nachgewiesen werden. Während der Proteinbiosynthese entsteht allerdings nicht aus jeder Schablone ein Endprodukt, sprich ein Protein. Demzufolge ist es möglich, dass mit der ISH mehr mRNA-Moleküle nachgewiesen werden als fertige Proteine mit der IHC. Aber auch der umgekehrte Fall ist möglich. So können während der Proteinsynthese unterschiedliche Konzentrationen von mRNA in den Zellen vorkommen. Demzufolge ist der mRNA-Gehalt zwischen den Zellen unterschiedlich, da sie sich in verschiedenen Proteinsynthesestadien befinden. Daher können Zellen kaum oder schwach in der ISH angefärbt werden, obwohl das fertige Protein vorhanden ist. Dieser Effekt konnte für das VIP-Gen beobachtet werden (Prönneke et al. 2015). In den Auszählungen der *Vip*-Sonde konnte, unabhängig vom Maus-Genotyp und kortikaler Region, eine Kolokalisationsquote von 98 % mit dem nativen tdTomato-Signals beobachtet werden. Diese hohe Kolokalisationsrate in der FISH liegt zum einen im Bereich der IHC und zum anderen weitaus höher als für die FISH in vorangegangenen Studien im *Barrel*-Kortex (Prönneke et al 2015).

Für die Gene GAD1 und VGLUT1 ist eine gleichbleibende Proteinsynthese anzunehmen, da sie für ein essentielles Protein in der Zelle kodieren. Der immunhistochemische Nachweis von GAD1 wird seit Jahren in der Literatur kritisch gesehen, da das biologische Material während des Prozesses stark beeinträchtigt wird und nicht mit Proteinnachweisen anderer Gene

kompatibel ist (Castañeda et al. 2005; Stephenson et al. 2005; Ricci et al. 2005; Grimes et al. 2003). Daher wurde für den Nachweis der inhibitorischen Eigenschaften der VIP/TdTomato-Zellen ebenfalls die FISH mittels einer GAD67-Sonde durchgeführt. VIP/Tomato-Zellen die kein GAD67 exprimieren, was speziell von der *Gad1*-Sonde nachgewiesen wird, können trotzdem inhibitorische Zellen sein, da diese Zellen eventuell GAD65 exprimieren (Nachweis durch *Gad2*-Sonde). In verschiedenen Studien an der Ratte konnte bereits eine Expression von GAD65 für VIP/TdTomato-Zellen nachgewiesen werden (Karagiannis et al. 2009; Porter et al. 1998; Cauli et al. 1997). Für das RGS8-Gen sollten keine Kollokationen untersucht werden, sondern lediglich ein Verteilungsprofil erstellt werden. Demzufolge ist eine unterschiedlich starke RGS8-Proteinsynthese nicht entscheidend. Zusammenfassend stellte die FISH zum Nachweis der vier Gene (GAD1, VGLUT1, RGS8, VIP) den besten Kompromiss dar, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen, was auch zu einer wünschenswerten Reduktion der benötigten Anzahl der Versuchstiere führte.

#### 4.1.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie kann für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen als auch für immunhistochemische Färbungen verwendet werden. Somit konnten hiermit zum einen die durch die FISH markierten *Vip*- und *Rgs8*-Sondenmoleküle und zum anderen jene rot fluoreszierenden, RFP-exprimierenden tdTomato-Zellen, die mit Hilfe der IHC gekennzeichnet wurden, sichtbar gemacht werden. Bei dieser Art von Mikroskopie wird das Bild mit Hilfe des emittierten Lichtes erzeugt, welches durch eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe im Präparat entsteht. Die Anregung erfolgt mit Hilfe von kurzwelligem Licht, welches mittels Filter lediglich den für das Fluorochrom passenden Bereichs des Lichtspektrums umfasst. Das emittierte Fluoreszenzlicht der Probe liegt in einem höheren Wellenlängenbereich und wird über einen spezifischen Filter auf eine Grauskalen-Kamera geleitet.

Ein Problem bei Epifluoreszenzaufnahmen stellt Streulicht von außerhalb der Fokusebene dar, welches insbesondere bei dicken Gewebeschnitten die Qualität der Aufnahme und dadurch auch die Auswertung beeinträchtigt. Je dicker das Präparat ist, desto mehr Streulicht aus anderen Ebenen tritt auf. Demzufolge wird nicht nur das Licht aus der eingestellten Fokusebene, sondern auch von darüber oder darunter gelegenen Ebenen aufgenommen. Um dieses Problem zu lösen, und Streulicht zu reduzieren, wurden die Bildstapel in der ZEN blue Software (Zeiss) dekonvolviert (Hafner et al. 2021). Für die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurden Hirnschnitte mit einer Dicke von 40 µm gescannt. Bereits in vorherigen Studien konnten mit dieser Schnittdicke gute Ergebnisse erzielt werden (Hafner et al 2021; Halabisky et al. 2006; Xu et al. 2006).



Es wurden auch bereits Schnittdicken mit 16, 25 sowie 50  $\mu\text{m}$  (Xu et al. 2006) oder 20  $\mu\text{m}$  (Pesold et al. 1999) verwendet. Durch die Färbungen und die damit verbundene Belastung haben die Schnitte im Anschluss an die Färbungen nur noch eine durchschnittliche Dicke von 21  $\mu\text{m}$  (Scheuer 2015; Fischer 2018). Demnach ist davon auszugehen, dass die hier gewählte Schnittdicke keine wesentliche Problematik in Bezug auf die Epifluoreszenzaufnahmen darstellt. In dieser Studie wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axioimager von Zeiss verwendet, wodurch es möglich wurde einen kompletten Bildstapel des gescannten Areals zu erzeugen. Dies brachte den großen Vorteil, dass man nun durch die einzelnen Ebenen virtuell durchmikroskopieren und jene Zellen sehr gut quantitativ analysieren konnte.

Ein zweiter Nachteil der Epifluoreszenzmikroskopie ist, dass es beim Bestrahlen des Präparats dazu kommen kann, dass mehrere Floreszenzen mit unterschiedlicher Wellenlänge gleichzeitig angeregt und aufgenommen werden, was zum sogenannten „Durchbluten“ der unterschiedlichen Farbkanäle führen kann. Da ein Teil dieser Arbeit auch die Kolo-kalisation von roten tdTomato-Zellen mit den grünen *Vip-*, *Gad1-* und evtl. auch *Vglut1-*Sonden untersucht, ist diese Problematik von besonderer Relevanz und sollte nach Möglichkeit ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, wären Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gewesen. Bei diesem Mikroskop ist ein „Durchbluten“ ausgeschlossen und es entstehen weniger Kachelartefakte durch Ausbleichen. In dieser Untersuchung wurde kein „Durchbluten“ der jeweiligen Farbkanäle beobachtet.

### 4.1.3 Auszählung im richtigen Kortextbereich

In der quantitativen Analyse dieser Studie wurden „dreidimensionale“ Aufnahmen im Bereich des primären motorischen Kortext (M1; Abbildung 2.1), des primären somatosensorischen Kortext (S1; S1BF; Abbildung 2.2) sowie des primären visuellen Kortext (V1; Abbildung 2.3) mit 25-facher Vergrößerung angefertigt. Die Auswahl des jeweiligen Kortextareals erfolgte manuell unter Zuhilfenahme des Maus-Hirn-Atlas (Paxinos und Franklin 2001) sowie anhand charakteristischer anatomischer Landmarken. Die Kortextregion M1 wurde anhand der typischen Form der Seitenventrikel, sowie des *Corpus callosum* ausgewählt. Im Bereich des primären somatosensorischen Kortext waren die typischen *Barrels* auf Höhe von Schicht 4 der WT-Maus bzw. der *Barrel*-Äquivalente in der *Reeler*-Maus ein gut wiederzuerkennendes Merkmal. Die Kortextregion V1 konnte an der sich verändernden Form des Hippocampus von rostral nach okzipital sowie anhand der verschwindenden Ventrikel identifiziert werden. Die Methodik der manuellen Abgrenzung jener kortikalen Bereiche ist wahrscheinlich als kritisch zu betrachten, da Ungenauigkeiten durchaus zu falschen Ergebnissen und falschen Schlussfolgerungen führen können. In der *Reeler*-Maus erwies sich die genaue Abgrenzung

aufgrund der Abwesenheit von Schichten und der vergrößerten Ventrikel als deutlich schwieriger. Jedoch lagen durch vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe in *Reeler* sehr gute Referenzwerte vor (Mingo-Moreno 2018). Zudem belegen die erhobenen Werte für die Verteilung von VIP-Zellen indirekt, dass die Auszählungen in den korrekten kortikalen Regionen vorgenommen wurden (Prönneke et al. 2015). Laut Prönneke et al. (2015) und DeFelipe (2002) lassen sich in einem Abstand von 150  $\mu\text{m}$  zur *Pia mater* die meisten VIP- Zellen nachweisen, was Schicht 2/3 entspricht. In der hier durchgeführten schichtenunabhängigen Bin-Size-Analyse konnten die meisten VIP-Zellen in Bin 3 (M1, S1) bzw. in Bin 4 (V1) nachgewiesen werden (vgl. 3.2). Geht man von einer durchschnittlichen Dicke des WT-Kortex in M1 von 1136,4  $\mu\text{m}$ , in S1 von 1037,4  $\mu\text{m}$  und in V1 von 720,4  $\mu\text{m}$  (Tabelle 7.2) aus, liegt Bin 3 in M1-WT ca. 113,7–170,6  $\mu\text{m}$  von der *Pia* Oberfläche entfernt, Bin 3 von S1-WT ca. 103,74–155,6  $\mu\text{m}$  und Bin 4 von V1-WT ca. 108,1–144,1  $\mu\text{m}$  entfernt von der *Pia mater*. Die Ergebnisse der schichtenunabhängigen Analyse stimmen somit in etwa mit den Resultaten von De Felipe et al. (2002) überein. Die Auszählung der durch die *Vip*-Sonde markierten Zellen, der nativen tdTomato-Zellen, sowie der kolokalisierten Zellen erfolgte computerunterstützt durch die Autorin selbst. Zur Verifizierung der Kolokalisationen sowie der Zellzahlen wurden vereinzelte Schnitte von einer weiteren Person ausgezählt, die nicht an der Durchführung dieser Studie beteiligt war. Sie führte die Auszählung „blind“ durch, d. h. die auszählende Person wusste nicht um welche Zellen oder Sonden es sich handelte. Die Kontrollperson kam zu identischen Ergebnissen.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ein Verständnis der Diversität kortikaler GABAerger Interneurone ist entscheidend für das Verständnis der Funktion und Informationsverarbeitung der Großhirnrinde. Die Interneuron-Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer intrinsischen Membraneigenschaften und in Bezug auf ihre Konnektivität. Des Weiteren gibt es Unterschiede bezüglich ihrer Wirksamkeit und Dynamik hinsichtlich *Input*- und *Output*-Synapsen. Diese Unterschiede sind mit der Expression spezifischer molekularer Marker verbunden (Cauli et al. 1997; Kawaguchi und Shindou 1998; Markram et al. 2004; Somogyi und Klausberger 2005; Yuste 2005; Ascoli et al. 2008). GABAerge Interneuron-Subtypen weisen ebenfalls Unterschiede in ihrer Reaktion auf Neuromodulatoren, d. h. in Bezug auf Handlungen, die die Funktion neokortikaler Schaltkreise tiefgreifend beeinflussen und für dynamische Veränderungen verantwortlich sind, die mit Änderungen der Gehirnzustände und des Verhaltenskontextes einhergehen auf (Kawaguchi 1997; Xiang et al. 1998; Gao et al. 2003; Bacci et al. 2005; Fanselow et al. 2008; Kruglikov und Rudy 2008). Obwohl GABAerge Interneurone

mit 15–20 % eine Minderheit aller kortikalen Neuronen darstellen (Staiger et al. 2015b), sind ihre Axone weit verzweigt und kontrollieren die gesamte neuronale Population des Kortex (Rudy et al. 2011). Sie sind sowohl an Lern- als auch Gedächtnisprozessen beteiligt (Cybulska-Klosowicz et al. 2013). Darüber hinaus wurde eine Fehlfunktion dieser Neurone mit einer Reihe von Krankheiten wie Epilepsie, Schizophrenie, Angststörungen sowie Autismus verknüpft (Cossart et al. 2001; Noebels 2003; Levitt et al. 2004; Cobos et al. 2005; Gonzalez-Burgos und Lewis 2008). VIP-exprimierende Interneurone gehören zur großen Gruppe der GABAergen Interneurone. Rein morphologisch betrachtet sind sie zu 85–90 % bipolar (Connor und Peters 1984; Bayraktar et al. 2000), können jedoch auch als Korbzellen, Doppelbouquetzellen oder doppelt gebüschelte Zellen in Erscheinung treten (Markram et al. 2004). Sie werden zur Untergruppe jener inhibitorischen Neurone gezählt, die den ionotropen Serotonin-Rezeptor 5HT<sub>3a</sub> exprimieren (Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013; Staiger et al. 2015b; Tremblay et al. 2016). Interessanterweise handelt es sich bei lediglich 30 % aller GABAergen Interneurone um 5HT<sub>3a</sub>-exprimierende Neurone von denen nur 40 % das vasoaktive intestinale Polypeptid VIP exprimieren (Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011; Zeisel et al. 2015). Es handelt sich also um eine relativ kleine Neuronengruppe. Doch warum stellt sie trotzdem ein so großes Interesse für die Wissenschaft dar? Zum einen stellen kortikale VIP-Zellen Schlüsselemente bei der neurovaskulären Kopplung (Cauli et al. 2004) sowie bei der Regulation des neuronalen Energiestoffwechsels (Magistretti et al. 1998) dar. Was den kortikalen Schaltkreis betrifft, so wurde wiederholt nachgewiesen, dass VIP-Neurone bevorzugt auf mehrere andere Klassen von hemmenden Interneuronen abzielen (Staiger et al. 2004; David et al. 2007; Pfeffer et al. 2013; Walker et al. 2016). Dabei zeigen sie unregelmäßige Entladungsmuster (Cauli et al. 1997) und hemmen speziell SST- (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013) sowie PV-Zellen (David et al. 2007; Hioki et al. 2013). Sie vermitteln dabei eine Enthemmung, indem sie exzitatorische Hauptneurone von einer Hemmung befreien. Dieses Motiv der Disinhibition wurde sowohl im visuellen (Fu et al. 2014; Zhang et al. 2014), im auditorischen (Pi et al. 2013) sowie im primären somatosensorischen (*Barrel*) Kortex (Lee et al. 2013; Walker et al. 2016) beschrieben. Somit haben Neurone, die das vasoaktive intestinale Polypeptid exprimieren, einen Einfluss auf den Informationsfluss innerhalb und zwischen kortikalen Säulen (Silberberg und Markram 2007; Adesnik et al. 2012; Gentet et al. 2012; Kepecs und Fishell 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich im primären somatosensorischen Kortex die Inputs von VIP-exprimierenden Interneuronen im Vergleich zu anderen inhibitorischen GABAergen Interneuronen in ihren unitären Eigenschaften sowie der Kurzzeitplastizität unterscheiden (Walker et al. 2016).

#### 4.2.1 Stellt die *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mauslinie ein verlässliches Mausmodell zur Untersuchung von VIP-Neuronen dar?

Die Untersuchung von VIP-exprimierenden Interneuronen wurde durch die Züchtung transgener Mauslinien deutlich erleichtert. Die 2011 eingeführte *VIPcre-Driver*-Mauslinie versprach ein hohes Maß an Spezifität und Sensitivität für kortikale VIP-exprimierende Neurone (Taniguchi et al. 2011). Vor der 2011 eingeführten *Cre-Driver* Mauslinie verwendete man BAC-transgene Mauslinien, die jedoch den Nachteil hatten, dass sie VIP-Zellen entweder als Teil größerer Neuronenpopulationen markierten (ChAT-eGFP von Engelhardt et al. 2007; GAD65-eGFP oder G30 Xu and Callaway 2009; CR-eGFP Caputi et al. 2009; Miyoshi et al. 2010) oder unzuverlässig in der Expression des transgenen VIP-Signals waren (lediglich 75,4 %ige Kolokalisation in VIPeGFP; persönliche Mitteilung, Witte, Vortrag 2019). In den letzten 10 Jahren war die *VIPcre*-Maus Ausgangspunkt vieler Konnektivitätsstudien von VIP-Interneuronen ohne eine grundlegende Charakterisierung dieser Mauslinie für kortikale Regionen (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013; Fu et al. 2014; Zhang et al. 2014; Karnani et al. 2014). Erst vier Jahre später wurde für den *Barrel*-Kortex (S1BF) eine schichtenspezifische und schichtenunabhängige Analyse zur kortikalen Lage von VIP-Interneuronen, sowie zur Spezifität und Sensitivität der *VIPcre* Maus durchgeführt (Prönneke et al. 2015).

In der jetzigen Studie wurde zum einen die Spezifität und Sensitivität der *VIPcre*-Maus erneut untersucht, zum anderen wurde das Verteilungsprofil der VIP-Neurone zusätzlich auf den primären motorischen (M1) sowie auf den primären visuellen (V1) Kortex ausgeweitet. Diese Daten dienen zusätzlich als Vergleich für die Verteilung und Spezifität von VIP-Neuronen in Bezug auf die primären Kortexregionen M1, S1BF und V1 der *Reeler*-Maus. Zur Untersuchung der Spezifität und Sensitivität der *VIPcre/tdTomato/Reeler*-Maus wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit Sonden für die mRNA für VIP, GAD1 und VGLUT1 durchgeführt. In allen drei untersuchten Kortexarealen liegt eine sehr hohe Kolokalisation der *Vip*-Sonde mit den nativen tdTomato-positiven Zellen sowohl im WT- als auch in der *Reeler*-Maus vor. Die Kolokalisationsrate liegt im WT bei stets über 98 % und in *Reeler* sogar bei über 99 % (Abbildung 3.3). Des Weiteren lassen sich keine Unterschiede zwischen den Kortexarealen M1, S1 und V1 finden. Im Vergleich zu Prönneke et al. (2015) fällt die Kolokalisationsrate für die FISH der *Vip*-Sonde höher aus und befindet sich auf dem Niveau der Antikörper-Färbung gegen das VIP-Protein. Diese verbesserte Sensitivität der FISH war auch ein Grund, warum in dieser Studie auf zusätzliche IHC-Versuche verzichtet werden konnte. In einer qualitativen Versuchsreihe mit der *Gad1*-Sonde und der *Vglut1*-Sonde konnten für die kortikalen Regionen M1, S1BF und V1 sowie für die Mausgenotypen WT- und *Reeler* eine durchgängige

Kolokolisation mit *Gad1* und keine Überlagerung mit *Vglut1* beobachtet werden. Diese Beobachtungen stimmen mit vorherigen quantitativen Studien im *Barrel*-Kortex überein (Prönneke et al. 2015). Dies schließt die Vermutung aus, dass möglicherweise einige VIP-Neurone exzitatorisch sind (von Engelhardt et al. 2007; Wouterlood et al. 2008). Demzufolge konnte zweifelsfrei belegt werden, dass es sich bei den tdTomato-Zellen der *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus in den drei untersuchten Kortexbereichen M1, S1BF und V1 ausschließlich um inhibitorische VIP-exprimierende Interneurone handelt. Damit kommt es durch die Kreuzung der *VIPcre* Maus mit der *Reeler*-Mausmutante zu keiner Reduktion der Spezifität sowie Sensitivität für VIP-Neurone.

#### 4.2.2 Verteilung der VIP-exprimierenden Interneurone

Infolge der ausgezeichneten Sensitivität und Spezifität der *VIPcre/RosaTomato/WT*- sowie der *VIPcre/tdTomato/Reeler*-Mauslinie im primären motorischen (M1), im primären somatosensorischen (S1, S1BF) und im primären visuellen (V1) Kortex, konnte für die nachfolgenden Auswertungen angenommen werden, dass es sich bei den rot fluoreszierenden tdTomato-Zellen ausschließlich um VIP-exprimierende Interneurone handelt. Die tdTomato-Zellen wurden manuell ausgezählt und mittels eines Scriptes in RStudio in 20 Bins (Bin 1 unter der *Pia mater*) einsortiert. Um die computergestützte Analyse zu verifizieren, wurden die erhobenen Daten für S1BF der WT-Maus mit der vorangegangenen schichtenunabhängigen Analyse für den *Barrel*-Kortex von Prönneke et al. (2015) verglichen und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Infolgedessen konnte die absolute Zellzahl (Abbildung 3.7), die Zellzahlen für jedes Bin (Abbildung 3.11-3.13) sowie die prozentuale Verteilung (Abbildung 3.4-3.6) pro Bin bestimmt werden.

In der WT- und in der *Reeler*-Maus sind VIP-Neurone in allen Bins und demnach in allen Schichten von M1, S1 und V1 zu finden. Jedoch gibt es hinsichtlich ihrer Verteilung klare Unterschiede. Im Wildtyp kommen VIP-exprimierende Interneurone bevorzugt im oberen Drittel (Bin 1–6) in allen drei untersuchten Kortexregionen M1, S1BF und V1 vor, was im WT der Schicht 2/3 entspricht. Insgesamt sind hier etwa 60 % der VIP-Zellen lokalisiert mit einem Maximalwert von 17,2 % in Bin 3 von S1BF, 19,2 % in Bin 3 von M1 und 16,5 % in Bin 4 von V1. Vorangegangene Studien (Prönneke et al. 2015; He et al. 2016) im *Barrel*-Kortex sowie in M1 und V1 (Xu et al. 2010; Fazzari et al. 2020) bestätigen diese Ergebnisse. Das prozentuale Verteilungsmuster der VIP-Zellen stimmt im Wildtyp in M1, S1 sowie V1 weitestgehend überein (vgl. Abbildung 3.4, Abbildung 3.5, Abbildung 3.6). Demnach lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die hier erhobenen Befunde auf eine generelle Präferenz der VIP-Zellen, unabhängig der kortikalen Region, auf die supragranulären Schichten im WT hindeuten.

In der *Reeler*-Maus sind die Zellen, die das vasoaktive intestinale Polypeptid exprimieren nicht präferenziert verteilt, eher im Gegenteil. In allen drei kortikalen Regionen M1, S1BF und V1 sind die VIP-Zellen über viele Bins annähernd gleichverteilt. So weisen in M1 der *Reeler*-Maus 15 Bins und in S1BF sowie in V1 14 Bins mehr als 4 % aller VIP-Zellen auf (Anhang, Tabelle 7.1). Insgesamt sind 86–89 % der VIP-Zellen in diesen 14 bzw. 15 Bins verteilt. Der Maximalwert der prozentualen Verteilung liegt für M1 mit 8,2 % in Bin 4, für S1BF mit 7,6 % ebenfalls in Bin 4 und für V1 mit 8,0 % in Bin 5 zwar ebenfalls im oberen Drittel der Kortexdicke, jedoch sticht dieser Wert nicht so prominent wie bei der WT-Maus heraus. Des Weiteren kommen im oberen Drittel des Kortex signifikant weniger und im unteren Drittel signifikant mehr VIP-Zellen in der *Reeler*-Maus vor (Anhang, Tabelle 7.1). Im Vergleich der Regionen M1, S1BF und V1 innerhalb der *Reeler*-Maus sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen, was analog zum Wildtyp, auf keine prinzipielle regionenabhängige Verteilung der VIP-Zellen hindeutet. Der beobachtete zweite Maximalwert in V1, in tiefer gelegenen Bins (Bin 14 mit 7,4%), steht zwar offensichtlich im Gegensatz zum stetigen Abfall der prozentualen Verteilung in M1 und S1BF, ist jedoch nicht statistisch signifikant (siehe 4.2.3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die VIP-exprimierenden Interneurone in der *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus in allen drei kortikalen Bereichen signifikant unterschiedlich zur WT-Maus lokalisiert sind. Während die VIP-Zellen in der WT-Maus eine klare Präferenz für das obere Drittel bzw. die supragranulären Schichten zeigen, liegen die VIP-Zellen in der *Reeler*-Maus nahezu gleichmäßig über die gesamte Kortexdicke verteilt vor. Der Hauptunterschied beider Genotypen liegt in ihrer unterschiedlichen Schichtung bzw. Anordnung exzitatorischer Zellen im Kortex. Ob kortikale Schichten ein entwicklungs-dynamisch bedingtes strukturelles Epiphänomen darstellen oder eine funktionell wichtige Modularisierung kortikaler Berechnungsvorgänge sind, ist bislang noch nicht ausreichend erforscht (Guy et al. 2017). Der Neokortex der Wildtyp-Maus zeigt die klassische Gliederung in sechs Schichten (Zilles und Wree 1995; Skoglund et al. 1997; Lein et al. 2007; Feldmeyer 2012; Staiger et al. 2015a). Im Gegensatz zur geordneten kortikalen Schichtung der Wildtyp-Maus zeigt *Reeler* keinerlei Einteilung des Kortex in eine Art Schichtenmodell (Falconer et al. 1951; Hamburg 1960; D'Arcangelo et al. 1999; Hiesberger et al. 1999; Howell et al. 1999; Keshvara et al. 2001; Bock und Herz 2003). Dennoch konnte wiederholt nachgewiesen werden, dass sämtliche Zelltypen, die normalerweise in jenen Schichten zu finden sind, auch im Kortex der *Reeler*-Maus existieren (Caviness und Sidman 1973; Stanfield und Cowan 1979; Boyle et al. 2011). Das erstaunliche daran ist, dass jene mutierte Maus trotz dieser Defizite ein erstaunlich normales Verhalten zeigt (Hamburg 1960; Myers 1970; Sinex et al. 1979; Salinger et al. 2003; Wagener et al. 2010; Pielecka-Fortuna et al. 2015; Guy und Staiger 2017). Der Grund für das Fehlen einer Schichtung

im *Reeler*-Kortex ist allem Anschein nach die Abwesenheit des Glykoproteins Reelin (D'Arcangelo et al. 1999; Hiesberger et al. 1999; Howell et al. 1999; Keshvara et al. 2001; Bock und Herz 2003). Demnach scheint Reelin einen entscheidenden Einfluss auf die Anordnung sämtlicher Neuronentypen in Schichten zu haben und somit auch einen entscheidenden Einfluss auf die Positionierung von VIP-exprimierenden Interneuronen. Eine weitere wesentliche Rolle bei der Steuerung der Migration spielen radiale Gliafasern. Sie dienen als Leitstrukturen, die exzitatorische Neurone der Schichten 5 bis 2/3 benutzen, um ihren endgültigen Standort zu erreichen (Mingo-Moreno 2018). Es ist bereits bekannt, dass Reelin auch die Entwicklung radialer Gliafasern beeinflusst (Weiss et al. 2003; Chai et al. 2015) und diese demnach auch in *Reeler* verändert vorliegen (Hunter-Schaedle 1997; Hartfuss et al. 2003). In früheren Arbeiten wurde darauf hingewiesen, dass VIP-Zellen sich zum Zeitpunkt der Geburt des Tieres (P0) in der *Cortical plate* befinden und von dort strikt radial Richtung *Pia mater* wandern (Taniguchi et al. 2011). Es ist anzunehmen, dass auch sie für ihren Wanderungsprozess die radialen Gliafasern nutzen. Demnach könnte ein gestörtes Gliagerüst ebenfalls zu Komplikationen bei der Migration führen, die sich in einer abnormalen neuronalen Lage der VIP-Zellen im Kortex niederschlagen könnte.

In einer weiteren Analyse dieser Arbeit wurde die Gesamtanzahl der VIP-Zellen in den drei untersuchten kortikalen Arealen beider Mausgenotypen betrachtet. Dabei weist lediglich der primäre motorische Kortex in der *Reeler*-Maus signifikant mehr VIP-Zellen, im Vergleich zum S1- und V1-*Reeler* Kortex sowie zu allen drei Kortexarealen der WT-Maus auf. Die Gründe konnten im Rahmen dieser Studie nicht eingehender untersucht werden. Allerdings wurde neben der Anzahl der VIP-Zellen ebenfalls die kortikale Dicke in den Arealen bestimmt. Dabei lässt sich eine Abnahme der kortikalen Dicke von rostral (M1) über parietal (S1BF) nach kaudal (V1) eindeutig nachweisen. Mit ca. 1100  $\mu\text{m}$  ist M1 signifikant dicker als S1 mit ca. 900–1000  $\mu\text{m}$  und V1 mit ca. 700  $\mu\text{m}$ . Dieser Befund trifft sowohl für die WT-Maus als auch für die *Reeler*-Mutante zu, wobei zwischen den Maus-Genotypen keine Unterschiede auftreten. Demzufolge liegt die Ursache der vermehrt vorkommenden VIP-Zellen in M1 der *Reeler*-Maus nicht an der kortikalen Dicke, sonst würden generell im primären motorischen Kortex mehr VIP-Interneurone vorkommen. Die *Reeler*-Maus ist phänotypisch durch motorische Defizite gekennzeichnet, wohingegen die sensorische Informationsverarbeitung sowie die kognitiven Fähigkeiten als Wildtyp-ähnlich beschrieben sind (Salinger et al. 2003; Wagener et al. 2010; Pielecka-Fortuna et al. 2015; Imai et al. 2017; Hafner et al. 2021). Weiterhin wird angenommen, dass das Fehlen von Schichten zu einer alternativen Konnektivität führt, um die sensorischen sowie die kognitiven Fähigkeiten in der *Reeler*-Maus weitestgehend aufrecht zu erhalten (Salinger et al. 2003; Wagener et al. 2010; Pielecka-Fortuna et al. 2015; Hafner et al. 2021). Bei der

Konnektivität von VIP-Neuronen geht man davon aus, dass VIP-Zellen im Vergleich zu anderen GABAergen Neuronen mehr *Input* pro Zelle erhalten (Wall et al. 2016) und im Gegensatz zu pyramidalen und SST- sowie PV-exprimierenden Neuronen stärker durch kortikalen Langstrecken-*Input* aktiviert werden (Lee et al. 2013; Zhang et al. 2014). Hafner et al. konnte 2021 ebenfalls nachweisen, dass VIP-Zellen im *Barrel*-Kortex von WT- sowie *Reeler*-Mäusen von den gleichen Quellen innerviert werden. Guy und Staiger (2017) stellten die Hypothese auf, dass „trotz aller relevanten Beeinträchtigungen, die das Fehlen von Reelin auf verschiedenen Ebenen der neuronalen sowie der Schaltkreisentwicklung verursachen kann, vermutlich kompensatorische Mechanismen in Aktion treten, um die Entstehung funktioneller Schaltkreise zu gewährleisten. Die Erhaltung kognitiver Fähigkeiten wurde bisher immer der Tatsache zugeschrieben, dass die Neurone in *Reeler* nicht nur ihre physiologischen Eigenschaften, sondern auch ihre Konnektivität beibehalten, was die Bildung ähnlicher bzw. gleicher Schaltkreise trotz Fehllaminierung impliziert“ (Guy und Staiger 2017).

Vergleicht man die Anzahl der VIP-Zellen und die kortikalen Dicken, so kommt man zu dem Fazit, dass die Dichten der VIP-Zellen im visuellen Kortex deutlich höher ausfallen. Es ist bisher nicht bekannt inwieweit das für alle Substypen von GABAergen Interneuronen zutrifft. Hier müssen weitergehende Studien zeigen, ob es in sensorischen Arealen generell mehr GABAerge Interneurone gibt oder ob lediglich der Anteil der VIP-Zellen höher ist. In den bisherigen Studien deutet vieles auf regionale Unterschiede hin, da der Anteil der GABAergen Interneurone an der Gesamtzahl der Neurone zwischen 12 und 30 % liegt (Markram et al. 2004; Rudy et al. 2011; De Felipe et al. 2013; Staiger et al. 2015b; Tremblay et al. 2016; Feldmeyer et al. 2018). Auch der Anteil von VIP-Zellen an den GABAergen Subtypen, ist mit 12–17 % (Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013; Staiger et al. 2015b) regional verschieden.

Dennoch sind weiterführende Studien zur Verteilung von GABAergen Interneuronen, insbesondere in der *Reeler*-Maus, notwendig, um bestehende Konnektivitätsschemata sowie deren physiologischen Effekt besser verstehen zu können. Letzendlich ist zu erwarten, dass die Verwendung der *Reeler*-Maus als Modell für neurologische Erkrankungen durch diese Erkenntnisse beschleunigt wird. Reelin und sein assoziierter Signalweg wurden als wichtiger Einfluss bei Entwicklungsstörungen wie Lissenzephalie, Autismus oder Schizophrenie vorgeschlagen. Diese Entwicklungsstörungen weisen ebenfalls offensichtliche Fehlbildungen des *Corpus callosum* auf (Fenlon und Richards 2015; Ishii et al. 2016; Romero et al. 2018). Die *Reeler*-Maus wurde bereits zur Modellierung dieser Erkrankungen eingesetzt und könnte helfen, Mechanismen zu verstehen, die zu störungsbedingten Konnektivitätsveränderungen führen.



### 4.2.3 Folgen inhibitorische VIP-Zellen der Verteilung exzitatorischer RGS8-Zellen?

Bereits vor 40 Jahren konnte in einem entscheidenden Experiment zur Bestimmung des Zell-Geburtsdatums gezeigt werden, dass im *Reeler*-Kortex frühgeborene Neuronen in den pianahen Abschnitten angeordnet sind, während spätgeborene Neuronen die weiße Substanz-nahen Abschnitte besetzen (Caviness et al. 1982a). Dies führte zur Schlussfolgerung, dass der *Reeler*-Kortex umgekehrt oder nach außen gekehrt aufgebaut ist. Seitdem gilt er als invertiert. Der Begriff des invertierten *Reeler*-Kortex hat sich in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bis heute hartnäckig gehalten (Gupta et al. 2002; Tissir et al. 2002; Cooper 2008; Chai und Frotscher 2016; Jiang und Nardelli 2016), obwohl es klare Indizien dagegen gibt (Dekimoto et al. 2010; Wagener et al. 2010; Boyle et al. 2011). Ein Problem all dieser Untersuchungen stellt jedoch die Tatsache dar, dass jene Modelle die Ergebnisse aus verschiedenen phylogenetischen Hirnstrukturen kombinieren (Kortex, Hippocampus, Kleinhirn, Rückenmark). Jedoch unterscheiden sich deren Entwicklung und zytoarchitektonische Organisation stark voneinander. Hinzu kommt, dass Studien, die sich auf die Zellmigration im *Reeler*-Kortex konzentrieren, oft keine Unterteilung in Unterregionen, wie die primären somatosensorischen Areale (wie M1 und S1) oder die primären sensorische Areale (wie V1 und A1), berücksichtigen. Aufgrund der allgegenwärtigen These, dass der Migrationsprozess durch das Fehlen von Reelin gestört ist, kommt es zur Vereinheitlichung kortikaler Areale mit dem Fazit einer Umkehrung des *Inside-out*- zu einem *Outside-in*-Modell in *Reeler*. Eine aktuelle Studie (Mingo-Moreno 2018) in unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch nachweisen, dass es einen Gradienten dieser Modelle von rostral nach kaudal in der *Reeler*-Maus gibt. Mittels verschiedener Lamina-Fate-Marker für die Schichten 1 bis 6 wurden ein eher wildtypähnlicher Phänotyp im primären motorischen Kortex (M1), ein *Sandwich*-Phänotyp im primären somatosensorischen Kortex (S1) und der beschriebene invertierte Phänotyp im visuellen Kortex (V1) identifiziert. Diese Studie stellte die Grundlage der hier durchgeführten Versuche und Analysen dar.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollte ein erster Beitrag geleistet werden, inwieweit sich inhibitorische GABAerge Interneurone an exzitatorischen Neuronen im finalen Abschnitt ihrer Migration orientieren. Im vorherigen Paragraph wurde beschrieben, dass VIP-Zellen in der *Reeler*-Maus, im Gegensatz zur WT-Maus, fast gleichmäßig über die gesamte Kortexdicke verteilt vorkommen. Mit Hilfe des Lamina-Fate-Marker *Rgs8* sollte eine mögliche Ursache für die Dislokalisierung gefunden werden und folgender Frage nachgegangen werden: Folgen die inhibitorische VIP-Zellen der Verteilung exzitatorischer RGS8-Zellen in der *Reeler*-Maus? Dazu wurde die absolute Verteilung der VIP-Zellen dem Fluoreszenzprofil der *Rgs8*-positiven Zellen in der WT- und der *Reeler*-Maus gegenübergestellt (Abbildung 3.11-Abbildung 3.13). *Rgs8*-positive Zellen entsprechen Zellen, die zum Zeitpunkt der Geburt (um E14.5) späterer

exzitatorischer Schicht 2/3-Zellen angelegt werden und während der Migration zu ihrer endgültigen Lage in der *cortical plate* wandern (Mingo-Moreno 2018). In den kortikalen Arealen M1, S1BF und V1 der WT-Maus ist ein prominenter *Peak* im Fluoreszenzprofil der *Rgs8*-positiven Zellen im oberen Drittel (Bin 2–6) der kortikalen Dicke zu erkennen (Abbildung 3.11-Abbildung 3.13). Anhand der Bin-Verteilung und Schichtenzuweisung in der VIPcre-Maus für den *Barrel*-Kortex liegt der *Peak* im Bereich der kortikalen Schicht 2/3 (Prönneke et al. 2015). Dies deckt sich hervorragend mit dem Fluoreszenzprofil der RGS8-Zellen als Lokalisator exzitatorischer Schicht 2/3 Zellen. Des Weiteren stimmen die Fluoreszenzprofile in allen drei untersuchten kortikalen Arealen mit den bereits durchgeführten manuellen Zellzählungen anhand von FISH Färbungen überein (Mingo-Moreno 2018). Daher kann die Fluoreszenz der *Rgs8*-positiven Zellen als Marker für die kortikale Position für Schicht 2/3-Zellen angesehen werden. Aus den Abbildung 3.11 A für M1, Abbildung 3.12 A für S1BF und Abbildung 3.13 A für V1 wird klar ersichtlich, dass es eine sehr gute Überlappung der Verteilung der VIP-Zellen mit dem RGS8-Fluoreszenzprofil gibt. Insgesamt liegen im WT mehr als 60 % der VIP-Zellen im Bereich der RGS8-Zellen (Bin 2–7). Lediglich der primäre visuelle Kortex ist analog zur Verteilung der VIP-Zellen im RGS8-Fluoreszenzprofil um einen Bin zur weißen Substanz verschoben und zeigt einen breiteren *Peak* (1–2 Bins) im Vergleich zu M1 und S1BF. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es zwischen den einzelnen kortikalen Bereichen Unterschiede bezüglich der Größenverhältnisse der einzelnen Schichten gibt (De Felipe et al. 2002). So weist V1 scheinbar eine dickere Schicht 1 und Schicht 2/3 als M1 bzw. S1 auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Messung der Schichtendicken durchgeführt, jedoch sind alle Schnitte mit DAPI gefärbt worden und könnten in nachfolgenden Studien genutzt werden, um den kortikalen Schichtenaufbau in den Regionen genauer zu untersuchen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der primäre visuelle Kortex signifikant dünner ist, als die rostraler gelegenen Areale S1 und M1. Demzufolge würde bei einer dünneren kortikalen Dicke und einer breiteren Schicht 2/3 in V1, die Schicht 2/3 einen größeren Anteil am 6-schichtigen Aufbau besitzen. Aufgrund der umfangreichen Verschaltung des visuellen Kortex in sekundäre Areale, wie den sekundären visuellen, somatosensorischen und auditorischen Kortex, sowie assoziative Kortexareale, durch Assoziationsfasern und Kommissurfasern, deren Ursprung vornehmlich die Pyramidenzellen in Schicht 2/3 darstellen, könnte dies zutreffend sein.

Betrachtet man die Verhältnisse in der *Reeler*-Maus, so wird für den primären motorischen und den somatosensorischen Kortex eine gleichmäßige Verteilung sowohl von VIP-Zellen als auch von *Rgs8*-positiven Zellen über die gesamte Kortexdicke deutlich. Dagegen zeigen beide Zellpopulationen im visuellen Kortex der *Reeler*-Maus eine nicht überlappende Verteilung. Während die VIP-Zellen analog zu M1 und S1 gleichmäßig verteilt vorkommen, sind die *Rgs8*-

positiven Zellen auf die tieferen Kortexabschnitte beschränkt. Damit weist das RGS8-Fluoreszenzprofil im V1 *Reeler*-Kortex auf eine Invertierung der exzitatorischen Schicht 2/3-Neurone hin. Diese Beobachtung entspricht der klassischen Ansicht über den Aufbau des *Reeler*-Kortex (Gupta et al. 2002; Tissir et al. 2002; Cooper 2008; Chai und Frotscher 2016; Jiang und Nardelli 2016). Allerdings trifft dies lediglich für V1 zu, denn die nahezu gleichmäßige Verteilung der Rgs8-positiven Zellen in M1 und S1 steht dieser verallgemeinernden Behauptung entgegen. Bereits in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe (Mingo-Moreno 2018) konnten für M1 und S1 keine Beweise hinsichtlich einer Invertierung des gesamten *Reeler*-Kortex gefunden werden. Die in der jetzigen Arbeit erhobenen Daten zur Verteilung der Rgs8-positiven Zellen verdeutlichen erneut, dass ein ausschließlich invertiertes Muster der kortikalen Neurone eine zu starke Vereinfachung darstellt, die weit davon entfernt ist, die Komplexität des Reelin-defiziten Kortex zu repräsentieren (Mingo-Moreno 2018). Die Verteilung der VIP-Zellen in der *Reeler*-Maus verhält sich ebenfalls nicht nach der klassischen Lehrmeinung eines invertierten Kortex. Die VIP-Zellen sind in allen drei untersuchten Arealen gleichmäßig verteilt und weisen zudem keine signifikanten Unterschiede zueinander auf. Es treten lediglich Tendenzen auf, die weiter untersucht werden sollten. So kommen die meisten VIP-Zellen in M1 und S1 in den Bins 4 und 5 vor, wohingegen in V1 neben Bin 5 die zweitmeisten VIP-Zellen in Bin 14 lokalisiert sind. Die Beobachtung eines zweiten *Peaks* der VIP-Zellen in V1-*Reeler* könnte durch die Invertierung der kortikalen Schicht 2/3 und dessen exzitatorischer Zellen hervorgerufen werden. Um diesen Effekt zu untersuchen, sind in den nächsten Jahren weitere Studien zur Verteilung von PV- und SST-exprimierenden Neuronen im *Reeler*-Kortex geplant.

Letztendlich lässt sich schlussfolgern, dass sich die inhibitorischen VIP-Zellen nicht ausschließlich aber weitestgehend an den supragranulär vorkommenden exzitatorischen Rgs8-positiven Zellen orientieren. Die Invertierung der Rgs8-positiven Zellen im primären visuellen Kortex von *Reeler* führt interessanterweise nicht zu einer vollständigen Invertierung der Lage der VIP-Zellen. Dies deutet aber darauf hin, dass sich zumindest dort VIP-Neurone nicht ausschließlich an exzitatorischen RGS8-Zellen orientieren. Es müssen weitere molekulare Mechanismen, wie beispielsweise eine Interaktion mit anderen Interneuronen, die für diese unterschiedliche zelluläre Verschiebung von VIP-exprimierenden GABAergen Interneurone im sich entwickelnden Neokortex sorgen, vorhanden sein. Schlussendlich scheint die genaue Lage von Zellen im Kortex weniger entscheidend für die Wahrnehmung, das Lernen und das Gedächtnis bei der *Reeler*-Maus zu sein. Obwohl einige Verhaltensanomalien berichtet wurden scheinen diese eher die soziale und emotionale Funktion als die sensorische Schärfe zu betreffen (Sailinger et al. 2003). *Reeler*-Mäuse zeigen trotz ihres desorganisierten Kortex ein breites und insgesamt normales Spektrum an Verhaltensweisen, sobald sie erwachsen sind, einschließlich

der Paarung (Myers 1970), trotz bemerkenswerter Verzögerungen in der sensomotorischen und sozialen Entwicklung (Romano et al. 2013). Die bisher wahrscheinlich umfangreichste Verhaltensstudie zu *Reeler* kam außerdem zu dem Schluss, dass trotz Anomalien im Sozialverhalten und reduzierten Angstzustände die sensorischen Funktionen dieses Maustyps weitestgehend normal sind (Salinger et al. 2003). Die sensomotorischen Funktionen scheinen ebenfalls nicht beeinträchtigt zu sein (Wagener et al. 2010) genau wie sämtliche visuelle Funktionen (Sinex et al. 1979; Pielecka-Fortuna et al. 2015). Nach früheren Studien (Caviness und Sidman 1973; Stanfield und Cowan 1979; Boyle et al. 2011) können alle Hauptklassen von kortikalen Neuronen im adulten Kortex von *Reeler* nachgewiesen werden und ihre relativen Anteile entsprechen denen, die in Wildtyp-Tieren gefunden wurden. Es hat also den Anschein, dass der Verlust der kortikalen Laminierung die kortikale Funktion in kaum einer erkennbaren Weise beeinträchtigt und dass die Schichten in der Tat intakt bleiben. Guy und Staiger (2017) vertreten die Ansicht, dass Schichten als solche keine Funktion im Zusammenhang mit der Informationsverarbeitung haben, obgleich sie nicht ausschließen, dass sie anderen Zwecken dienen könnten.

### 4.3 Funktionelle Relevanz

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Charakterisierung der *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Mauslinie in den kortikalen Regionen M1, S1BF und V1 durchzuführen. Als Vergleich diente die *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mauslinie, die bisher lediglich für S1BF umfassend beschrieben wurde (Prönneke et al. 2015). In dieser Arbeit sollte nachgewiesen werden, dass es sich bei den fluoreszenten tdTomato-positiven Zellen ausschließlich um VIP-exprimierende Zellen handelt. Dies konnte durch die *Vip*-Sonde mit Hilfe einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung für alle drei untersuchten Kortexregionen der *Reeler*-Mutante sowie für die WT-Maus mit durchschnittlich 99,3 % bzw. 99,0 % zweifelsfrei belegt werden. Doch warum ist der Nachweis, dass es sich bei den nativen tdTomato-positiven Zellen tatsächlich um jene Zellen handelt, die das vasoaktive intestinale Polypeptid exprimieren, überhaupt so wichtig?

Bisher wurden lediglich für den *Barrel*-Kortex (S1BF) die Spezifität sowie die Sensitivität der *VIPcre*-Maus für VIP-Zellen nachgewiesen. Untersuchungen in anderen kortikalen Regionen und insbesondere nach der Kreuzung mit der *Reeler*-Maus fehlten bislang. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse können die VIP/tdTomato-Zellen mittels FISH, IHC oder auch anderen färbetechnischen Untersuchungen weiter immunhistochemisch untersucht werden. Besonders für elektrophysiologische Untersuchungen sind eine solche Charakterisierung eines Mausmodells sowie die Sicherheit, dass es sich bei den fluoreszenten Zellen ausschließlich um VIP-Zellen handelt von entscheidender Bedeutung. Ableitungen können dadurch auch ohne

aufwendige *single-cell* Transkriptom-Analysen den VIP-Zellen zugeordnet werden (Lipovsek et al. 2021) und eine tiefgreifende elektrophysiologische Charakterisierung begünstigen, wie sie für die VIP-Zellen im *Barrel*-Kortex durchgeführt worden ist (Prönneke et al. 2015). Ebenfalls von Vorteil sind diese Ergebnisse für optogenetische Studien, in denen die Projektionen von VIP-Zellen untersucht werden bzw. wurden (David et al. 2007; Hioki et al. 2013; Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Walker et al. 2016). Letztlich ist die Aussagekraft dieser Experimente, neben der Spezifität des eingesetzten Cre-abhängigen Virus, hauptsächlich von einer hohen Verlässlichkeit des verwendeten Mausmodells abhängig. Dies gilt in gleicher Weise für durchgeführte *Tracing* Studien, bei denen die VIP-Zellen Ziel- bzw. Ausgangszellen darstellen (Wall et al. 2016; Hafner et al. 2021). Ergebnisse von unspezifischen und unsensitiven Mausmodellen verfälschen Ergebnisse, führen zu falschen Resultaten sowie zu fehlerhaften Schlussfolgerungen. Diese Studie hat zur Verlässlichkeit der Forschung mit der VIPcre-Maus beigetragen und stellt insbesondere für weitere Untersuchungen der *Reeler*-Maus einen entscheidenden Vorteil dar. Die hohe Spezifität und Sensitivität der *VIPcre/tdTomato/Reeler*-Mauslinie für VIP-Zellen kann in zukünftigen Experimenten zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf die Morphologie sowie die Elektrophysiologie von VIP-Zellen und deren Verschaltungsmustern im neuronalen Netzwerk in einem desorganisierten Kortex führen. Innerhalb dieser Studie konnte nun eine schichtenunabhängige Untersuchung der *Reeler*-Maus im Hinblick auf die Verteilung von VIP-Zellen durchgeführt werden.

Die schichtenunabhängige Verteilung von VIP-exprimierenden GABAergen Interneuronen in den verschiedenen Regionen des Wildtyp- sowie des *Reeler*-Kortex stellte das Hauptziel dieser Arbeit dar. Schichtenunabhängig deswegen, weil der *Reeler*-Kortex keinerlei Gliederung in Schichten aufweist und so die Verteilung der VIP-Zellen in *Reeler* und im Wildtyp in den jeweiligen Kortexarealen überhaupt erst verglichen werden konnte. Im Neokortex der WT-Maus wurden die meisten VIP-exprimierenden-Zellen in den supragranulären Bereichen (entsprechend Schicht 2/3) unabhängig des kortikalen Areals (M1, S1BF und V1) nachgewiesen. Im *Reeler*-Kortex dagegen konnte keine bevorzugte Lage von VIP-Zellen beobachtet werden. In den kortikalen Arealen (M1, S1BF und V1) der *Reeler*-Maus kamen die VIP-Zellen überwiegend gleichverteilt über die kortikale Dicke vor. Eine charakteristische Zellverteilung hat vermutlich Auswirkungen auf das Verschaltungsmuster von Zellen. Sie kann aber auch Hinweise auf eine eventuelle Abhängigkeit hinsichtlich der Lage verschiedener Zellpopulationen zueinander geben. VIP-Zellen sind in disinhibitorische Schaltkreise eingebunden (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013; Fu et al. 2014; Zhang et al. 2014; Walker et al. 2016) und besitzen im WT einen überwiegend bipolaren Dendritenbaum, sowie ein ausgeprägtes absteigendes Axon (Prönneke et al. 2015). Über die detaillierte Morphologie

von VIP-Zellen in der *Reeler*-Maus ist bislang noch nichts bekannt. Für das Verschaltungsmuster der VIP-Zellen in den sensorischen Arealen (S1 und V1) ist anzunehmen, dass es unverändert auch in der *Reeler*-Maus existiert, da keine besonderen Auffälligkeiten in der somatosensiblen und visuellen Informationsverarbeitung beschrieben worden sind (Lemmon und Pearlman 1981; Simmons et al. 1982; Guy et al. 2015; Pielecka-Fortuna et al. 2015; Guy und Staiger 2017). Ob das für die *Reeler*-Maus beschriebene motorische Defizit ausschließlich durch eine veränderte Lage der VIP-Zellen oder durch eine erhöhte Anzahl an VIP-Zellen ausgelöst wird, darf bezweifelt werden. Hier müssen weitere Untersuchungen stattfinden, die sich aller Subtypen von GABAergen Interneuronen annehmen. Daneben hat das vasoaktive intestinale Polypeptid im Gehirn einen Einfluss auf Vasodilatation, Hypotonie sowie Hypotension. Damit hat es einen entscheidenden Einfluss auf die zerebralen Blutgefäße (Said und Mutt 1970). Inwieweit eine veränderte Lage der VIP-Zellen die radialen Gefäße und damit insbesondere die Sauerstoffversorgung verändert, bleibt spekulativ. Aufgrund der Lage der Zellkörper von VIP-Zellen lassen sich keine Aussagen über eine veränderte lokale Ausschüttung von VIP treffen.

Eine mögliche Ursache für die gleichmäßige Verteilung der VIP-exprimierenden Neurone im Kortex der *Reeler*-Maus wurde mit Hilfe einer *Rgs8*-Sonde in der FISH untersucht. Es galt der Hypothese nachzugehen, ob und inwiefern tangential wandernde inhibitorische VIP-Zellen den radial aufsteigenden exzitatorischen Zellen in der Endphase ihrer Entwicklung folgen. Dabei deutet sich an, dass die VIP-Zellen sich scheinbar an den exzitatorischen *Rgs8*-positiven Zellen orientieren. Jedoch muss es ebenso weitere Mechanismen zur final ebenfalls radiären Migration von VIP-Zellen im Neokortex geben. Es ist bekannt, dass die neuronalen Migrationsrouten während der embryonalen Hirnentwicklung komplex sind und eine präzise Zell-intrinsische wie auch -extrinsische molekulare Koordination erfordern (Marin et al. 2010). Neurone auf ihrem Weg zum Kortex sind der Reorganisation des Zytoskeletts, den zellulären Organellen und Zelloberflächenproteinen unterworfen (Ayala et al. 2007; Cooper 2013). Diese Ereignisse führen zu morphologischen Umlagerungen und Polaritätsänderungen, die die Richtung der Migration eines bestimmten Neurons bestimmen. Es ist nicht überraschend, dass Reelin vermutlich eines der extrazellulären Proteine ist, die diese und andere Schlüsselereignisse der radialen Migration steuern (Curran und D'Arcangelo 1998; Rice und Curran 2001; Frotscher und Zhao 2010). Jedoch ist anzunehmen, dass Reelin nicht das einzige Schlüsselprotein darstellt. Es ist mit Sicherheit interessant, inwiefern die Positionsveränderung der VIP-Zellen zu einer morphologischen Veränderung der VIP-Zellen beiträgt. Diese könnte insbesondere durch die Suche der VIP-Zellen nach ihren Zielzellen begründet sein sowie durch die Aufrechterhaltung des „genetisch vorgegebenen Verschaltungsschematas“. Bevor die Wanderung der GABAergen Interneurone, insbesondere in ihrer Endphase, abschließend geklärt werden kann, müssen

---

vorher die molekularen Prozesse für die radiale Wanderung von exzitatorischen Zellen (85 % der kortikalen Neurone) umfassender untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Inhibitorische GABAerge Interneurone sind mit ca. 15–20 % (Staiger et al. 2015b) den exzitatorischen Nervenzellen im Neokortex von Mäusen zahlenmäßig deutlich unterlegen. Lediglich etwa 12–17 % dieser GABAergen Neurone exprimieren das vasoaktive intestinale Polypeptid, kurz VIP, (Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013) und kommen mit rund 60 % vorwiegend in der Schicht 2/3 des *Barrel*-Kortex von WT-Mäusen vor (Prönneke et al. 2015). Bisher ging man davon aus, dass eine Gliederung des Neokortex in sechs Schichten essentiell für dessen Funktionen ist. Die *Reeler*-Maus weist, trotz fehlender sechsschichtiger Gliederung ihres Neokortex, außer einigen motorischen Defiziten, keine schweren Verhaltensauffälligkeiten auf (Hamburgh 1960; Guy et al. 2017). Um den Grund dafür besser nachvollziehen zu können, und zu verstehen inwieweit GABAerge Interneurone dabei eine Rolle spielen, wurde die Verteilung der VIP-exprimierenden Neurone im Neokortex der *Reeler*-Maus genauer analysiert. Dafür wurden die kortikalen Regionen primärer motorischer Kortex (M1), *Barrel*-Kortex (S1BF, als Teil des primären somatosensorischen Kortex) sowie der primäre visuelle Kortex (V1) von *VIPcre/RosaTomato/Reeler*- Mäusen und zum Vergleich von *VIPcre/RosaTomato/WT*-Mäusen untersucht. Neben der Verteilung der mit dem fluoreszenten tdTomato-Protein markierten VIP-Zellen wurde eine schichtenunabhängige Charakterisierung mit Hilfe einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung für die molekularen Marker: vasoaktives intestinales Polypeptid (*Vip*), Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*), vesikulärer Glutamattransporter 1 (*Vglut1*) und der Regulator der G-Protein-Signalübertragung 8 (*Rgs8*) an Hirnschnitten durchgeführt.

Die Ergebnisse belegen in allen drei untersuchten kortikalen Arealen (M1, S1BF, V1), durch außerordentlich gute Kollokalisationsraten mit der *Vip*-Sonde von stets über 98 % im WT und von über 99 % in der *Reeler*-Maus, dass es sich bei den tdTomato-positiven Zellen um VIP-exprimierende Neurone handelt. Des Weiteren wurde überwiegend eine Kollokalisierung der tdTomato-Zellen mit der *Gad1*-Sonde und niemals eine Überlagerung mit der *Vglut1*-Sonde beobachtet. Demzufolge stellt die *VIPcre/RosaTomato/WT*- sowie die *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Linie ein hochspezifisches und hochsensitives Mausmodell zur Untersuchung von kortikalen inhibitorischen VIP-exprimierenden Interneuronen dar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der Verteilung der VIP-Zellen in der Wildtyp-Maus zwischen M1, S1BF und V1 keine Unterschiede gibt. In allen primären Arealen kommen die VIP-Zellen mit mehr als 60 % im oberen Drittel des Kortex vor. Dagegen besitzen die VIP-Zellen im desorganisierten *Reeler*-Kortex keine präferierte Lage und sind nahezu gleichmäßig über die kortikale Dicke von M1, S1BF und V1 verteilt. Ebenso wie für den Wildtyp lassen sich keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der VIP-Zellen zwischen M1, S1BF und V1 nachweisen. In einem weiteren Teilprojekt untersuchten wir, inwiefern tangential wandernde inhibitorische VIP-Neurone den



---

radial aufsteigenden exzitatorischen Pyramidenzellen der Schicht 2/3 (*Rgs8*-positiv) in der Endphase ihrer Entwicklung folgen. Dabei scheinen sich die inhibitorischen VIP-Zellen weitestgehend, aber nicht ausschließlich, an exzitatorischen RGS8-Zellen zu orientieren. Denn obwohl die Verteilung der *Rgs8*-positiven Zellen in V1 der *Reeler*-Maus eher dem beschriebenen *Outside in*-Modell ähnelt, kommt es nicht zu einer Invertierung der VIP-Zellen. Nachfolgende Studien in der *Reeler*-Maus müssen zeigen, welche weiteren Mechanismen der Migration von VIP-Zellen und anderen Subtypen von GABAergen Interneuronen existieren, die letztlich in einem Kortex ohne Schichten die Informationsverarbeitung und wohl auch das dahinterstehende kortikale Netzwerk aufrechterhalten.

---

## 6 Abstract

Inhibitory GABAergic interneurons are clearly outnumbered by excitatory neurons in the neocortex of mice, and amount to 15–20 % (Staiger et al. 2015b). Only about 12–17 % of these GABAergic neurons express the vasoactive intestinal polypeptide, or VIP, (Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013) and, at about 60 % are found in layer 2/3 of the barrel cortex of WT mice (Prönneke et al. 2015). Until now, it was assumed that a division of the neocortex into six layers was essential for its functions. Despite the lack of a six-layer structure of the neocortex, the Reeler mouse does not exhibit any severe behavioural abnormalities, except for a few motor defects (Hamburgh 1960; Guy et al. 2017). In order to better understand the reasons for this and the extent to which GABAergic interneurons play a role, the distribution of VIP-expressing neurons in the neocortex of the Reeler mouse was analysed in more detail. For this purpose, the cortical regions primary motor cortex (M1), barrel cortex (S1BF, as part of the primary somatosensory cortex) as well as the primary visual cortex (V1) of VIPcre/RosaTomato/Reeler mice and, for comparison, VIPcre/RosaTomato/WT mice were examined. In addition to the distribution of VIP cells labelled with the fluorescent tdTomato protein, a layer-independent characterisation was performed using fluorescence in situ hybridisation for the molecular markers vasoactive intestinal polypeptide (Vip), glutamate decarboxylase 1 (Gad1), vesicular glutamate transporter 1 (Vglut1) and the regulator of G-protein signalling 8 (Rgs8) on brain slices.

The results prove that the tdTomato-positive cells are VIP-expressing neurons in all three cortical areas examined (M1, S1BF, V1) through extraordinarily good colocalisation rates with the Vip probe of always more than 98 % in the WT and 99 % in the Reeler mouse. Furthermore, a colocalisation of the tdTomato cells with the Gad1 probe was predominantly observed and never an overlap with the vGlut1 probe. Consequently, the VIPcre/RosaTomato/WT and the VIPcre/RosaTomato/Reeler line represent a highly specific and highly sensitive mouse model for the investigation of cortical inhibitory VIP-expressing interneurons. Furthermore, it was shown that there are no differences in the distribution of VIP cells in the wild-type mouse between M1, S1BF and V1. In all primary areas, more than 60% of the VIP cells are found in the upper third of the cortex thickness. In contrast, the VIP cells in the disorganised Reeler cortex do not have a preferred location and are almost evenly distributed across the cortical thickness of M1, S1BF and V1. Just as for the wild type, no differences in the distribution of VIP cells can be detected between M1, S1BF and V1. In another subproject, we investigated to what extent the initially tangentially migrating inhibitory VIP neurons follow the radially ascending excitatory pyramidal cells of layer 2/3 (Rgs8-positive) in the final phase of their development. In this process, the inhibitory VIP cells appear to be largely, but not exclusively,

---

oriented towards excitatory RGS8 cells. This is because although the distribution of Rgs8-positive cells in V1 of the Reeler mouse more closely resembles the described outside-in model, there is no inversion of VIP cells. Subsequent studies in the Reeler mouse must show what other mechanisms exist for the migration of VIP cells and other subtypes of GABAergic interneurons, which ultimately maintain information processing and probably also the underlying cortical network in a cortex without layers.

## 7 Anhang

**Tabelle 7.1: Prozentuale Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen in M1, S1 und V1 von WT- und *Reeler*-Mäusen**

Die prozentuale Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen für die Regionen M1, S1 und V1 in WT (n=63/5) und *reeler*-Mäusen (n=89/6) ist über die Dicke des Kortex (Bin) dargestellt. Die Prozentwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung separat für M1, S1 sowie V1 angegeben. Der statistische Vergleich zwischen WT und *reeler* innerhalb der Bins wurde mittels *Mann-Whitney Rank Sum* Tests erhoben. Signifikante Werte mit einem Signifikanzlevel von  $P < 0,05$  sind in fett dargestellt.

Bin	WT – M1 Verteilung tdTomato+ Zellen in %	<i>Reeler</i> – M1 Verteilung tdTomato+ Zellen in %	P-Werte Vgl. WT vs. <i>Reeler</i> pro Bin	WT – S1 Verteilung tdTomato+ Zellen in %	<i>Reeler</i> – S1 Verteilung tdTomato+ Zellen in %	P-Werte Vgl. WT vs. <i>Reeler</i> pro Bin	WT – V1 Verteilung tdTomato+ Zellen in %	<i>Reeler</i> – V1 Verteilung tdTomato+ Zellen in %	P-Werte Vgl. WT vs. <i>Reeler</i> pro Bin
1	0,3 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,6	P = 0,067	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	P = 0,329	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,6	P = 0,762
2	9,1 $\pm$ 3,0	4,7 $\pm$ 0,7	<b>P = 0,010</b>	9,0 $\pm$ 3,1	2,1 $\pm$ 0,6	<b>P = 0,004</b>	3,8 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 1,7	P = 0,114
3	19,2 $\pm$ 3,6	6,7 $\pm$ 0,6	<b>P = 0,010</b>	17,2 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 0,6	<b>P = 0,004</b>	13,1 $\pm$ 3,1	3,2 $\pm$ 0,8	<b>P = 0,010</b>
4	13,5 $\pm$ 1,3	8,2 $\pm$ 1,0	<b>P = 0,010</b>	12,9 $\pm$ 1,7	7,6 $\pm$ 2,1	<b>P = 0,004</b>	16,5 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 1,1	<b>P = 0,010</b>
5	9,2 $\pm$ 1,3	7,9 $\pm$ 1,1	P = 0,171	10,4 $\pm$ 1,5	7,5 $\pm$ 1,2	<b>P = 0,009</b>	13,0 $\pm$ 2,5	8,0 $\pm$ 1,5	<b>P = 0,010</b>
6	7,6 $\pm$ 2,3	6,9 $\pm$ 1,0	P = 1,000	9,8 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 0,6	<b>P = 0,004</b>	10,5 $\pm$ 0,7	6,1 $\pm$ 1,6	<b>P = 0,010</b>

<b>7</b>	7,5±1,0	6,4±0,6	P = 0,067	8,2±1,2	6,9±0,7	<b>P = 0,009</b>	8,0±0,8	6,4±0,9	<b>P = 0,010</b>
<b>8</b>	6,7±0,9	6,3±0,5	P = 1,000	6,2±1,1	6,4±1,1	P = 0,792	7,2±1,3	5,7±1,0	P = 0,114
<b>9</b>	3,1±1,4	6,4±0,9	<b>P = 0,010</b>	4,8±1,0	6,5±1,1	<b>P = 0,030</b>	6,0±0,8	5,5±0,5	P = 0,257
<b>10</b>	2,1±0,5	5,7±0,4	<b>P = 0,010</b>	3,8±0,8	6,1±1,4	<b>P = 0,009</b>	4,8±1,0	5,3±1,7	P = 0,476
<b>11</b>	2,5±0,9	5,4±1,3	<b>P = 0,019</b>	2,9±0,5	6,7±1,0	<b>P = 0,004</b>	4,3±1,1	6,8±1,7	<b>P = 0,038</b>
<b>12</b>	2,8±0,7	5,8±1,1	<b>P = 0,010</b>	2,4±0,6	6,5±1,6	<b>P = 0,004</b>	2,4±0,8	6,3±0,9	<b>P = 0,010</b>
<b>13</b>	2,7±0,4	5,2±1,1	<b>P = 0,038</b>	1,8±0,5	6,0±1,3	<b>P = 0,004</b>	1,4±0,8	6,5±1,1	<b>P = 0,010</b>
<b>14</b>	2,7±0,8	4,8±0,8	<b>P = 0,010</b>	2,2±0,9	5,5±0,7	<b>P = 0,004</b>	1,6±0,7	7,4±0,7	<b>P = 0,010</b>
<b>15</b>	2,4±0,6	4,3±0,3	<b>P = 0,010</b>	1,8±0,3	5,8±0,3	<b>P = 0,004</b>	1,3±0,9	6,4±1,2	<b>P = 0,010</b>
<b>16</b>	2,6±0,5	4,5±0,9	<b>P = 0,010</b>	1,3±0,5	4,8±1,1	<b>P = 0,004</b>	1,5±1,0	5,0±1,1	<b>P = 0,010</b>
<b>17</b>	1,8±0,3	3,0±0,4	<b>P = 0,010</b>	1,2±0,4	3,8±0,9	<b>P = 0,004</b>	0,9±0,2	4,3±1,0	<b>P = 0,010</b>
<b>18</b>	1,5±0,7	3,3±0,5	<b>P = 0,010</b>	1,4±0,4	3,0±0,3	<b>P = 0,004</b>	1,4±0,4	2,8±1,2	P = 0,114
<b>19</b>	1,7±0,9	2,4±0,8	P = 0,257	1,6±0,4	2,4±0,6	<b>P = 0,030</b>	1,4±0,7	2,7±0,3	<b>P = 0,019</b>
<b>20</b>	1,0±0,7	0,9±0,6	P = 0,762	0,7±0,3	1,2±0,7	P = 0,329	0,7±0,6	3,3±1,6	<b>P = 0,019</b>

**Tabelle 7.2: Verteilung der VIP/tdTomato Zellen in M1, S1 und V1**

Die Verteilung der ausgezählten VIP/tdTomato-Zellen für die Regionen M1, S1 und V1 in WT (n=63/5) und *Reeler*-Mäusen (n=89/6) ist über die Dicke des Kortex (Bin) angegeben. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der für jedes Tier ausgezählten Schnitte für die einzelnen Bins sowie in Summe aufgeführt. Der statistische Vergleich zwischen WT und *Reeler* bezieht sich nur auf die Gesamtanzahl der VIP/tdTomato in der jeweiligen Region (*Mann-Whitney Rank Sum* Test, Werte mit einem Signifikanzlevel von  $P < 0,05$  sind in fett dargestellt). Die durchschnittliche Dicke der Kortexareale ist in  $\mu\text{m}$  als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

<b>Bin</b>	<b>WT – M1</b> Zellzahl tdTomato- Zellen	<b><i>Reeler</i> – M1</b> Zellzahl tdTomato- Zellen	<b>WT – S1</b> Zellzahl tdTomato- Zellen	<b><i>Reeler</i> – S1</b> Zellzahl tdTomato- Zellen	<b>WT – V1</b> Zellzahl tdTomato- Zellen	<b><i>Reeler</i> – V1</b> Zellzahl tdTomato- Zellen
<b>1</b>	0,4 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
<b>2</b>	10,4 $\pm$ 3,7	6,9 $\pm$ 1,0	9,5 $\pm$ 2,8	2,3 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,8
<b>3</b>	21,8 $\pm$ 3,7	9,9 $\pm$ 1,6	18,3 $\pm$ 2,0	5,3 $\pm$ 0,6	13,6 $\pm$ 2,8	3,3 $\pm$ 0,6
<b>4</b>	15,3 $\pm$ 0,8	12,1 $\pm$ 1,2	13,8 $\pm$ 2,7	8,3 $\pm$ 2,0	17,1 $\pm$ 2,5	6,3 $\pm$ 1,5
<b>5</b>	10,5 $\pm$ 2,0	11,6 $\pm$ 2,1	11,1 $\pm$ 2,2	8,3 $\pm$ 1,8	13,7 $\pm$ 3,5	8,8 $\pm$ 2,0
<b>6</b>	8,6 $\pm$ 2,8	10,1 $\pm$ 1,7	10,5 $\pm$ 1,5	7,0 $\pm$ 1,0	10,8 $\pm$ 1,2	7,1 $\pm$ 1,9
<b>7</b>	8,6 $\pm$ 1,4	9,3 $\pm$ 1,0	8,6 $\pm$ 0,7	7,6 $\pm$ 1,5	8,3 $\pm$ 1,3	7,1 $\pm$ 1,8
<b>8</b>	7,6 $\pm$ 1,1	9,4 $\pm$ 1,2	6,6 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 1,8	7,5 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 1,5
<b>9</b>	3,5 $\pm$ 1,4	9,5 $\pm$ 1,5	5,2 $\pm$ 1,2	7,1 $\pm$ 1,6	6,3 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 1,4
<b>10</b>	2,4 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 1,1	4,0 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 1,0	5,1 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 1,5
<b>11</b>	2,8 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 2,1	3,1 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 1,5	7,1 $\pm$ 1,5

<b>12</b>	3,2±1,0	8,5±1,6	2,5±0,8	7,0±1,6	2,5±0,7	7,0±1,3
<b>13</b>	3,0±0,5	7,6±1,3	1,9±0,5	6,7±1,8	1,4±0,8	6,8±1,2
<b>14</b>	3,1±0,7	7,0±1,5	2,3±0,7	6,0±0,9	1,6±0,6	8,0±1,2
<b>15</b>	2,7±0,6	6,3±0,5	1,9±0,4	6,3±0,9	1,3±0,9	6,9±0,7
<b>16</b>	3,0±0,4	6,5±0,9	1,4±0,6	4,8±1,2	1,5±1,0	5,6±1,4
<b>17</b>	2,1±0,4	4,4±0,4	1,3±0,5	4,3±1,3	1,0±0,1	4,6±0,9
<b>18</b>	1,7±0,8	4,9±0,8	1,5±0,4	3,2±0,3	1,5±0,6	3,3±0,9
<b>19</b>	1,9±1,0	3,4±0,8	1,6±0,4	2,6±0,4	1,4±0,6	2,8±0,5
<b>20</b>	1,1±0,8	1,3±0,8	0,7±0,4	1,3±0,8	0,7±0,6	3,0±1,4
<b>Σ</b>	113,5 ± 6,7	147,0 ± 11,0	106,1 ± 8,7	109,3 ± 11,9	103,9 ± 6,5	107,9 ± 13,9
<b>Dicke</b>	1136,4±135,0	1181,4±4	1037,4±206,8	888,9±134,4	720,4±85,8	694,8±84,5

**Tabelle 7.3: Ergebnisse des *Mann-Whitney Rank Sum Tests* für die absolute Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen**

Dargestellt sind die Ergebnisse des *Mann-Whitney Rank Sum Tests* der Gesamtzahl der VIP/tdTomato-Zellen der jeweiligen Region mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Signifikante Werte mit einem Signifikanzlevel von  $P < 0,05$  sind in fett dargestellt

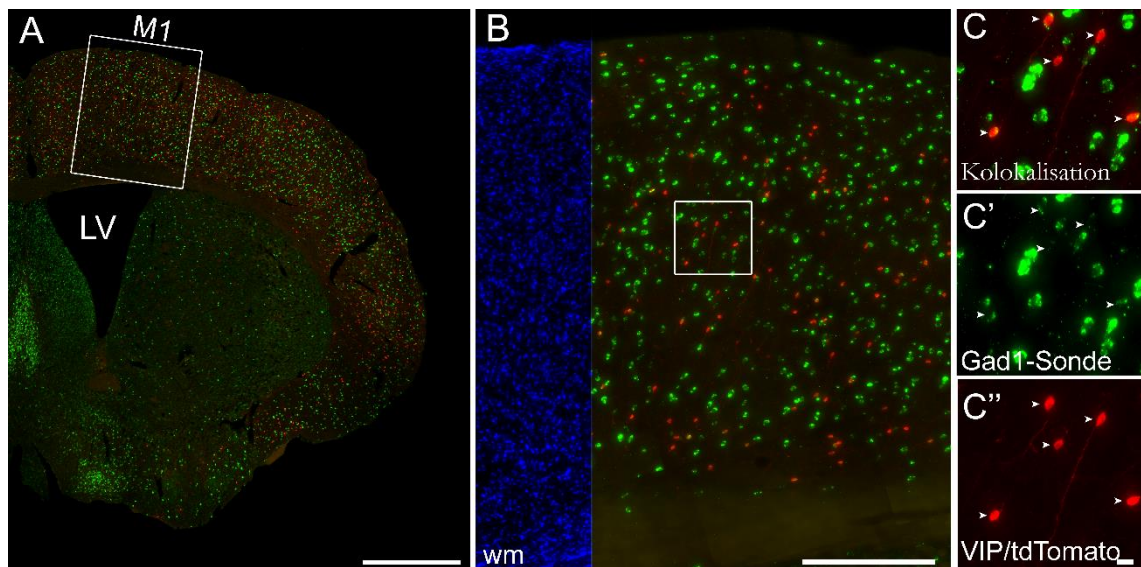
	WT-M1	Reeler-M1	WT-S1	Reeler-S1	WT-V1	Reeler-V1
WT-M1		<b>P=0,010</b>	P=0,286	-	P=0,114	-
Reeler-M1	<b>P=0,010</b>		-	<b>P=0,002</b>	-	<b>P=0,004</b>
WT-S1	P=0,286	-		P=0,931	P=0,556	-
Reeler-S1	-	<b>P=0,002</b>	P=0,931		-	P=0,792
WT-V1	P=0,114	-	P=0,556	-		P=0,905
Reeler-V1	-	<b>P=0,004</b>	-	P=0,792	P=0,905	



**Tabelle 7.4: Ergebnisse des *Mann-Whitney Rank Sum* Tests für die Kortexdicke**

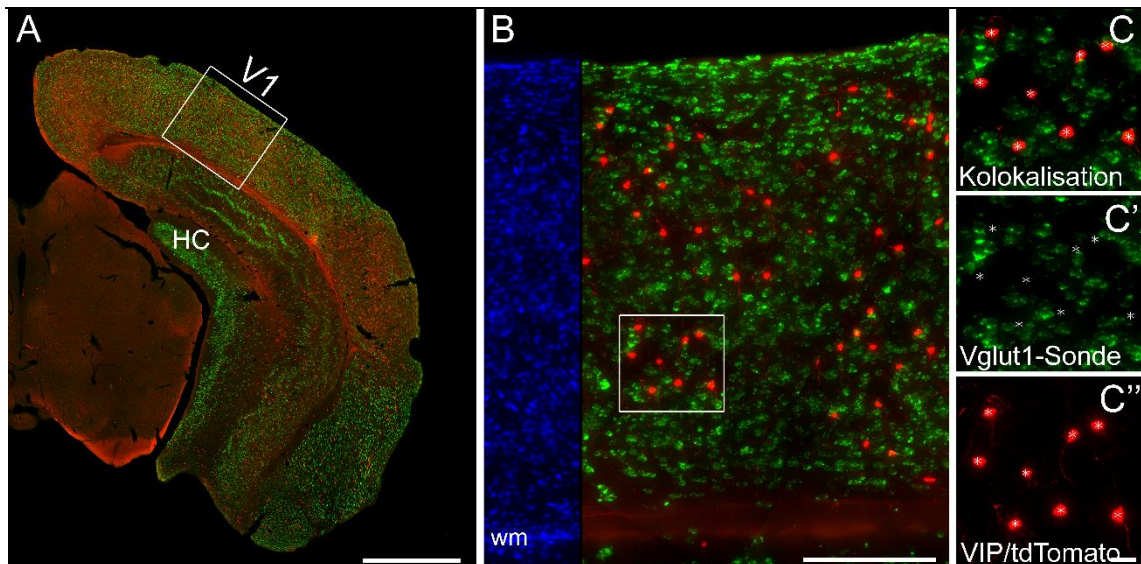
Dargestellt sind die Ergebnisse des *Mann-Whitney Rank Sum* Tests in Bezug auf die Kortexdicke der jeweiligen Region mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Signifikante Werte mit einem Signifikanzlevel von  $P < 0,05$  sind in fett dargestellt

	WT-M1	<i>Reeler</i> -M1	WT-S1	<i>Reeler</i> -S1	WT-V1	<i>Reeler</i> -V1
WT-M1		P=0,361	<b>P=0,026</b>	-	<b>P=&lt;0,001</b>	-
<i>Reeler</i> -M1	P=0,361		-	<b>P=&lt;0,001</b>	-	<b>P=&lt;0,001</b>
WT-S1	<b>P=0,026</b>	-		<b>P=0,001</b>	<b>P=&lt;0,001</b>	-
<i>Reeler</i> -S1	-	<b>P=&lt;0,001</b>	<b>P=0,001</b>		-	<b>P=&lt;0,001</b>
WT-V1	<b>P=&lt;0,001</b>	-	<b>P=&lt;0,001</b>	-		P=0,196
<i>Reeler</i> -V1	-	<b>P=&lt;0,001</b>	-	<b>P=&lt;0,001</b>	P=0,196	



**Abbildung 7.1: FISH zur Markierung der *Gad1*-positiven-Zellen im Bereich des primären motorischen Kortex (M1) der *Reeler*-Maus**

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an einem frontalen Hirnschnitt einer *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal, in Grün das *Gad1*-Sondensignal, in Gelb die mit der *Gad1*-Sonde kolokalisierten Zellen und in Blau die Zellkerne (DAPI). **A** zeigt die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären motorischen Kortex (Rechteck; M1). Als weitere Struktur erkennt man den lateralen Ventrikel (LV); Maßstab: 1000  $\mu\text{m}$ . **B** zeigt eine *maximum intensity projection* des primären motorischen Kortex; Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . In **C-C''** ist die Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs in B dargestellt. Hierbei sind die Kolokalisierungen (C) des transgenen tdTomato-Signals (C'') mit den *Gad1*-positiven Zellen (C') zu erkennen; Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 7.2: FISH zur Markierung der *Vglut1*-positiven Zellen im Bereich des primären visuellen Kortex (V1) der *Reeler*-Maus**

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der *Vglut1*-Sonde einer *VIPcre/RosaTomato/Reeler*-Maus zeigt in Rot das transgene tdTomato-Signal, in Grün die *Vglut1*-positiven Zellen sowie in Blau die Zellkerne (DAPI). **A** zeigt die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des primären visuellen Kortex (Rechteck; V1). Als weitere Struktur erkennt man den Hippocampus (HC); Maßstab: 1000  $\mu\text{m}$ . In **B** ist eine *maximum intensity projection* des primären visuellen Kortex dargestellt; Maßstab 250  $\mu\text{m}$ . **C-C''** zeigen die Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs aus B. Dabei sind keine Kolokalisationen (C) des transgenen tdTomato-Signals (C'') mit den *Vglut1*-positiven Zellen (C) zu erkennen; Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

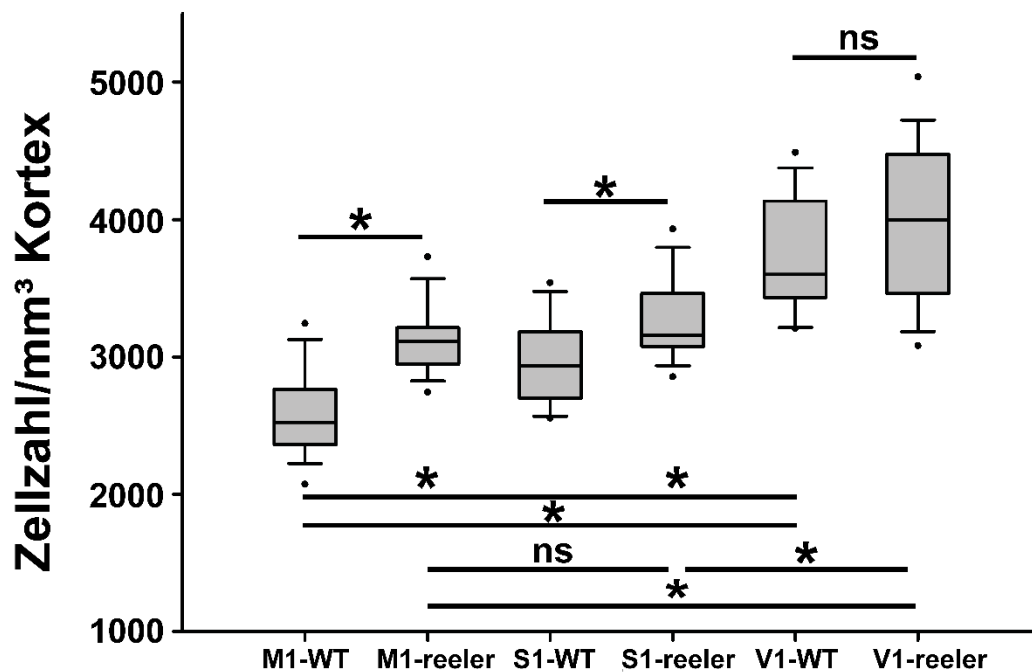


Abbildung 7.3: Anzahl der nativen VIP/tdTomato-Zellen pro mm<sup>3</sup> Kortex für M1, S1 und V1 in der Wildtyp- und der Reeler-Maus

Das Boxplot-Diagramm stellt die Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen in den drei verschiedenen Kortexarealen (M1, S1, V1) pro 1 mm<sup>3</sup> Kortex dar. Die Schnitte wurden individuell pro Region und Genotyp betrachtet und als Boxplots mit Median, 25-75 % Quartile, 95 % Perceptile und Ausreißer dargestellt. Im V1-WT-Kortex befinden sich signifikant mehr VIP-Zellen als im S1- und M1-WT-Kortex und der S1-WT-Kortex beinhaltet signifikant mehr Zellen als der M1-WT-Kortex (V1-WT>S1-WT>M1-WT). Im V1-Reeler-Kortex befinden sich signifikant mehr VIP-Zellen als im M1-Reeler-Kortex sowie im S1-Reeler-Kortex. Zwischen M1-Reeler und S1-Reeler gibt es keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl. Zwischen WT und Reeler zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen. So kommen in der M1- und in der S1-Region von Reeler signifikant mehr Zellen als im WT vor. In V1-Reeler finden sich lediglich tendenziell (P=0,053) mehr VIP-Zellen als in V1-WT. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit \* gekennzeichnet.

---

## 8 Literaturverzeichnis

**Adesnik H, Bruns W, Taniguchi H, Huang ZJ, Scanziani MA** (2012): A neural circuit for spatial summation in visual cortex. *Nature* 490, 226-231

**Alcántara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E** (1998): Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci* 18, 7779-7799

**Almási Z, Dávid C, Witte M, Staiger JF** (2019): Distribution Patterns of Three Molecularly Defined Classes of GABAergic Neurons Across Columnar Compartments in Mouse Barrel Cortex. *Front Neuroanat* 13, 45

**Angevine Jun JB, Sidman RL** (1961): Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768

**Armstrong-James MA, Fox K** (1987): Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 “barrel” cortex. *J Comp Neurol* 263, 265-281

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

**Ayala R, Shu T, Tsai LH** (2007): Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43

**Bacci A, Huguenard JR, Prince DA** (2005): Modulation of neocortical interneurons: Extrinsic influences and exercises in self-control. *Trends Neurosci* 28, 602–610

**Badea A, Nicholls PJ, Johnson GA, Wetsel WC** (2007): Neuroanatomical phenotypes in the reeler mouse. *Neuroimage* 34, 1363-1374

**Baillarger JGF**: Recherches sur la Structure de la Couche Corticale des Circonvolutions du Cerveau. Baillière, Paris 1840

**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

- 
- Birling MC, Gofflot F, Warot X** (2009): Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome. *Methods Mol Biol* 561, 245-263
- Bock HH, Herz J** (2003): Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol* 13, 18-26
- Boyle MP, Bernard A, Thompson CL, Ng L, Boe A, Mortrud M, Hawrylycz MJ, Jones AR, Hevner RF, Lein ES** (2011): Cell-type-specific consequences of Reelin deficiency in the mouse neocortex, hippocampus, and amygdala. *J Comp Neurol* 519, 2061-2089
- 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
- Castañeda MT, Sanabria ER, Hernandez S, Ayala A, Reyna TA, Wu JY, Colom LV** (2005): Glutamic acid decarboxylase isoforms are differentially distributed in the septal region of the rat. *Neurosci Res* 52, 107-119
- Cauli B, Audinat E, Lambollez 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
- Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambollez B, Rossier J, Hamel E** (2004): Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 24, 8940-8949
- Caviness VS** (1976): Patterns of cell and fiber distribution in the neocortex of the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 170, 435-447
- Caviness VS Jr** (1975): Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol* 164, 247-264
- Caviness VS Jr** (1982a): Neocortical histogenesis in normal and reeler mice- a developmental- study based upon [H-3] thymidin autoradiography. *Brain Res* 4, 293-302
- Caviness VS Jr** (1982b): Development of neocortical afferent systems: studies in the reeler mouse. *Neurosci Res Program Bull* 20, 560-569
- Caviness VS Jr, Sidman RL** (1973): Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 148, 141-151

- 
- Chai X, Frotscher M** (2016): How does Reelin signaling regulate the neuronal cytoskeleton during migration? *Neurogenesis (Austin)* 3, e1242455
- Chai X, Fan L, Shao H, Lu X, Zhang W, Li J, Wang J, Chen S, Frotscher M, Zhao S** (2015): Reelin Induces Branching of Neurons and Radial Glial Cells during Corticogenesis. *Cereb Cortex* 25, 3640-3653
- Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL** (2005): Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* 8, 1059–1068
- Connor JR, Peters A** (1984): Vasoactive Intestinal Polypeptide-Immunoreactive Neurons in Rat Visual-Cortex. *Neuroscience* 12, 1027-1044
- Cooper JA** (2008): A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci* 31, 113-119
- Cooper JA** (2013): Cell biology in neuroscience: mechanisms of cell migration in the nervous system. *J Cell Biol* 202, 725-734
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez 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
- Curran T, D'Arcangelo G** (1998): Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Rev* 26, -
- Cybulska-Klosowicz A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB** (2013): Interneurons containing somatostatin are affected by learning-induced cortical plasticity. *Neuroscience* 254, 18-25
- D'Arcangelo G** (2005): The reeler mouse: anatomy of a mutant. *Int Rev Neurobiol* 71, 383-417
- D'Arcangelo G** (2014): Reelin in the Years: Controlling Neuronal Migration and Maturation in the Mammalian Brain. *Advances in Neuroscience*, 19
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T** (1995): A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719-723

---

**D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T** (1997): Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci* 17, 23-31

**D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T** (1999): Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471-479

**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** (2002): Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136, 215-238

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

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

**Dekimoto H, Terashima T, Katsuyama Y** (2010): Dispersion of the neurons expressing layer specific markers in the reeler brain. *Dev Growth Differ* 52, 181-193

**Dymecki SM, Ray RS, Kim JC** (2010): Mapping cell fate and function using recombinase-based intersectional strategies. *Methods Enzymol* 477, 183-213

**Fairen A, Cobas A, Fonseca M** (1986): Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 251, 67-83

**Falconer DS** (1951): Two new mutants 'Trembler' and 'Reeler', with neurological actions in the house mouse. *J Genet* 50, 192-201

**Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW** (2008): Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 100, 2640-2652

**Fazzari P, Mortimer N, Yabut O, Vogt D, Pla R** (2020): Cortical distribution of GABAergic interneurons is determined by migration time and brain size. *Development* 147,



- 
- Feldmeyer D** (2012): Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Front Neuroanat* 6, 24
- Feldmeyer D, Egger V, Lübke J, Sakmann B** (1999): Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single ‘barrel’ of developing rat somatosensory cortex. *J Physiol* 521, 169-190
- Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF** (2018): Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Neuroscience* 368, 132-151
- Fenlon LR, Richards LJ** (2015): Contralateral targeting of the corpus callosum in normal and pathological brain function. *Trends Neurosci* 38, 264-272
- Férezou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, Lambolez B** (2002): 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci* 22, 7389-7397
- Fischer T**: Schichtenspezifische Charakterisierung Somatostatin-exprimierender Interneurone in der GIN- und SOMcre/tdTomato-Maus mittels neurochemischer Marker im primären somatosensorischen Barrel-Kortex. Med. Diss. Göttingen 2018
- Frotscher M, Zhao ST** (2010): Go or Stop? Divergent Roles of Reelin in Radial Neuronal Migration. *Neuroscientist* 16, 421-434
- Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Förster E, Zhao S** (2009): Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *J Neural Transm (Vienna)* 116, 1451-1455
- Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP** (2014): A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell* 156, 1139-1152
- Gao WJ, Wang Y, Goldman-Rakic PS** (2003): Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* 23, 1622–1630
- Gelman DM, Marin O** (2010): Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31, 2136-2141
- Gennari F**: De Peculiaribus Structura Cerebri Nonnullisque Ejus Morbis. Parmae, Parma 1784 (Available online at: <https://archive.org/details/b2170935x>)

- 
- Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen CCH** (2012): Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci* 15, 607–612
- 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
- Grimes JM, Ricci LA, Melloni RH Jr.** (2003): Glutamic acid decarboxylase (GAD65) immunoreactivity in brains of aggressive, adolescent anabolic steroid-treated hamsters. *Horm Behav* 44, 271-280
- Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA** (2006): Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 75, 567-605
- Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A** (2002): Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3, 342-355
- Guy J, Staiger JF** (2017): The functioning of a cortex without layers. *Front Neuroanat* 11, 54
- Guy J, Wagener RJ, Möck M, Staiger JF** (2015): Persistence of functional sensory maps in the absence of cortical layers in the somatosensory cortex of reeler mice. *Cereb Cortex* 25, 2517-2528
- Guy J, Sachkova A, Mock M, Witte M, Wagener RJ, Staiger JF** (2017): Intracortical Network Effects Preserve Thalamocortical Input Efficacy in a Cortex Without Layers. *Cereb Cortex* 27, 4851-4866
- Hafner G, Witte M, Guy J, Subhashini N, Fenno LE, Ramakrishnan C, Kim YS, Deisseroth K, Callaway EM, Oberhuber M et al.** (2019): Mapping Brain-Wide Afferent Inputs of Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Barrel Cortex Reveals Local and Long-Range Circuit Motifs. *Cell Rep* 28, 3450-3461
- Hafner G, Guy J, Witte M, Truschow P, Ruppel A, Sirmipilatz N, Dadarwal R, Boretius S, Staiger JF** (2021): Increased Callosal Connectivity in Reeler Mice Revealed by Brain-Wide Input Mapping of VIP Neurons in Barrel Cortex. *Cereb Cortex* 31, 1427-1443

- 
- Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA** (2006): Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96, 834-845
- Hamburgh M** (1960): Observations on the neuropathology of "Reeler", a neurological mutation in mice. *Exp Suppl* 16, 460-461
- Hartfuss E, Forster E, Bock HH, Hack MA, LePrince P, Luque JM, Herz J, Frotscher M, Gotz M** (2003): Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130, 4597-4609
- He M, Tucciarone J, Lee S, Nigro MJ, Kim Y, Levine JM, Kelly SM, Krugikov I, Wu P, Chen Y et al.** (2016): Strategies and tools for combinatorial targeting of GABAergic neurons in mouse cerebral cortex. *Neuron* 92, 555
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J** (1999): Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481-489
- Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T** (2013): Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *J Neurosci* 33, 544-555
- Howell BW, Herrick TM, Cooper JA** (1999): Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev* 13, 643-648
- Huang Z** (2009): Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. *Mol Cell Neurosci* 42, 11-22
- Hunter-Schaedle KE** (1997): Radial glial cell development and transformation are disturbed in reeler forebrain. *J Neurobiol* 33, 459-472
- Imai H, Shoji H, Ogata M, Kagawa Y, Owada Y, Miyakawa Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y** (2017): Dorsal forebrain-specific deficiency of reelin-Dab1 signal causes behavioral abnormalities related to psychiatric disorders. *Cereb Cortex* 27, 3485–3501

---

**Inta D, Alfonso J, von Engelhardt J, Kreuzberg MM, Meyer AH, van Hooft JA, Monyer H** (2008): Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20994-20999

**Ishii K, Kubo K, Nakajima K** (2016): Reelin and neuropsychiatric disorders. *Front Cell Neurosci* 10, 1-13

**Ito M** (1985): Processing of vibrissa sensory information within the rat neocortex. *J Neurophysiol* 54, 479-490

**Jensen KF, Killackey HP** (1987): Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat I: The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J Neurosci* 7, 3529-3543

**Jiang X, Nardelli J** (2016): Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol Dis* 92, 3-17

**Kandel ER, Schwartz JM, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ**: Principles of Neural Science. 5. Auflage; McGraw Hill Companies, Vereinigte Staaten von Amerika 2013

**Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B** (2009): Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 29, 3642-3659

**Karnani MM, Agetsuma M, Yuste R** (2014): A blanket of inhibition: functional inferences from dense inhibitory connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 26, 96-102

**Kawaguchi Y** (1997): Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol* 78, 1743-1747

**Kawaguchi Y, Kubota Y** (1993): Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 70, 387-396

**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, Shindou T** (1998): Noradrenergic excitation and inhibition of GABAergic cell types in rat frontal cortex. *J Neurosci* 18, 6963-6976

- 
- Kepecs A, Fishell G** (2014): Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505, 318-326
- Keshvara L, Benhayon D, Magdaleno S, Curran T** (2001): Identification of reelin-induced sites of tyrosyl phosphorylation on disabled 1. *J Biol Chem* 276, 16008-16014
- Kirschuk S, Luhmann HJ, Kilb W** (2014): Cajal-Retzius cells: update on structural and functional properties of these mystic neurons that bridged the 20th century. *Neuroscience* 275, 33-46
- Kruglikov I, Rudy B** (2008): Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators. *Neuron* 58, 911–924
- Lee GH, D’Arcangelo G** (2016): New Insights into Reelin-Mediated Signaling Pathways. *Front Cell Neurosci* 10, 122
- 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
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ et al.** (2007): Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176
- Lemmon V, Pearlman AL** (1981): Does laminar position determine the receptive field properties of cortical neurons? A study of corticotectal cells in area 17 of the normal mouse and the reeler mutant. *J Neurosci* 1, 83-93
- Levitt P, Eagleson KL, Powell EM** (2004): Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders. *Trends Neurosci* 27, 400–406
- Lewandoski M.** (2001): Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2, 743-55
- Lipovsek M, Bardy C, Cadwell CR, Hadley K, Kobak D, Tripathy SJ** (2021): Patch-seq: Past, Present, and Future. *J Neurosci* 41, 937-946

- 
- Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hench TK, Arlotta P** (2011): Excitatory Projection Neuron Subtypes Differentially Control the Distribution of Local Inhibitory Interneurons in the Cerebral Cortex. *Neuron* 69, 763-779
- Lopez-Bendito G, Sanchez-Alcaniz JA, Pla R, Borrell V, Pico E, Valdeolmillos M, Marin O** (2008): Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 28, 1613-1624
- Lu SM, Lin RCS** (1993): Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res* 10, 1-16
- Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W** (2015): Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* 9, 1-15
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR et al.** (2010): A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13, 133-140
- Magistretti PJ, Cardinaux JR, Martin JL** (1998): VIP and PACAP in the CNS: regulators of glial energy metabolism and modulators of glutamatergic signalling. *Ann N Y Acad Sci* 865, 213-225
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR** (1988): Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to nonselectable genes. *Nature* 336, 348-52
- Mariani J, Crepel F, Mikoshiba K, Changeux JP, Sotelo C** (1977): Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 281, 1-28
- Marín O** (2013): Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* 38, 2019-2029
- Marin O, Valiente M, Ge X, Tsai LH** (2010): Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001834
- 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

- 
- Meynert T** (1867): Der Bau der Grosshirnrinde und seiner örtlichen Verschiedenheiten, nebst einem pathologisch-anatomischen collarium. Vierteljahresschr Psychiat 1, 77-93
- Miller MW** (1985): Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. Brain Res 355, 187-192
- Mingo-Moreno N**: From *inside-out* to *outside-in*: cortical lamination development in the Reelin-deficient neokortex. Biol. Diss. Göttingen 2018
- Miyata T, Nakajima K, Aruga J, Takahashi S, Ikenaka K, Mikoshiba K, Ogawa M** (1996): Distribution of a reeler gene-related antigen in the developing cerebellum: an immunohistochemical study with an allogeneic antibody CR-50 on normal and reeler mice. J Comp Neurol 372, 215-228
- 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
- Myers WA** (1970): Some observations on “reeler”, a neuromuscular mutation in mice. Behav Genet 1, 225–234
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong ROL, Parnavelas JG** (2003): Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. Cereb Cortex 13, 607-611
- Noebels JL** (2003): The biology of epilepsy genes. Annu Rev Neurosci 26, 599–625
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K** (1995): The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. Neuron 14, 899-912
- Ohtaka-Maruyama C, Okado H** (2015): Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. Front Neurosci 2, 447
- Paxinos G, Franklin KBJ**: The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. Auflage; Academic Press, 2001
- Peduzzi JD** (1988): Genesis of GABA-immunoreactive neurons in the ferret visual cortex. J Neurosci 8, 920-931

- 
- 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
- Pfeffer CK, Xue MS, 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* 503, 521-524
- Pielecka-Fortuna J, Wagener RJ, Martens AK, Goetze B, Schmidt KF, Staiger JF, Lowel S** (2015): The disorganized visual cortex in reelin-deficient mice is functional and allows for enhanced plasticity. *Brain Struct Funct* 220, 3449-3467
- Pinto Lord MC, Caviness VS Jr** (1979): Determinants of cell shape and orientation: a comparative Golgi analysis of cell-axon interrelationships in the developing neocortex of normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 187, 49-69
- Pla R, Borrell V, Flames N, Marin O** (2006): Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci* 26, 6924-6934
- Porter JT, Cauli B, Staiger JF, Lambolez B, Rossier J, Audinat E** (1998): Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur J Neurosci* 10, 3617-3628
- Prönneke A, Scheuer B, Wagener RJ, Möck M, Witte M, Staiger JF** (2015): Characterizing VIP Neurons in the Barrel Cortex of VIPcre/tdTomato Mice Reveals Layer-Specific Differences. *Cereb Cortex* 25, 4854-4868
- Rakic P** (1972): Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145, 61-83
- Rakic P** (1974): Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183, 425-427
- Ricci LA, Grimes JM, Knyshevski I, Melloni RH** (2005): Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase-65 (GAD65) immunoreactivity in hamster brain: correlation with offensive aggression. *Brain Res* 1035, 131-138



- 
- Rice DS, Curran T** (2001): Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24, 1005-1039
- Romano E, Michetti C, Caruso A, Laviola G, Scattoni ML** (2013): Characterization of neonatal vocal and motor repertoire of reelin mutant mice. *PLoS One* 8, e64407
- Romero DM, Bahi-Buisson N, Francis F** (2018): Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. *Semin Cell Dev Biol* 76, 33-75
- 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
- Said SI, Mutt V** (1970): Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. *Science* 169, 1217-1218
- Said SI, Mutt V** (1972): Isolation from porcine intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem* 28, 199-204
- Salinger WL, Ladrow P, Wheeler C** (2003): Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation. *Behav Neurosci* 117, 1257-1275
- Sauer B, Henderson N** (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170
- Scheuer B**: Schichtenspezifische Charakterisierung der *VIPcre/tD Tomato*-Mauslinie mittels neurochemischer Marker. Med. Diss. Göttingen 2015
- Schubert D, Kötter R, Staiger JF** (2007): Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Struct Funct* 212, 107-119
- Schubert D, Kötter R, Zilles K, Luhmann HJ, Staiger JF** (2003): Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. *J Neurosci* 23, 2961-2970
- Sekine K, Kawauchi T, Kubo K, Honda T, Herz J, Hattori M, Kinashi T, Nakajima K** (2012): Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin alpha5beta1. *Neuron* 76, 353-369
- Silberberg G, Markram H** (2007): Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 53, 735-746

- 
- Silva LR, Gutnick MJ, Connors BW** (1991): Laminar distribution of neuronal membrane properties in neocortex of normal and reeler mouse. *J Neurophysiol* 66, 2034-2040
- Simmons PA, Lemmon V, Pearlman AL** (1982): Afferent and efferent connections of the striate and extrastriate visual cortex of the normal and reeler mouse. *J Comp Neurol* 211, 295–308
- Simons DJ** (1978): Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41, 798-820
- Sinex DG, Burdette LJ, Pearlman AL** (1979): A psychophysical investigation of spatial vision in the normal and reeler mutant mouse. *Vision Res* 19, 853-857
- Skoglund TS, Pascher R, Berthold CH** (1997): The existence of a layer IV in the rat motor cortex. *Cereb Cortex* 7, 178-180
- Somogyi P, Klausberger T** (2005): Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562, 9-26
- Staiger JF**: “S1 laminar specialization” In: Prescott TJ, Ahissar E, Izhikevich EM (Hrsg.): *Scholarpedia of Touch*. Atlantis Press, Paris 2015, 507–533
- Staiger JF, Petersen CCH** (2021): Neuronal Circuits in Barrel Cortex for Whisker Sensory Perception. *Physiol Rev* 101, 353-415
- 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, Masannek C, Schleicher A, Zuschratter W** (2004): Calbindin-containing interneurons are a target for VIP-immunoreactive synapses in rat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 468, 179-189
- Staiger JF, Bojak I, Miceli S, Schubert D** (2015a): A gradual depth-dependent change in connectivity features of supragranular pyramidal cells in rat barrel cortex. *Brain Struct Funct* 220, 1317-1337
- Staiger JF, Möck M, Prönneke A, Witte M** (2015b): What types of neocortical GABAergic neurons do really exist? *eNeuroforum* 6, 49-56
- Stanfield BB, Cowan WM** (1979): The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 185, 393-422

- 
- Stephenson DT, Li Q, Simmons C, Connell MA, Meglasson MD, Merchant K, Emborg E** (2005): Expression of GAD65 and GAD67 immunoreactivity in MPTP-treated monkeys with or without L-DOPA administration. *Neurobiol Dis* 20, 347-359
- Sternberg N, Hamilton D** (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486
- Tabata H, Nakajima K** (2002): Neurons tend to stop migration and differentiate along the cortical internal plexiform zones in the Reelin signal-deficient mice. *J Neurosci Res* 69, 723-730
- 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
- Tissir F, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM** (2002): The role of reelin in the development and evolution of the cerebral cortex. *Braz J Med Biol Res* 35, 1473-1484
- Tremblay R, Lee S, Rudy B** (2016): GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260-292
- Valcanis H, Tan SS** (2003): Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J Neurosci* 23, 5113-5122
- Valiente M, Marín O** (2010): Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 20, 68-78
- Van Duynes GD** (2015): Cre Recombinase. *Microbiol Spectr* 3, MDNA3-0014-2014
- Vicq d'Azyr F**: *Traité d'anatomie et de Physiologie avec des Planches Coloriées Représentant au Naturel les Divers Organes de l'homme et des Animaux*. François-Ambroise Didot, Paris 1786
- Von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, Monyer H** (2007): Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *J Neurosci* 27, 5633-5642
- Wagener RJ, David C, Zhao ST, Haas CA, Staiger JF** (2010): The Somatosensory Cortex of reeler Mutant Mice Shows Absent Layering But Intact Formation and Behavioral Activation of Columnar Somatotopic Maps. *J Neurosci* 30, 15700-15709

- 
- Wagener RJ, Witte M, Guy J, Mingo-Moreno N, Kugler S, Staiger, JF** (2016): Thalamocortical Connections Drive Intracortical Activation of Functional Columns in the Mislaminated Reeler Somatosensory Cortex. *Cereb Cortex* 26, 820-837
- Walker F, Möck 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
- Wall NR, De La Parra M, Sorokin JM, Taniguchi H, Huang ZJ, Callaway EM** (2016): Brain-wide maps of synaptic input to cortical interneurons. *J Neurosci* 36, 4000-4009
- Weiss KH, Johanssen C, Tielsch A, Herz J, Deller T, Frotscher M, Forster E** (2003): Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *J Comp Neurol* 460, 56-65
- Welker C** (1971): Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of SmI cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26, 259-275
- Witte M**: Vortrag im Rahmen des Ephys-Meetings, Göttingen 01.03.2019
- Woolsey TA, van der Loos H** (1970): The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S1) of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 17, 205-242
- Wouterlood FG, Aliane V, Boekel AJ, Hur EE, Zaborszky L, Barroso-Chinea P, Hartig W, Lanciego JL, Witter MP** (2008): Origin of calretinin-containing, vesicular glutamate transporter 2-coexpressing fiber terminals in the entorhinal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 506, 359-370
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA** (1998): Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science* 281, 985-988
- 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 XM, 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

---

**Yavorska I, Wehr M** (2016): Somatostatin-expressing inhibitory interneurons in cortical circuits. *Front Neural Circuits* 10, 76

**Yuste R** (2005): Origin and classification of neocortical interneurons. *Neuron* 48, 524-527

**Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lonnerberg P, La Manno G, Jureus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C et al.** (2015): Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347, 1138-1142

**Zhang S, Xu M, Kamigaki T, Hoang Do JP, Chang WC, Jenvay S, Miyamichi K, Luo L, Dan Y** (2014): Selective attention: Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing. *Science* 345, 660-665

**Zhou X, Rickmann M, Hafner G, Staiger JF** (2017): Subcellular targeting of VIP boutons in mouse barrel cortex is layer-dependent and not restricted to interneurons. *Cereb Cortex* 27, 5353-5368

**Zilles K, Wree A**: "Cortex: areal and laminar structure," In: Paxinos G (Hrsg.): *The Rat Nervous System*. Academic Press, London 1995

---

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jochen Staiger bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, im Institut für Neuroanatomie in Göttingen zu promovieren.

Besonderer Dank gilt Dr. Mirko Witte für seine kompetente Betreuung und Hilfsbereitschaft. Er stand mir stets mit viel Geduld, guten Ratschlägen und konstruktiven Verbesserungsvorschlägen zur Seite. Sowohl Prof. Dr. Jochen Staiger als auch Dr. Witte danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich danke besonders Sandra Heinzl für die Hilfe bei der Durchführung der praktischen Versuche im Labor und Pavel Truschow für die technische Unterstützung am Mikroskop und die Programmierung des Skriptes. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Julien Guy für die Zucht der transgenen Mäuse sowie die zur Verfügungstellung zusätzlicher Schnitte und bei Dr. Georg Hafner für die fachliche Unterstützung sowie die Programmierung eines Skriptes.

Auch Dr. Joachim Rosenbusch gilt mein Dank für die Vermittlung der Promotionsstelle.

Ich bedanke mich außerdem bei der gesamten Arbeitsgruppe Neuroanatomie für die angenehme Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft sowie die wertvollen Dialoge. Ohne euch alle wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.