

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

Nachweis der Expression metabotroper GABA_B-Rezeptoren in GABAergen Interneuronen des somatosensorischen Kortex mittels Immunhistochemie

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Lisa Thiecke

aus
Templin

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. Wolfgang Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. Jochen Staiger
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. Swen Hülsmann
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. Ralf Dressler

Datum der mündlichen Prüfung: 12.10.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Nachweis der Expression metabotroper GABA_B-Rezeptoren in GABAergen Interneuronen des somatosensorischen Kortex mittels Immunhistochemie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der Kortex cerebri	1
1.2 Der <i>Barrel</i> -Kortex.....	2
1.3 GABA _B -Rezeptoren	3
1.4 GABAerge Interneurone	5
1.4.1 Parvalbumin-exprimierende Interneurone	6
1.4.2 Somatostatin-exprimierende Interneurone	6
1.4.3 Gruppe der 5HT _{3a} -Rezeptor-exprimierenden Interneurone	7
1.5 Ziele der Studie	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Versuchstiere	10
2.2 Perfusion der Versuchstiere und Vorbereitung des Gewebes	10
2.3 Immunhistochemie.....	11
2.4 Auszählen/Auswertung	12
3 Ergebnisse	16
3.1 Exprimieren SST-positive Zellen GABA _B -Rezeptoren?.....	16
3.2 Exprimieren VIP- und PV-positive Zellen GABA _B -Rezeptoren?.....	20
3.3 Vergleich der GABA _B -Rezeptor Expression zwischen den verschiedenen Subpopulationen der kortikalen GABAergen Interneurone	30
4 Diskussion	32
4.1 Methodische Aspekte.....	33
4.1.1 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	33
4.1.2 Manuelles Einzeichnen der Schichten	34
4.1.3 Immunhistochemie (IHC)	35
4.2 Diskussion der Ergebnisse	37
4.2.1 Expression des GABA _B -Rezeptors in SST-exprimierenden Zellen	38
4.2.2 Expression des GABA _B -Rezeptors in VIP Interneuronen.....	39
4.2.3 Expression des GABA _B -Rezeptors in PV Interneuronen	41
4.3 Physiologische Relevanz	42
5 Zusammenfassung.....	46
6 Anhang.....	48
7 Literaturverzeichnis	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schichten des primär somatosensorischen Kortexes	1
Abbildung 2: Primär somatosensorischer Kortex eines Mausgehirns im Frontalschnitt	3
Abbildung 3: Manuelles Einzeichnen der kortikalen Schichten	14
Abbildung 4: Immunhistochemie mittels GABA _B -Antikörper zur Markierung GABA _B -positiver Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus	17
Abbildung 5: Immunhistochemie mittels GABA _B -Antikörper zur Markierung GABA _B -positiver Zellen im Bereich des <i>Barrel</i> -Kortex der GIN-Maus	18
Abbildung 6: Kolokation zwischen SOMcre/tdTomato- bzw. GFP-GIN- und dem GABA _B -Antikörper	20
Abbildung 7: Immunhistochemie mittels GABA _B -Antikörper zur Markierung GABA _B -positiver Zellen im <i>Barrel</i> -Kortex der VIPcre/tdTomato-Maus	21
Abbildung 8: Kolokalisation der VIP/tdTomato-Zellen mit dem GABA _B -Antikörper	22
Abbildung 9: Verteilung kolokalisierter und nicht-kolokalisierter VIP/tdTomato-Zellen im <i>Barrel</i> -Kortex	23
Abbildung 10: Immunhistochemie mittels GABA _B -Antikörper zur Markierung GABA _B -positiver Zellen im <i>Barrel</i> -Kortex der PVcre/tdTomato-Maus	24
Abbildung 11: Kolokalisation der PV/tdTomato-Zellen mit dem GABA _B -Antikörper	26
Abbildung 12: Verteilung kolokalisierter und nicht-kolokalisierter PV/tdTomato-Zellen im <i>Barrel</i> -Kortex	27
Abbildung 13: Schichtenbezogene Kolokalisationsquote von PVcre/tdTomato-Zellen und VIPcre/tdTomato-Zellen mit dem GABA _B -Antikörper	29
Abbildung 14: Prozentsatz der Kolokalisation mit dem GABA _B -Antikörper innerhalb der untersuchten GABAergen Interneurone im <i>Barrel</i> -Kortex	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle A1: Kolokalisation der VIP/tdTomato-Maus mit dem GABA _B -Rezeptor	48
Tabelle A2: Verteilung der kolokalisierten und nicht kolokalisierten VIP/tdTomato-Zellen mit dem GABA _B -Rezeptor	49
Tabelle A3: Kolokalisation der PV/tdTomato-Maus mit dem GABA _B -Rezeptor	50
Tabelle A4: Verteilung der kolokalisierten und nicht kolokalisierten PV/tdTomato-Zellen mit dem GABA _B -Rezeptor	51
Tabelle A5: Schichtenbezogene Kolokalisationsquote von Pvcree/tdTomato-Zellen und VIPcree/tdTomato-Zellen mit dem GABA _B -Rezeptor	52

Abkürzungsverzeichnis

Amy	Amygdala
BSA	bovines Serumalbumin
CB	Calbindin
CCK	Cholezystokinin
CR	Calretinin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ER	endoplasmatisches Retikulum
GABA	γ -Aminobuttersäure, <i>γ-aminobutyric acid</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HC	Hippocampus
IHC	Immunhistochemie
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
PB	Phosphatpuffer, <i>phosphate buffer</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline, <i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PV/ <i>Pvalb</i>	Parvalbumin
Rt	Nucleus reticularis
S1BF	primärer somatosensorischer <i>Barrel</i> -Kortex, <i>primary somatosensory barrel field</i>
SST	Somatostatin
TB	Tris-Puffer, <i>tris buffer</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung, <i>tris-buffered saline</i>
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Triton X-100, <i>tris-buffered saline with triton X-100</i>
UE	Untereinheit
VIP	vasoaktives-intestinales Polypeptid
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis, <i>ventral posteromedial nucleus</i>
wm	weiße Substanz, <i>white matter</i>
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Kortex cerebri

Der Kortex cerebri wird in den phylogenetisch älteren Allokortex mit drei bis vier Schichten und in den Neokortex mit einem sechsschichtigen Aufbau unterteilt. Zu dem älteren Teil gehören der Hippocampus (Archikortex) sowie das Riechhirn (Paläokortex), wobei der Neokortex den größten Teil des Kortex cerebri ausmacht (Creutzfeld 1983). Im Bereich des primär somatosensorischen Kortex lassen sich die in Abbildung 1 aufgeführten Schichten, ausgehend von der *Pia mater*, voneinander unterscheiden. Die Großhirnrinde (*Kortex cerebri*) wird durch die *Fissura longitudinalis* in zwei Hemisphären unterteilt. Der *Sulcus centralis* ist in der Frontalebene mit diesem Interhemisphärenspalt verbunden und trennt das Gehirn in prinzipiell zwei funktionell unterschiedliche Abschnitte. Im frontalen Bereich befinden sich Kortexareale, die vermehrt die Steuerung von Bewegungsabläufen (Motorkortex) übernehmen, und im parietalen Teil Kortexbereiche, die für die somatosensorische Wahrnehmung verantwortlich sind. Die *Gyri*, die direkt hinter und vor dem *Sulcus centralis* liegen, werden als *Gyrus prä-* bzw. *post-centralis* bezeichnet.

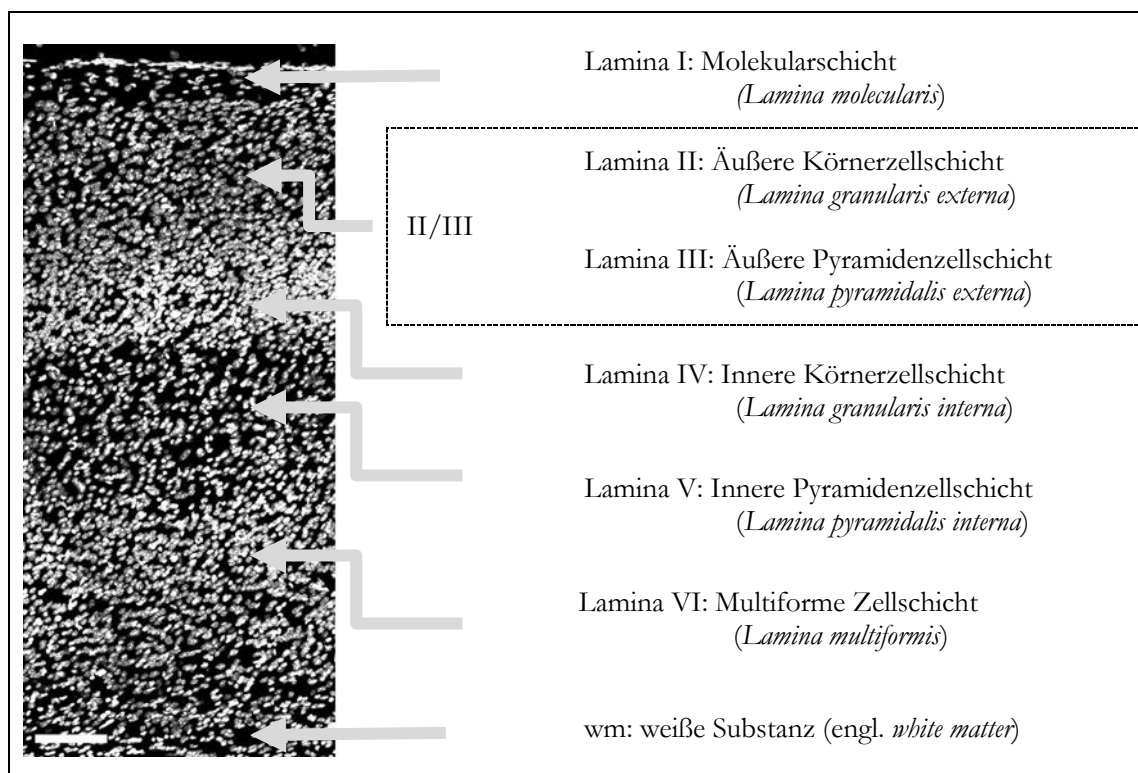


Abbildung 1: Schichten des primär somatosensorischen Kortexes

Darstellung der neokortikalen Schichten (Laminae) in einer Epifluoreszenzaufnahme in der Zellkernfärbung DAPI. Der Schnitt ist 40 µm dick. Maßstableiste 100 µm (Scheuer 2014). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Dr. Bianca Scheuer.

1.2 Der *Barrel*-Kortex

Das Augenmerk richtet sich während dieser Studie auf das Modellsystem des *Barrel*-Kortex von Mäusen, der einen Teil des somatosensorischen Kortex bildet. Die hohe Dichte der Körnerzellen wird hervorgerufen durch die dort endenden Sinnesbahnen. Die innere Körnerzellschicht stellt damit die wichtigste Sammelstelle der meisten Afferenzen aus dem Thalamus dar (Staiger et al. 1996). Diese stammen aus spezialisierten Sinnesorganen, den sogenannten Vibrissen der Maus (Simons 1978).

Der *Barrel*-Kortex beschreibt ein Arrangement von Zellen, die sich in der gesamten Breite der Schicht IV erstrecken und in Säulen angeordnet sind. Ihre Dreidimensionalität erinnerte die Wissenschaftler Woolsey und van der Loos an Fässer (engl. *barrels*). Darüber hinaus beschreiben sie eine höhere Dichte von Zellen, die die Wand des *barrels* bilden, wohingegen die Mitte des *barrels* geradezu hohl erscheint aufgrund der wenigen Zellen, die dort zu finden sind. Die *barrels* erhalten über den Thalamus Informationen über die Tasthaare der kontralateralen Gesichtshälfte des Nagetiers. Daraus schlussfolgerte Woolsey, durch seine im Jahr 1967 vorangegangenen Studien zu kortikal evozierten Potenzialen, dass die Anordnung der *barrels* der somatosensorischen (S1) Kopf-Hals-Region des Menschen entspricht (Woolsey und van der Loos 1970).

Das Modell der *barrels* ist von äußerstem Interesse, da die Kolumnen zur Veranschaulichung der kortikalen Verarbeitung dienen und man dadurch ein besseres Verständnis für die Transformation somatosensorischer Information erhält. Beispielsweise existieren intrakortikal nur wenige, jedoch starke Synapsen, die zu einer sensorischen Antwort beitragen oder sie unterdrücken. Dieser Mechanismus entsteht dadurch, dass die eingehenden Informationen vom Thalamus im *Barrel*-Kortex modifiziert werden und über die Modifikation eine höhere Komplexität erlangen. Neuronaler Input kann so unterschiedliche Ergebnisse triggern und über die gute Sichtbarkeit der *barrels* reproduzierbar analysiert werden (Brecht 2007).

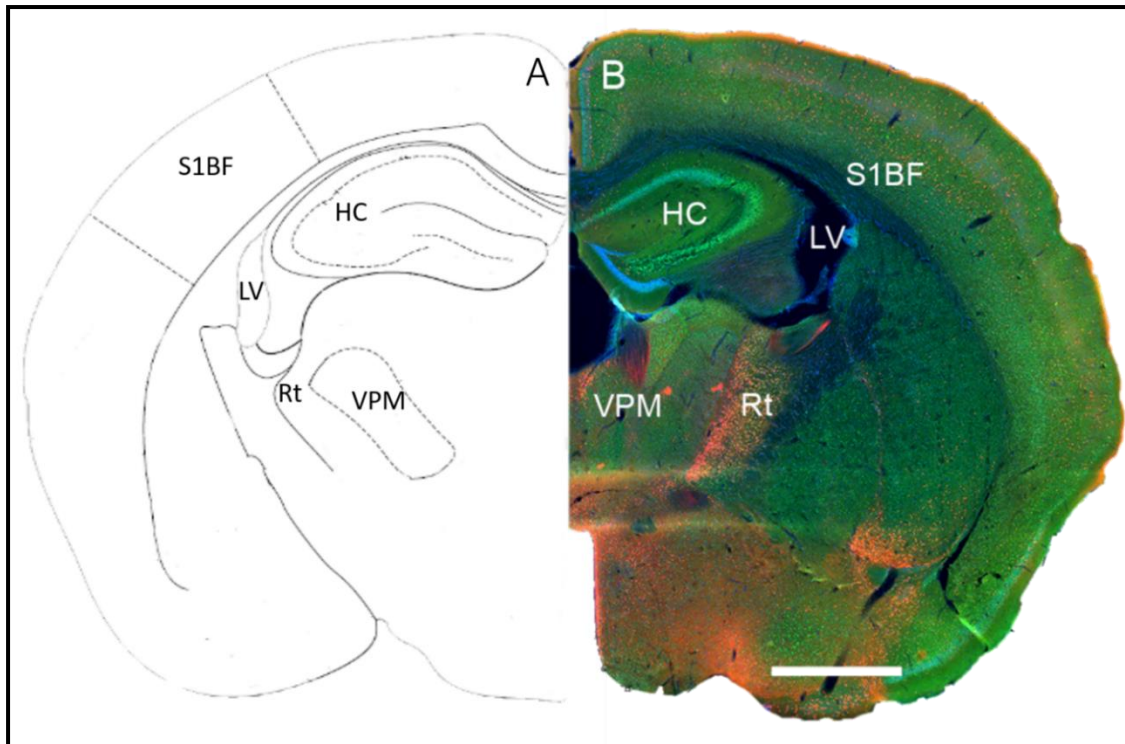


Abbildung 2: Primär somatosensorischer Kortex eines Mausehirns im Frontalschnitt

Überlagerung einer schematischen Darstellung (A) und einer 3-Kanalfärbung (B) eines Frontalschnittes im Bereich des *Barrel*-Kortex (S1BF). Die Epifluoreszenzaufnahme des Kortex im Frontalschnitt in B bildet das histologische Äquivalent zu A ab. Hervorgehoben sind: *Barrel*-Kortex (S1BF), Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV) und der *Nucleus ventralis posteromedialis* (VPM), sowie der *Nucleus reticularis* des Thalamus. Die Aufnahme wurde im Rot- und Grünkanal eines konfokalen Mikroskops aufgenommen und im DAPI-Kanal mithilfe eines ApoTomes. Maßstabsleiste: 1000 μm .

1.3 GABA_B-Rezeptoren

GABA ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des ZNS. In der Regel enthalten etwa ein Drittel aller Synapsen im ZNS das biogene Amin GABA, das auch als Gamma-Aminobuttersäure bezeichnet wird. Es entsteht in einer Decarboxylierungsreaktion aus Glutamat, ein Schritt, der durch die Glutamat-Decarboxylase katalysiert wird. (Roberts und Frankel 1950).

Im ZNS sind verschiedene Arten von GABA-Rezeptoren zu finden, die eine nahezu ausschließlich inhibitorische Wirkung auf die Zielzelle haben. Zu ihnen zählen neben den ionotropen GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren auch die metabotropen GABA_B-Rezeptoren (Borrmann und Feigenspan 1995). Die Struktur der GABA_B-Rezeptoren wurde zuerst im Jahre 1998 von der Arbeitsgruppe um White et al. beschrieben. Aus dieser Studie geht hervor, dass eine Koexpression von zwei GABA_B-Subtypen existiert, die in Synergie zu einem vollfunktionierenden GABA_B-Rezeptor an der Zelloberfläche fusionieren. Dieser Rezeptor setzt sich

aus dem GABA_{B1}-Subtyp, der als unreifes Glykoprotein an der intrazellulären Membran lokalisiert ist, und dem GABA_{B2}-Subtyp zusammen. Letzterer formt mithilfe der intrazellulären Carboxylenden ein Heterodimer mit GABA_{B1}, wodurch diese Rezeptoruntereinheit am terminalen Ende glykosyliert und so an der Oberfläche der Zelle exprimiert wird. Über den GABA_{B2}-Subtyp wird in der Zelle die Induktion der G-Protein-gekoppelten *Second-Messenger*-Signalkaskade initiiert und die Integration allosterischer Modulation innerhalb der heptahelikalen Strukturen bewirkt (Pin et al. 2004; Robbins et al. 2001). Darüber hinaus existieren noch weitere Isoformen des GABA_{B1}-Rezeptors, die eine Unterscheidung mehrerer GABA_B-Rezeptor-Subtypen ermöglichen (Ulrich und Bettler 2007; Bowery 2006; Bettler et al. 1998). Darunter fällt zum einen die GABA_{B1a}-Isoform der Rezeptoruntereinheit GABA_{B1}, die vornehmlich an präsynaptischen Axonterminalen zu finden ist, und die GABA_{B1b}-Isoform, die vor allem an postsynaptischen Axonterminalen exprimiert wird (Pérez-Garci et al. 2006; Vigot et al. 2006). Der Transmitter GABA bedingt eine Konformationsänderung am Rezeptor, wodurch eine Reaktion in der Zielzelle ausgelöst wird. Des Weiteren setzt GABA über den GABA_B-Rezeptor, abhängig davon, ob sich der GABA_B-Rezeptor an der Prä- bzw. Postsynapse befindet, unterschiedliche Mechanismen in Gang. Befindet sich der GABA_B-Rezeptor an der Präsynapse, wird über eine *Second-Messenger*-Kaskade die Abnahme der Kalzium-Leitfähigkeit bewirkt (Curtis et al. 1997; Wu und Saggau 1997), was zur Inhibierung der Transmitterausschüttung an GABAergen und glutamatergen Synapsen führt (McNamara und Skelton 1996). Im Gegensatz dazu wird bei einer postsynaptischen Lokalisation des GABA_B-Rezeptors die Kalium-Leitfähigkeit der Kir3-Typ-Kanäle erhöht. Diese Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit bewirkt die Generierung eines langsamen inhibitorischen postsynaptischen Potenzials (IPSP) (Kaupmann et al. 1998; Kerr und Ong 1995). Metabotrope GABA_B-Rezeptoren sind über eine *Second-Messenger*-Signalkaskade, mithilfe des Guanosin triphosphatbindenden Proteins (G-Protein), verantwortlich für die Feinmodulation der inhibitorischen Neurotransmission (Bettler et al. 1998). Charakteristisch für die langsamen IPSPs der GABA_B-Rezeptoren ist ein langsamerer Beginn und eine längere Dauer des IPSP im Vergleich zu schnellen IPSPs, die von ionotropen GABA_A-Rezeptoren generiert werden (Kaupmann et al. 1998; Bormann und Feigenspan 1995). Studien lassen darauf schließen, dass GABA_B-Rezeptoren bei der Modulation synaptischer Plastizität (Huang et al. 2005; Davies et al. 1991), bei der heterosynaptischen Depression und bei der Inhibition der Backpropagation von Aktionspotentialen eine wesentliche Rolle spielen (Leung und Pelequin 2006; Vogt und Nicoll 1999).

Im medizinischen Bereich wurde, noch bevor die Existenz von GABA_B-Rezeptoren bekannt war, ab 1972 das Medikament Baclofen zur Reduktion spastische Krampfanfälle erfolgreich verwendet, das als Agonist auf den GABA_B-Rezeptor wirkt. Dieses zentral vermittelte Muskelrelaxans ist das Medikament der Wahl bei zerebralen Lähmungen, Multiple Sklerose, dem *Stiff-Person-Syndrom* und Tetanus (Bowery 2006).

1.4 GABAerge Interneurone

Bei Nagetieren besitzt eine neokortikale Säule in der S1-Region circa einen Durchmesser von 0,3 mm und enthält circa 9000 Neurone (Oberlaender et al. 2012; Lefort et al. 2009; Lübke, J., Feldmeyer, D. 2007). Mit etwa 70-80 % bilden die exzitatorischen Pyramidenzellen einen Großteil der neokortikalen Neurone (DeFelipe und Farinas 1992). Die verbleibenden 20-30 % der kortikalen Neurone sind sogenannte Interneurone (Markram et al. 2004).

Die GABAergen Interneurone spielen eine fundamentale Rolle für die Modulation neuronaler Schaltkreise und deren Aktivität. Die Unterscheidung und Charakterisierung unterschiedlicher Klassen und Subklassen von Interneuronen ist essentiell, um zu verstehen, wie Inhibition die kortikale Verarbeitung von Information moduliert (Feldmeyer et al. 2018; Tremblay et al. 2016; Ascoli et al. 2008). Sie bilden mit circa 25 % eine Minderheit in der Verteilung von Neuronen im Kortex von Primaten (Fogarty et al. 2007). In Nagetieren machen sie allerdings nur einen Anteil von 10-15 % der kortikalen Neurone aus (Meyer et al. 2011). Aufgrund der beständigen Forschung im Bereich der GABAergen Interneurone hat sich in den letzten Jahrzehnten herauskristallisiert, dass sie viele wichtige Funktionen besitzen. Dazu gehört, dass GABAerge Interneurone für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Aktivitätsmustern verantwortlich sind – ein Vorgang, der den neuronalen Transfer von Information im Kortex ermöglicht (Tremblay et al. 2016).

Es existieren verschiedene Subpopulationen von GABAergen Interneuronen, die sich in ihren morphologischen, elektrophysiologischen und molekularbiologischen Eigenschaften unterscheiden. Kubota et al. konnten durch ihre Versuche drei verschiedene Subklassen von GABAergen Interneuronen klar definieren (Kubota et al. 1994). Zu diesen zählen die Parvalbumin-immunreaktiven (PV), die Somatostatin- (SST) reaktiven sowie diejenigen, die immunreaktiv auf das vasoaktive-intestinale Polypeptid (VIP) reagieren und zur Gruppe der ionotropen Serotonin-Rezeptor – 5HT_{3a}-exprimierenden Interneurone – gehören (Rudy et al. 2011). Dabei zeigen die genannten molekularen Marker keine bzw. nur ganz geringe Überlagerungen bei den verschiedenen Subpopulationen von GABAergen Interneuronen (Xu et al. 2010). Die Immunfärbung für molekulare Marker ist ein wichtiges Mittel, um inhibierende

Zelltypen zu identifizieren und zu klassifizieren. Des Weiteren treten häufig Korrelationen zwischen der Expression molekularer Marker und morphologischen und elektrophysiologischen Charakteristika auf.

1.4.1 Parvalbumin-exprimierende Interneurone

PV-positive Interneurone bilden mit 40 % die größte Gruppe der GABAergen Interneurone und setzen sich aus verschiedenen Untergruppen zusammen (Rudy et al. 2011). Sie stammen wie auch die SST-positiven Zellen aus der dorsalen Region der ganglionischen Eminenz (Fogarty et al. 2007). Diese Zellen sind von Kubota et al. als mit GABA kolokalisiert beschrieben worden (Kubota et al. 1994). Es existiert ebenfalls eine Kolokalisation mit Calbindin (D28k) (Cauli et al. 1997; Kubota et al. 1994). Eine Immunreaktivität für Neuropeptid Y (NPY), Calretinin (CR) oder Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) wurde bei PV-positiven Zellen ausgeschlossen (Xu et al. 2010; Kubota et al. 1994). Morphologisch betrachtet gehören zu den PV-positiven Zellen die großen Korbzellen und die Chandelier-Zellen (Markram et al. 2004). PV-positive Zellen sind in der Lage, sich gegenseitig zu inhibieren, allerdings vermeiden sie es, andere Neuronenpopulationen zu hemmen (Pfeffer et al. 2013). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass PV-Interneurone in der Lage sind, Subtypen von Somatostatin-positiven Zellen effektiv zu inhibieren (Walker et al. 2016). PV-positive Interneurone werden elektrophysiologisch als schnell feuernde Interneurone charakterisiert (Cauli et al. 1997). In der Literatur findet man auch noch die *multipolar bursting neurons* als weitere Untergruppe der PV-positiven Zellen, die vor allem in der Schicht L2 lokalisiert sein sollen (Blatow et al. 2003), jedoch nicht von weiteren Arbeitsgruppen beschrieben werden (Tremblay et al. 2016).

1.4.2 Somatostatin-exprimierende Interneurone

Somatostatin-exprimierende Interneurone entstehen in der Embryogenese in der dorsalen Region der medialen ganglionischen Eminenz, wandern von dort in den Kortex ein und bilden annähernd 30 % der GABAergen Interneurone (Rudy et al. 2011; Fogarty et al. 2007). Sie sind nicht nur mit GABA kolokalisiert, sondern können darüber hinaus auch mit dem Neuropeptid Y, Calretinin, Calbindin und mit Stickstoffmonoxidsynthase kolokalisiert sein (Xu et al. 2010; Cauli et al. 1997; Kubota et al. 1994).

Die SST-positiven Zellen gehören zu einer Gruppe stark heterogener Zellen, die noch vor wenigen Jahren in keine voneinander klar abgrenzbaren Subtypen unterteilt werden konnten. Aufgrund dieses Umstandes war es nicht ersichtlich, ob sich innerhalb dieser Subpopulation eine hohe Variabilität zeigt oder ob weitere Unterklassen existieren. Ma et al. generierten

aufgrund dieser Problematik Mauslinien (X94 und X98) mit der Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (Ma et al. 2006). Diese Zellen exprimieren GFP, indem über den GAD67-Promoter das Gen für die Expression von GFP ins Genom eingefügt wurde. Bereits im Jahr 2000 konnten Oliva et al. auf diese Weise die zahlreich verwendete GIN-Maus generieren. In nachfolgenden Studien wurde festgestellt, dass es sich bei den GFP-positiven Neuronen der GIN-Maus um einen speziellen Subtyp der Somatostatin-positiven Interneuronen handelt: den Martinotti-Zellen (Ma et al. 2006; Wang et al. 2004). Martinotti-Zellen besitzen ein typisches morphologisches Erscheinungsbild: ein aufsteigendes Axon, das bis in die Schicht I hineinreicht und sich dort horizontal über andere neokortikale Säulen hinaus verzweigt und die basalen sowie die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen innerviert. Somatostatin-positive Interneurone sind zu einem Großteil in Schicht V zu finden, vereinzelt aber auch in den Schichten II bis VI (Wang et al. 2004; Kawaguchi und Kubota 1997). Die Subgruppe der Martinotti-Zellen zeigt sich in den Schicht II/III und V und z. T. auch in tieferen kortikalen Schichten (Zhou et al. 2019; Tremblay et al. 2016). Die GIN-Maus wurde aufgrund der möglichen Differenzierbarkeit der Martinotti-Zellen von den SST-positiven Zellen zusätzlich in diese Studie miteinbezogen.

Zu den elektrophysiologischen Eigenschaften der SST-positiven Zellen gehört, dass sie in der Lage sind, sowohl PV- als auch VIP-exprimierende Interneurone zu hemmen (Pfeffer et al. 2013). Dabei ist zu erwähnen, dass die Martinotti-Zellen auch inhibitorischen Input von den PV- und auch von den VIP-positiven Zellen erhalten (Walker et al. 2016). Darüber hinaus werden sie durch ein kontinuierlich adaptierendes Feuermuster charakterisiert (Ma et al. 2006).

1.4.3 Gruppe der 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Interneurone

Die Population der 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Interneurone umfasst annähernd 30 % aller GABAergen Interneurone. Mithilfe der Immunhistochemie und In-situ Hybridisierung konnten Interneurone mit der Expression des 5HT3a-Rezeptors klar von den PV- bzw. SST-exprimierenden unterschieden werden. Diese Gruppe der 5HT3aR-Interneurone ist äußerst heterogen und daher schwer genau zu charakterisieren, deshalb wird im weiteren Verlauf die bislang best-erforschte Gruppe vorgestellt, die für diese Studie von Relevanz ist (Lee et al. 2010).

Ein Teil der 5HT3aR-Interneurone (ca. 50 %) exprimiert das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP). Diese Interneurone stammen aus der kaudalen ganglionischen Eminenz (CGE),

in der mindestens 90 % aller 5HT_{3a}R-Neurone ihren Ursprung haben (Miyoshi et al. 2010). Die VIP-positiven Zellen sind mit GABA kolokalisiert, und ein signifikanter Anteil dieser Population exprimiert darüber hinaus Calretinin (CR). Die 5HT_{3a}R-Interneurone können aber auch mit Cholecystinin (CCK) und Neuropeptid Y (NPY) kolokalisiert sein (Xu et al. 2010; Markram et al. 2004; Cauli et al. 1997; Kubota et al. 1994).

VIP-exprimierende Interneurone sind morphologisch voneinander zu unterscheiden in bipolare Zellen, kleine Korbzellen, sowie in Doppelbouquetzellen und doppelt büschelige Zellen (Markram et al. 2004). VIP-exprimierende Interneurone sind in allen Schichten des Kortex zu finden, wobei der Großteil dieser Interneurone mit ca. 60 % in Schicht II/III lokalisiert ist (Prönneke et al. 2015; Taniguchi et al. 2011; Staiger et al. 2004).

Im Hinblick auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften weisen VIP-Interneurone ein eher unregelmäßiges Feuermuster auf. Es wird beschrieben, dass VIP-positive Interneurone in der Lage sind, SST-positive Zellen zu inhibieren (Pfeffer et al. 2013; Lee et al. 2010). Zusätzlich dazu können sie auf PV-positive Zellen projizieren. VIP-positive Interneurone können selbst durch Acetylcholin und durch Serotonin moduliert werden (Walker et al. 2016; Hioki et al. 2013; Dávid et al. 2007; Ferezou et al. 2002; Porter et al. 1998; Cauli et al. 1997).

1.5 Ziele der Studie

In dieser Studie sollen die kortikalen GABAergen Interneurone hinsichtlich der Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors untersucht werden. Hierfür werden die vier transgenen Mauslinien VIP^{cre}/tdTomato-, PV^{cre}/tdTomato-, SOM^{cre}/tdTomato- und die GIN-Maus verwendet. Die jeweilige GABAerge Interneuronenpopulation ist bei den transgenen Mäusen mit dem rot fluoreszierenden Protein tdTomato bzw. mit dem grün fluoreszierenden Protein bei der GIN-Maus markiert. Mittels Immunhistochemie soll auf das Vorkommen des GABA_B-Rezeptors getestet werden. Eine Überlagerung des nativen Fluoreszenzsignals (rot bei tdTomato-Mäusen und grün bei der GIN-Maus) und der Antikörpermarkierung (grün bzw. rot), wird als Kolokalisation der Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor gewertet. Diese Zellen sind in den Schnitten gelb markiert.

Für die Analyse werden Hirnschnitte des *Barrel*-Kortex der vier transgenen Mauslinien verwendet und anschließend mit dem GABA_B-Rezeptor-Antikörper versetzt. Im Anschluss werden die Schnitte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop aufgenommen und dann mithilfe eines Softwareprogrammes ausgewertet. Für die Population der Somatostatin-

positiven Interneuronen werden die SOMcre/tdTomato-Maus und die GIN-Maus eingesetzt. Hier soll der Frage nachgegangen werden, ob die Subpopulation der Martinotti-Zellen bevorzugt GABA_B-Rezeptoren exprimieren und sich somit von der heterogenen SST-Population abgrenzen. Die Untersuchung der VIP- und PV-exprimierenden Interneurone erfolgt schichtenspezifisch, um eventuelle Aussagen zu einer schichtenabhängigen Kollokalisierung mit dem metabotropen GABA_B-Rezeptor zu treffen.

Die Befunde sollen einen Beitrag zum Verständnis der inhibitorischen Transmission und insbesondere für die Modulation der GABAergen Interneurone leisten. Aufgrund einer prä- und postsynaptischen Lokalisation von GABA_B-Rezeptoren im Kortex und deren Assoziation mit Kalzium- und Kaliumkanälen können bei der Aktivierung dieser Rezeptoren verschiedenste Effekte (langanhaltende Hyperpolarisation, Reduktion der Transmitterausschüttung) entstehen, die einen Einfluss auf die kortikale Prozessierung und letztlich auf das Verhalten des Organismus haben (Bowery, 2006).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die immunhistochemischen Versuche wurden insgesamt 16 adulte männliche Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsklinik in Göttingen unter Standardbedingungen gehalten. Alle durchgeführten Experimente erfolgten unter strenger Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (Stand 2014).

Für die vorliegende Studie wurden jeweils vier Tiere der transgenen Mauslinien PVcre/tdTomato-, VIP/tdTomato-, SOMcre/tdTomato- und die GIN-Maus verwendet. Die GIN-Maus gehört zu einer transgenen Mauslinie, in deren Genom das grün fluoreszierende Protein (eGFP, *enhanced green fluorescent protein*) eingefügt wurde. Nach Untersuchungen wurde ersichtlich, dass eGFP in einer Subpopulation SST-positiver Zellen exprimiert wird. Diese Zellen befinden sich vorwiegend in Hippocampus und Neokortex. Im Kortex sind sie in Schicht II-IV und in der oberen Schicht V lokalisiert (Olivia et al. 2000).

Darüber hinaus wurden VIPcre/tdTomato-Mäuse verwendet, die VIP exprimieren und durch die Verpaarung der VIP-ires-Cre-Maus mit der Reportermaus Ai9: loxP-STOP-loxP-tdTomato entstanden sind und mit dem rot fluoreszierenden Protein markiert sind. Die Reportermaus Ai9 wurde auch bei der Verpaarung zur Entstehung der SOMcre/tdTomato-Maus (Ssttm2.1(cre)Zjh/J) und der PVcre/tdTomato-Maus (B6;129P2-*Pvalb*^{tm1(cre)Arbr}/J) genutzt (Taniguchi et al. 2011; Madisen et al. 2010).

2.2 Perfusion der Versuchstiere und Vorbereitung des Gewebes

Für diese Studie wurden von dem labormedizinischen Fachpersonal der Arbeitsgruppe des Instituts die Versuchstiere vor der Perfusion mit Ketamin (0,1 ml pro 10 g Körpergewicht) narkotisiert, woraufhin das Ausbleiben der Reflexe vor der Präparation der Tiere überprüft wurde. Im Anschluss daran wurde der Thorax der Tiere geöffnet, das Herz dargestellt und die Aorta über den linken Ventrikel transkardial perfundiert. Für die Perfusion wurde eine stumpfe Kanüle verwendet, die in Herzachse den linken Ventrikel perforierte und in Richtung Aorta weiter vorgeschoben wurde, um dann mit einer Arterienklemme in ihrer Position fixiert zu werden. Nachfolgend wurde zur Umgehung des Lungenkreislaufes das rechte Atrium geöffnet. Das Gefäßsystem wurde daraufhin vom Blut mit 20 ml 10 %iger Sucroslösung gereinigt, und im Anschluss erfolgte die Fixierung der Versuchstiere mit 250 ml

4 %iger Paraformaldehyd (PFA). Die Gehirne wurden nach der Perfusion aus dem Kranium herauspräpariert und bei 4°C für zwei Stunden mit PFA nachfixiert.

Zur Vorbereitung des Gewebes auf die Immunhistochemie wurden die Gehirne nach der Postfixation zweimal für jeweils 15 min in Phosphatpuffer gewaschen und anschließend bis zum Schneidevorgang in Phosphatpuffer bei 4°C gelagert.

2.3 Immunhistochemie

In dieser Studie wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie verwendet. Hierbei bindet der Primärantikörper an das Antigen des GABA_{B2}-Rezeptors. Im Anschluss an diesen Vorgang wurde ein zweiter Antikörper, der an das Fc-Fragment des ersten Antikörpers bindet und mit einem Fluorophor markiert ist, hinzugegeben. Aufgrund seiner Markierung mit einem Fluoreszenzmarker ist dieser in der Lage, den primären Antikörper in der Fluoreszenzmikroskopie indirekt sichtbar zu machen. Dieser primäre Antikörper kann hier als das darzustellende Antigen betrachtet werden (Boenisch 2001).

Für das Experiment wurden mithilfe eines Vibratoms (VT 1200S der Firma Leica, Wetzlar, Deutschland) 40 µm dicke Frontalschnitte vom *Barrel*-Kortex der Versuchstiere angefertigt, in Phosphatpuffer gesammelt und bis zur Anwendung bei 4°C gelagert. Zuerst wurden die Schnitte 2x 15 min in 0,05 M Tris-Puffer auf dem Schüttler gewaschen bzw. geschüttelt. Dadurch wurden sie für den sich anschließenden TBS-Puffer vorbehandelt, in dem die Schnitte auch jeweils 2x 15 min auf dem Schüttler inkubierten. Darauffolgend wurden die Schnitte mit TBST-Puffer für 2x 15 min versetzt. Dieser hat zusätzlich zum TBS-Puffer noch die Triton-X-Komponente, durch die die Oberflächenspannung herabgesetzt wird und das Gewebe durch die Antikörper besser penetriert werden konnte. Im Anschluss wurden die Schnitte separat voneinander für ca. 90 min. in einer Lösung, bestehend aus bovinem Serum Albumin (BSA; 0,25 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10 % normalem Ziegen Serum (Normal Goat Serum, NGS der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) und TBST-Puffer, blockiert. BSA ist ein Proteinbestandteil des Rinderserums und verhindert eine unspezifische Antikörperbindung an Zellmembranen. Das Ziegen Serum wurde hinzugefügt, weil der sekundäre Antikörper aus der Ziege gewonnen wurde und es über sein Hinzufügen nicht zu einer unspezifischen Antikörperbindung kommen sollte. Beide Bestandteile wurden in TBST-Puffer gelöst. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper (Goat anti-Guinea Pig-GABA_B-R2, #AB2255; EMD Millipore) für den GABA_B-Rezeptor in der Blockierlösung mit einer Verdünnung von 1:250 hinzugefügt. Die Schnitte

wurden dann für 48-72 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde wieder für 1x 5 min und 4x 15 min mit TBST gespült. Nach dem Waschen der Hirnschnitte wurden diese mit dem sekundären Antikörper versetzt. Zu den Schnitten der transgenen Mauslinien VIPcre/tdTomato, SOMcre/tdTomato und PVcre/tdTomato wurde der sekundäre Antikörper (Goat anti-Guinea Pig-Alexa 488 der Firma Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:500 in der Blockierlösung hinzugegeben. Für der GIN-Mauslinie wurde dagegen ein anderer sekundären Antikörper (Goat anti-Guinea Pig Alexa 594 der Firma Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), jedoch in gleicher Verdünnung, verwendet. Die mit dem sekundären Antikörper versetzten Schnitte wurden daraufhin für 4 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit TBST 1x 5 min und 2x 15 min gespült und anschließend für 1x 15 min mit TBS gewaschen. Darauf folgte das Anfärben der Zellkerne durch 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:1000 in TBS für 5 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach anschließenden Waschschritten mit TBS für 1x 15 min und TB für 2x 15 min wurden die Schnitte in TB-Puffer auf den Objektträger aufgezogen und mit Aqua Poly-Mount (Polyscience, Warrington, USA) eingedeckelt.

2.4 Auszählen/Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte der vier verwendeten transgenen Mauslinien wurden für die Auswertung im Bereich des *Barrel*-Kortex mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CF-LSM, SP2 Wetzlar, Firma LEICA, Deutschland) aufgenommen.

Zur quantitativen Analyse wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop mit dem Browser 2.9 (Arivis Vision, Rostock, Deutschland) verwendet. Es wurden dreidimensionale Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung und einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixel angefertigt. Die Aufnahmen mit Focus auf dem *Barrel*-Kortex besitzen in der z-Ebene eine Auflösung von einem Mikrometer (Fokusebene) und umfassen den *Barrel*-Kortex von der Pia mater bis zur weißen Substanz. Die Aufnahmen wurden sequentiell durchgeführt, um eine Spektralüberschneidung der einzelnen Farbkanäle (Rot- und Grünkanal) während des Scanvorgangs zu vermeiden.

Da bei dem für diese Studie zur Verfügung stehenden konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine Aufnahme der Zellkernfärbung nicht möglich war, wurden die Übersichtsaufnahmen der einzelnen Schnitte im DAPI-Kanal mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskopes angefertigt. Anschließend erfolgte eine Angleichung beider Aufnahmen mithilfe histologischer Landmarken der einzelnen Schnitte sowie durch eine Überlagerung der nativen Fluoreszenz der untersuchten transgenen Mauslinien. Hierfür wurde am Epifluoreszenzmikroskop das tdTomato-Signal der SOMcre-, VIPcre- und PVcre/tdTomato-Zellen, bzw. des GFP-Signals der GIN-Maus ebenfalls aufgenommen. Diese Vorgehensweise ermöglichte das kongruente Verschmelzen des DAPI-Kanals aus der Übersichtsaufnahme mit den Fluoreszenzsignalen der markierten Zellen aus den LSM-Aufnahmen und schaffte somit die Voraussetzungen für das manuelle Einzeichnen der Schichten.

Die einzelnen Bildteile wurden mithilfe des Programms Arivis 2.9 zusammengesetzt, da bei den Aufnahmen vier einzelne Bildaufnahmen (sog. Kacheln) entstanden sind, die zu einem Bild zusammengesetzt werden mussten. Hierbei wurden die zellspezifischen Strukturen und die Überlappung der einzelnen Kacheln in mindestens 7 Pixeln zur Hilfe genommen, um ein für die Analyse valides Bild zu generieren.

Im Anschluss daran wurden die dreidimensionalen Aufnahmen in das Computerprogramm NeuroLucida überführt. In einem Teilbereich des *Barrel*-Kortex wurde eine Kontur mit einer Mindestbreite von 1000 μm gezogen, um eine Eingrenzung des zu untersuchenden Gebiets für die Analyse festzulegen. Zellsomata, die mit mehr als 50 % außerhalb dieser Kontur lagen, wurden nicht in die Auszählung miteingeschlossen. Die Fluoreszenz-markierten Somata der transgenen Mauslinien und die Kolokalisationen mit dem GABA_B-Rezeptor wurden per Hand markiert. In dieser Studie wurden dafür jeweils zwei Schnitte von vier Tieren für jede transgene Mauslinie, wie oben beschrieben, eingescannt und ausgewertet. In der Auszählung wurden folgende Charakteristika der Zellen registriert: VIP/tdTomato-positive, SST/tdTomato-positive, PV/tdTomato-positive und GFP-positive Zellen der GIN-Maus. Zusätzlich dazu wurden die Kolokalisationen mit dem GABA_B-Rezeptor untersucht. Eine Kolokalisation wurde in der Analyse angenommen, sobald die Zelle nicht nur ihr Eigensignal, wie beispielsweise tdTomato zeigte, sondern darüber hinaus auch das Signal für den eingesetzten GABA_B-Rezeptor-Antikörper (#AB2255; EMD Millipore). Die Überlagerung beider Signale zeigte eine Gelbfärbung der Somata. Wurde eine direkte Überlagerung einer Zelle mit beiden Signalen detektiert, obwohl sie nicht gelb erschien, wurde dies auch als eine Kolokalisation angesehen. Auf diese Weise wurde vor allem bei den GFP-positiven Zellen vorgegangen.

Die Schichten für die Hirnschnitte der PVcre/tdTomato- und VIPcre/tdTomato-Maus wurden manuell mithilfe der DAPI-Zellkernfärbung mit der Software Neurolucida eingezeichnet. Das Einzeichnen der Schichten erfolgte in folgenden Arbeitsschritten: Pia mater und Schicht I wurden in der Analyse als ein Abschnitt gewertet, da die Pia mater durch die Präparation des Gewebes nicht immer erhalten wurde. Durch den zellarmen Charakter der Schicht I war es möglich, diese von der deutlich zellreicheren Schicht II/III abzugrenzen. Darüber hinaus waren die *Barrel*-Strukturen in Schicht IV klar erkennbar, was die Abgrenzung der darüber liegenden Schicht II/III erleichterte und letztere dadurch definierte. Eine Unterscheidung zwischen Schicht II und III wurde nicht vorgenommen, da keine anerkannte Grenze existiert. Schicht VI besaß eine deutlich höhere Zelldichte als Schicht V, was wiederum eine Abgrenzung zwischen Schicht VI und V erlaubte. Eine Unterscheidung zwischen Schicht Va und Schicht Vb ist möglich, da sich in der Schicht Va deutlich weniger Zellen befinden als in Schicht Vb, und Schicht Va macht etwa ein Drittel der gesamten Ausdehnung von Schicht V aus (Schubert et al. 2006).

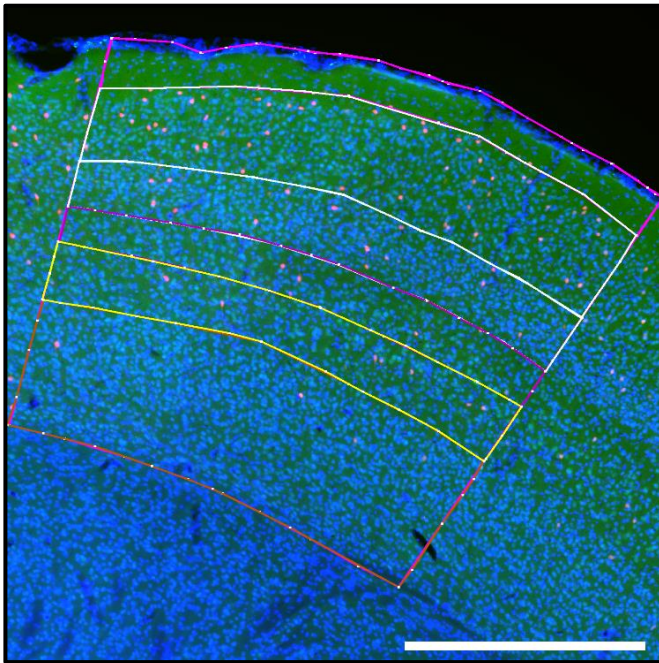


Abbildung 3: Manuelles Einzeichnen der kortikalen Schichten

Frontalschnitt einer VIPcre/tdTomato-Maus nach erfolgter immunhistochemischer Behandlung mit dem GABA_B-Antikörper. Die GABA_B-positiven Zellen sind grün. Rot ist das tdTomato-Signal der transgenen Mauslinie. Die Zellkerne stellen sich Blau (DAPI) dar. Die zu untersuchenden Zellen werden durch Marker hervorgehoben und die farbigen Umrandungen grenzen die neokortikalen Schichten voneinander ab, die aufgrund der DAPI-Färbung eindeutig zu differenzieren sind. Maßstableiste: 500 µm

Das zur Auswertung verwendete Programm Neuroexplorer errechnete die Zellzahl nicht nur für den *Barrel*-Kortex, sondern auch für jede einzelne Schicht. Im Anschluss daran wurden die gewonnenen Daten in die Programme Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond,

Washington, USA), Sigma Plot 13 (Systac Software, San Jose, Kalifornien, USA) und Microcal Origin Version 8.5 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) exportiert und analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte in Sigma Plot 13. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mithilfe des Mann-Whitney Rangsummentests statistisch untersucht und miteinander verglichen. Signifikant unterschiedliche Ergebnisse sind durch * gekennzeichnet (vgl. Abbildung 14)

3 Ergebnisse

In dieser Studie steht die Charakterisierung der GABAergen Interneurone im Mittelpunkt der Betrachtung. In diesem Zusammenhang soll mithilfe der Immunhistochemie ermittelt werden, ob GABAerge Interneurone ubiquitär GABA_B-Rezeptoren exprimieren oder ob unter ihnen Ausnahmen existieren. Darüber hinaus soll eine Aussage über die schichtenspezifische Verteilung von GABA_B-Rezeptoren in den PVcre/tdTomato- und VIPcre/tdTomato-Mauslinien getroffen werden können.

3.1 Exprimieren SST-positive Zellen GABA_B-Rezeptoren?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden SOMcre/tdTomato-Mäuse (SOM-ires-Cre JAXa 013044), deren SST-positive Zellen tdTomato als rot fluoreszierendes Protein besitzen, verwendet. Des Weiteren wurde diese transgene Mauslinie mit der Mauslinie TgN (Gad-GFP)45704Swn (GIN-Maus) in Relation gesetzt, da diese eine Untergruppe der SST-positiven Zellen markiert. Die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus besitzen Axone, die bis in Schicht I des primären somatosensorischen Kortexes hineinreichen und neokortikalen Martinotti-Zellen entsprechen (Ma et al. 2006).

Jeweils acht Gehirnschnitte von vier SOMcre/tdTomato- und von vier GIN-Mäusen (zwei Schnitte pro Maus) wurden hinsichtlich ihrer Expression auf den metabotropen GABA_B-Rezeptor untersucht. In allen Gehirnschnitten der SOMcre/tdTomato-Mäuse ist eine ansprechende Färbung für den GABA_B-Antikörper zu erkennen. In der 10-fachen Vergrößerung, zur Übersicht des frontalen Hirnschnittes, sind im Neokortex und im Bereich des *Nucleus reticularis* (Rt) SST-positive Zellen auszumachen (Abbildung 4A). In der 20-fachen Vergrößerung des *Barrel*-Kortex mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sind deutlich mehrere SST-positive (rot) und GABA_B-positive Zellen (grün) zu erkennen (Abbildung 4B). Bei näherer Betrachtung wird in der Abbildung 4C die Überlagerung beider oben genannter Signale (gelb) verdeutlicht. Diese Abbildung zeigt die Kollokalisierung von SST-positiven Zellen, die zusätzlich über die immunhistochemische Färbung mit dem GABA_B-Antikörper markiert wurden.

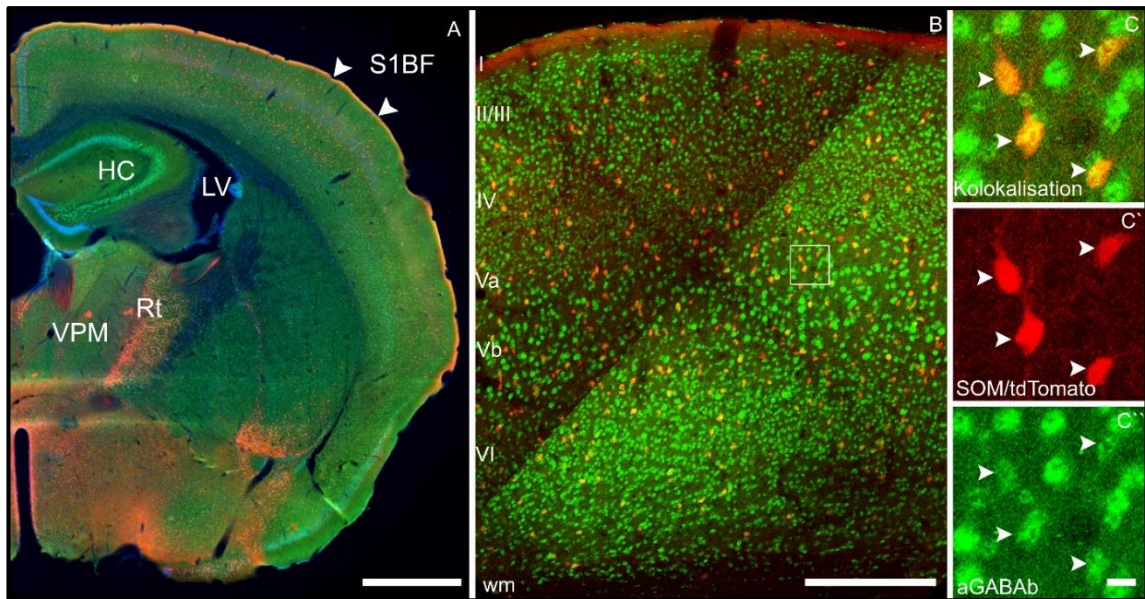


Abbildung 4: Immunhistochemie mittels GABA_B-Antikörper zur Markierung GABA_B-positiver Zellen im Barrel-Kortex der SOMcre/tdTomato-Maus

A: Frontalschnitt des Kortex einer SOMcre/tdTomato-Maus, bei der Rot das tdTomato-Signal und Grün die mit GABA_B-markierten Zellen hervorhebt. Eine Kolokalisation beider Signale ist gelb dargestellt. Die Zellkerne (DAPI) sind in Blau dargestellt. (A) In der 10-fachen Vergrößerung der linken Hemisphäre ist der *Barrel*-Kortex (S1BF, Pfeilspitzen) zu erkennen. Folgende Strukturen wurden als Landmarken identifiziert: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV), *Nucleus ventralis posteromedialis* (VPM) und der *Nucleus reticularis* (Rt); Maßstabelleiste: 1000 μm . (B) Der *Barrel*-Kortex ist in 20-facher Vergrößerung und in der *maximum intensity projection* abgebildet. Die einzelnen Schichten sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstabelleiste: 200 μm . Das umrahmte Gebiet aus B ist in C-C'' detaillierter zu betrachten. Die Kolokalisation (C), bestehend aus der Überlagerung des tdTomato-Signals (C') und dem Signal des GABA_B-Antikörpers (C'') wird in Gelb dargestellt. Maßstabelleiste: 20 μm .

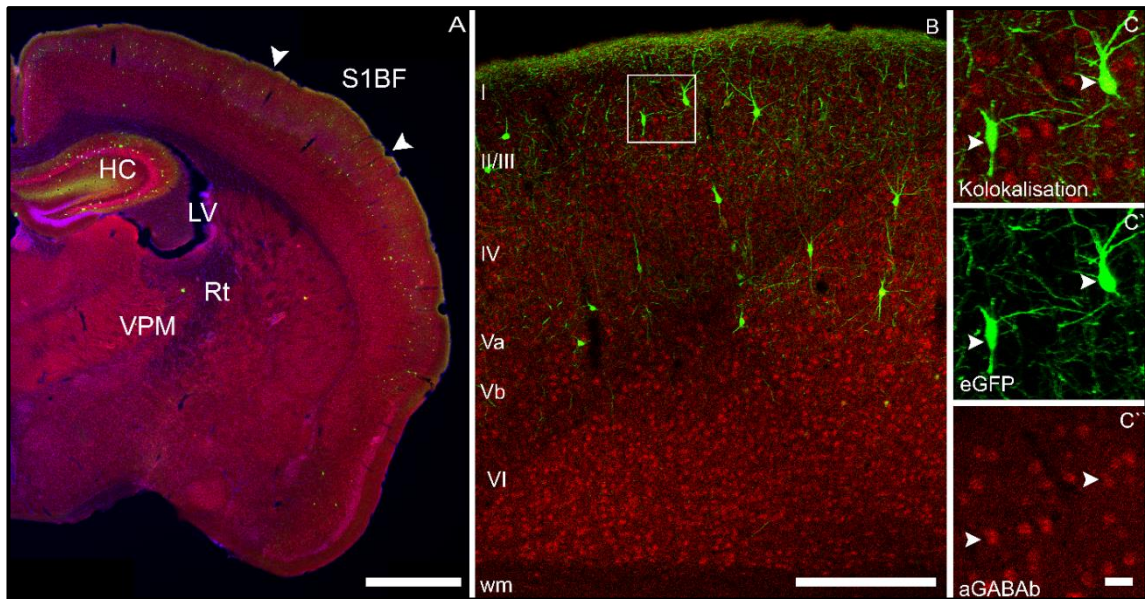


Abbildung 5: Immunhistochemie mittels GABA_B-Antikörper zur Markierung GABA_B-positiver Zellen im Bereich des *Barrel*-Kortex der GIN-Maus

A: Frontalschnitt des Kortex einer GIN-Maus, bei der Grün das GFP Signal in den Martinotti-Zellen und Rot die mit GABA_B-markierten Zellen hervorhebt. Die linke Hemisphäre des Kortex ist in 10-facher Vergrößerung, Maßstableiste: 1000 μ m. B: Die *maximum intensity projection* des *Barrel*-Kortex ist in 20-facher Vergrößerung aufgenommen ist; Maßstableiste: 200 μ m. In C-C'' ist das markierte Gebiet aus B in der Vergrößerung zu sehen. Die Kolokalisation des grün fluoreszierenden Proteins (C) mit dem GABA_B-Antikörper (C') wird in C veranschaulicht. Maßstableiste: 20 μ m.

In der immunhistochemischen Färbung der Hirnschnitte waren die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus deutlich zu erkennen (Abbildung 5A und 5B). In der 10-fachen Vergrößerung zur Übersicht waren die GFP-positiven Zellen sowohl im primär somatosensorischen Kortex als auch im Bereich des Hippocampus (HC) zu finden (Abbildung 5A). In der 20-fachen Vergrößerung des *Barrel*-Kortex zeigten die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus ihre charakteristischen Axone bzw. Axonaufzweigungen in der Schicht I. Die GABA_B-Färbung zeigte eine ubiquitäre Anfärbung der Somata in den Bereichen des Kortex cerebri, Hippocampus und Thalamus (Abbildung 5A und 5B). Nach Aufspaltung des GFP- und des GABA_B-Signals war die Kolokalisation beider Signale deutlich zu erkennen (Abbildung 5C-C'). In der Überlagerung des tdTomato-Signals und der GABA_B-Antikörpermarkierung imponierte die Kolokalisation zwar nicht gelb, aber es konnte mittels NeuroLucida erkannt werden, dass eine Markierung beider Signale in denselben Zellen besteht. (Abbildung 5C).

Mithilfe der quantitativen Analyse konnte ermittelt werden, dass in allen acht untersuchten Hirnschnitten der GIN-Maus eine vollständige Kolokalisation mit GABA_B-Rezeptoren vorliegt. Im Mittel zeigten $948,9 \pm 252,9$ Zellen pro 1 mm^3 *Barrel*-Kortex (Mittelwert \pm Standardabweichung) eine Überlagerung des transgenen GFP-Signals mit der GABA_B-Immunfärbung (Abbildung 5A). In keinem der acht Schnitte waren GFP-positive Zellen zu finden, die nur ihr Eigensignal exprimierten. Demzufolge wiesen 100 % der GIN-Zellen eine Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors auf (Abbildung 5B).

Sowohl eigene Untersuchungen der Arbeitsgruppe als auch bereits veröffentlichte Studien zeigen, dass es sich bei den GFP-positive Zellen der GIN-Maus um SST-exprimierende Interneurone handelt. Jedoch stellen sie nur eine Subpopulation der SST-exprimierenden GABAergen Interneuronen dar. Deshalb wurde ebenfalls eine quantitative Analyse der GABA_B-Rezeptor-Färbung der SOMcre/tdTomato-Maus durchgeführt. In fünf von acht untersuchten Hirnschnitten war jede tdTomato-positive Zelle mit dem GABA_B-Signal kolokalisiert. Im Bereich des *Barrel*-Kortex konnten $5854,1 \pm 1190,8$ Zellen pro mm^3 , die mit dem tdTomato-Signal markiert und potenziell SST-positiv sind, registriert werden. Davon waren in acht ausgezählten Hirnschnitten $5677,3 \pm 1272,5$ Zellen mit dem GABA_B-Antikörper kolokalisiert, und lediglich $176,8 \pm 313,6$ tdTomato-Zellen in drei Hirnschnitten zeigten keine Überlagerung der Signale (Abbildung 6A). Daraus ergibt sich eine $96,8 \pm 5,6$ % Kolokalisation der SST-positiven Zellen mit der GABA_B-Rezeptor-Färbung im Bereich des *Barrel*-Kortex (Abbildung 6B).

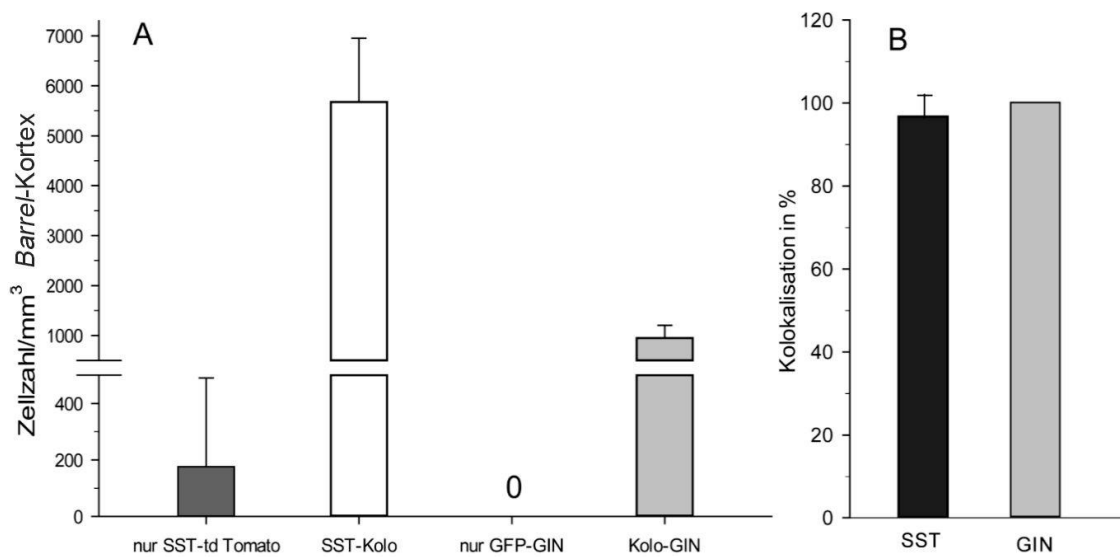


Abbildung 6: Kolokation zwischen SOMcre/tdTomato- bzw. GFP-GIN- und dem GABA_B-Antikörper

6A: Anzahl der Kolokalisationen zwischen den SOMcre/tdTomato-Zellen bzw. den GFP-GIN Zellen mit dem GABA_B-Antikörper innerhalb des *Barrel*-Kortex. Anzahl an SOMcre/tdTomato, die nicht mit der GABA_B-Rezeptor-Färbung markiert wurden (dunkelgrauer Balken). Ausschließlich GFP-positive Zellen der GIN-Maus konnten nicht beobachtet werden. 6B: Kolokalisationen (in %) zwischen den tdTomato-positiven Zellen der SOM-cre Maus bzw. den GFP-positiven Zellen der GIN-Maus mit dem GABA_B-Antikörper im Bereich des *Barrel*-Kortex. Bei der GIN-Maus sind 100 % der Zellen und bei der SOM/cre Maus 96,8 % der Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass GFP-positive Zellen und demzufolge mehrheitlich Martinotti-Zellen eine Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors aufweisen. Des Weiteren liegt der Prozentsatz der kolokalisierten Zellen in der SOMcre/tdTomato-Maus so hoch, dass ebenso für weitestgehend alle Somatostatin-exprimierenden GABAergen Interneurone eine Expression von GABA_B-Rezeptoren angenommen werden kann.

3.2 Exprimieren VIP- und PV-positive Zellen GABA_B-Rezeptoren?

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die transgenen Mauslinien VIPcre/tdTomato und PVcre/tdTomato verwendet. Die VIP- bzw. die PV-exprimierenden GABAergen Interneurone besitzen bei diesen Mauslinien das tdTomato-Protein, das rot fluoresziert. In die Analyse wurden die Daten von jeweils acht Hirnschnitten von je vier VIPcre/tdTomato- und PVcre/tdTomato-Mäusen (zwei Schnitte pro Maus) einbezogen. Mittels Immunhistochemie wurden die VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen auf die zusätzliche Expression von GABA_B-Rezeptoren untersucht. Die Auswertung erfolgte für diese Experimente schichtenbezogen und umfasste alle Schichten des Kortex. Die schichtenbezogene Auswertung der SST-

exprimierenden Interneurone wurde nicht berücksichtigt, da in der weiteren Analyse eine fast umfassende Markierung der SST-positiven Zellen mit dem GABA_B-Antikörper vorlag. Der GABA_B-Antikörper zeigt in allen acht untersuchten Hirnschnitten der VIPcre/tdTomato-Maus eine immunhistochemische Anfärbung (grün). In der 10-fachen Vergrößerung ist im Neokortex und vor allem im Bereich des *Barrel*-Kortex das tdTomato-Signal der VIP-exprimierenden Zellen (rot) zuerkennen (Abbildung 7A). Außerdem sind auch einzelne VIP-positive Zellen im Bereich der Amygdala (Amy) auszumachen. In der 20-fachen Vergrößerung des Kortex, die mithilfe des LSMs aufgenommen wurde, ist die Verteilung der VIP-positiven Zellen zu erkennen, wobei diese Zellen zum Großteil in Schicht II/III und IV vorkommen (Abbildung 7B). In einem vergrößerten Ausschnitt von Schicht II/III ist die Kolokalisation des tdTomato-Signals mit dem GABA_B-Antikörper deutlich zu erkennen (Abbildung 7C). Nicht kolokalisierte VIP-exprimierende Zellen waren in allen Schichten in einer geringen Anzahl und in lediglich drei von acht Hirnschnitten überhaupt zu beobachten.

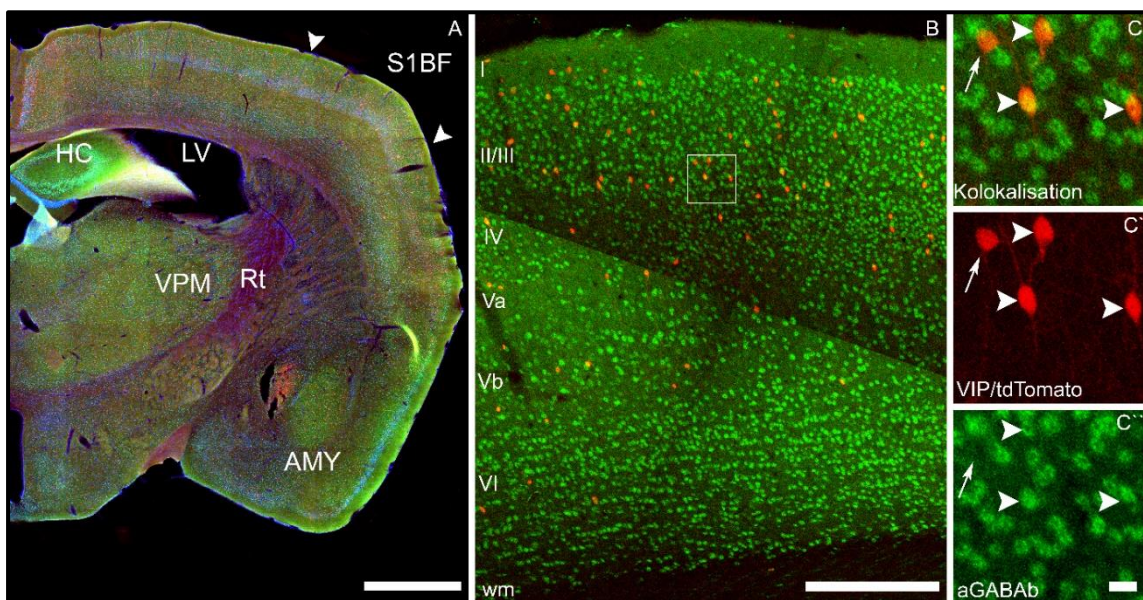


Abbildung 7: Immunhistochemie mittels GABA_B-Antikörper zur Markierung GABA_B-positiver Zellen im *Barrel*-Kortex der VIPcre/tdTomato-Maus

A: Frontalschnitt des Kortex einer VIPcre/tdTomato-Maus, bei der Rot das transgene tdTomato-Signal und Grün die für die GABA_B-Rezeptoren markierten Zellen hervorhebt. Zellen, die gelb erscheinen, sind VIP-positive Zellen, die neben ihrem tdTomato-Eigenesignal zusätzlich mit dem GABA_B-Antikörper markiert wurden. Maßstableiste: 1000 μ m. B: *Barrel*-Kortex in *maximum intensity projection*, Maßstableiste: 200 μ m. Die Detailaufnahme C-C'' bildet das markierte Gebiet in B ab. Die Kolokalisation wird durch die gelbe Färbung der Zellen in C sichtbar (mit Pfeilspitzen gekennzeichnet). Die nicht mit dem GABA_B-Antikörper kolokalisierten VIP-positiven Zellen wurden mit Pfeilen hervorgehoben. Das Einzelsignal tdTomato in der VIPcre/tdTomato-Maus wird in C' rot dargestellt. Die bloße Markierung mit dem GABA_B-Antikörper wurde in C'' grün visualisiert. Maßstableiste: 20 μ m.

Acht Hirnschnitte der VIPcre/tdTomato-Maus wurden in Bezug auf die Expression des GABA_B-Rezeptors quantitativ ausgewertet. In 1 mm³ *Barrel*-Kortex weisen $2288,3 \pm 302,3$

tdTomato-positive Zellen eine Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor auf. Zellen, die nur das native tdTomato-Signal zeigten, konnten lediglich in drei von acht Hirnschnitten der VIPcre/tdTomato-Maus beobachtet werden (Tabelle A1). Die Anzahl der VIP-positiven Zellen, die nicht mit dem GABA_B-Antikörper Signal kolokalisiert sind, beläuft sich auf $138,6 \pm 190,4$ Zellen pro 1 mm^3 Barrel-Kortex. In Schicht I finden sich $15,5 \pm 33,7$ und in Schicht II/III $75,2 \pm 123,9$ Zellen, die ausschließlich das tdTomato-Signal exprimieren. $34,2 \pm 59,4$ VIP-positive Zellen, die nicht mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert waren, wurden für die Schicht IV ermittelt. In Schicht V fanden sich im Mittel nur $10,5 \pm 19,9$ und in Schicht VI sich nur $3,2 \pm 8,5$ VIP-exprimierende Zellen, die keine Koexpression des GABA_B-Rezeptors aufwiesen (Abbildung 8, Tabelle A1). Das entspricht einer Kolokalisationsquote von $95 \% \pm 7,0$ (Abbildung 14, Tabelle A5).

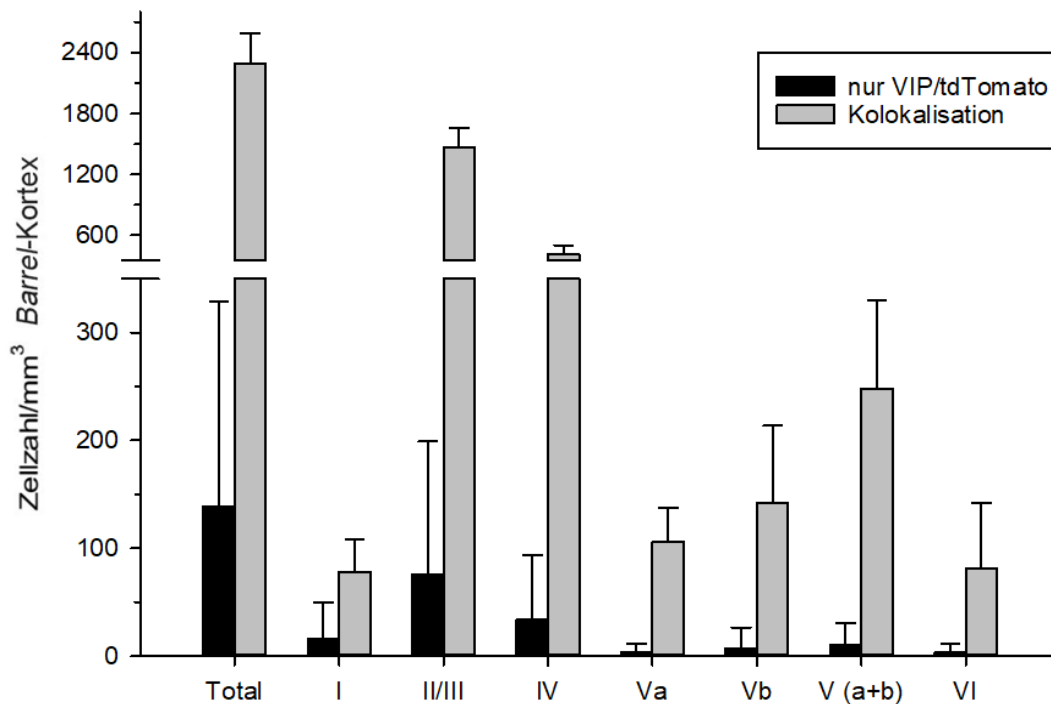


Abbildung 8: Kolokalisation der VIP/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Antikörper

Anzahl an Kolokalisationen zwischen den VIP/tdTomato-Zellen und dem GABA_B-Antikörper innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex (graue Balken) und Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen, die nicht mit dem GABA_B-Antikörper markiert sind (schwarze Balken). Nicht-kolokalisierte Zellen kommen in allen kortikalen Schichten in geringer Anzahl vor. Die Werte sind bezogen auf 1 mm^3 Barrel-Kortex (Total) und für die Schichten I-VI angegeben.

Im nächsten Schritt wurde die prozentuale Verteilung der kolokalisierten und nicht-kolokalisierten VIP-tdTomato-Zellen innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex betrachtet. Es zeigte sich, dass zwischen den mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisierten und den

nicht-kolokalisierten VIP/tdTomato-Zellen eine prozentual ähnliche Verteilung ($P > 0,05$) innerhalb der einzelnen Schichten besteht (Abbildung 9).

Dabei ist mit $64,0 \pm 8,6$ % die Mehrheit der mit dem GABA_B-Antikörper kolokalisierten VIP-positiven Zellen in Schicht II/III zu finden. Die Zahl der Zellen, die nur mit dem tdTomato-Signal markiert wurden, betrug in Schicht II/III $54,3 \pm 34,0$ %. In Schicht I wiesen insgesamt $3,4 \pm 1,3$ % der Zellen eine Koexpression mit tdTomato- und dem GABA_B-Antikörper auf. Es waren in Schicht I prozentual $11,2 \pm 12,0$ % Zellen zu finden, die nur mit dem tdTomato-Signal markiert waren. In Schicht IV betrug der Prozentsatz von Kolokalisation mit dem GABA_B-Antikörper und dem tdTomato-Signal $18,0 \pm 3,9$ %. In Schicht IV belief sich der Anteil der nicht kolokalisierten VIP-positiven Zellen auf $24,7 \pm 17,5$. Allerdings wurden in nur zwei von acht Schnitten in Schicht IV Zellen gefunden, die nicht mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert waren. Die Zahl der Kolokalisationen mit GABA_B-Rezeptor belief sich für Schicht V auf $10,9 \pm 3,6$ % und für Schicht VI auf $3,6 \pm 2,7$ %. Tendenziell war der prozentuale Anteil von Zellen, die keine Koexpression mit dem GABA_B-Rezeptor aufwiesen, geringer. Sie lag für Schicht V bei $7,6 \pm 6,4$ % und für Schicht VI bei $2,3 \pm 3,3$ % (Abbildung 9, Tabelle A2).

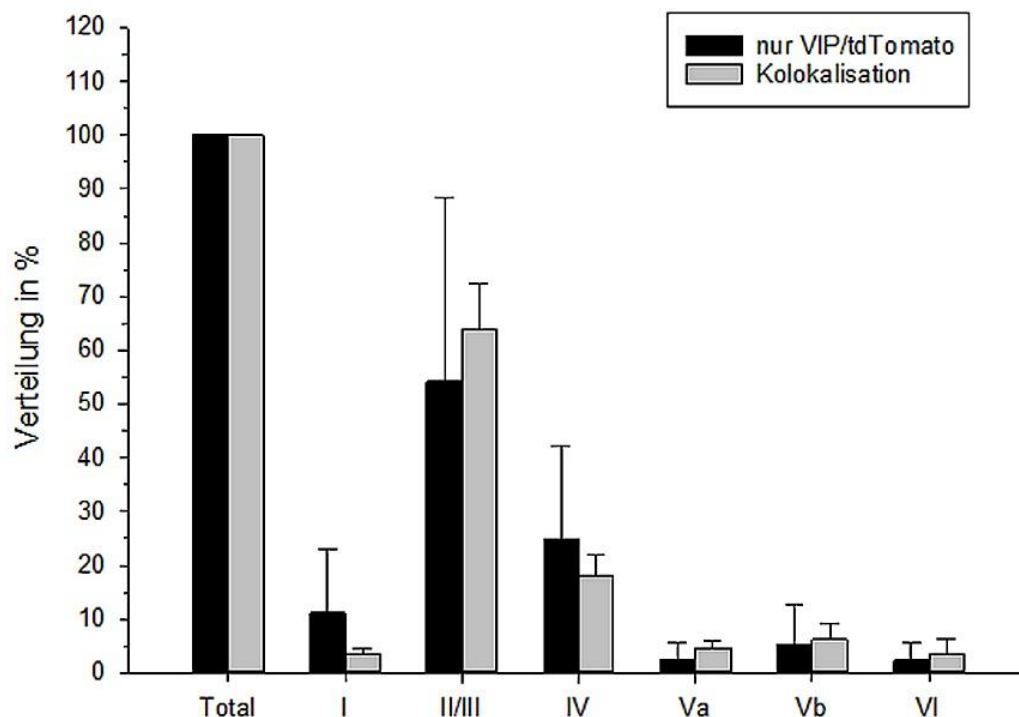


Abbildung 9: Verteilung kolokalisierter und nicht-kolokalisierter VIP/tdTomato-Zellen im *Barrel*-Kortex

Prozentuale Verteilung der kolokalisierten VIP/tdTomato-positiven Zellen mit dem GABA_B-Antikörper (grauer Balken), sowie der nicht-kolokalisierten Zellen, die ausschließlich das tdTomato-Signal der transgenen Mauslinie VIPcre/tdTomato exprimieren (schwarzer Balken). Die Werte beziehen sich auf die jeweilige schichtenspezifische Verteilung der Zellen, wobei 100 % der Zellen auf 1 mm³ *Barrel*-Kortex (Total) bezogen ist.

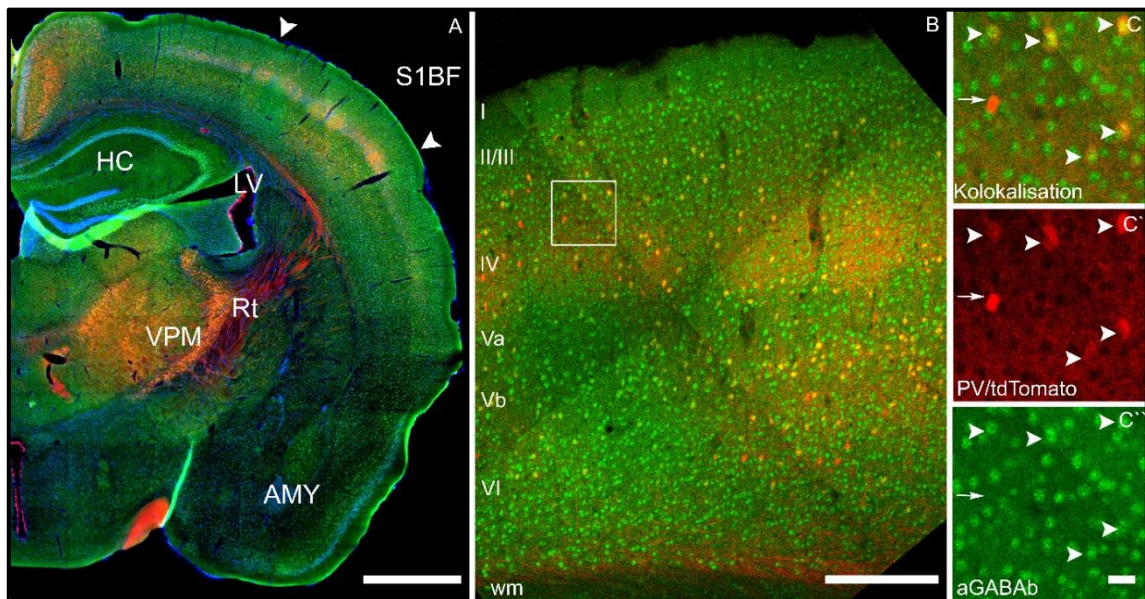


Abbildung 10: Immunhistochemie mittels GABA_B-Antikörper zur Markierung GABA_B-positiver Zellen im *Barrel*-Kortex der PVcre/tdTomato-Maus

A: Frontalschnitt des Kortex einer PVcre/tdTomato-Maus, bei der Rot das transgene tdTomato-Signal und Grün die mit GABA_B-markierten Zellen hervorhebt. Gelb gekennzeichnete Zellen weisen auf Zellen hin, die das tdTomato-Signal besitzen und gleichzeitig mit dem GABA_B-Antikörper markiert sind. In Abb. 10A ist in 10-facher Vergrößerung die linke Hemisphäre abgebildet, Maßstabelleiste: 1000 μm . B: *maximum intensity projection* des *Barrel*-Kortex in 20-facher Vergrößerung, Maßstabelleiste: 200 μm . Der umrahmte Ausschnitt in B stellt sich in den Abb. C-C'' im Detail dar. Die Überlagerung des tdTomato-Signals mit dem GABA_B-Antikörper wird in C (Pfeilspitzen) abgebildet. PV-positive Zellen, die nicht mit dem GABA_B-Antikörper kolokalisiert waren, sind mit Pfeilen hervorgehoben. Das tdTomato-Signal der einzelnen Zellen ist in C' zu erkennen, wohingegen das reine Signal der Zellen mit dem GABA_B-Antikörper in C'' dargestellt wird. Maßstabelleiste: 20 μm .

Für die Untersuchung der PVcre/tdTomato-Maus wurden ebenfalls acht Hirnschnitte verwendet und mittels Immunhistochemie mit dem GABA_B-Antikörper gefärbt. Im frontalen Hirnschnitt in der 10-fachen Vergrößerung der Übersichtsaufnahme heben sich die PV-positiven Zellen eingängig hervor und weisen ein Vorkommen im *Barrel*-Kortex sowie im *Nucleus reticularis* (Rt) und dem *Nucleus ventralis posteromedialis* (VPM) auf (Abbildung 10A), wobei es sich bei der Färbung des Letzteren nur um eine Färbung der perizellulären Körbe handeln könnte oder aber um ein Artefakt. Die 20-fache Vergrößerung des *Barrel*-Kortex mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop veranschaulicht, dass PV-positive Zellen am häufigsten in Schicht IV und Schicht V vorkommen (Abbildung 10B). Die Überlagerung des td/To-mato-Signals mit dem Antikörper des GABA_B-Rezeptors wird in Abbildung 10C (Pfeilspitzen, gelb) dargestellt. Nicht mit dem GABA_B-Antikörper markierte Zellen wurden durch Pfeile hervorgehoben (Abbildung 10C-C').

Aus der quantitativen Prüfung der acht analysierten Hirnschnitte der PVcre/tdTomato-Maus geht hervor, dass $6396,0 \pm 1085,7$ Zellen pro 1 mm^3 *Barrel*-Kortex eine Kolokalisation des

tdTomato-Signals und des GABA_B-Antikörpers aufweisen (Tabelle A3). Darüber hinaus konnten in sieben von acht untersuchten Hirnschnitten PV/tdTomato-Zellen beobachtet werden, die nicht mit dem GABA_B-Antikörper markiert waren. Daraus lässt sich schließen, dass nur einer von acht ausgewerteten Hirnschnitten der PV^{cre}/tdTomato-Mauslinie eine 100 %ige Überlagerung zwischen dem tdTomato-Signal und dem GABA_B-Antikörper aufweist. Insgesamt wurden in den Präparaten $851,4 \pm 683,5$ Zellen, die nur mit dem tdTomato-Signal markiert waren und keine Kolokalisation zeigten, gezählt (Abbildung 11, Tabelle A3). Das entspricht einer Kolokalisation aller PV/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Antikörper von $88,4 \pm 8,9$ % (Abbildung 14, Tabelle A5).

Die Kolokalisation der PV-positiven Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor in Schicht I beläuft sich auf $7,1 \pm 12,3$ Zellen. In Schicht II/III fanden sich $307,2 \pm 239,9$ PV-positive Zellen, die nicht mit dem Antikörper GABA_B kolokalisiert waren. $953,9 \pm 295,8$ Zellen in Schicht II/III wiesen eine Kolokalisation mit dem GABA_B-Antikörper auf. In Schicht II/III fanden sich, anteilig an der Gesamtzahl der Zellen und im Vergleich zu den anderen Schichten des *Barrel*-Kortex, die meisten PV-positiven Zellen, die nur das tdTomato-Eigensignal aufwiesen. In der Schicht IV waren $296,8 \pm 347,3$ PV/tdTomato-Zellen zu finden, die nicht mit dem GABA_B-Rezeptor-Signal kolokalisiert waren. Eine Koexpression von GABA_B-Rezeptoren war für Schicht IV bei $1483,5 \pm 504,5$ Zellen nachzuweisen. Bei der Analyse von Schicht V wurden $2984,8 \pm 583,8$ PV-positive Zellen gezählt, die mit dem GABA_B-Antikörper markiert waren. Die Zahl der Zellen in Schicht V, die nur das tdTomato-Signal aufwiesen, belief sich auf $174,2 \pm 176,4$. In Schicht VI fanden sich $957,3 \pm 284,4$ Zellen, die eine Kolokalisation aufwiesen – wohingegen $73,2 \pm 76,4$ der PV-positiven Zellen keine Koexpression aufwiesen (Abbildung 11, Tabelle A3).

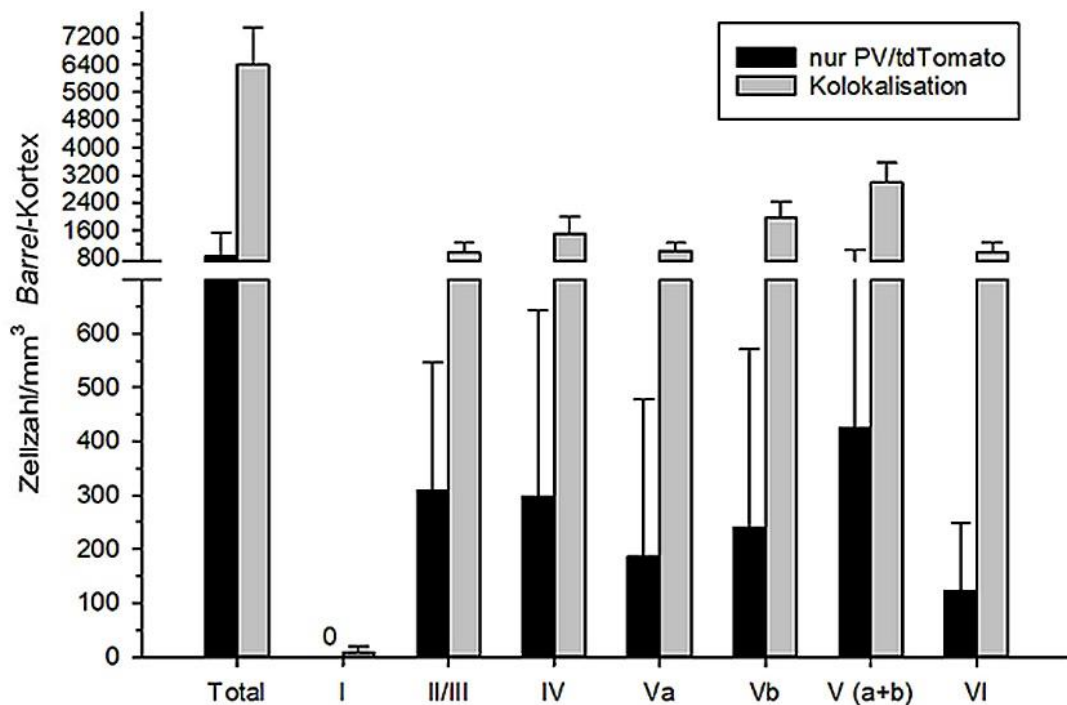


Abbildung 11: Kokalisation der PV/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Antikörper

Anzahl der Kokalisationen zwischen den PV/tdTomato-Zellen und den mit GABA_B-Antikörper markierten Zellen innerhalb der einzelnen Schichten des *Barrel*-Kortex (graue Balken). Die Anzahl an PV/tdTomato-Zellen, die nicht mit dem GABA_B-Antikörper markiert sind, wurde als schwarzer Balken hervorgehoben. Nicht-kolokalisierte Zellen kommen in allen kortikalen Schichten in geringerer Zahl vor. Die Werte sind bezogen auf 1 mm³ *Barrel*-Kortex (Total) und für die Schichten I-VI angegeben.

Im weiteren Verlauf wurde die prozentuale Verteilung der kolokalisierten und nicht kolokalisierten PV/tdTomato-Zellen innerhalb der einzelnen Schichten des *Barrel*-Kortex betrachtet. Es zeigte sich, dass in Schicht II/III und Schicht IV tendenziell weniger Zellen mit dem GABA_B-Antikörper markiert waren als in den anderen Schichten.

Zellen, die das tdTomato-Signal exprimieren, waren vor allem in Schicht II/III, IV und in Schicht V zu finden. In Schicht V machten sie, gemessen an der Gesamtzahl der PV-positiven Zellen, einen Anteil von $20,5 \pm 20,7$ % auf 1 mm³ Kortextvolumen aus. Der Anteil der PV-positiven Zellen, die in dieser Schicht mit dem GABA_B-Antikörper kolokalisiert waren, belief sich auf $46,7 \pm 9,1$ %. In Schicht II/III betrug der Wert für die Zellen, die nur mit tdTomato markiert waren, $36,1 \pm 28,2$ % und in Schicht IV $34,9 \pm 40,8$ %. Gemessen an der Anzahl der Zellen, die das tdTomato-Signal besaßen, wurden in diesen beiden Schichten weniger Zellen, die mit dem Antikörper für den GABA_B-Rezeptor markiert waren, gefunden. In Schicht II/III konnte eine Kokalisationsrate von $14,9 \pm 4,6$ % zwischen PV-positiven Zellen und dem GABA_B-Rezeptor berechnet werden, und in Schicht IV betrug ihr Anteil $23,2 \pm 7,9$ %.

Abschließend ist zu erkennen, dass gemessen an der Zahl der PV-positiven Zellen, die sich in Schicht II/III und in Schicht IV fanden, in diesen Schichten weniger Kollokationen mit dem GABA_B-Antikörper bestanden. Vervollständigend muss hinzugefügt werden, dass in Schicht I die Kollokation der PV-positiven Zellen mit dem Antikörper für den GABA_B-Rezeptor bei $0,1 \pm 0,2 \%$ und in Schicht VI bei $15,0 \pm 4,5 \%$ lag. In Schicht I konnten keine Zellen, die nur das tdTomato-Signal exprimierten, identifiziert werden. In Schicht VI wurden $8,6 \pm 9,0 \%$ PV/tdTomato-Zellen gezählt, die nicht mit dem GABA_B-Antikörper markiert waren (Abbildung 12, Tabelle A4)

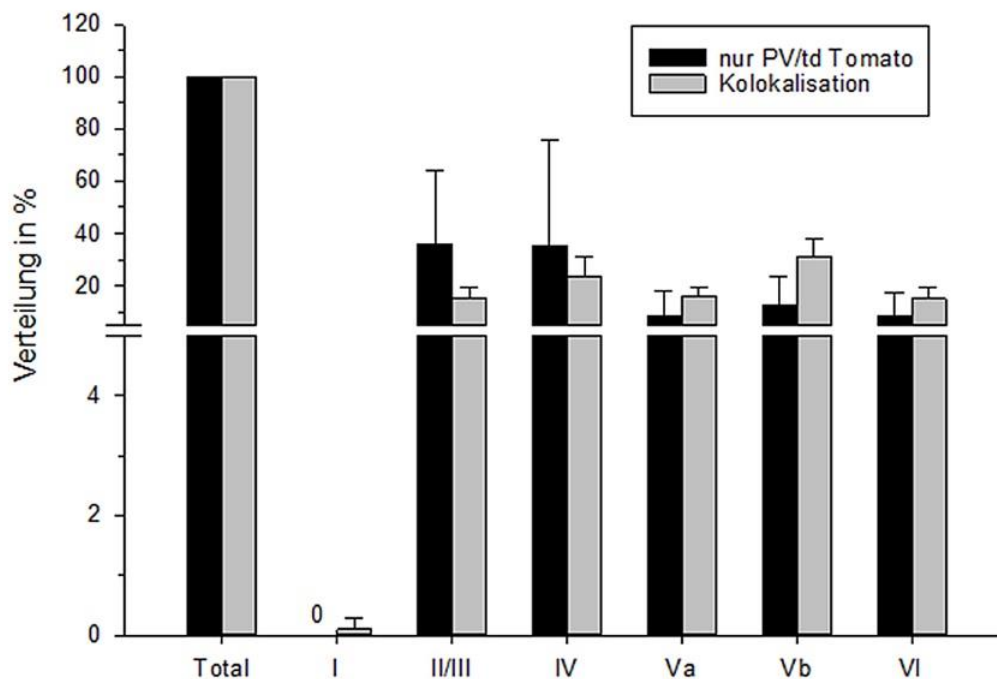


Abbildung 12: Verteilung kollokalisierter und nicht-kollokalisierter PV/tdTomato-Zellen im Barrel-Kortex

Prozentuale Verteilung der kollokalisierten PV/tdTomato-positiven Zellen mit dem GABA_B-Antikörper (grauer Balken) sowie der nicht-kollokalisierten PV-Zellen, die ausschließlich das tdTomato-Signal exprimieren (schwarzer Balken). Die Werte beziehen sich auf die jeweilige schichtenspezifische Verteilung der Zellen, wobei 100 % der Zellen auf 1 mm³ Barrel-Kortex (Total) bezogen sind.

Im schichtenspezifischen Vergleich der VIPcre/tdTomato- und der PVcre/tdTomato-Maus können für die Kollokation mit dem GABA_B-Antikörper folgende Aussagen getroffen werden: Im Mittel weisen die PV/tdTomato-positiven Zellen eine geringere Kollokationsrate mit dem GABA_B-Signal für die Schichten II bis VI im Vergleich zu den VIP/tdTomato-positiven Zellen auf (Abbildung 13, Tabelle A5). Lediglich in Schicht I sind 100 % der PV-Zellen kollokalisiert, wobei nur in zwei von acht Hirnschnitten jeweils eine ausschließlich tdTomato-positive Zelle registriert werden konnte. Mit Ausnahme von Schicht I konnten die höchsten Kollokalisationsquoten in den neokortikalen Schichten V und VI beobachtet

werden (Abbildung 13). In der Schicht VI beträgt die Kollokalisation bei den VIP-positiven Zellen $97,6 \pm 5,8 \%$ und bei den PV-positiven Zellen $93,5 \pm 6,9 \%$. In der Schicht V sind die Werte für die obere Schicht Va und untere Schicht Vb in der jeweiligen Mauslinie auf einem ähnlichen Niveau. Für die PV/tdTomato-positiven Zellen konnte eine Kollokalisation von $94,1 \pm 7,1 \%$ in der Schicht Va und $95,4 \pm 4,3 \%$ in der Schicht Vb beobachtet werden. Die VIP/tdTomato-positiven Zellen weisen auch hier eine tendenziell höhere Überlagerung mit dem GABA_B-Signal mit $97,9 \pm 5,5 \%$ für Schicht Va und $96,4 \pm 9,4 \%$ für Schicht Vb auf. In den Schichten II/III und IV wurden geringere Kollokationen der tdTomato-positiven Zellen festgestellt, dies gilt insbesondere für die PV-exprimierenden Zellen (Abbildung 13, Tabelle A5). Für die PV/tdTomato-Zellen sinkt die Kollokalisationsquote auf $74,2 \pm 18,9 \%$ in der Schicht IV und auf $76,4 \pm 17,6 \%$ in der Schicht II/III. Dagegen weisen die VIP-exprimierenden Zellen in diesen Schichten eine höhere Kollokalisation von $82,6 \pm 12,8 \%$ in der Schicht IV und $95,7 \pm 7,3 \%$ in der Schicht II/III auf (Abbildung 13, Tabelle A5). Für Schicht II/III ist dieser Unterschied zwischen den PV- und VIP-positiven Zellen statistisch signifikant ($P < 0,05$; Rangsummentest).

Abschließend kann hervorgehoben werden, dass tendenziell eine ähnliche Verteilung der Kollokationen für die beiden Mauslinien PV^{cre}/tdTomato und VIP^{cre}/tdTomato besteht. Eine Ausnahme stellen die Schichten IV und II/III dar, auf die im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen werden wird.

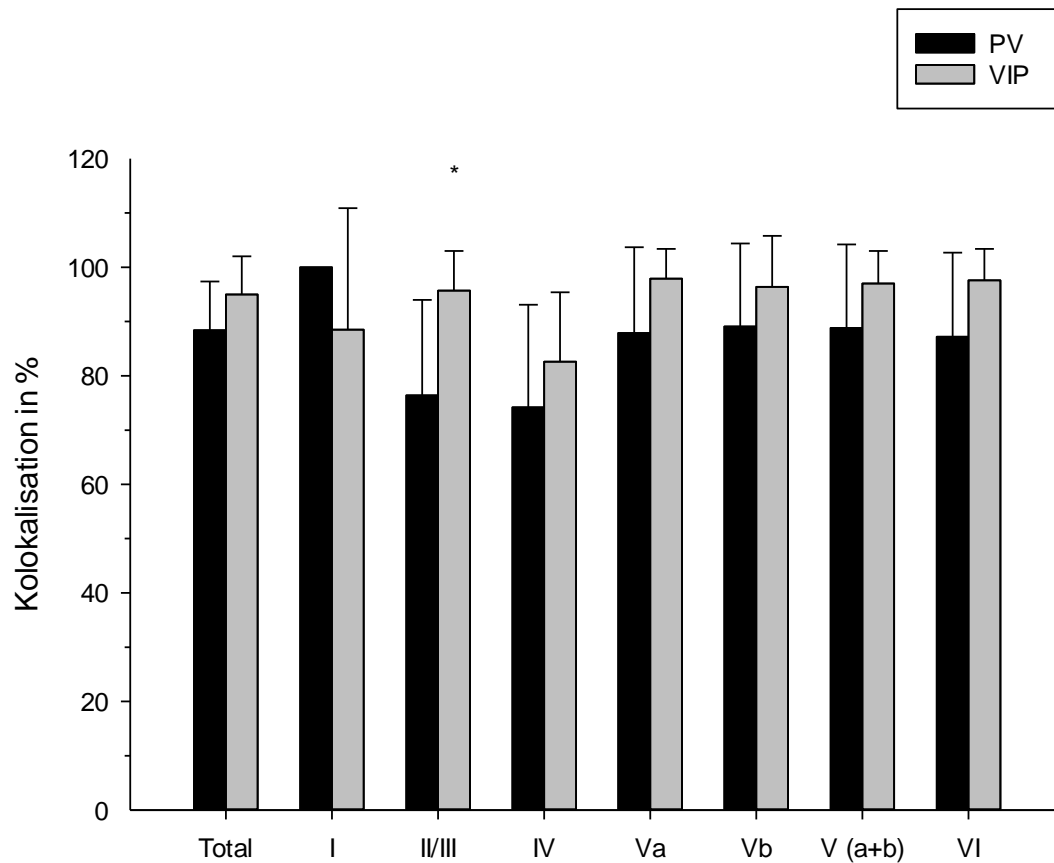


Abbildung 13: Schichtenbezogene Kokolalisationsquote von PVcre/tdTomato-Zellen und VIPcre/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Antikörper

Gegenüberstellung der schichtenbezogenen prozentualen Kokolisationen von PVcre/tdTomato-Zellen (schwarzer Balken) und VIPcre/tdTomato-Zellen (grauer Balken) mit dem GABA_B-Antikörper im Bereich des *Barrel*-Kortex. Tendenziell weisen die PV/tdTomato-positiven Zellen in allen kortikalen Schichten eine geringere Kokolisation auf, mit Ausnahme Schicht I. Allerdings ist lediglich in Schicht II/III ein signifikanter Unterschied in der Kokolisation mit dem GABA_B-Signal zwischen den PV- und VIP-positiven Zellen festzustellen (*, $P < 0,05$).

3.3 Vergleich der GABA_B-Rezeptor Expression zwischen den verschiedenen Subpopulationen der kortikalen GABAergen Interneurone

GABAerge Interneurone unterscheiden sich hinsichtlich ihrer morphologischen, elektrophysiologischen und molekularen Eigenschaften. In dieser Studie wurden diese drei Gruppen sowie eine Subpopulation der SST-positiven, die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus, auf die Expression des GABA_B-Rezeptors hin untersucht. Die GABAergen Interneurone Populationen wurden untereinander in Bezug auf ihre Kolokalisation mit dem GABA_B-Antikörper verglichen.

Im quantitativen Vergleich der GABAergen Neuron-Subpopulationen können folgende Aussagen gemacht werden: (I) Die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus waren zu 100 % mit dem GABA_B-Antikörper markiert. Im Mittelwert wiesen $948,9 \pm 252,9$ der mit GFP markierten Zellen pro 1 mm^3 *Barrel*-Kortex eine Kolokalisation mit GABA_B-Rezeptor auf. (II) Bei der Auswertung der Kolokalisation von PV-positiven Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor ergab sich dagegen ein Anteil von nur $88,4 \pm 8,9$ % (Tabelle A5). Der Unterschied zwischen GFP-positiven Zellen in der GIN-Maus und PV-positiven Zellen in der PVcre/tdTomato-Maus ist statistisch signifikant ($P < 0,002$, Rangsummentest; Abbildung 14,*). Ein weiterer statistisch signifikanter Unterschied ergibt sich zwischen den SST-positiven Zellen und den PV-positiven Zellen ($P < 0,038$, Rangsummentest; Abbildung 14,*). Die Gesamtheit der Somatostatin-exprimierenden Zellen, die mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert sind, beträgt $96,8 \pm 5,6$ %. Insgesamt konnten $5854,1 \pm 1190,8$ SST-positiver Zellen auf 1 mm^3 Barrel-Kortex aus jeweils acht Gehirnschnitten ermittelt werden. Von diesen Zellen waren $5677,3 \pm 1272,5$ mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert. Bei der Untersuchung der PV-positiven Zellen ergab sich eine Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor von $6396,0 \pm 1085,7$ von insgesamt $7240,8 \pm 970,4$ PV-exprimierenden Zellen (Tabelle A3). Für die GABAergen Interneurone innerhalb der PVcre/tdTomato-Maus lässt sich feststellen, dass sie eine signifikant geringere Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor aufwiesen (Rangsummentest mit SOMcre/tdTomato, $P < 0,038$; Rangsummentest mit GIN-Maus, $P < 0,002$). Die VIPcre/tdTomato-Maus wies eine Kolokalisation von $95,0 \pm 7,0$ % mit dem GABA_B-Rezeptor auf (Tabelle A5). Es konnte für die Population der VIP-positiven GABAergen Interneurone kein signifikanter Unterschied zu den anderen in dieser Studie untersuchten Zellpopulationen festgestellt werden (Abbildung 14).

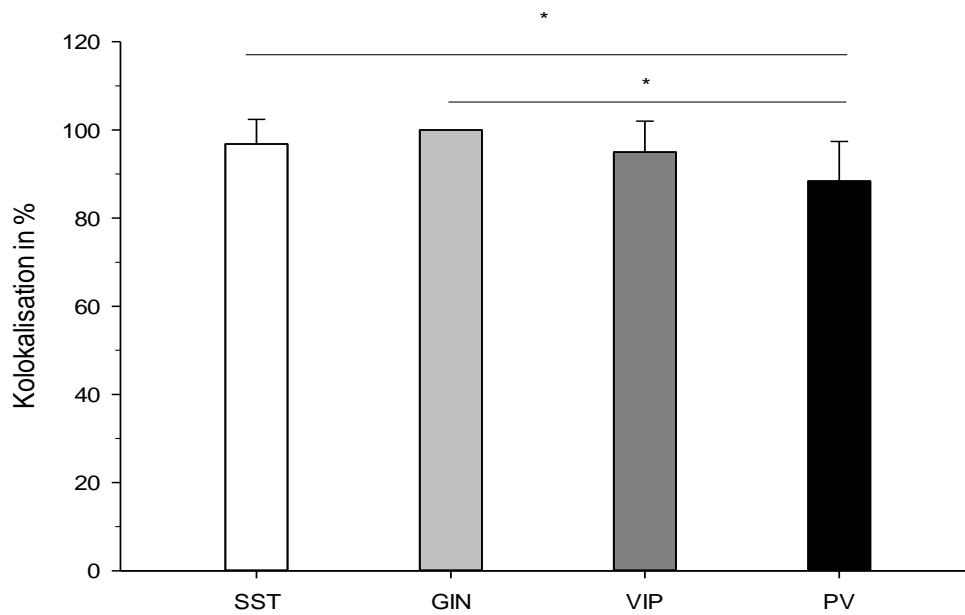


Abbildung 14: Prozentsatz der Kokalisation mit dem GABA_B-Antikörper innerhalb der untersuchten GABAergen Interneurone im *Barrel*-Kortex

Prozentuale Kokalisation der SOMcre/tdTomato- (weiß), VIPcre/tdTomato- (dunkelgrau) und PVcre/tdTomatopositiver Zellen (schwarz), sowie der GFP-positiven Zellen der GIN-Maus(hellgrau) mit dem GABA_B-Antikörper im Bereich des *Barrel*-Kortex. Die GFP-positiven Zellen weisen mit 100 % die höchste Kokalisation mit dem GABA_B-Signal auf, gefolgt von den SOMcre/tdTomato-positiven Zellen mit $96,8 \pm 5,6$ %, den VIPcre/tdTomato-Zellen mit $95,0 \pm 7,0$ % und den PVcre/tdTomato-Zellen mit $88,4 \pm 9,0$ % (*, $P < 0,05$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie soll ermittelt werden, in welchem Umfang GABAerge Interneurone im *Barrel*-Kortex von Mäusen metabotrope GABA_B-Rezeptoren exprimieren. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden vier verschiedene transgene Mauslinien untersucht. Für die Untersuchung der SST-positiven GABAergen Interneurone wurde zum einen die transgene Mauslinie SOMcre/tdTomato (Taniguchi et al. 2011) und zum anderen die transgene GIN-Maus benutzt. Die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus stellen eine Subpopulation der SST-positiven Zellen dar, die als Martinotti-Zellen bekannt sind (Ma et al. 2006; Wang et al. 2004). Zur Untersuchung der PV- und der VIP-exprimierenden Interneurone wurden die transgenen Mauslinien PVcre/tdTomato und VIPcre/tdTomato (Taniguchi et al. 2011) verwendet. Aufgrund der hohen Kollokalisationsrate der SST-positiven Zellen von 96,8 % mit dem GABA_B-Rezeptor wurde von einer schichtenbezogenen Analyse Abstand genommen. Darüber hinaus waren die SST-positiven Zellen, die keine Rezeptorfärbung aufwiesen, nicht einer spezifischen Schicht zugehörig, sondern verteilten sich auf alle Schichten im Kortex. Im Gegensatz zur Analyse der SST-positiven Neurone wurde bei den mit dem tdTomato-Signal markierten VIP- und PV-positiven Zellen eine schichtenbezogene Auswertung der Koexpression mit dem GABA_B-Rezeptor vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Studie erlauben folgende Aussagen für den *Barrel*-Kortex von Mäusen: (I) SST-positiven Interneurone sind mit ca. 97 % nahezu vollständig mit dem GABA_B-Rezeptor kollokalisiert. (II) Die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus, und damit mehrheitlich Martinotti-Zellen, exprimieren zu 100 % den GABA_B-Rezeptor. (III) Die VIP-positiven Interneurone weisen eine Kollokalisierung mit dem GABA_B-Rezeptor von 95 % auf. Dabei ist die Kollokalisationsquote für die einzelnen neokortikalen Schichten bei den VIP-positiven Zellen tendenziell gleichverteilt. (IV) PV-exprimierende Interneurone zeigen nur eine 88 %ige Kollokalisierung mit GABA_B-Rezeptoren. Des Weiteren liegt in den Schichten II/III und IV eine geringere Koexpression des GABA_B-Rezeptors im Vergleich zu den anderen kortikalen Schichten vor.

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

In dieser Studie wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) zur visuellen Darstellung dreidimensionaler biologischer Proben verwendet. Die Lichtquelle, ein Laser, bestrahlt nur einen kleinen Teil des Präparates, wodurch die weiteren Anteile des Präparates während des Scanvorgangs geschont werden und das histologische Material im Gegensatz zur Epifluoreszenz-Vollbelichtung nur geringfügig belastet (ausgebleicht) wird. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Fluoreszenzmikroskopiemethoden ist eine kleine Apertur, die als *pinhole* (dt. Lochblende) bezeichnet wird. Diese ermöglicht es, während der Bildaufnahmen Fluoreszenzlicht oberhalb und unterhalb des Fokus zu eliminieren und erhöht auf diese Weise deutlich die Auflösung des Signals in den histologischen Schnitten (Halbhuber und König 2003; Zucker und Price 2001). Die verbesserte Qualität der Aufnahme wird überdies durch eine Erhöhung des Kontrastes ermöglicht sowie durch die Unterdrückung des Streulichts (Wilhelm et al. 2003). Ein langsames Abescannen der Proben resultiert in einer höheren Sensitivität der Aufnahmen (Cox 2002).

Zur Gewährleistung qualitativ hochwertiger Aufnahmen ist es essentiell, die Intensität des Lasers anzupassen und den *photomultiplier tube* (PMT) auszubalancieren, um Störsignale zu minimieren. Der PMT agiert hierbei als Photoelektronenvervielfacher, mit dem schwache Signale durch Erzeugung und Verstärkung eines elektrischen Signals überhaupt erst zu detektieren sind (Halbhuber und König 2003). Durch diese Funktion können aber auch überbelichtete Aufnahmen entstehen, und die histologischen Schnitte können ausbleichen, was zu ungenaueren Bildern und damit auch zu Fehlern bei der Auswertung der Schnitte führt. Während der Aufnahmen wurde auf eine geringe Intensität des PMT geachtet, doch es war in einigen Präparaten nicht möglich, ohne die Steigerung der Intensität ausreichend auswertbare Bilder zu generieren. Wie im Vorhinein schon erwähnt, werden bei der Aufnahme mit dem LSM immer einzelnen Abschnitte, sog. Kacheln, beleuchtet. Hierbei spielt das *pinhole* eine wichtige Rolle, das in der Lage ist, die einzelnen Kacheln optisch zu separieren. Hierbei kann es jedoch an den Kachelnahstellen zum Ausbleichen kommen, was wiederum die Qualität der Schnitte beeinträchtigt und somit auch deren Auswertung.

Des Weiteren wurde für die Aufnahmen kein Zoom verwendet, da das Ausbleichen der Proben mit der Erhöhung des Zoomfaktors einhergeht und so die Qualität des Schnittes beeinträchtigen würde. Gleichzeitig kann jedoch der Durchmesser der Lochblende vergrößert und die Stärke des Lasers erhöht werden (Zucker und Price 2001).

Bei der Laser-Scanning Methode wird wie bei der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie jeweils nur ein Laser einer Wellenlänge eingesetzt, um die Fluoreszenz anzuregen. Durch dieses Verfahren wird das sogenannte „Durchbluten“ (engl. *bleed through*) der verschiedenen Kanäle reduziert (Cox 2002). Der Vorteil des LSMs besteht jedoch darin, dass das Licht, das von der Fluoreszenz emittiert wird, sehr nah am Focus detektiert wird und so ein Bild entsteht mit einer deutlich besseren Tiefenabbildung des histologischen Schnittes, wobei auch Präparate mit einem größeren Durchmesser aufgenommen und analysiert werden können (Weigel et al. 2009; Cox 2002). Ein „Durchbluten“ der Kanäle war bei mehreren Aufnahmen der Hirnschnitte mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop nicht auszuschließen, weshalb die Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop SP2 erfolgten.

4.1.2 Manuelles Einzeichnen der Schichten

Die Einzeichnung der einzelnen Schichten im primär somatosensorischen Kortex wurde nur in den Hirnschnitten der transgenen Mauslinien PVcre/tdTomato und VIP/tdTomato vorgenommen. Bei der Auswertung der SOMcre/tdTomato- und GIN-Maus wurde aufgrund der hohen prozentualen Kolo-kalisation in beiden Mauslinien auf eine schichtenspezifische Analyse verzichtet.

Die Schicht mit der geringsten Zelldichte ist Schicht I und ist klar von der Pia mater sowie von den zellreicheren Schichten II/III abgrenzbar. Schicht IV stellt sich als die zellreichste Schicht dar, in der die *barrels* zu finden sind. Schicht II/III kann durch das Bestimmen von Schicht I und IV differenziert werden. Aufgrund der unregelmäßigen Verteilung der dortigen Zellkörper ist eine Unterscheidung von Schicht II zu Schicht III nicht möglich. Die Schichten Va und Vb werden in Bezug auf ihre Zelldichte voneinander unterschieden, wobei Schicht Va eine geringere Zelldichte besitzt als Schicht Vb (Schubert et al. 2006). Es ist möglich, Schicht VI von Schicht Vb abzugrenzen, weil Schicht Vb keine gleichmäßige Verteilung der Zellen besitzt, wohingegen Schicht VI durch kleine und gleichmäßig verteilte Zellen charakterisiert wird (Ren et al. 1992). Das manuelle Einzeichnen der Schichten ist trotz der genannten Richtlinien nicht als genaue und adäquate Methode zu bezeichnen. Ungenauigkeiten und sich daraus ergebende Fehler bei der Auswertung sind nicht auszuschließen.

4.1.3 Immunhistochemie (IHC)

Das Ziel dieser Studie war es, mithilfe des polyklonalen Antikörpers gpGABA_B-Rezeptor R2 (Firma: EMD Millipore) nachzuweisen, zu welchen Anteilen GABAerge Interneurone den GABA_B-Rezeptor exprimieren. Als Nachweismethode wurde die indirekte Immunmarkierung verwendet. Bei dieser Methodik wird der primäre Antikörper, der an das zu untersuchende Epitop bindet, mithilfe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht (Buchwalow und Böcker 2010).

Die verwendeten polyklonalen Primärantikörper haben zwei Vorteile gegenüber monoklonalen Antikörpern. Dazu gehört, dass polyklonale Antikörper in der Lage sind, viele freie Epitope zu binden, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass der Antikörper an das fixierte Präparat bindet. Darüber hinaus hat der sekundäre Antikörper, über die gesteigerte Bindung des Primärantikörpers an das Epitop, eine bessere Grundlage, den Primärantikörper zu markieren und so in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass der polyklonale Antikörper auch unspezifisch an Epitope anderer Zellen binden kann, wodurch eine Kreuzreaktion möglich ist (Lipman et al. 2005). Diese Tatsache muss auch bei dieser Studie berücksichtigt werden. Es könnte sich demnach bei angefärbten Zellen mit dem Antikörper-Signal für den GABA_B-Rezeptor auch um Farbartefakte handeln.

Der verwendete Primärantikörper, der den GABA_{B2}-Rezeptor visualisieren sollte, stammt von EMD Millipore (Chemicon in Temecula, CA, USA) und bindet an die GABA_{B2}-Untereinheit des GABA_B-Rezeptors. Dieser polyklonale Antikörper wurde in einer Veröffentlichung 2006 von Luján und Shigemoto auf seine Spezifität hin untersucht und beschrieben.

Aus dieser Studie geht hervor, dass dieser Antikörper durchgehend und verlässlich den GABA_{B2}-Rezeptor an der Plasmamembran der Zellen markiert. Mithilfe ihrer Untersuchungen konnte des Weiteren ermittelt werden, dass es zu keiner Kreuzreaktion mit anderen Rezeptoren beziehungsweise Zellstrukturen gekommen ist, die ihre Ergebnisse hätten beeinflussen können (Luján und Shigemoto 2006). Darüber hinaus wurde der Primärantikörper gegen den GABA_{B2}-Rezeptor schon in der Arbeitsgruppe von Charles et al. an unterschiedlichen zentralnervösen Strukturen getestet, einschließlich des Kortex. Auch in dieser Publikation wurde die Spezifität des Rezeptorantikörpers bestätigt (Charles et al. 2001).

Eine der ersten Publikationen, die immunhistochemisch die Expression von GABA_B-Rezeptoren an GABAergen Interneuronen untersuchte, bezog sich auf die PV-positiven GABAergen Interneurone. Die Publikation zur Kollokalisation des GABA_B-Rezeptors auf den PV-

positiven Zellen wurde 1999 von Sloviter veröffentlicht und legt nahe, dass nur wenige PV-positive Interneurone, wie z.B. *basket cells* im Gyrus dentatus sowie im Hippocampus zu identifizieren sind, die eine Expression mit dem GABA_B-Rezeptor aufweisen (Sloviter et al. 1999). In diesem Falle muss jedoch hervorgehoben werden, dass bei der immunhistochemischen Untersuchung der Antikörper anti-GBR1 (AB1531, Chemicon) verwendet wurde, der an die GABA_{B1} Untereinheit des GABA_B-Rezeptors bindet (Sloviter et al. 1999). Untersuchungen mehrerer Wissenschaftler lassen darauf schließen, dass der GABA_{B1}-Rezeptor allein nicht zur Ausbildung eines vollfunktionierenden GABA_B-Rezeptors ausreicht und das GABA_{B1} nicht an der Oberfläche der Zelle exprimiert wird, sondern am intrazellulären Teil des Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert ist (Pin et al. 2004; Pagano et al. 2001; Filippov et al. 2000; Margeta-Mitrovic et al. 2000; Couve et al. 1998). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Einsatz dieses Primärantikörpers gegen die GABA_{B1}-Untereinheit keine zuverlässige Aussage hinsichtlich einer Expression oder gar Kollokalisierung des GABA_B-Rezeptors zulässt (Charles et al. 2001).

Bei der immunhistochemischen Färbung der Schnitte wurde ersichtlich, dass bei der Anfärbung der zu untersuchenden Zellen, mit der Markierung für den GABA_{B2}-Rezeptor mit dem Antikörper Goat anti-Guinea Pig-GABA_{B2} der Firma Chemicon, nicht nur die Membran der Zelle angefärbt wurde, sondern darüber hinaus auch das Zytoplasma. Die Anfärbung des Zytoplasmas mit diesem Antikörper ist auch in anderen Veröffentlichungen für diesen Rezeptor zu sehen und geht wahrscheinlich auf einen Reservepool der Rezeptorproteine am ER zurück (Kulik et al. 2003; Charles et al. 2001).

Zum besseren Verständnis für die Art der Anfärbung in der Immunhistochemie muss an dieser Stelle darauf eingegangen werden, dass die Entstehung eines voll funktionierenden GABA_B-Rezeptors durch eine Heterodimerisierung des Rezeptors aus seinen Untereinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2} bedingt wird. Die GABA_{B1}-Untereinheit ist verantwortlich für die Bindung des Liganden, wohingegen die GABA_{B2}-Untereinheit essentiell für die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche ist, da sie die Translokation des GABA_{B1}-Proteins ermöglicht (Pagano et al. 2001; Calver et al. 2000; Jones et al. 1998; Kaupmann et al. 1998; White et al. 1998). Kulik et al. unterstützen in ihrer Publikation diese Aussage und beschreiben in ihren Ergebnissen eine starke Markierung der Somata der Zellen, was sie auf eine Anreicherung der Untereinheiten des GABA_B-Rezeptors zurückführen (Kulik et al. 2003). Weiterhin weist die Studie darauf hin, dass die beiden Untereinheiten des Rezeptors in den gleichen subzellulären Kompartimenten zu finden sind. Die Aussage bezieht sich auf ihre

Beobachtung einer starken Immunreaktivität von GABA_{B1} und GABA_{B2} in CA1 Pyramidenzellen und GABAergen Interneuronen des Hippocampus in sowohl prä- als auch postsynaptischen zellulären Kompartimenten (Kulik et al. 2003). Im visuellen Kortex von Ratten konnte beobachtet werden, dass das Zytoplasma vor allen in den proximalen Dendriten von Pyramidenzellen und GABAergen Interneuronen angefärbt wurde, jedoch nicht in den distalen Dendriten (Gonchar et al. 2001). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass beide Rezeptoruntereinheiten im Zellkörper, im Zytoplasma und an der Membranoberfläche mit Antikörper markiert sind und sowohl mit exzitatorischen als auch mit inhibitorischen Synapsen sowie mit extrasynaptischen Strukturen assoziiert sind (Gonchar et al. 2001). Eine weitere Studie konnte in Amakrinzellen der Retina und in Kultur gehaltenen Hippocampus-Neuronen nachweisen, dass beide Untereinheiten des Rezeptors mit dem aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (ATF), der im Zytoplasma lokalisiert ist, assoziiert sind (Nehring et al. 2000).

Es kann abschließend festgestellt werden, dass eine Anfärbung der Zellmembran sowie des Zytoplasmas der Somata auch von anderen Studien beschrieben wurde, aber nicht beweisend ist für die Spezifität der Antikörperfärbung (Kulik et al. 2003; Gonchar et al. 2001).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden die distinkten Gruppen GABAerger Interneurone, die PV-, die SST- und VIP-exprimierenden Neurone, mittels immunhistochemischer Färbemethoden auf die Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors hin untersucht. Um der vorliegenden Fragestellung nachzugehen, wurden vier transgene Mauslinien verwendet. Für die Untersuchung der SST-positiven Interneurone kamen die SOMcre/tdTomato-Mauslinie und die GIN-Maus zum Einsatz (Taniguchi et al. 2011; Olivia et al. 2000). Die GIN-Maus wurde verwendet, da die GFP-positiven Zellen eine Subpopulation der SST-positiven Zellen darstellen, die als Martinotti-Zellen bekannt sind (Ma et al. 2006). Zur Untersuchung der mit 40 % größten Gruppe an GABAergen Interneuronen, den PV-positiven Interneuronen, wurde die PVcre/tdTomato-Maus benutzt. Die VIPcre/tdTomato-Mauslinie diente zur Untersuchung der VIP-exprimierenden Interneurone, die zur distinkten Gruppe der 5HT_{3a}-Rezeptor exprimierenden Interneurone gezählt werden und innerhalb dieser Population ca. 40 % ausmachen (Rudy et al. 2011; Lee et al. 2010).

4.2.1 Expression des GABA_B-Rezeptors in SST-exprimierenden Zellen

Die SST-positiven Zellen gehören zu den GABAergen Interneuronen, die innerhalb ihrer Subpopulation in Bezug auf ihre Morphologie, Elektrophysiologie und molekularen Eigenschaften eine hohe Diversität aufweisen (Tremblay et al. 2016; Rudy et al. 2011; Ascoli et al. 2008). Zur besseren Differenzierung der SST-exprimierenden GABAergen Interneurone können sie mithilfe ihrer Morphologie in die Untergruppen Martinotti-Zellen und Nicht-Martinotti-Zellen eingeordnet werden (Tremblay et al. 2016; Chiu et al. 2013; Wang et al. 2004). In dieser Studie wird zum einen die Gesamtheit der SST-Population betrachtet und zum anderen auf die spezifische Untergruppe der Martinotti-Zellen eingegangen.

Die Studie zeigt, dass in den acht ausgewerteten Hirnschnitten der SOMcre/tdTomato-Maus, durchschnittlich $5677,3 \pm 1272,5$ von $5854,1 \pm 1190,8$ tdTomato-Zellen pro 1 mm^3 Barrel-Kortex mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert vorkommen. Das entspricht einer Quote von $96,8 \pm 5,6 \%$. In fünf von acht untersuchten Hirnschnitten war jede tdTomato-positive Zelle mit dem Antikörpersignal für den GABA_B-Rezeptor kolokalisiert. Die geringe Zahl der nicht mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisierten SST-positiven Zellen und das Vorhandensein dieser Zellen in nur drei von acht Hirnschnitten lässt vermuten, dass alle bzw. so gut wie alle SST-positiven Interneurone eine Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors aufweisen und bei den wenigen nicht-kokalisierten Zellen die Anfärbung unter der Nachweisgrenze war. Diese Vermutung wird weiter dadurch unterstützt, dass in der GIN-Maus alle GFP-positiven Zellen mit dem Antikörpersignal des GABA_B-Rezeptors kolokalisiert waren. Demzufolge kann für die Subpopulation der SST-positiven Interneurone, die Martinotti-Zellen von einer 100 %igen Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors ausgegangen werden. Die Ergebnisse zu den SST-positiven Interneuronen in dieser Arbeit decken sich mit der subzellulären Lokalisationsstudie zu GABA_{B1}-UE und der GABA_{B2}-UE im visuellen Kortex von Ratten. Mittels immunhistochemischen Färbungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine 92-100 %ige Kolokalisation der GABA_B-Rezeptor-Untereinheiten in SST-positiven Interneuronen festgestellt werden (Gonchar et al. 2001). Zudem zeigt diese Studie keine schichtenbezogenen Unterschiede in der Kolokalisationsquote, eine Tatsache, die auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

In der Literatur finden sich wenige Daten zur Expression von GABA_B-Rezeptoren in SST-positiven Interneuronen in spezifischen sensorischen Kortexarealen. Lediglich im präfrontalen Kortex konnte in den Schicht V-Pyramidenzellen nachgewiesen werden, dass diese über SST-positive Terminalen mit GABA_B-Rezeptoren verfügen (Liu et al. 2017). Demnach

sollen die SST-exprimierenden Zellen im präfrontalen Kortex immunpositiv für die GABA_B-Rezeptor-Moleküle sein. Für neuronale Strukturen, wie den Hippocampus und die Amygdala, sind bereits immunhistochemische Studien veröffentlicht worden. So konnte in der basolateralen Amygdala der Ratte gezeigt werden, dass 72 % der SST-exprimierenden Interneurone immunpositiv für die GABA_{B1}-UE-Rezeptorfärbung reagieren (McDonald et al. 2004). Die Antikörperfärbung visualisierte bei den Interneuronen maßgeblich das Soma, so wie es auch in dieser Studie zu beobachten ist. Ebenfalls konnte, in histologischen Präparaten der Ratte, im Hippocampus an SST-exprimierenden Interneuronen eine Kollokalisierung mit dem GABA_B-Rezeptor festgestellt werden (Sloviter et al. 1999). Aussagen über die Anzahl der Kollokalisierung wurden in dieser Arbeit nicht getroffen. In immunhistochemischen Versuchen an Mäusen konnte für SST-positive Interneurone in der CA1-Region des Hippocampus eine Kollokalisierung mit der GABA_{B1b}-UE von 56 % und für den Hilus des Gyrus dentatus von 45 % gezeigt werden.

Zusammenfassend lassen sich klare Anzeichen finden, dass Somatostatin-exprimierende Interneurone über metabotrope GABA_B-Rezeptoren verfügen. Ausgehend von den eigenen Daten im *Barrel*-Kortex kann vermutet werden, dass kortikale SST-positive Interneurone eine höhere Expressionsrate aufweisen als deren Pendants im Hippocampus. Eigene, noch nicht veröffentlichte Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten in elektrophysiologischen Experimenten zeigen, dass Martinotti-Zellen im *Barrel*-Kortex auf einen GABA_B-Rezeptor Agonisten mit einer langanhaltenden Hyperpolarisation reagieren.¹ Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden in dieser Studie für die untersuchten GFP-positiven Zellen der GIN-Maus. Zusammengenommen stellen die hier erhobenen Resultate den ersten Nachweis einer Expression von metabotropen GABA_B-Rezeptoren an Somatostatin-positiven und insbesondere Martinotti-Zellen in sensorischen Kortexarealen dar.

4.2.2 Expression des GABA_B-Rezeptors in VIP Interneuronen

VIP-exprimierende Interneurone gehören zur Gruppe der 5HT_{3aR}-exprimierenden GABAergen Interneurone, die ca. 30 % aller GABAergen Interneurone ausmachen (Lee et al. 2010). Die VIP-positiven Zellen machen innerhalb dieser Population ca. 40 % aus (Prönneke et al. 2015; Rudy et al. 2011). Sie sind in der Lage, andere GABAerge Interneurone zu hemmen, was vor allem für SST-positive Interneurone beschrieben wurde (Lee et al. 2013; Pfeffer et

¹ Diese Information verdanke ich Herrn Dr. Mirko Witte, der mir am 08. Mai 2015 in einem Gespräch einen Teil seiner Forschungsergebnisse erläutert hat.

al. 2013; Pi et al. 2013) und laut verschiedenster Publikationen zu Disinhibition von Pyramidenzellen führt (Karnani et al. 2016; Fu et al. 2014; Lee et al. 2013; Pi et al. 2013). Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass VIP-exprimierende Interneurone im *Barrel*-Kortex Zielzellen der PV-exprimierenden GABAergen Interneurone darstellen (Staiger et al. 1997).

In den ausgewerteten Hirnschnitten der VIPcre/tdTomato-Maus weisen durchschnittlich $2288,3 \pm 301$ Zellen pro 1 mm^3 *Barrel*-Kortex eine GABA_B-Rezeptor Expression auf. Lediglich bei $138,6 \pm 190,4$ von $2427,0 \pm 399,2$ tdTomato-Zellen pro 1 mm^3 *Barrel*-Kortex konnte keine Kolo-kalisation mit dem GABA_B-Rezeptor festgestellt werden (Tabelle A1). Dies entspricht einer Quote von $95,0 \pm 7,0 \%$ (Tabelle A5). VIP-positive Zellen, die vereinzelt keine GABA_B-Rezeptor Expression aufwiesen, kamen nur in drei von acht Schnitten vor. Daher kann angenommen werden, dass VIP-positive Zellen eine fast vollständige Koexpression mit dem GABA_B-Rezeptor aufweisen. Die GABA_B-positiven und die GABA_B-negativen VIP-Interneurone weisen in ihrer schichtenspezifischen Verteilung keine Unterschiede auf. Mit Ausnahme der Schichten I und IV liegt die Kolo-kalisationsquote bei über 95 % (Tabelle A5). Die Verteilung der tdTomato-positiven VIP-Zellen in dieser Studie ist analog zu bereits veröffentlichten Arbeiten (Prönneke et al. 2015; Xu et al. 2010).

Bisher sind nur wenige Studien zur Expression von GABA_B-Rezeptoren in VIP-positiven Zellen bekannt, die sich ausschließlich auf den Hippocampus bzw. die Amygdala beziehen. Im Stratum *lacunosum moleculare* des Hippocampus von Mäusen konnte mittels elektrophysiologischer Methoden festgestellt werden, dass VIP-positive Interneurone GABA_B-Rezeptoren exprimieren. Bei einer Aktivierung kommt es zu inhibitorischen Effekten auf die synaptische Transmission in der CA1 Region des Hippocampus (Yanovsky et al. 1997). In der Amygdala von Ratten sind lediglich 25-27 % der VIP-Neurone immunpositiv für die GABA_{B1}-UE (McDonald et al. 2004). Aufgrund des Fehlens weiterer vergleichender Studien muss davon ausgegangen werden, dass VIP-exprimierende Interneurone im *Barrel*-Kortex den GABA_B-Rezeptor universell exprimieren. Eigene elektrophysiologische Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigen diese Vermutung. In *Whole-cell-patch-clamp*-Ableitungen konnte an VIP-positiven Interneuronen ein hyperpolarisierender Effekt auf das Membranpotentials infolge einer GABA_B-Rezeptor Aktivierung beobachtet werden.²

² Diese Information verdanke ich Herrn Dr. Mirko Witte, der mir am 23. Juli 2015 in einem Gespräch einen Teil seiner Forschungsergebnisse erläutert hat.

4.2.3 Expression des GABA_B-Rezeptors in PV Interneuronen

Die PV-positiven GABAergen Interneurone bilden mit ca. 40 % die größte Gruppe der Interneurone im Kortex. Sie sind Gegenstand verschiedenster Untersuchungen, weil ihnen eine Rolle bei der Entwicklung psychiatrischer Erkrankungen zugeschrieben wird. Innerhalb der PV-positiven Interneurone können durch spezifische morphologische Merkmale unterschiedliche Subgruppen identifiziert werden, wie z. B. die Chandelier-Zellen und die Korbzellen (Marín 2012; Rudy et al. 2011; Ascoli et al. 2008; Kawaguchi und Kubota 1997). In der Analyse der Hirnschnitte der PV^{cre}/tdTomato-Maus wiesen in der Region des *Barrel*-Kortex im Mittel 6389,4 von 7240,8 PV-positive Zellen eine Kollokalisierung mit dem GABA_B-Rezeptor auf (Tabelle A3). Daraus resultiert eine Kollokalisationsquote von 88,4 % (Tabelle A5). In der schichtenspezifischen Quantifizierung heben sich insbesondere die kortikalen Schichten II/III und IV mit einer Kollokalisationsquote von lediglich 76,4 % bzw. 74,2 % ab (Tabelle A5). Im Vergleich dazu weisen die PV-exprimierenden Interneurone in den Schichten V und VI mit 95,0 % bzw. 93,5 % eine nahezu vollständige Expression mit dem GABA_B-Rezeptor auf. Nicht-kollokalisierte PV-Zellen wurden in sieben von acht untersuchten Hirnschnitten gefunden (Tabelle A5).

Der hohe Prozentsatz der mit dem GABA_B-Rezeptor Antikörper markierten PV-positiven Neurone deckt sich mit Ergebnissen bereits durchgeführter Studien. In einer immunelektronenmikroskopischen Untersuchung der PV^{cre}/tdTomato-Maus im Str. radiatum des Hippocampus wurden vor allem an der Membran des Somas PV-positiver GABAergen Interneurone GABA_B-Rezeptoren gefunden (Booker et al. 2013). Deren Ergebnissen zur Folge existiert eine hohe Dichte von GABA_B-Rezeptoren am Soma und zum Teil an den Dendriten der PV-positiven Zellen im Kontrast zum Dendritenschaft, an dem weniger GABA_B-Rezeptoren zu identifizieren sind. Ebenfalls konnte die Expression von GABA_B-Rezeptoren an PV-positiven Zellen mithilfe optokinetischer Versuche im Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesen werden (Yang et al. 2015).

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch zusätzlich darauf eingegangen werden, dass die PV-positiven Zellen der PV^{cre}/tdTomato-Mauslinie weniger häufig mit dem GABA_B-Rezeptor kollokalisiert waren als bei den anderen untersuchten Mauslinien, insbesondere in den Schichten II/III und IV. Aufgrund dieser Beobachtung stellt sich die Frage, ob innerhalb der PV-positiven GABAergen Neuronenpopulation eine Subklasse von PV-positiven Zellen existiert, die keine Expression des GABA_B-Rezeptors aufweist. Betrachtet man

die morphologischen Charakteristika der PV-exprimierenden Zellen, die innerhalb dieser Interneuronenklasse eine Einteilung erlaubt, dann könnte darauf geschlossen werden, dass die Korbzellen diese Zellpopulation darstellen. Die Korbzellen gehören über ihre Expression von Parvalbumin zur Population der PV-positiven Zellen und treten vermehrt an der Grenze zwischen Schicht III und IV auf (Somogyi et al. 1983). Es muss hinzugefügt werden, dass in den analysierten Schnitten der PV^{cre}/tdTomato-Maus dieser Studie vor allem Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor im oberen Bereich der Schichten II/III zu finden waren. Anderen Studien zur Folge scheinen Chandelier-Zellen weitestgehend in den Schichten II/III, V und VI vorzukommen (Wang et al. 2016; Taniguchi et al. 2011), wobei Taniguchi und Kollegen hervorheben, dass eine überproportional hohe Zahl von Chandelier-Zellen in Schicht II (74,6 %) zu finden ist (Taniguchi et al. 2013). Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie und der derzeitigen Datenlage kann angenommen werden, dass die meisten PV-positiven GABAergen Interneurone den GABA_B-Rezeptor exprimieren. Es ist jedoch hinzuzufügen, dass aufgrund der Heterogenität dieser Interneuronenklasse auch PV-exprimierende Zellen existieren, die keine Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor aufweisen. Die Ergebnisse in dieser Studie lassen vermuten, dass es möglicherweise PV-positive Korbzellen sind, die keine Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor besitzen.

4.3 Physiologische Relevanz

In der vorliegenden Arbeit steht der metabotrope GABA_B-Rezeptor im Fokus der Analyse, der im Kortex sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert ist. Präsynaptisch sind die GABA_B-Rezeptoren hauptsächlich mit Kalziumkanälen und postsynaptisch mit Kaliumkanälen assoziiert. Aufgrund dessen können bei Aktivierung dieser Rezeptoren verschiedenste Effekte entstehen, z. B. eine Reduktion der Neurotransmitterausschüttung über einen reduzierten Ca²⁺-Einstrom in die Präsynapse oder eine langanhaltende Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran, die letztlich nicht nur einen Einfluss auf die Zielzelle haben, sondern auch gesamte neuronale Netzwerke beeinflussen können (Bowery 2006). Den GABA_B-Rezeptoren wird somit eine essenzielle Rolle bei der Regulierung der Wirksamkeit der synaptischen Transmission im gesamten Gehirn zugeschrieben (Valenzuela et al. 2014). Neben der Lokalität von GABA_B-Rezeptoren an der Prä- bzw. Postsynapse beschreibt die Arbeitsgruppe um Scanziani eine *spill-over*-Aktivität des Neurotransmitters GABA im Hippocampus, die die Netzwerkaktivität beeinflusst (Scanziani 2000).

In dieser Studie wurden vier Subpopulationen der kortikalen GABAergen Interneurone auf das Vorkommen von GABA_B-Rezeptoren hin untersucht. Hierbei ergab sich, dass SST-positive Zellen fast vollständig den GABA_B-Rezeptor exprimieren. Die Subpopulation der SST-exprimierenden Interneurone, die Martinotti-Zellen (Ma et al. 2006; Wang et al. 2004), in der GIN-Maus zeigen dabei eine 100 %ige Kollokalisierung. Die Population der VIP-exprimierenden Interneurone war ebenfalls nahezu vollständig mit dem GABA_B-Rezeptor kollokaliert. Eine Ausnahme innerhalb der GABAerger Interneurone stellen die PV-positiven Zellen dar. Sie weisen nur zu ca. 88 % eine Expression des GABA_B-Rezeptors auf, die zudem inhomogen für die kortikalen Schichten ausfällt. Die Analyse zeigt vor allem eine geringere Kollokalisationsrate von PV-Interneuronen mit dem GABA_B-Rezeptor in den Schichten II/III und Schicht IV.

Doch welche Schlussfolgerungen lassen die Ergebnisse der Studie zu, und inwieweit können die Beobachtungen einen Einfluss auf die neuronale Netzwerkaktivität haben?

GABAergen Interneurone sind für die Balance der Exzitation mit dem richtigen Maß an Inhibition innerhalb neuronaler Netzwerke verantwortlich (Markram et al. 2004; Shu et al. 2003). Ein Ungleichgewicht innerhalb dieser Netzwerke ist mitverantwortlich für die Entstehung unterschiedlichster neuronaler Erkrankungen, wie z. B. Autismus, Epilepsie und Schizophrenie (Bowery 2006; Benes und Berretta 2001; Hussmann 2001).

Es muss hervorgehoben werden, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten GABAergen Interneurone in ihrer Gesamtheit eine fast vollständige Kollokalisierung mit dem GABA_B-Rezeptor aufweisen. Allerdings konnten die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen keine Hinweise auf die genaue Lokalisation der GABA_B-Rezeptoren in den Interneuronen geben. Die Immunreaktion des GABA_B-Rezeptor Antikörpers zeigte maßgeblich eine Anfärbung am Zytoplasma der Somata und nur im geringen Maße eine Anfärbung der Dendriten. Die prominente Markierung der Somata der Zellen ist auf die Akkumulation der GABA_{B2}-UE am ER zurückzuführen (Kulik et al. 2003). Aus diesem Grund kann auf der Basis der hier erhobenen Daten kein Rückschluss auf die subzelluläre Lage der metabotropen GABA_B-Rezeptoren gezogen werden. Dadurch bleibt unklar, ob die GABA_B-Rezeptoren prä-, post- oder extrasynaptisch vorkommen. Die Lokalität ist aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsweise der GABA_B-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung und muss in nachfolgenden Studien untersucht werden. Hierfür scheint die Elektronenmikrosko-

pie am geeignetsten zu sein, da mittels dieser Technik an glutamatergen Synapsen von Pyramidenzellen im Hippocampus und im Neokortex auf die Lokalisation des GABA_B-Rezeptors geschlossen werden konnte (Shaban et al. 2006; Vigot et al. 2006).

Für die untersuchten Subpopulationen der GABAergen Interneurone, den SST-, VIP- und PV-exprimierenden Zellen lassen sich somit nur hypothetische Wirkungsmechanismen ableiten. In der Literatur sind subzelluläre Untersuchungen zu metabotropen GABA_B-Rezeptoren an neokortikalen Interneuronen nur spärlich vorhanden. Lediglich an SST-positiven Terminalen in der Schicht V des präfrontalen Kortex von Mäusen und an PV- und SST-positiven Terminalen im visuellen Kortex der Ratte konnte eine Expression von GABA_B-Rezeptoren nachgewiesen werden (Liu et al. 2017; Gonchar et al. 2001). In eigenen elektrophysiologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass VIP- und PV-Terminalen im *Barrel*-Kortex GABA_B-Rezeptoren exprimieren. Bei der synaptischen Transmission von VIP- und PV-Zellen auf Martinotti-Zellen konnte eine durch Baclofen-induzierte Reduktion der postsynaptischen Ströme beobachtet werden.³ Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Lokalisation des GABA_B-Rezeptors an der Präsynapse von inhibitorischen Synapsen ein Großteil der GABAergen Interneuronenpopulationen bei Stimulation des GABA_B-Rezeptors aus dem neuronalen Netzwerk genommen werden kann.

Von einer postsynaptischen bzw. extrasynaptischen Expression der GABA_B-Rezeptoren an GABAergen Interneuronen kann, aufgrund der gefundenen hohen Kollokalisationsquote, den eigenen elektrophysiologischen Untersuchungen der internen Arbeitsgruppe des Institutes für Neuroanatomie und den in der Literatur aufgeführten Studien über Interneurone, ausgegangen werden (Ulrich und Bettler 2007; Kulik et al. 2003; Scanziani 2000). GABA_B-Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran führen überwiegend zu langanhaltender Hyperpolarisation. Auf diese Weise wird der Einfluss exzitatorischer Zellen auf die GABA_B-exprimierenden Interneurone erschwert und die neuronale Netzwerkaktivität geht zurück (Bowery 2006). Wohingegen präsynaptische GABA_B-Rezeptoren, die als Autorezeptoren fungieren, eine komplett gegensätzliche Funktion haben und in der Lage sind, Langzeitpotenzierung zu induzieren (Collingridge und Davies 1996; Davies et al. 1991).

Es kann daher geschlossen werden, dass die Lokalisation des GABA_B-Rezeptors von besonderer Bedeutung ist. Die Komplexität neuronaler Schaltkreise GABAerger Interneurone lässt auf mannigfaltige Möglichkeiten von Wirkmechanismen schließen. Aus diesem

³Diese Information verdanke ich Herrn Dr. Mirko Witte, der mir am 23. Juli 2015 in einem Gespräch einen Teil seiner Forschungsergebnisse erläutert hat.

Grund ist es von essenzieller Bedeutung, die genaue Lokalisation des GABA_B-Rezeptors an GABAergen Interneuronen zu ermitteln, um die Auswirkungen des GABA_B-Rezeptors auf neuronale Netzwerke besser einordnen zu können.

Während der Auswertung konnte festgestellt werden, dass neben der hohen Rate an GABA_B-Rezeptoren in allen GABAergen Interneuronpopulation die PV-positiven Zellen neben ihrer Expression des GABA_B-Rezeptors zusätzlich schichtenspezifische Unterschiede aufweisen. Hierbei wurde eine geringere Kolo­kalisierung von PV-positiven Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor in Schicht II/III mit 76,4 % sowie in Schicht IV mit 74,2 % ermittelt, wohingegen die Schichten V und VI eine deutlich höhere Kolo­kalisierung mit mehr als 90 % aufwiesen.

Schicht IV nimmt eine besondere Rolle in Bezug auf die Inhibition nachgeschalteter Neurone in den kortikalen Schaltkreisen ein - wie beispielsweise bei den thalamokortikalen Inputs sensorischer Information (Rudy et al. 2011). Befinden sich die GABA_B-Rezeptoren an der Präsynapse der PV-positiven Zellen, kann davon ausgegangen werden, dass ihre hemmende Wirkung reduziert wird und die Neurone, auf die sie projizieren, gehemmt werden. PV-exprimierende Interneurone sollen neben den Pyramidenzellen vermehrt ihre eigene Population inhibieren (Stark et al. 2014; Pfeffer et al. 2013; Wen et al. 2010). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass PV-Interneurone für eine schnelle und starke Inhibition auf SST-positive Martinotti-Zellen im *Barrel*-Kortex verantwortlich sind (Walker et al. 2016). Da lediglich die PV-Zellen keine 100 %ige Kolo­kalisierung mit dem GABA_B-Rezeptor aufweisen und zudem noch schichtenspezifische Unterschiede bei der Analyse der Schnitte identifiziert werden konnten, scheinen die PV-exprimierenden Zellen im *Barrel*-Kortex einige Unterschiede aufzuweisen. Im Besonderen sind hier die PV-positiven *fast-spiking*-Korbzellen zu erwähnen, die vor allem an der Grenze zwischen Schicht III und IV vorkommen (Somogyi et al. 1983). Sie spielen eine Rolle bei der Vermittlung inhibierender Plastizität und projizieren mit ihren Synapsen auf die Somata von Pyramidenzellen (Dehorter et al. 2017). Die PV-positiven Zellen zwischen Schicht III und IV, in den analysierten Hirnschnitten dieser Studie, wiesen kaum Kolo­kalisierung mit GABA_B-Rezeptoren auf. Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass Korbzellen vornehmlich auf Pyramidenzellen projizieren und deren Plastizität beeinflussen, scheint diese kortikale Verschaltung sich in Bezug auf ihre Modulierbarkeit anders zu verhalten als beispielsweise die Verschaltung zwischen PV-positiven Zellen und Martinotti-Zellen.

5 Zusammenfassung

Im Kortex cerebri lassen sich unterschiedliche Gruppen von Neuronen aufgrund ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Auf der einen Seite die exzitatorischen (erregenden) Neurone, die mit 70-80 % den Großteil der vorhandenen Neurone ausmachen (DeFelipe und Farinas 1992). Die restlichen 20-30 % sind inhibitorische (hemmende) Neurone, die eine starke Diversität aufweisen (Markram et al. 2004). Diese GABAergen Interneurone können aufgrund molekularer Marker in drei Subpopulationen untergliedert werden: die Parvalbumin (PV)-, die Somatostatin (SST)- und die 5HT_{3a}-Rezeptor-exprimierenden Neurone (Rudy et al. 2011; Kubota et al. 1994). Innerhalb der 5HT_{3a}-Rezeptor Gruppe kann nochmals zwischen Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)-exprimierenden und nicht VIP-exprimierenden Zellen unterschieden werden (Xu et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf dem Nachweis der Expression von metabotropen GABA_B-Rezeptoren in den PV-, den VIP- und den SST-positiven GABAergen Interneuronen. Die Experimente wurden an frontalen Hirnschnitten im Bereich des somatosensorischen Kortex (*Barrel*-Kortex) mittels Immunhistochemie für den GABA_B-Rezeptor durchgeführt. Zur Visualisierung der Subpopulationen von Interneuronen kamen transgene Mauslinien (PV^{cre}/tdTomato, VIP^{cre}/tdTomato und SST^{cre}/tdTomato) zum Einsatz, bei denen die Zellen mit dem Fluorophor tdTomato markiert sind. Zur weiteren Charakterisierung der SST-exprimierenden Neurone wurde die GIN-Maus verwendet, bei der die spezifische Gruppe der SST-positiven Martinotti-Zellen mittels GFP markiert sind. Nach erfolgreicher immunhistochemischer Färbung wurden die Schnitte am konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen und Software-unterstützt auf Kollokationen mit dem GABA_B-Rezeptor überprüft.

Für die SST-positiven Interneurone konnte nachgewiesen werden, dass nahezu eine vollständige Koexpression ($96,8 \pm 5,6$ %) mit dem GABA_B-Rezeptor vorliegt. Für die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus lag eine 100 %ige Überlagerung beider Signale vor. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass wahrscheinlich die gesamte Population der SST-exprimierenden Interneurone, auf jeden Fall aber die GFP-positiven Zellen der GIN-Maus, die die Martinotti-Zellen darstellen, in allen Schichten des *Barrel*-Kortex den metabotropen GABA_B-Rezeptor exprimieren (Ma et al. 2006). Die VIP-positiven Interneurone exprimieren zu $95,0 \pm 7,0$ % den GABA_B-Rezeptor. Für die größte Population der GABAergen Interneurone, die PV-exprimierenden Zellen, konnte ermittelt werden, dass sie zum Großteil ($88,4 \pm 9,0$ %) über alle Schichten hinweg mit dem GABA_B-Rezeptor kollokalisiert sind. Eine Ausnahme stellen

hier die Schichten II/III und IV dar, in denen eine signifikant geringere Kolo-kalisation ($76,4 \pm 17,6$ % bzw. $74,2 \pm 18,9$ %) mit dem GABA_B-Rezeptor vorliegt. Demnach scheinen die PV-exprimierenden Interneurone eine Sonderrolle innerhalb der GABAergen Interneurone einzunehmen. Aufgrund der Häufigkeit von PV-positiven Korbzellen in dieser Region kann gefolgert werden, dass diese Subpopulation der PV-exprimierenden Interneurone keine metabotropen GABA_B-Rezeptoren besitzen.

Zusammenfassend weisen die Mehrzahl der SST-, VIP- und PV-exprimierenden Interneurone eine Expression des metabotropen GABA_B-Rezeptors auf. Bisher gab es über deren kortikale Verbreitung, insbesondere an Interneuronen, nur wenige Anhaltspunkte (Davies et al. 1990). Um die Bedeutung der GABA_B-Rezeptoren für die kortikale Verarbeitung zu verstehen, muss insbesondere im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation des GABA_B-Rezeptors eine weitere Studie angeschlossen werden. Für eine Unterscheidung hinsichtlich einer prä- oder postsynaptischen oder auch extrasynaptischen Lokalisation der GABA_B-Rezeptoren sollte auf die hochauflösende Elektronenmikroskopie zurückgegriffen werden. Erst mit der Kenntnis über die Lage der Rezeptoren lässt sich die mögliche Modulation der Balance von Exzitation und Inhibition durch metabotrope GABA_B-Rezeptoren besser beschreiben.

6 Anhang

Tabelle A1: Kolokalisation der VIP/tdTomato-Maus mit dem GABA_B-Rezeptor

Region	alle VIP/tdTomato ±SD	Nur VIP/tdTo- mato±SD	Kolokalisation mit GA- BA _B ±SD
<i>Barrel</i> -Kortex	2420.6±399.5	138.6±190.4	2282.0±302.3
Schicht I	93.7±35.7	15.5±33.7	78.2±30.0
Schicht II/III	1534.6±240.4	75.2±123.9	1459.4±196.8
Schicht IV	445.5±92.5	34.2±59.4	411.4±88.8
Schicht Va	109.2±35.0	3.2±8.5	106.0±31.7
Schicht Vb	149.2±74.4	7.3±19.2	142.0±71.6
Schicht V (a+b)	258.4±91.5	10.5±19.9	248.0±82.1
Schicht VI	84.8±63.7	3.2±8.5	81.6±60.7

In der obigen Tabelle wird die schichtenspezifische Kolokalisation von VIP/tdTomato mit GABA_B-Rezeptor dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die linke Spalte stellt alle Zellen, die mit dem tdTomato-Signal in der VIPcre/tdTomato-Maus markiert sind, dar. Die zweite Spalte gibt an, wie viele Zellen nicht mit GABA_B kolokalisiert sind, sondern nur ihr tdTomato-Eigensignal exprimieren. Die dritte Spalte zeigt die Kolokalisationen von VIP-positiven Zellen mit GABA_B.

Tabelle A2: Verteilung der kolokalisierten und nicht kolokalisierten VIP/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor

Region	alle VIP/tdTomato ±SD	Nur VIP/tdTo- mato±SD	Kolokalisation mit GA- BA _B ±SD
<i>Barrel</i> -Kortex	100.0	100.0	100.0
Schicht I	3.9±1.5	11.2±12.0	3.4±1.3
Schicht II_III	63.4±9.9	54.3±34.0	64.0±8.6
Schicht IV	18.4±3.8	24.7±17.5	18.0±3.9
Schicht Va	4.5±1.4	2.3±3.3	4.6±1.4
Schicht Vb	6.2±3.1	5.2±7.4	6.2±3.1
Schicht V (a+b)	10.7±3.8	7.6±6.4	10.9±3.6
Schicht VI	3.5±2.6	2.3±3.3	3.6±2.7

Zu sehen ist die prozentuale Verteilung der VIP/tdTomato-positiven Zellen in der ersten Spalte und ihre Kolokalisation mit GABA_B-Rezeptor in der dritten Spalte. VIP-positive Zellen, die ausschließlich das tdTomato-Signal der transgenen Mauslinie VIPcre/tdTomato exprimieren, sind in ihrer prozentualen Verteilung in der zweiten Spalte dargestellt. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige schichtenspezifische Verteilung der Zellen, wobei 100 % der Zellen auf 1 mm³ *Barrel*-Kortex bezogen sind.

Tabelle A3: Kolokalisation der PV/tdTomato-Maus mit dem GABA_B-Rezeptor

Region	alle PV/tdTomato ±SD	Nur PV/tdTo- mato±SD	Kolokalisation mit GA- BA _B ±SD
<i>Barrel</i> -Kortex	7240.8±970.4	851.4±683.5	6389.4±1089.6
Schicht I	7.1±12.3	0.0±0.0	7.1±12.3
Schicht II_III	1261±291.7	307.2±239.9	953.9±295.8
Schicht IV	1780.3±386.3	296.8±347.3	1483.5±504.5
Schicht Va	1077.5±251.2	69.9±84.0	1007.6±222.4
Schicht Vb	2081.6±504.3	104.3±96.0	1977.2±470.7
Schicht V (a+b)	3159.0±654.2	174.2±176.4	2984.8±583.8
Schicht VI	1030.5±312.6	73.2±76.4	957.3±284.4

In der Tabelle wird die schichtenspezifische Kolokalisation von PV/tdTomato mit GABA_B-Rezeptor dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die erste Spalte stellt alle PV-positiven Zellen, die das tdTomato-Signal exprimieren, dar. Die zweite Spalte gibt an, wie viele Zellen nicht mit dem GABA_B-Rezeptor kolokalisiert sind, sondern nur ihr tdTomato-Eigensignal exprimieren. Die dritte Spalte zeigt die Kolokalisationen von PV-positiven Zellen mit GABA_B-Rezeptor.

Tabelle A4: Verteilung der kolokalisierten und nicht kolokalisierten PV/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor

Region	alle PV/tdTomato ±SD	Nur PV/tdTo- mato±SD	Kolokalisation mit GABA _B ±SD
<i>Barrel</i> -Kortex	100	100	100
Schicht I	0.1±0.2	0.0±0.0	0.1±0.2
Schicht II_III	17.4±4.0	36.1±28.2	14.9±4.6
Schicht IV	24.6±5.3	34.9±40.83	23.2±7.9
Schicht Va	14.9±3.5	8.2±9.9	15.8±3.5
Schicht Vb	28.7±7.0	12.3±11.3	30.9±7.4
Schicht V (a+b)	43.6±9.0	20.5±20.7	46.7±9.1
Schicht VI	14.2±4.3	8.6±9.0	15.0±4.5

Zu sehen ist die prozentuale Verteilung der kolokalisierten PV/tdTomato-positiven Zellen in der ersten Spalte und ihre Kolokalisation mit dem GABA_B-Rezeptor in der dritten Spalte. PV-Zellen, die ausschließlich das tdTomato-Signal der transgenen Mauslinie PV^{cre}/tdTomato exprimieren, sind in ihrer prozentualen Verteilung in der zweiten Spalte dargestellt. Die Werte beziehen sich auf die jeweilige schichtenspezifische Verteilung der Zellen, wobei 100 % der Zellen auf 1 mm³ *Barrel*-Kortex bezogen sind.

Tabelle A5: Schichtenbezogene Kollokalisationsquote von Pvcrc/tdTomato-Zellen und VIPcre/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor

Region	Kollokalisierung von VIP/tdTomato mit GABA _B ±SD	Kollokalisierung von PV/tdTomato mit GABA _B ±SD
<i>Barrel</i> -Kortex	95.0±7.0	88.4±8.9
Schicht I	88.5±22.4	100±0.0
Schicht II_III	95.7±7.3	76.4±17.6
Schicht IV	82.6±12.8	74.2±18.9
Schicht Va	97.9±5.5	94.1±7.1
Schicht Vb	96.4±9.4	95.4±4.3
Schicht V (a+b)	97.0±6.0	95.0±5.1
Schicht VI	97.6±5.8	93.5±6.9

Dargestellt ist in einer Gegenüberstellung die schichtenbezogene prozentuale Kollokalisierungen von Pvcrc/tdTomato-Zellen und VIPcre/tdTomato-Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor. In der ersten Spalte ist die Kollokalisierung der VIP-positiven Zellen mit dem GABA_B-Rezeptor angegeben. In der zweiten Spalte kann die Koexprimierung von PV mit dem GABA_B-Rezeptor abgelesen werden. Die Werte sind in Prozent und als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

7 Literaturverzeichnis

- Ascoli GA, Barrionuevo G, Burkhalter A, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Benavides-Piccione R, Buzsáki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairén A et al. (2008): Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9, 557–568
- Benes FM, Berretta S (2001): GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25, 1–27
- Bettler B, Kaupmann K, Bowery N (1998): GABAB receptors: drugs meet clones. *Curr Opin Neurobiol* 8, 345–350
- Blatow M, Rozov A, Katona I, Hormuzdi SG, Meyer AH, Whittington MA, Caputi A, Monyer H et al. (2003): A Novel Network of Multipolar Bursting Interneurons Generates Theta Frequency Oscillations in Neocortex. *Neuron* 38, 805–817
- Boenisch T (Hrsg.): *Handbook: Immunochemical Staining Methods*. 3. Auflage; Dako Corporation, Carpinteria 2001
- Booker SA, Gross A, Althof D, Shigemoto R, Bettler B, Frotscher M, Hearing M, Wickman K, Watanabe M, Kulik A, Vida I et al. (2013): Differential GABAB-Receptor-Mediated Effects in Perisomatic- and Dendrite-Targeting Parvalbumin Interneurons. *J Neurosci* 33, 7961–7974
- Bormann J, Feigenspan A (1995): GABA_A receptors. *Trends Neurosci* 18, 515–519
- Bowery N (2006): GABA B receptors: a site of therapeutic effect. *Curr Opin Pharmacol* 6, 37–43
- Brecht M (2007): Barrelcortex and whisker-mediated behaviors. *Curr Opin Neurobiol* 17, 408–416
- Buchwalow IB, Böcker W (Hrsg.): *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. 1. Auflage; Springer, Münster 2010
- Calver AR, Medhurst AD, Robbins MJ, Charles KJ, Evans ML, Harrison DC, Stammers M, Hughes SA, Hervieu G, Couve A, Moss SJ, Middlemiss DN et al. (2000): The expression of GABAB1 and GABAB2 receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience* 100, 155–170
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J et al. (1997): Molecular and Physiological Diversity of Cortical Nonpyramidal Cells. *J Neurosci* 17, 3894–3906

- Charles KJ, Evans ML, Robbins MJ, Calver AR, Leslie RA, Pangalos MN (2001): Comparative immunohistochemical localisation of GABAB1a, GABAB1b and GABAB2 subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. *Neuroscience* 106, 447–467
- Chiu CQ, Lur G, Morse TM, Carnevale NT, Ellis-Davies GC, Higley MJ (2013): Compartmentalization of GABAergic Inhibition by Dendritic Spines. *Science* 340, 759–762
- Collingridge GL, Davies CH (1996): Regulation of EPSPs by the synaptic activation of GABAB autoreceptors in rat hippocampus. *J Physiol* 496, 451–470
- Couve A, Filippov AK, Connolly CN, Bettler B, Brown DA, Moss SJ (1998): Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* 273, 26361–26367
- Cox G (2002): Biological confocal microscopy. *Mater Today* 5, 34–41
- Creutzfeld OD: *Cortex Cerebri*. 1. Auflage; Springer, Berlin-Heidelberg 1983
- Curtis DR, Gynther BD, Lacey G, Beattie DT (1997): Baclofen: reduction of presynaptic calcium influx in the cat spinal cord in vivo. *Exp Brain Res* 113, 520–533
- Dávid 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
- Davies CH, Davies SN, Collingridge GL (1990): Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J Physiol* 424, 513–531
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL (1991): GABAB autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349, 609–611
- DeFelipe J, Farinas I (1992): The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39, 563–607
- Dehorter N, Marichal N, Marín O, Berninger B (2017): Tuning neural circuits by turning the interneuron knob. *Curr Opin Neurobiol* 42, 144–151
- Feldmeyer D, Qi G F, Emmenegger V, Staiger JF (2018): Inhibitory Interneurons and their Circuit Motifs in the Many Layers of the Barrel Cortex. *Neuroscience* 368, 132–151
- Ferezou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, Lambolez B (2002): 5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci* 22, 7389–7397
- Filippov AK, Couve A, Pangalos MN, Walsh FS, Brown DA, Moss SJ, (None) (2000): Heteromeric assembly of GABABR1 and GABABR2 receptor subunits inhibits Ca²⁺ current in sympathetic neurons. *J Neurosci* 20, 2862–2874

- Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marin O, Pachnis V, Kessaris N (2007): Spatial Genetic Patterning of the Embryonic Neuroepithelium Generates GABAergic Interneuron Diversity in the Adult Cortex. *J Neurosci* 27, 10935–10946
- Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa J, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP et al. (2014): A Cortical Circuit for Gain Control by Behavioral State. *Cell* 156, 1139–1152
- Gonchar Y, Pang L, Malitschek B, Bettler B, Burkhalter A (2001): Subcellular localization of GABAB receptor subunits in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 431, 182–197
- Halbhuber KJ, König K (2003): Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine. *Ann Anat* 185, 1–20
- Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T et al. (2013): Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *J Neurosci* 33, 544–555
- Huang CS, Shi SH, Ule J, Ruggiu M, Barker LA, Darnell RB, Jan YN, Jan LY et al. (2005): Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition. *Cell* 123, 105–118
- Hussmann JP (2001): Suppressed GABAergic Inhibition as a Common Factor in Suspected Etiologies of Autism. *J Autism Dev Disord* 32, 247–248
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q et al. (1998): GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABABR1 and GABABR2. *Nature* 396, 674–679
- Karnani MM, Jackson J, Ayzenshtat I, Hamzehei Sichani A, Manoocheri K, Kim S, Yuste R (2016): Opening Holes in the Blanket of Inhibition: Localized Lateral Disinhibition by VIP Interneurons. *J Neurosci* 36, 3471–3480
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B et al. (1998): GABAB-receptorsubtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683–687
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997): GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7, 476–486
- Kerr DIB, Ong J (1995): GABA B Receptors. *Pharmacol Ther* 67, 187–246
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994): Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649, 159–173
- Kulik A, Vida I, Lujan R, Haas CA, Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Frotscher M (2003): Subcellular Localization of Metabotropic GABAB Receptor Subunits GABAB1/B and GABAB2 in the Rat Hippocampus. *J Neurosci* 23, 11026–11035

- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B (2010): The Largest Group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors. *The Journal of Neuroscience* 30, 16796–16808
- Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B (2013): A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 16, 1662–1670
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC (2009): The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron* 61, 301–316
- Leung LS, Pelequin P (2006): GABA B receptors inhibit backpropagating dendritic spikes in hippocampal CA1 pyramidal cells in vivo. *Hippocampus* 16, 388–407
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* 46, 258–268
- Liu L, Ito W, Morozov A (2017): GABAB Receptor Mediates Opposing Adaptations of GABA Release from Two Types of Prefrontal Interneurons After Observational Fear. *Neuropsychopharmacology* 42, 1272–1283
- Lübke J, Feldmeyer D (2007): Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column. *Brain Struct Funct* 212, 3–17
- Luján R, Shigemoto R (2006): Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur J Neurosci* 23, 1479–1490
- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A (2006): Distinct Subtypes of Somatostatin-Containing Neocortical Interneurons Revealed in Transgenic Mice. *J Neurosci* 26, 5069–5082
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES et al. (2010): A robust and high-throughput Cre reporting and characterization. *Nat Neurosci* 13, 133–140
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2000): A Trafficking Checkpoint Controls GABAB Receptor Heterodimerization. *Neuron* 27, 97–106
- Marín O (2012): Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13, 107–120
- 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
- McDonald AJ, Mascagni F, Muller JF (2004): Immunocytochemical localization of GABA_B1 receptor subunits in the basolateral amygdala. *Brain Res* 1018, 147–158

- #McNamara RK, Skelton RW (1996): Baclofen, a selective GABAB receptor agonist, dose-dependently impairs spatial learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53, 303–308
- Meyer HS, Schwarz D, Wimmer VC, Schmitt AC, Kerr JN, Sakmann B, Helmstaedter M (2011): Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16807–16812
- Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G et al. (2010): Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interpopulation of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30, 1582–1594
- Nehring RB, Horikawa HP, El Far O, Kneussel M, Brandstätter JH, Stamm S, Wischmeyer E, Betz H, Karschin A et al. (2000): The Metabotropic GABAB Receptor Directly Interacts with the Activating Transcription Factor 4. *J Biol Chem* 275, 35186–35191
- Oberlaender M, de Kock CP, Bruno RM, Ramirez A, Meyer HS, Dercksen VJ, Helmstaedter M, Sakmann B et al. (2012): Cell Specific Three-Dimensional Structure of Thalamocortical Circuits in a Column of Rat Vibrissal Cortex. *Cereb Cortex* 22, 2375–2391
- Olivia AA, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW (2000): Novel Hippocampal Interneuronal Subtypes Identified Using Transgenic Mice That Express Green Fluorescent Protein in GABAergic Interneurons. *J Neurosci* 20, 3354–3368
- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Prezeau L, Pin J et al. (2001): C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABAB receptors. *J Neurosci* 21, 1189–1202.
- Pérez-Garci E, Gassmann M, Bettler B, Larkum ME (2006): The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca²⁺ spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron* 50, 603–616
- Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M (2013): Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* 16, 1068–1076
- Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A (2013): Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* 503, 521–524
- Pin J, Kniazeff J, Binet V, Liu J, Maurel D, Galvez T, Duthey B, Havlickovab M, Blahos J, Prézeau L, Rondard P et al. (2004): Activation mechanism of the heterodimeric GABAB receptor. *Biochem Pharmacol* 68, 1565–1572
- 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
- Ren JQ, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T (1992): Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp Brain Res* 92
- Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN et al. (2001): The GABA B2 subunit is essential for G protein coupling of the GABA B receptor heterodimer. *J Neurosci* 21, 8043–8052
- Roberts E, Frankel S (1950): γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187, 55–63
- 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
- Scanziani M (2000): GABA Spillover Activates Postsynaptic GABAB Receptors to Control Rhythmic Hippocampal Activity. *Neuron* 25, 673–681
- Scheuer B: Schichtenspezifische Charakterisierung der VIPcre/tdTomato-Mauslinie. Med. Diss.Göttingen 2014
- Schubert D, Kötter R, Luhmann HJ, Staiger JF (2006): Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer va in the primary somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 16, 223–236
- Shaban H, Humeau Y, Herry C, Cassasus G, Shigemoto R, Ciochi S, Barbieri S, van der Putten H, Kaupmann K, Bettler B, Lüthi A et al. (2006): Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 9, 1028–1035
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003): Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423, 288–293
- Simons DJ (1978): Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysio* 41, 798–820
- Sloviter R, Ali-Akbarian L, Elliott RC, Bowery BJ, Bowery NG (1999): Localization of GABAB (R1) receptors in the rat hippocampus by immunocytochemistry and high resolution autoradiography, with specific reference to its localization in identified hippocampal interneuron subpopulations. *Neuropharmacology* 38, 1707–1721
- Somogyi P, Kisvárday ZF, Martin KA, Whitteridge D (1983): Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience* 10, 261–294

- Staiger JF, Freund TF, Zilles K (1997): Interneurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) are extensively innervated by parvalbumin-containing boutons in rat primary somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 9, 2259–2268
- 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, Zilles K, Freund TF (1996): Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat. *J Comp Neurol* 367, 194–204
- Stark E, Roux L, Eichler R, Senzai Y, Royer S, Buzsáki G (2014): Pyramidal Cell-Interneuron Interactions Underlie Hippocampal Ripple Oscillations. *Neuron* 83, 467–480
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G et al. (2011): A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995–1013
- Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ (2013): The Spatial and Temporal Origin of Chandelier Cells in Mouse Neocortex. *Science* 339, 70–74
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016): GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–292
- Ulrich D, Bettler B (2007): GABAB receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 17, 298–303
- Valenzuela J, Jaureguiberry-Bravo M, Salas DA, Ramírez OA, Cornejo VH, Lu HE, Blanpied TA, Couve A et al. (2014): Transport along the dendritic endoplasmic reticulum mediates the trafficking of GABA. *J Cell Sci* 127, 3382–3395
- Vigot R, Barbieri S, Bräuner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, Luján R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher M et al. (2006): Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* 50, 589–601
- Vogt KE, Nicoll RA (1999): Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1118–1122
- Walker F, Möck M, Feyerabend M, Guy J, Wagener RJ, Schubert D, Staiger JF, Witte M et al. (2016): Parvalbumin- and vasoactive intestinal polypeptide-expressing neocortical interneurons impose differential inhibition on Martinotti cells. *Nat Commun* 7, 45
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H (2004): Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561, 65–90

- Wang Y, Zhang P, Wyskiel DR (2016): Chandelier Cells in Functional and Dysfunctional Neural Circuits. *Front Neural Circuits* 10, 1–8
- Weigel A, Schild D, Zeug A (2009): Resolution in the ApoTome and the confocal laser scanning microscope: comparison. *J Biomed Opt* 16, 14022
- Wen L, Lu YS, Zhu XH, Li XM, Woo RS, Chen YJ, Yin DM, Lai C, Terry AV, Vazdarjanova A, Xiong WC et al. (2010): Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1211–1216
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH et al. (1998): Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor. *Nature* 396, 679–682
- Wilhelm S, Gröbler B, Gluch M, Heinz H (Hrsg.): Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie: Grundlagen. Auflage 03/09; Carl Zeiss Mikroskopsysteme, Jena 2003
- Woolsey T, van der Loos H (1970): The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 17, 205–242
- Wu LG, Saggau P (1997): Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20, 204–212
- Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010): Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518, 389–404
- Yang K, Ma R, Wang Q, Jiang P, Li YQ (2015): Optoactivation of parvalbumin neurons in the spinal dorsal horn evokes GABA release that is regulated by presynaptic GABAB receptors. *Neurosci Lett* 594, 55–59
- Yanovsky Y, Sergeeva OA, Freund TF, Haas HL (1997): Activation of interneurons at the stratum oriens/alveus border suppresses excitatory transmission to apical dendrites in the CA1 area of the mouse hippocampus. *Neuroscience* 77, 87–96
- Zhou X, Mansori I, Fischer T, Witte W, Staiger JF (2019): Characterizing the morphology of somatostatin-expressing interneurons and their synaptic innervation pattern in the barrel cortex of the GFP-expressing inhibitory neurons mouse. *J Comp Neurol* 528, 244–260
- Zucker RM, Price O (2001): Evaluation of confocal microscopy system performance. *Cytometry* 44, 273–294

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. Jochen Staiger bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, bei ihm im Institut wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Mein weiterer Dank gilt außerdem meinem Betreuer Herrn Dr. Mirko Witte, der mir hilfreiche Hinweise und Anregungen während dieser Zeit gegeben hat und mich in jedem Schritt der Arbeit unterstützt hat.

Darüber hinaus hat mir Herr Dr. Alvar Prönneke sehr bei technischen Fragen geholfen und mir auch inhaltlich Hilfestellungen geben können, wofür ich sehr dankbar bin.

Frau Dr. Bianca Scheuer war so freundlich, mich bei der Einarbeitung in die Software NeuroLucida zu unterstützen und mir auch praktische Tipps für die Arbeit im Institut zu geben.

Bei den technischen Assistentinnen Patricia Sprysch und Sandra Heinzl möchte ich mich auch für ihre Unterstützung im Labor bedanken. Vor allem die Einarbeitung im Labor wurde mir durch Patricia erleichtert. Ich danke ihr auch für die durchgeführten Perfusionen der Versuchstiere.

Insgesamt bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung und die Gespräche bei allen Mitarbeitern im Institut.

Lebenslauf

Geboren wurde ich 1990 in Templin. Ich erwarb die Allgemeine Hochschulreife im Juni 2010 am Strittmatter-Gymnasium Gransee. Daraufhin arbeitete ich bis September 2011 als Au Pair bei einer Familie in Minneapolis/St. Paul in Minnesota (USA) und kümmerte mich dort um deren drei Kinder. Im Anschluss daran begann ich ein Pflegepraktikum in Hamburg-Boberg.

Im April 2012 trat ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen an. Den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im April 2014. Im Frühjahr 2015 begann ich mit der Einarbeitung im Institut für Neuroanatomie und führte die ersten immunhistochemischen Versuche durch. Die Aufnahme der immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte mittels LSM sowie deren Auswertung erfolgten 2016/2017.

Während des klinischen Abschnitts meines Studiums arbeitete ich ab 2015 als Tutor im Studentischen Trainingszentrum Ärztlicher Praxis und Simulation (STÄPS). Zudem erwarb ich im Verlauf meines Studiums aufgrund dieser Arbeit und meines ehrenamtlichen Engagements ein Stipendium der Stiftung der Deutschen Wirtschaft. Famulaturen absolvierte in den Abteilungen der Inneren Medizin, in einer HNO-Praxis sowie in der HNO-Abteilung des Sinai Hospitals in Baltimore. Von Juni 2016 bis Dezember 2016 studierte ich als *freemover* an der Stellenbosch Universität (Südafrika). Hier begann ich mit der Verschriftlichung der Dissertation. Im Oktober 2017 absolvierte ich den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfungen, woraufhin ich im November mein Praktisches Jahr begann, was ich u. a. am Royal Adelaide Hospital (Australien), Fiona Stanley Hospitals in Perth (Australien) sowie in der HNO am Massachusetts Eye&Ear in Boston (USA) und dem Addenbroke's Hospital in Cambridge (England) absolvierte.

Den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich erfolgreich am 12.12.2018. Ich arbeite seit dem 01.02.2019 als Assistenzärztin in der Chirurgie in Bonn.