

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

**Schichtenspezifische Charakterisierung der *VIPcre/tdTomato*-Mauslinie
mittels neurochemischer Marker**

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

vorgelegt von

Bianca Scheuer

aus

Düsseldorf

Göttingen 2015

Dekan:

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

I. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. Jochen F. Staiger

II. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. Stefan Jakobs

III. Berichterstatter/in:

Prof. Dr. Rainer Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung:

17.08.2015

| | |
|---|------------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | III |
| TABELLENVERZEICHNIS | V |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VI |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Großhirnrinde (Cortex cerebri) | 1 |
| 1.2 Somatosensorischer Kortex (Barrel-Kortex) | 2 |
| 1.3 GABAerge Interneurone | 5 |
| 1.3.1 SOM-exprimierende Interneurone | 6 |
| 1.3.2 PV-exprimierende Interneurone | 7 |
| 1.3.3 VIP-exprimierende Interneurone | 7 |
| 1.4 <i>VIPcre/tdTomato</i>-Maus | 9 |
| 1.5 Ziele der Studie | 11 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 12 |
| 2.1 Versuchstiere | 12 |
| 2.2 Perfusion der Versuchstiere und Vorbereitung des Gewebes | 12 |
| 2.3 Immunhistochemie (IHC) | 13 |
| 2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) | 14 |
| 2.5 Quantifikation/Auswertung | 16 |
| 3 ERGEBNISSE | 22 |
| 3.1 Handelt es sich bei den tdTomato-fluoreszenten Zellen um VIP-positive Zellen? | 22 |
| 3.2 Handelt es sich bei den VIP/tdTomato-Zellen um exzitatorische oder inhibitorische Zellen? | 34 |
| 3.3 Verteilung der Zellpopulationen | 39 |
| 3.3.1 Schichtenspezifische Verteilung der VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen in der IHC | 39 |
| 3.3.2 Schichtenspezifische Verteilung aller VIP/tdTomato-, <i>Gad1</i> -, <i>Pvalb</i> - und <i>Sst</i> -Zellen in der FISH | 42 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.3 | <i>Bin size</i> -Analyse der IHC | 47 |
| 3.3.4 | <i>Bin size</i> -Analyse der FISH | 48 |
| 4 | DISKUSSION | 51 |
| 4.1 | Methodische Aspekte | 51 |
| 4.1.1 | Epifluoreszenz- und konfokale Mikroskopie | 51 |
| 4.1.2 | Manuelles Abgrenzen der Schichten und <i>Bin size</i> -Analyse | 54 |
| 4.1.3 | Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung | 55 |
| 4.1.4 | VIP-Antikörper der Firmen Abcam und ImmunoStar | 56 |
| 4.1.5 | Eingesetzte Sonden | 57 |
| 4.2 | Diskussion der Ergebnisse | 58 |
| 4.2.1 | Verteilung der PV-, SOM- und VIP-exprimierenden Interneurone | 58 |
| 4.2.2 | VIP-Zellen als inhibitorische Interneurone | 63 |
| 4.3 | Funktionelle Relevanz | 64 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 67 |
| 6 | ABSTRACT | 69 |
| 7 | ANHANG | 70 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 78 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Schichten des Barrel-Kortex 1

Abbildung 1.2: Frontalschnitt eines Mausgehirns..... 3

Abbildung 1.3: Natives tdTomato-Signal 9

Abbildung 2.1: Schichten-Analyse..... 17

Abbildung 2.2: *Bin size*-Analyse..... 20

Abbildung 3.1: IHC mittels VIP-Antikörper ImmunoStar zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex..... 23

Abbildung 3.2: Kolokalisation von VIP/tdTomato mit α VIP ImmunoStar 24

Abbildung 3.3: IHC mittels VIP-Antikörper Abcam zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex 25

Abbildung 3.4: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und α VIP Abcam 26

Abbildung 3.5: FISH zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex 27

Abbildung 3.6: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Vip*-Sonde 28

Abbildung 3.7: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Vip*-Sonde, α VIP ImmunoStar und α VIP Abcam 29

Abbildung 3.8: IHC der VIP-Antikörper ImmunoStar und Abcam, des PV- und SOM-Antikörpers..... 31

Abbildung 3.9: FISH der *Gad1*-, *Vip*-, *Pvalb*-, *Sst*- und *Vglut1*-Sonde 33

Abbildung 3.10: FISH zur Markierung der *Gad1*-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex 35

Abbildung 3.11: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Gad1*-Sonde..... 36

Abbildung 3.12: FISH zur Markierung der *Vglut1*-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex 37

Abbildung 3.13: Verteilung aller VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen in der IHC ... 42

Abbildung 3.14: Verteilung aller VIP/tdTomato-, *Pvalb*- und *Sst*-Zellen in der FISH 45

Abbildung 3.15: Verteilung aller VIP/tdTomato-Zellen innerhalb des Barrel-Kortex 46

Abbildung 3.16: Verteilung aller VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen in der IHC ... 48

Abbildung 3.17: Verteilung aller VIP/tdTomato-, *Pvalb*- und *Sst*-Zellen in der FISH 50

Abbildung 4.1: Konfokale Aufnahmen der IHC und FISH 53

Abbildung 7.1: IHC zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex 71

| | | |
|-----------------------|--|----|
| Abbildung 7.2: | FISH zur Markierung der <i>Sst</i> -positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex | 71 |
| Abbildung 7.3: | IHC zur Markierung der PV-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex | 72 |
| Abbildung 7.4: | FISH zur Markierung der <i>Pvalb</i> -positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex | 72 |
| Abbildung 7.5: | Prozentuale Verteilung von PV und SOM | 74 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tabelle 3.1: | Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato mit <i>Gad1</i> oder <i>Vglut1</i> | 38 |
| Tabelle 3.2: | Schichtenspezifische Verteilung aller kartierten VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen | 40 |
| Tabelle 3.3: | Schichtenspezifische Verteilung aller VIP/tdTomato-, <i>Gad1</i> -, <i>Pvalb</i> - und <i>Sst</i> -Zellen in der FISH | 44 |
| Tabelle 7.1: | Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato, α VIP(ImmunoStar), α VIP(Abcam) und der <i>Vip</i> -Sonde | 70 |
| Tabelle 7.2: | Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und SOM oder PV | 73 |
| Tabelle 7.3: | Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der <i>Gad1</i> -Sonde | 73 |
| Tabelle 7.4: | Verteilung aller VIP/tdTomato-, PV- und SOM-Zellen | 75 |
| Tabelle 7.5: | Ergebnisse des Student's t-Test | 76 |
| Tabelle 7.6: | Eingesetzte Sonden | 76 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

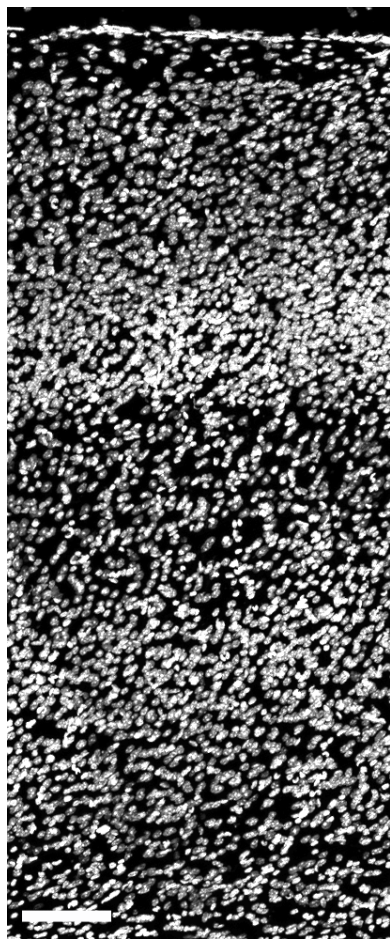
| | |
|----------------|---|
| 3V | dritter Ventrikel |
| Amy | Amygdala |
| AS | Antisense |
| BP | Basenpaare |
| CB | Calbindin |
| CCK | Cholezystokinin |
| CFLSM | konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, <i>confocal-laser-scanning-microscope</i> |
| ChAT | Cholin-Acetyltransferase |
| CR | Calretinin |
| D3V | dorsaler dritter Ventrikel |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-Phenylindol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| FA | Formamid |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| GABA | γ -Aminobuttersäure, <i>γ-aminobutyric acid</i> |
| GAD/Gad | Glutamatdecarboxylase |
| GAR | Ziege gegen Kaninchen, <i>goat anti rabbit</i> |
| HB | Hybridisierungspuffer, <i>hybridisation buffer</i> |
| HC | Hippocampus |
| IHC | Immunhistochemie |
| LV | lateraler Ventrikel |
| MGE | mediale ganglionische Eminenz |
| NGS | normales Ziegen-Serum, <i>normal goat serum</i> |
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |

| | |
|--------------------|--|
| NPY | Neuropeptid Y |
| NSS | normales Schaf-Serum, <i>normal sheep serum</i> |
| PB | Phosphatpuffer, <i>phosphate buffer</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PLP | Pyridoxalphosphat |
| PMBSF | posteromediales Barrel-Feld, <i>posteromedial barrel subfield</i> |
| POm | Nucleus posterior thalami, pars medialis |
| Pr5 | Nucleus principalis nervi trigemini |
| PV/Pvalb | Parvalbumin |
| RNA | Ribonucleinsäure, <i>ribonucleic acid</i> |
| Rt | Nucleus reticularis thalami |
| S1BF | primärer somatosensorischer Barrel-Kortex, <i>primary somatosensory barrel field</i> |
| SOM/Sst | Somatostatin |
| Sp5i | Nucleus spinalis nervi trigemini, pars interpolaris |
| SSC | Standard-Saline-Citratpuffer, <i>standard saline citratbuffer</i> |
| TB | Tris-Puffer, <i>tris buffer</i> |
| TBS | Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, <i>tris buffered saline</i> |
| TBST | Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit Triton X-100, <i>tris buffered saline with triton X-100</i> |
| VGLUT/Vglut | vesikulärer Glutamatttransporter |
| VIP/Vip | vasoaktives intestinales Polypeptid |
| VPM | Nucleus ventralis posteromedialis thalami, <i>ventral posteromedial nucleus</i> |
| wm | weiße Substanz, <i>white matter</i> |
| ZNS | Zentralnervensystem |

1 EINLEITUNG

1.1 Großhirnrinde (Cortex cerebri)

Die Großhirnrinde (Cortex cerebri) wird phylogenetisch in einen älteren und einen jüngeren Teil untergliedert. Der ältere Teil, der Allokokortex, zeigt einen drei- bis fünfschichtigen Aufbau und lässt sich in den Archikortex und den Paläokortex aufteilen. Zum Archikortex gehört der Hippocampus, der Gyrus dentatus und die Fimbria fornicis. Der Paläokortex umfasst die kortikalen Regionen des Geruchssinns (olfaktorisches System). Der jüngere Teil des Kortex, der Neokortex zeigt einen sechsschichtigen Aufbau. Ausgehend von der Pia mater lassen sich die folgenden Schichten (Laminae) unterscheiden:



I Lamina I: Molekularschicht (Lamina molecularis)

Lamina II: Äußere Körnerzellschicht (Lamina granularis externa)

II/III

Lamina III: Äußere Pyramidenzellschicht (Lamina pyramidalis externa)

IV Lamina IV: Innere Körnerzellschicht (Lamina granularis interna)

V Lamina V: Innere Pyramidenzellschicht (Lamina pyramidalis interna)

VI Lamina VI: Multiforme Zellschicht (Lamina multiformis)

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

Abbildung 1.1: Schichten des Barrel-Kortex

Epifluoreszenzaufnahme eines 40 µm dicken Frontalschnittes im Bereich des Barrel-Kortex einer Maus mit Darstellung der neokortikalen Schichten (Laminae) in der Zellkernfärbung mit DAPI; die einzelnen Schichten sind mit römischen Buchstaben gekennzeichnet, die Namen der neokortikalen Schichten sind in Deutsch und in Latein angegeben; Maßstab: 100 µm

Die Ausdehnung der einzelnen Schichten hängt von der Spezies und von der Gehirnregion ab. Im somatosensorischen Kortex der Maus gestaltet sich die Ausdehnung folgendermaßen: Schicht I macht 5,7% der gesamten Kortexdicke, Schicht II/III 19,4%, Schicht IV 17,2%, Schicht V 20,5% und Schicht VI 37,3% aus (DeFelipe et al. 2002). Die kortikalen Schichten weisen unterschiedliche Verteilungsmuster verschiedener Zellgruppen auf.

Bei Schicht I handelt es sich um die Schicht mit der geringsten Zelldichte. Die Schichten II und III zeigen im somatosensorischen Kortex der Maus keine klare Grenze und werden somit zu einer Schicht II/III zusammengefasst, die gleichmäßig verteilte Körner- und Pyramidenzellen enthält. In Schicht IV befinden sich dicht gepackte kleine Körnerzellen, und die Zelldichte ist hier am höchsten. Schicht V des somatosensorischen Kortex enthält locker angeordnete Pyramidenzellen von großer und mittlerer Größe. In Schicht VI ist das Verteilungsmuster der Zellen eher gleichmäßig und die Zellgröße als klein zu beschreiben (Ren et al. 1992).

1.2 Somatosensorischer Kortex (Barrel-Kortex)

Der somatosensorische Kortex ist Teil des Neokortex. Er ist für die zentrale Verarbeitung der haptischen Wahrnehmung zuständig. Zu den im somatosensorischen Kortex verarbeiteten Sinneswahrnehmungen gehören Berührung, Vibration, Druck, Temperatur und Schmerz. Die Informationen über umweltbedingte Reize werden über das periphere Nervensystem zum Hirnstamm und von dort zum Thalamus weitergeleitet. Der Thalamus projiziert mit seinen Fasern bevorzugt in die Schicht IV des somatosensorischen Kortex (Simons 1978; Staiger et al. 1996a; Petersen 2007; Feldmeyer 2012). Anfang der 70er Jahre wurde von Thomas Woolsey und Hendrik Van der Loos ein besonderer Teil des somatosensorischen Kortex in Mäusen entdeckt. Auffällig war hier die Strukturierung der Schicht IV. Die Zellanordnung erinnerte an Fässer (engl. *barrel*), weswegen dieser Teil des somatosensorischen Kortex den Namen Barrel-Kortex erhielt. Er zeigt, wie der übrige Neokortex, einen sechsschichtigen Aufbau und hat bei Mäusen eine Fläche von ca. 2,52 mm² (Abb. 1.2).

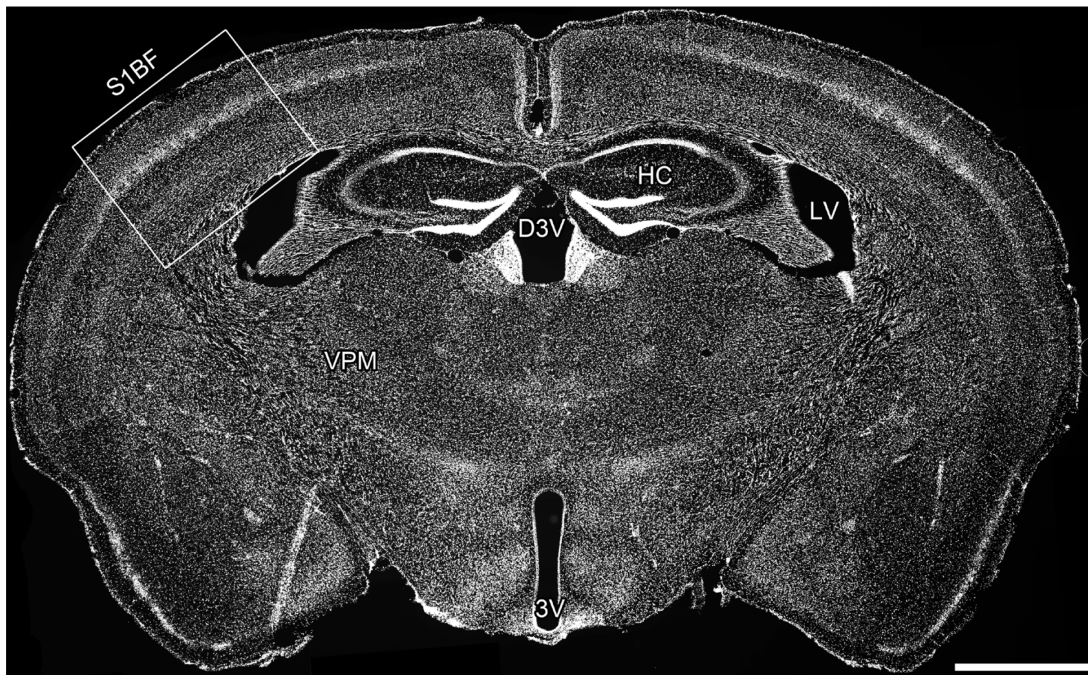


Abbildung 1.2: Frontalschnitt eines Mausgehirns

Epifluoreszenzaufnahme eines frontal geschnittenen Mausgehirns im Bereich des primären somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex = S1BF) in der Zellkernfärbung mit DAPI. Als weitere Strukturen erkennt man den Nucleus ventralis posteromedialis (VPM), den Hippocampus (HC), den lateralen Ventrikel (LV), den dritten Ventrikel (3V) und den dorsalen dritten Ventrikel (D3V). Das Rechteck verdeutlicht die Lage des S1BF; Maßstab: 1000 μm

Ein Barrel besteht aus einem zellreichen Bereich, der von Woolsey und Van der Loos als Rand (engl. *side*) bezeichnet wurde. Dieser Bereich umgibt einen weniger zellreichen Bereich, den sogenannten Hohlraum (engl. *hollow*). Der zellarme Bereich zwischen den Barrels wird als Septum bezeichnet. In manchen Präparaten ist es nicht möglich, ein Septum zwischen den Barrels zu erkennen, dann erscheint es, als würden die *Sides* zweier Barrels aneinander liegen. Diese Struktur wird Wand (engl. *wall*) genannt.

Die medio-laterale Ausdehnung eines Barrels schwankt von 100-380 μm , die rostro-caudale von 50-170 μm . Daran erkennt man, dass es sowohl große als auch kleine Barrels gibt. Nur die Höhe der Barrels ist mit ca. 100 μm konstant. Eine *Side* hat eine Dicke von durchschnittlich 5 μm und entspricht damit etwa einer Zellschicht. Für den Durchmesser des *Hollows* bedeutet das, dass er ungefähr 10 μm schmaler ist als der des gesamten Barrels.

Die großen Barrels sind bei Mäusen posterior medial (*posterior medial barrel subfield*, PMBSF), die kleinen anterior lateral lokalisiert. Die Barrels sind in fünf Reihen angeordnet, die mit A-E bezeichnet werden. Die Reihen A und B enthalten nur vier Barrels, die anderen 8-10 im PMBSF. Die Anzahl der Barrels pro Hemisphäre schwankt zwischen 170-210 im gesamten Barrel-Kortex und zwischen 34-40 im PMBSF.

Das Muster der Barrels spiegelt exakt die Anordnung der Schnurrhaare wider. So befinden sich auf einer Seite der Schnauze 170-210 Schnurrhaare, die mit der Anzahl der Barrels der kontralateralen Hemisphäre korrespondieren. Daraus folgt, dass jedes Schnurrhaar ein korrelierendes Barrel hat und dass die topographische Position des Schnurrhaares mit der Position des entsprechenden Barrels übereinstimmt (Woolsey und Van der Loos 1970).

1.3 GABAerge Interneurone

Man unterscheidet bei den Neuronen des Neokortex zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Zellen. Etwa 70-80% aller Neurone des Neokortex sind exzitatorisch und nur etwa 20-30% inhibitorisch (Markram et al. 2004). In einem Barrel sieht die Verteilung ähnlich aus. Jedes Barrel enthält ca. 2000 Neurone (Pasternak und Woolsey 1975), wovon 75% exzitatorisch und 25% inhibitorisch sind (Ren et al. 1992).

Zu den exzitatorischen Zellen zählen die Pyramidenzellen, die Sternpyramidenzellen und die bedornten Sternzellen (Staiger et al. 2004a). Der Neurotransmitter der exzitatorischen Zellen ist Glutamat (Krnjevic und Phillis 1963; Conti et al. 1987; Dori et al. 1992). Glutamat wird mit Hilfe von Glutamattransportern in Vesikel verpackt und einem Protonengradienten folgend in den synaptischen Spalt sezerniert. Drei vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) sind bekannt, von denen vermutet wird, dass sie beim Verpacken und Freisetzen von Glutamat unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen.

VGLUT1 kommt vor allem in der Großhirnrinde, der Kleinhirnrinde und im Hippocampus vor. Eine Ausnahme stellt Schicht IV der Großhirnrinde dar, in der auch VGLUT2 zu finden ist. Außerdem kommt VGLUT2 im Hirnstamm und in Kernen des Kleinhirns vor. Im Thalamus kommen sowohl VGLUT1 und VGLUT2 vor, wobei VGLUT2 überwiegt.

Der dritte vesikuläre Glutamattransporter lässt sich in 70% der 5-HT-positiven Neurone und in Astrozyten nachweisen. VGLUT3 ist auch außerhalb des Gehirns in Leber und Nieren zu finden. Es gibt bei den vesikulären Glutamattransportern keine Kollokalisierungen (Fremeau et al. 2004).

Neben Glutamat ist γ -Aminobuttersäure (engl. *gamma-aminobutyric acid* = GABA) ein wichtiger Neurotransmitter im Kortex. Die Umwandlung von Glutamat in GABA wird von der Glutamatdecarboxylase (GAD) katalysiert. Man unterscheidet zwei verschiedene Isoformen der Glutamatdecarboxylase, die mit 65 kDa kleinere GAD2 und die größere GAD1 mit 67 kDa. Beide Isoformen katalysieren die Decarboxylierung von Glutamat zu γ -Aminobuttersäure und CO_2 . Für die Decarboxylierung ist Pyridoxalphosphat (PLP) ein wichtiger Cofaktor. Ohne ihr Coenzym liegt die Glutamatdecarboxylase als Apoenzym vor und ist inaktiv (Erlander et al. 1991; Erlander und Tobin 1991). Wie in Studien am Rattengehirn gezeigt werden konnte, liegen 50% der GAD als Apoenzym vor. Dabei handelt es sich vor allem um GAD2. GAD1 tritt hingegen meist in der aktiven Form mit PLP gekoppelt auf (Erlander et al. 1991).

GABA wird im Neokortex ausschließlich von inhibitorischen Interneuronen freigesetzt (Kubota et al. 1994) und ist eine nicht-proteinogene Aminosäure. Sie ist das Amin der Glutaminsäure (Tillakaratne et al. 1995).

Die GABAergen Interneurone des Neokortex lassen sich neurochemisch in drei distinkte Klassen unterteilen, die Parvalbumin (PV)-exprimierenden, die Somatostatin (SOM)-exprimierenden und die ionotropen Serotonin-Rezeptor 5HT3a-exprimierenden Interneurone. Die 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Interneurone, die 30% der GABAergen Interneurone ausmachen, sind eine sehr heterogene Gruppe und bestehen zu 40% aus vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)-exprimierenden Interneuronen. Bei den zwei weiteren Klassen von GABAergen Interneuronen machen PV-exprimierende 40% und SOM-exprimierende 30% aus (Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011).

1.3.1 SOM-exprimierende Interneurone

Somatostatin besteht aus 14 Aminosäuren, die zyklisch angeordnet sind. Es hat endokrine und neuronale Funktionen. Während der Embryogenese entstehen die SOM-exprimierenden Interneurone in der medialen ganglionären Eminenz (MGE) und wandern von dort in den Kortex ein (Fogarty et al. 2007).

Die Interneurone, die SOM-exprimieren, können in Untergruppen unterteilt werden. Man unterscheidet zwischen Martinotti-Zellen und noch nicht gut charakterisierten Nicht-Martinotti-Zellen (Ma et al. 2006).

SOM-exprimierende Interneurone sind im Neokortex mit GABA kolokalisiert (Kubota et al. 1994). Außerdem können sie mit Neuropeptid Y (NPY) (Kubota et al. 1994; Cauli et al. 1997; Xu et al. 2010), Calretinin (CR) (Xu et al. 2010), Calbindin (CB) und Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) kolokalisiert sein, aber nicht mit PV (Kubota et al. 1994) oder VIP (Xu et al. 2010).

Morphologisch lassen sich die SOM-exprimierenden Zellen folgendermaßen unterteilen: große Korbzellen (engl. *large basket cells*), Martinotti-Zellen oder doppelt gebüschelte Zellen (engl. *bitufted cells*) (Markram et al. 2004).

Elektrophysiologisch zeigen SOM-exprimierende Interneurone ein kontinuierlich adaptierendes Feuermuster (engl. *continous adapting*) (Halabisky et al. 2006; Ma et al. 2006).

SOM-exprimierende Interneurone inhibieren sich niemals gegenseitig. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie sowohl VIP- als auch PV-exprimierende Interneurone hemmen (Pfeffer et al. 2013).

1.3.2 PV-exprimierende Interneurone

Parvalbumin ist ein Calcium bindendes Protein, welches zur Troponin C-Familie gehört und 1965 erstmals im Skelettmuskel von Kaninchen nachgewiesen wurde. Es besteht aus 109 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 11,7 kDa (Briggs und Fleishman 1965).

PV-exprimierende Zellen entstehen wie die SOM-exprimierenden Zellen während der Embryogenese in der medialen ganglionären Eminenz (MGE) (Fogarty et al. 2007).

PV-exprimierende Interneurone sind im Neokortex mit GABA kolokalisiert (Kubota et al. 1994). Außerdem wurden Kolokalisationen mit Calbindin (D28k) beschrieben (Kubota et al. 1994; Cauli et al. 1997). PV-exprimierende Zellen zeigen keine Immunoreaktivität für Neuropeptide, CR oder NOS (Kubota et al. 1994; Xu et al. 2010).

Morphologisch können sie in Korbzellen (engl. *basket cells*) oder Chandelierzellen (engl. *chandelier cells*) unterteilt werden (Markram et al. 2004).

PV-exprimierende Zellen gehören zu den schnell feuernenden (engl. *fast spiking*) Interneuronen (Cauli et al. 1997).

PV-exprimierende Interneurone inhibieren sich gegenseitig, vermeiden es allerdings, andere Interneuronpopulationen zu hemmen (Pfeffer et al. 2013).

1.3.3 VIP-exprimierende Interneurone

Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) besteht aus 28 Aminosäuren und gehört zur Glucagon- und Sekretin-Familie (Mutt und Said 1974). Es ist mitverantwortlich für die systemische Vasodilatation, Hypotonie und Hypotension. VIP steigert die Auswurfleistung des Herzens und stimuliert respiratorische Chemorezeptoren. Es spielt ebenfalls bei der Hyperglykämie eine Rolle. VIP kommt sowohl im Gastrointestinaltrakt (Said und Mutt 1970) als auch im Zentralnervensystem (ZNS) vor (Bryant et al. 1976). Im Gehirn lassen sich die höchsten Konzentrationen im Kortex und im limbischen System finden (> 60 pmol/g Nassgewicht). In Basalganglien, im Thalamus, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark lassen sich nur niedrige VIP-Konzentrationen nachweisen (< 15 pmol/g Nassgewicht) (Loren et al. 1979). VIP lässt sich ebenfalls in Nervenendigungen (Synaptosomen) finden (Giachetti et al. 1977). Es lassen sich drei Rezeptor-Subtypen für VIP unterscheiden (Martin et al. 1992). VIP hat einen metabolischen Effekt auf die Aktivität von Astrozyten (Magistretti et al. 1998) und dilatiert Blutgefäße (Said und Mutt 1970).

Die VIP-exprimierenden Neurone des Kortex entstehen während der Embryogenese in der kaudalen ganglionären Eminenz (Miyoshi et al. 2010). Die VIP-Expression beginnt bereits während der Neonatalperiode. Zum Zeitpunkt P0 wandern die VIP-Neurone in die weiße Substanz und beginnen in die kortikale Platte einzutreten. Zum Zeitpunkt P2 haben die meisten VIP-Neurone den Kortex erreicht und wandern in Richtung Pia mater. Zu diesem Zeitpunkt verteilen sich die VIP-Neurone größtenteils innerhalb des Kortex und erreichen ihre endgültige laminäre Position (Taniguchi et al. 2011).

Im Neocortex ist VIP mit GABA kolokalisiert (Kubota et al. 1994; Bayraktar et al. 1997). VIP kann mit Cholezystokinin (CCK) (Markram et al. 2004), NPY (Xu et al. 2010) oder CR kolokalisiert sein (Kubota et al. 1994; Cauli et al. 1997; Xu et al. 2010), aber nicht mit PV oder SOM (Xu et al. 2010).

Es wird vermutet, dass VIP-positive Zellen die cholinerge Acetyltransferase (ChAT) exprimieren (Bayraktar et al. 1997). Es wurde mRNA der ChAT in Subpopulationen von VIP-exprimierenden Zellen nachgewiesen. Beachtenswert ist dabei der Aspekt, dass das Enzym ChAT an der Synthese von Acetylcholin beteiligt ist, welches als exzitatorisch gilt (Cauli et al. 1997).

Morphologisch lassen sich in der Ratte bei den VIP-exprimierenden Interneuronen folgende Typen unterscheiden: kleine Korbzellen (engl. *small basket cells*), bipolare Zellen (engl. *bipolar cells*), Doppelbouquetzellen (engl. *double bouquet cells*) oder doppelt gebüschelte Zellen (engl. *bitufted cells*) (Bayraktar et al. 2000; Markram et al. 2004).

VIP-positive Zellen zeigen ein unregelmäßiges Feuermuster (engl. *irregular spiking*) (Cauli et al. 1997), einen hohen Eingangswiderstand und schmale Aktionspotentiale (Porter et al. 1998; Karagiannis et al. 2009).

VIP-exprimierende Zellen werden von Pyramidenzellen (Porter et al. 1998) erregt. Sie inhibieren wiederum Somatostatin-positive Zellen (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013) und projizieren auf PV-exprimierende Interneurone (David et al. 2007; Hioki et al. 2013). Moduliert werden VIP-exprimierende Interneurone unter anderem durch Acetylcholin (Porter et al. 1999) und Serotonin (Ferezou et al. 2002).

1.4 *VIPcre/tdTomato*-Maus

Die molekuläre Diversität der GABAergen Interneuronen erlaubte die Generierung von transgenen Mauslinien.

Bei der für diese Studie verwendeten *VIPcre/tdTomato*-Maus sind VIP-exprimierende Neurone durch die Verpaarung der *VIP-ires-Cre*-Maus (Taniguchi et al. 2011) mit der Reportermaus *Ai9: loxP-STOP-loxP-tdTomato* (Madisen et al. 2010) mit fluoreszierenden Proteinen markiert (Abb. 1.3).

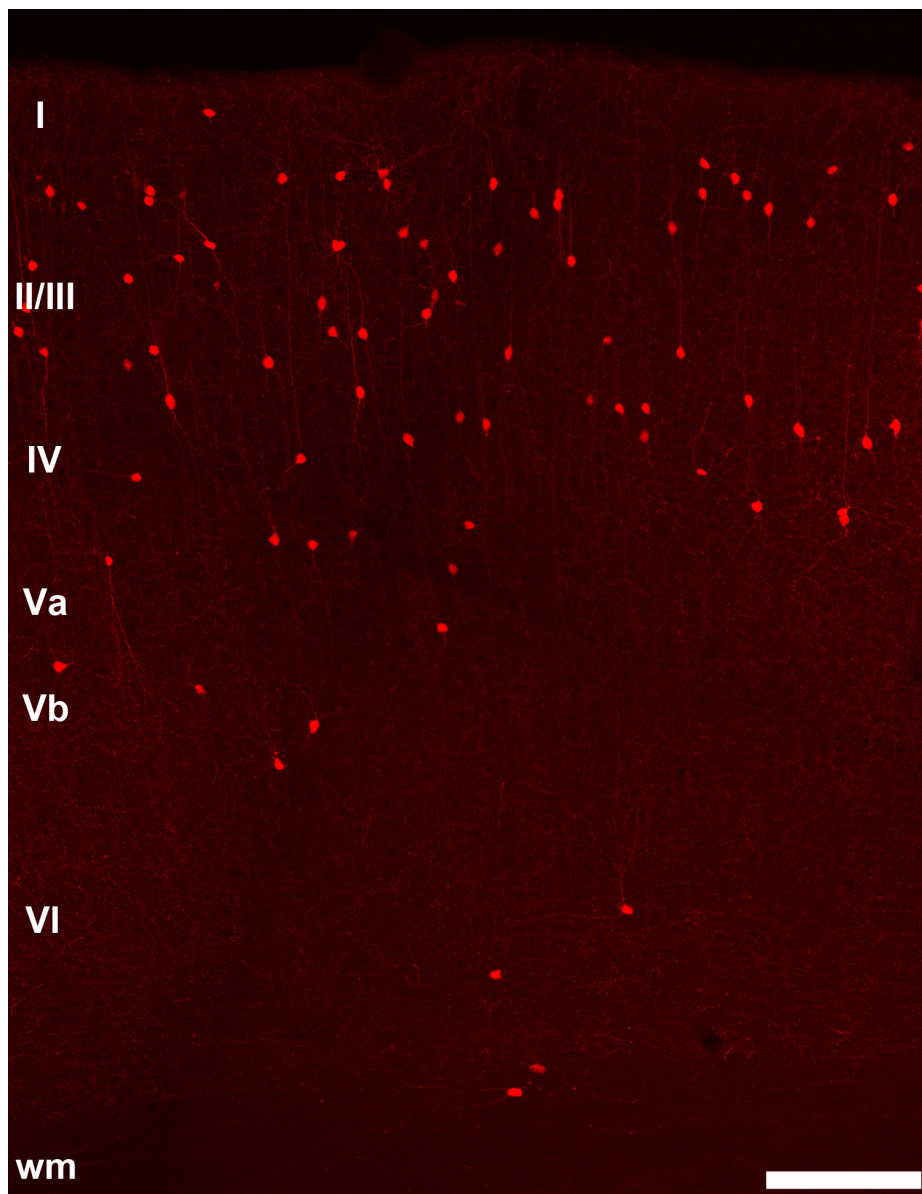


Abbildung 1.3: Natives tdTomato-Signal

Konfokale Aufnahme eines 40 µm dicken Frontalschnittes eines Mausgehirns im Bereich des Barrel-Kortex mit der nativen tdTomato-Fluoreszenz (rot). Der Ausschnitt erstreckt sich von der Pia mater bis zur weißen Substanz (wm). Die neokortikalen Schichten sind als römische Buchstaben angegeben; Maßstab: 150 µm

Die *VIPcre/tdTomato*-Maus ist ein transgenes Tier, welches mit Hilfe des Cre/loxP-Systems generiert wurde.

Beim Cre/loxP-System handelt es sich um ein in den 80er Jahren von Dr. Brian Sauer entwickeltes Rekombinationssystem. Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym der Integrase-Familie und stammt aus dem Bakteriophagen P1. Sie hat ein Gewicht von 38 kDa. Die Funktion der Rekombinase ist das Herausschneiden von DNA zwischen zwei loxP-Stellen (Hamilton und Abremski 1984; Sauer und Henderson 1988). Unter einer loxP-Stelle versteht man eine 34 Basenpaare (BP) lange DNA-Sequenz.

ATAACTTCGTATA NNNT**ANNN TATACGAAGTTAT**

13BP 8BP 13BP

In der Mitte dieser Sequenz befindet sich eine variable Anordnung von 8 Basenpaaren, wobei die mittleren 2 Basenpaare immer identisch sind. Flankiert werden die 8 Basenpaare von zwei palindromischen Sequenzen mit je 13 Basenpaaren (Hoess et al. 1982). Je nach Orientierung der loxP-Stellen ergeben sich unterschiedliche Funktionen für die Cre-Rekombinase. Befinden sich die loxP-Stellen in Cis-Orientierung führt die Cre-Rekombinase eine Exzision oder Inversion der betreffenden DNA-Sequenz durch. Für eine Insertion oder Translokation der DNA müssen die loxP-Stellen in Trans-Orientierung ausgerichtet sein (Nagy 2000).

Das Cre/loxP-System funktioniert hervorragend in Mäusen und kann daher für die Erzeugung transgener Mauslinien eingesetzt werden (Lakso et al. 1992; Orban et al. 1992).

1.5 Ziele der Studie

20-30% der Neurone des Neokortex sind inhibitorische, GABA freisetzende Interneurone, die aufgrund ihrer morphologischen, elektrophysiologischen und molekularen Merkmale voneinander unterschieden werden können: Mehr als zwei Drittel dieser Interneurone exprimieren entweder Parvalbumin, Somatostatin oder vasoaktives intestinales Polypeptid. Diese spezifischen molekularen Marker werden genutzt, um Interneuronpopulationen zu unterscheiden.

Für die folgende Studie wurde die transgene *VIPcre/tdTomato*-Maus verwendet, die mit Hilfe der Cre/loxP-Technik generiert wurde. In dieser Maus sind VIP-exprimierende Zellen mit dem fluoreszierenden Protein tdTomato markiert.

Die VIP-exprimierenden Neurone sollen im primären somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex) mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung charakterisiert werden. Dafür werden die Proteine vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), Somatostatin (SOM), Parvalbumin (PV), Glutamatdecarboxylase (GAD mit 67 kDa) und der vesikuläre Glutamattransporter 1 (VGLUT1) als zu identifizierende zelluläre Bestandteile genutzt.

Ziel ist es, Aussagen über die Zelldichte und Zellverteilung in den Schichten I-VI treffen zu können, um eine schichtenspezifische Charakterisierung GABAerger Interneurone in der *VIPcre/tdTomato*-Maus durchzuführen.

Außerdem sollen mögliche Kolokalisationen zwischen VIP- und SOM- und VIP- und PV-exprimierenden Interneuronen aufgezeigt werden. Durch den Einsatz von GAD1 und VGLUT1 lassen sich Rückschlüsse auf die exzitatorischen bzw. inhibitorischen Eigenschaften von VIP-exprimierenden Interneuronen ziehen.

Des Weiteren soll eine Aussage über die Spezifität und Sensitivität der markierten Interneurone in der *VIPcre/tdTomato*-Maus getroffen werden.

Dazu werden Hirnschnitte im Bereich des Barrel-Kortex angefertigt, durch Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gefärbt, mit Hilfe von verschiedenen mikroskopischen Techniken digitalisiert und quantitativ und statistisch ausgewertet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Untersuchungen (Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) wurden zwölf adulte männliche *VIPcre/tdTomato*-Mäuse mit einem Gewicht von 20-30 g verwendet. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Alle durchgeführten Experimente erfolgten unter strenger Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (Stand 2010).

2.2 Perfusion der Versuchstiere und Vorbereitung des Gewebes

Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (0,1 ml pro 10 g Körpergewicht) narkotisiert. Das Ausbleiben von Reflexen wurde überprüft. Nach der Eröffnung des Thorax und der Darstellung des Herzens erfolgte eine transkardiale Perfusion über den linken Ventrikel in die Aorta. Dazu wurde eine stumpfe Kanüle in Herzachse in den linken Ventrikel eingebracht, Richtung Aorta vorgeschoben und mit einer Arterienklemme in ihrer Position fixiert. Zur Umgehung des Lungenkreislaufes wurde das rechte Atrium eröffnet. Das Blut wurde mit 20 ml 10%iger Sucroslösung (in Aqua dest.) aus dem Gefäßsystem gespült. Die Fixierung erfolgte mit 250 ml 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4). Nach der Perfusion wurden die Gehirne aus dem Schädel präpariert und zwei Stunden lang bei 4°C mit PFA postfixiert.

Die Gehirne für die Immunhistochemie wurden nach der Postfixation zweimal für jeweils fünfzehn Minuten in PB (0,1 M, pH 7,4) gewaschen und anschließend bis zum Schneidevorgang in PB (0,1 M, pH 7,4) bei 4°C gelagert.

Die Gehirne für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden nach der Postfixation in die Kryoprotektionslösung (20%ige Sucroslösung in 0,1 M PB mit 0,9% NaCl; PBS, pH 7,4) überführt und darin bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Gehirne in Isopentan (C₅H₁₂) bei -40°C für zehn Sekunden schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3 Immunhistochemie (IHC)

Mit einem Vibratom (VT 1200S der Firma Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 40 µm dicke Frontalschnitte im Bereich des Barrel-Kortex angefertigt, in PB (0,1 M, pH 7,4) gesammelt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Vor Beginn der Färbung wurden die Gehirnschnitte folgendermaßen behandelt: 2x15 Minuten in 0,05 M Tris-Puffer (TB, pH 7,6), 2x15 Minuten in 0,05 M Tris-gepufferter Saline-Lösung (TBS, pH 7,6) und 2x15 Minuten in TBS mit 0,5% Triton X-100 (TBST, pH 7,6). Um die Bindung unspezifischer Antigene zu verhindern, wurden die Schnitte mit 0,25% Rinderserumalbumin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) + 10% normalem Ziegen-Serum (Normal Goat Serum, NGS der Firma Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) in TBST (0,05 M, pH 7,6) für 90 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur blockiert. Die primären Antikörper wurden mit der Blockierlösung wie folgt verdünnt: rb- α -VIP 43841 (Abcam, Cambridge, England) 1:1000, rb- α -VIP ImmunoStar 722001/20077 (ImmunoStar, Dietzenbach, Deutschland) 1:2000, rb- α -PV 25 (Swant, Marly, Schweiz) 1:5000 und rb- α -SOM T-4103 (Bachem, Bubendorf, Schweiz) 1:5000. Es wurden drei Gehirnschnitte pro primärem Antikörper für 48 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit TBST (0,05 M, pH 7,6) für 1x5 Minuten und 4x15 Minuten gewaschen. Die Inkubation der Schnitte mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti Rabbit, Verdünnung 1:500, GAR, Alexa 488 der Firma Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) erfolgte für vier Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in TBST (0,05 M, pH 7,6). Danach wurden die Gehirnschnitte 1x5 Minuten und 2x15 Minuten in TBST (0,05 M, pH 7,6) und 1x15 Minuten in TBS (0,05 M, pH 7,6) gewaschen. Das Anfärben der Zellkerne erfolgte durch 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:1000 in TBS (0,05 M, pH 7,6) für fünf Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte 1x15 Minuten in TBS (0,05 M, pH 7,6) und 2x15 Minuten in TB (0,05 M, pH 7,6) gewaschen und über Nacht in TB (0,05 M, pH 7,6) bei 4°C auf einem Schüttler gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Aqua-Poly/Mount (Polyscience, Warrington, Pennsylvania, USA) und Deckgläsern eingedeckt.

2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde mit RNase freien Materialien gearbeitet. Die RNase-Freiheit wurde durch vierstündiges Erhitzen der Materialien auf 180°C erreicht. Lösungen wurden mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC, C₆H₁₀O₅) behandelt und am nächsten Tag für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Einwegartikel wurden RNase frei erworben.

Die bei -80°C gelagerten perfundierten Maushirne wurden mittels Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) einzeln eingebettet und anschließend konnten 40 µm dicke Hirnschnitte in frontaler Orientierung im Bereich des Barrel-Kortex mit einem Mikrotom-Kryostat (Cryo-Star HM 560 MV der Firma Microm, Walldorf, Deutschland) bei -20°C angefertigt werden. Die Schnitte wurden in 0,1 M PBS (pH 7,4) gesammelt und 15 Minuten in PBS (0,1 M, pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte eine 1. Vorbehandlung bei Raumtemperatur mit 1%igem H₂O₂ in Methanol für 20 Minuten (Peroxidase Blockierung), ein Quenching mit 0,2 M HCl für 8 Minuten und ein Andauen des Gewebes mit Proteinase K (20 µg/ml, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) für 10 Minuten. Zwischen den Vorbehandlungsschritten wurden die Hirnschnitte jeweils für 2x2 Minuten mit PBS (0,1 M, pH 7,4) gewaschen und abschließend erneut für 20 Minuten in 4%igem PFA in 0,1 M PB (pH 7,4) bei 0°C fixiert. Danach folgte eine 2. Vorbehandlung mit Triethanolamin-Gebrauchslösung (1,5% Triethanolamin in H₂O, pH 8,0) und Essigsäureanhydrid (6 µl auf 1250 µl) für 10 Minuten auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte für 3x15 Minuten mit PBS (0,1 M pH 7,4) und für 15 Minuten in 2x Standard-Saline-Citratpuffer (1xSSC = 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,1) gewaschen. Zur Vorbereitung des Hybridisierungsprozesses wurden die Hirnschnitte in 2xSSC + Hybridisierungspuffer (HB = 50% deionisiertes Formamid, 4xSSC, 5% Dextransulfat, 25 mg/ml DNA, MB-grade aus Fischsperma, 4 mg/ml Hefe t-RNA und 1% Denhardts-Reagenz) mit einem Mischungsverhältnis von 1:1 für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde bei 55°C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Für den Hybridisierungsprozess wurden die unten aufgeführten Sonden (0,5 µl Sonde pro 0,5 ml HB) in Hybridisierungspuffer angesetzt und für 2 Minuten bei 90°C in einem Hitzeblock erwärmt, um eventuelle intramolekulare Faltungen der einzelsträngigen RNA zu lösen. Die Hybridisierung wurde anschließend bei 55°C über Nacht durchgeführt. Es kamen folgende Sonden zur Anwendung:

Glutamatdecarboxylase 1 (Gad1 AS hergestellt am 12.07.12), *Somatostatin (Sst AS* hergestellt am 30.03.12), *Parvalbumin (Pvalb AS* hergestellt 10/12), *vasoaktives intestinales Polypeptid (Vip AS* hergestellt am 21.06.12) und *vesikulärer Glutamattransporter 1 (Vglut1 AS* hergestellt am 05.03.12) (Tab. 7.6).

Alle Sonden hatten eine Ausgangskonzentration von 200 ng/µl DEPC und wurden von Dr. Robin Wagener zur Verfügung gestellt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mehrmals gewaschen: 2x15 Minuten in 2xSSC bei Raumtemperatur, 2x30 Minuten in 2xSSC / 50% Formamid (FA) bei 65°C und 2x5 Minuten in 2xSSC bei 65°C. Um nicht gebundene Reste der eingesetzten Sonden komplett zu beseitigen erfolgte eine Behandlung mit RNase A (4 mg/ml, Marcherey-Nagel, Düren, Deutschland) in 2xSSC für 35 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden folgende Waschschrte durchgeführt: 5 Minuten in 2xSSC bei Raumtemperatur, 30 Minuten in 2xSSC / 50% FA bei Raumtemperatur, 30 Minuten in 2xSSC / 50% FA bei 65°C, 15 Minuten in 0,1xSSC / 50% FA bei 65°C, 2x15 Minuten in 0,1xSSC bei 65°C und 2x10 Minuten in TBS (0,05 M, pH 7,5) bei Raumtemperatur. Es folgte das Blockieren mit 4% normalem Schaf-Serum (Normal Sheep Serum NSS der Firma Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) in TBS (0,05 M, pH 7,5) für eine Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte 3x2 Minuten in TBS (0,05 M, pH 7,5) gewaschen und danach in 0,5%iges Blockier-Reagenz (aus dem TSA Biotin System NEL 700) für eine Stunde bei Raumtemperatur gegeben. Zur Detektion der hybridisierten Sonden wurden die Schnitte in Anti-Digoxigenin-POD 1:2000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in 0,5%igem Blockier-Reagenz über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 3x5 und 1x15 Minuten in TBS (0,05 M, pH 7,5) gewaschen. Zur Verstärkung der Detektion erfolgte eine Biotinylierung der Schnitte mit dem TSA Biotin System NEL700 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) für 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Schnitte für 3x5 und 1x15 Minuten mit TBS (0,05 M, pH 7,5) wurden die Schnitte mit Streptavidin Alexa 488 1:400 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in TBS (0,05 M, pH 7,5) für 15 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss der Prozedur wurden die Schnitte für 3x5 und 2x15 Minuten in TBS (0,05 M, pH 7,5) gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine immunhistochemische Färbung (Protokoll analog zu Abschnitt 2.3), jedoch ohne den Einsatz von Triton X-100. Dieser Schritt war nötig um bei allen Schnitten das native VIP/tdTomato-Signal zu amplifizieren. Es wurden der polyklonalen Primärantikörper DsRed 1:250 (632496 der Firma Clontech Laboratories, Mountainview, Californien, USA) und der sekundäre Antikörper (Goat Anti Rabbit, 1:500, GAR, Alexa 546 der Firma Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.5 Quantifikation/Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Hirnschnitte erfolgte mit einem Software-gekoppelten Mikroskop (AxioImager.M2, Zeiss, Jena, Deutschland) und dem Programm Neurolucida (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA). Es wurden pro Gehirn und Färbung Übersichtsaufnahmen von je 2 Gehirnschnitten mit 10facher Vergrößerung in einer Ebene angefertigt. Für die quantitative Analyse wurden unter Zuhilfenahme des ApoTomes (Zeiss, Jena, Deutschland) dreidimensionale Aufnahmen im Bereich des Barrel-Kortex mit 25facher Vergrößerung durchgeführt. Dazu wurde ein Bereich des Barrel-Kortex von der Pia mater bis zur weißen Substanz ausgewählt und Aufnahmen in Focusebenen mit einem Mikrometer Abstand (z-Ebene) angefertigt.

Nach Beendigung der Scans wurden die Bildstapel mit dem Programm Neurolucida analysiert. Der zu analysierende Bereich wurde durch eine Kontur festgelegt. Lag ein Zellsoma genau auf der Kontur ging die entsprechende Zelle nur in die Analyse ein, wenn mehr als 50% des Somas innerhalb der Kontur lag. Innerhalb dieses Bereichs erfolgte das Markieren der entsprechenden Zellen per Hand, ebenso die Unterteilung der einzelnen Schichten (Abb. 2.1).

Die Differenzierung der kortikalen Schichten konnte aufgrund der Zelldichte in der DAPI-Zellkernfärbung wie folgt vorgenommen werden:

Schicht I stellte eine zellarme Schicht dar und ließ sich deutlich von der Pia mater und der zellreichen Schicht II/III abgrenzen. In Schicht IV ließ sich deutlich die Barrelstruktur erkennen, wodurch auch diese Schicht eindeutig von der darüber- bzw. darunterliegenden Schicht abgegrenzt werden konnte.

Durch die Abgrenzung von Schicht I und IV war automatisch die Ausdehnung der Schicht II/III festgelegt, wobei keine Differenzierung zwischen Schicht II und Schicht III möglich war.

Schicht V stellte einen Bereich mit einer geringeren Zelldichte dar, wohingegen in Schicht VI die Zelldichte wieder deutlich zunahm, sodass eine Abgrenzung zwischen den beiden Schichten möglich war. Um Schicht V weiter zu differenzieren in Schicht Va und Vb, bediente man sich zweier Regeln. Zum einen ist bekannt, dass die Schicht Va etwa ein Drittel der gesamten Schicht V ausmacht, zum anderen ist die Zelldichte in Schicht Va geringer als in Schicht Vb (Schubert et al. 2006).

Das anschließende schichtenspezifische Auszählen erfolgte mit der Neurolucida Software bzw. Neuroexplorer (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA).

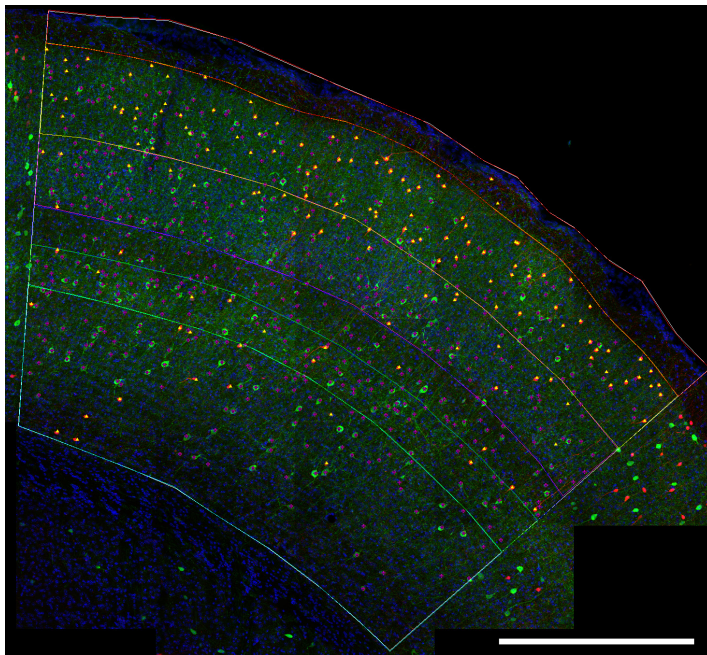


Abbildung 2.1: Schichten-Analyse

Immunhistochemie des PV-Antikörpers an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die α PV-positiven Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. Innerhalb des ausgewählten Bereichs sind die VIP/tdTomato- und α PV-positiven Zellen mit entsprechenden Markern versehen. Die neokortikalen Schichten sind in dem ausgewählten Bereich durch farbige Umrandungen voneinander abgegrenzt; Maßstab 500 μ m

Das Programm Neuroexplorer gab sowohl die Zellzahlen für den gesamten Barrel-Kortex Bereich als auch für jede einzelne Schicht an.

Ein Problem, das sich bei die Analyse ergab, waren die unterschiedlichen Schnittdicken, hervorgerufen durch die Schrumpfungsartefakte während der Färbungen. Um die Schrumpfungsartefakte auszugleichen, wurden zuerst alle Schnittdicken gemessen und ihre mittleren Bereiche (25-75%) bzw. Mittelwerte ermittelt. Für die IHC ergab sich ein mittlerer Bereich von 19-21 μ m, mit einem Mittelwert von 20 μ m. Die FISH zeigte einen mittleren Bereich von 20-22 μ m und einen Mittelwert von 21 μ m. Für alle Schnitte, die größere oder kleinere Dicken aufwiesen, wurden Korrekturfaktoren festgelegt. Folgendes Beispiel soll die Bestimmung des Korrekturfaktors verdeutlichen:

Ein Schnitt nach der IHC hat eine Schnittdicke von 18 μ m. Berechnet wurde, dass der Mittelwert bei 20 μ m liegt und der Schnitt mit seiner Dicke unterhalb des mittleren Bereiches liegt. Nun soll der Korrekturfaktor X berechnet werden,

$$18 \mu\text{m} * X = 20 \mu\text{m}$$

$$X = 20 \mu\text{m} / 18 \mu\text{m} = 1,11$$

Nun ist für diesen Schnitt der Korrekturfaktor bekannt und alle Zellzahlen können mit diesem Faktor multipliziert werden, um die Schrumpfungsartefakte auszugleichen.

Mit allen anderen Schnitten wurde in gleicher Weise verfahren.

Damit die Zellzahlen aller Schnitte miteinander verglichen werden können, ist ein einheitliches Volumen erforderlich. Dafür wurden die Zellzahlen auf ein Volumen von 1 mm³ für den ausgezählten Bereich des Barrel-Kortex extrapoliert. Dieser Wert wurde festgelegt, da 1 mm³ ein gängiges Referenzvolumen für die Beschreibung von Zelldichten darstellt. Weiterhin liegt dieser Wert innerhalb des tatsächlichen Volumens von ca. 3,5-4 mm³ des Barrel-Kortex, welches sich durch Berücksichtigung der Fläche von 2,5 mm² und der Dicke des Kortex von ca. 1-1,2 mm ermitteln lässt. Für die Extrapolation wurde das effektive Volumen des ausgezählten Schnittes im Bereich des Barrel-Kortex mit einem Normfaktor multipliziert. Die Formel für die Berechnung des Normfaktors ergibt sich folgendermaßen:

$$\text{Normfaktor Y} = \frac{1\text{mm}^3 \text{ Barrel Kortex}}{\text{tatsächliches Schnittvolumen}}$$

Ein Rechenbeispiel soll auch hier zur Veranschaulichung dienen. Berechnet wurde das Volumen des ausgezählten Schnittes im Bereich des Barrel-Kortex mit 69.724.400 µm³. Nun soll der Normfaktor Y bestimmt werden:

$$\text{Normfaktor Y} = \frac{1\text{mm}^3}{69.724.400\mu\text{m}^3} = 14,34$$

Für diesen Schnitt beträgt der Normfaktor 14,34. Nun werden für diesen Schnitt die Zellzahlen der einzelnen Schichten mit diesem Faktor multipliziert um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Alle Schnitte wurden in dieser Weise normalisiert.

Neben der Unterteilung der Schichten des Barrel-Kortex wurde zudem eine gleichmäßige Unterteilung (*Binning*) durchgeführt. Dafür wurden die Kortexdicken - von der Pia mater bis zur weißen Substanz - aller Schnitte in 20 Bereiche gleicher Größe (*bin size*) unterteilt. Innerhalb dieser *Bins* wurde für jede Zelle der Abstand zur Pia mater mit dem Programm Neuroexplorer errechnet. Auf diese Weise konnte die Zelldichte für jedes *Bin* bestimmt und anschließend mit der schichtenspezifischen Analyse verglichen werden. Das Auswertungsfenster wurde hierfür auf 600 µm medio-laterale Breite begrenzt (Abb. 2.2).

Da die Kortexdicken von der Pia mater bis zur weißen Substanz nicht in jedem Schnitt gleich sind, wurde eine einheitliche Länge von 1000 µm festgelegt. Somit erhält man 20 *Bins* mit einer Länge von je 50 µm. Die ermittelten Zellzahlen wurden mithilfe folgender Formel auf eine Länge von 1000 µm korrigiert:

$$\frac{\text{tatsächliche Zellzahl} \cdot 1000 \mu\text{m}}{\text{tatsächliche Kortexdicke}} = \text{korrigierte Zellzahl}$$

Die Problematik der Schrumpfungartefakte wurde analog zur schichtenspezifischen Analyse gelöst. Die Zellzahlen wurden mit den entsprechenden Korrekturfaktoren multipliziert.

Auch bei der *Bin size*-Analyse wurde ein einheitliches Volumen von 1 mm³ Barrel-Kortex für das gesamte Auswertungsareal festgelegt, um sowohl die einzelnen *Bins* miteinander vergleichen zu können, als auch die Ergebnisse mit denen der schichtenspezifischen Analyse vergleichen zu können. Daraus ergab sich für jedes der 20 *Bins* ein Volumen von 5*10⁷, auf das normiert werden musste (20 *Bins* * 5*10⁷ = 1 mm³).

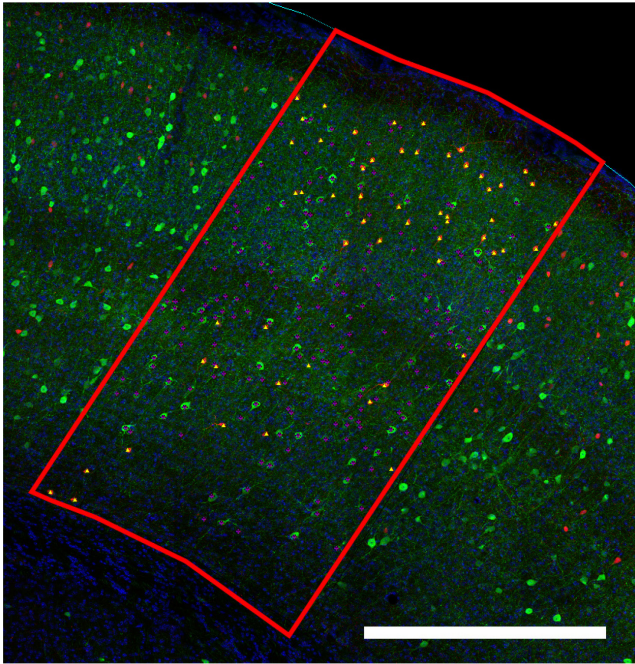


Abbildung 2.2: Bin size-Analyse

Immunhistochemie des PV-Antikörpers an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die α PV-positiven Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. Innerhalb des ausgewählten Bereichs sind die VIP/tdTomato- und α PV-positiven Zellen mit entsprechenden Markern versehen. Die Pia mater ist durch eine Linie markiert. Das rote Rechteck stellt die Abgrenzung des Arbeitsfeldes für die *Bin size*-Analyse dar; Maßstab 500 μ m

In der Regel wurden jeweils 3 Schnitte pro Antikörper bzw. pro Sonde von 6 Tieren auf diese Art und Weise gescannt und ausgewertet. Die Auswertung beinhaltet sowohl das Auszählen der tdTomato-positiven, der *Gad1*-positiven, der SOM-positiven, der PV-positiven und der VIP-positiven Zellen, als auch die Anzahl der kolokalisierten Zellen. Eine Kolokalisation trat dann auf, wenn die Zellen neben dem tdTomato-Signal noch das Signal eines der eingesetzten Antikörper bzw. Sonden aufwiesen. Weiterhin wurde überprüft ob das tdTomato-Signal mit den *Vglut1*-positiven Zellen kolokalisiert ist. Hierfür wurde nur eine Auszählung der tdTomato-positiven Zellen und eventueller Kolokalisationen vorgenommen, nicht aber aller *Vglut1*-positiven Zellen.

Letztendlich konnte für alle durchgeführten Färbungen die Anzahl der Zellen pro Schicht bzw. pro *Bin size* ermittelt werden, um sowohl eine Aussage über die Zelldichte als auch über die Verteilung der Zellen innerhalb des Kortex treffen zu können.

Neben diesen Befunden wurden zudem noch die eingesetzten Antikörper für VIP der Firmen Abcam und ImmunoStar und die PV-Antikörper Swant 25 und Swant 235 miteinander verglichen. Es sei an dieser Stelle bereits darauf hingewiesen, dass der PV-Antikörper 235 der Firma Swant nach eigenen Beobachtungen keine ausreichende Markierung der Zellen zeigte.

Anschließend wurden die Daten in die Programme Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, USA), Sigma Plot 12 (Systac Software, San Jose, Californien, USA) und Microcal Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) exportiert und analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte in Sigma Plot 12. Es wurde der Student's t-Test durchgeführt, mit einem Signifikanzniveau von 0,05. Signifikante Ergebnisse sind durch * gekennzeichnet.

Zusätzlich wurden Aufnahmen (je eine pro Antikörper bzw. Sonde) an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CF-LSM, SP2 der Firma Leica, Wetzlar, Deutschland) mit dem Arivis Browser 2.9 (Arivis Vision, Rostock, Deutschland) durchgeführt. Auch hier wurde ein Bereich des Barrel-Kortex von der Pia mater bis zur weißen Substanz ausgewählt und mit einer 20fachen Vergrößerung und einer Auflösung von 2048x2048 Pixel gescannt. Der Abstand der Fokusebenen betrug einen Mikrometer. Um die Spektralüberschneidung der einzelnen Farbkanäle während des Scannens zu vermeiden wurden sequenzielle Scans durchgeführt. Die einzelnen Bildteile wurden mithilfe des Programms Fiji Is Just ImageJ (ImageJ 1.48c, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) zusammengefügt.

3 ERGEBNISSE

Ziel der Studie ist die Charakterisierung der *VIPcre/tdTomato*-Maus im Bereich des primären somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex) mittels IHC und FISH. Es sollen in diesem Zusammenhang Aussagen über die Spezifität und Sensitivität der transgenen Maus für die VIP-positiven Zellen und über ihre schichtenspezifische Verteilung im Barrel-Kortex getroffen werden. Weiterhin werden potentielle Kollokalisierungen zwischen VIP- und SOM- und VIP- und PV-exprimierenden Interneuronen untersucht. Durch den Einsatz von *Gad1* und *Vglut1* sollen Rückschlüsse auf die inhibitorischen bzw. exzitatorischen Eigenschaften von VIP-exprimierenden Interneuronen gezogen werden.

3.1 Handelt es sich bei den tdTomato-fluoreszenten Zellen um VIP-positive Zellen?

Mit Hilfe des Cre/loxP-Systems sollten in den für diese Studie verwendeten *VIPcre/tdTomato*-Mäusen die VIP-exprimierende Neurone mit dem tdTomato fluoreszierenden Protein markiert sein. Im Folgenden sollen Aussagen darüber getroffen werden, ob (i) es sich bei den fluoreszierenden Zellen tatsächlich um VIP-Zellen handelt (Spezifität) und (ii) alle VIP-Neurone fluoreszent markiert sind (Sensitivität).

Für die Markierung von VIP-Zellen wurden zwei verschiedene VIP-Antikörper und eine *Vip*-Sonde eingesetzt. Untersucht wurden für den VIP-Antikörper ImmunoStar 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren, für den VIP-Antikörper Abcam 17 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren und für die *Vip*-Sonde 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren.

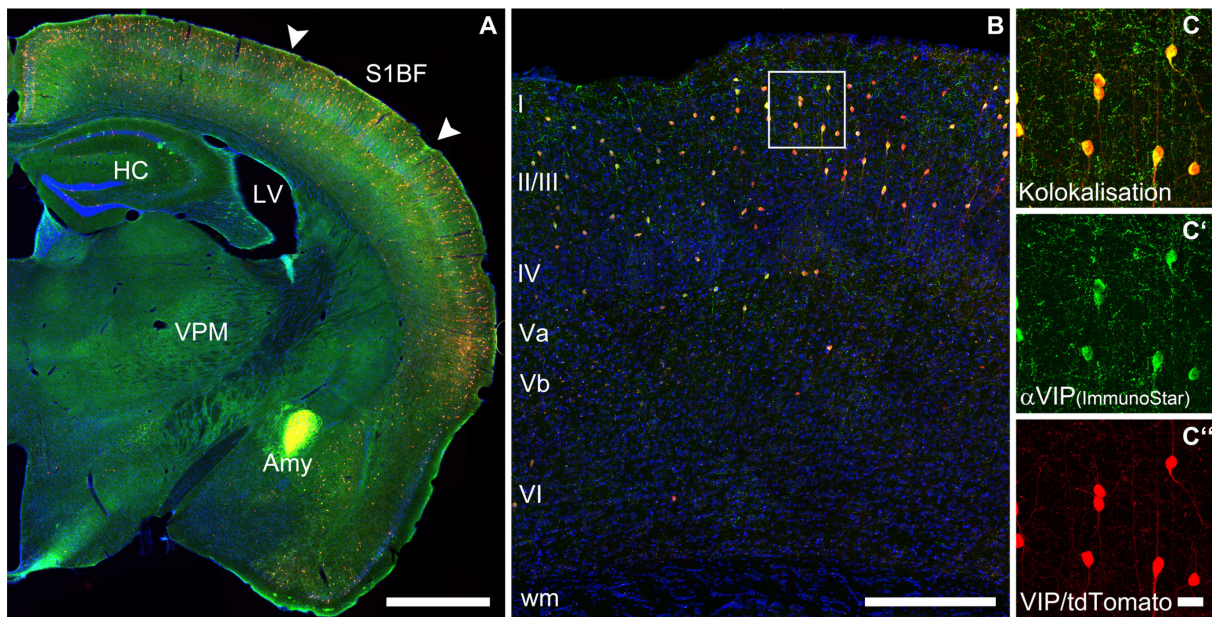


Abbildung 3.1: IHC mittels VIP-Antikörper ImmunoStar zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

IHC des VIP-Antikörpers ImmunoStar an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die α VIP (ImmunoStar)-markierten Zellen, die Kolokalisation in gelb und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV), Amygdala (Amy) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μ m. **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μ m. In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei wird die durchgängige Kolokalisation (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den α VIP (ImmunoStar)-positiven Zellen (**C'**) deutlich; Maßstab: 20 μ m.

Der VIP-Antikörper ImmunoStar zeigt in allen 18 frontalen Hirnschnitten eine ansprechende immunhistochemische Färbung. Schon in der 10fachen Übersicht eines frontalen Hirnschnittes (Abb. 3.1A) lassen sich sowohl im Neocortex als auch im Hippocampus (HC) einzelne mit α VIP und/oder tdTomato markierte Zellen erkennen. Eine starke VIP-Expression kann im Bereich der Amygdala (Amy) beobachtet werden. In der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex werden in der DAPI-Färbung die Barrels in Schicht IV, mehrere tdTomato- und α VIP-positive Zellen deutlich (Abb. 3.1B). Es lassen sich nun deutlicher VIP-positive Zellen in der neokortikalen Schicht II/III beobachten. Dabei ist die Übereinanderlagerung des VIP-Antikörpers ImmunoStar mit dem tdTomato-Signal zu erkennen, welche in einem vergrößerten Bereich in Schicht II/III eindrucksvoll belegt wird (Abb. 3.1C). In der quantitativen Analyse des VIP-Antikörpers ImmunoStar lassen sich für die Kolokalisation folgende Aussagen treffen. Im Bereich des Barrel-Kortex tragen $2123,3 \pm 337,4$ Zellen pro mm^3 das tdTomato-Signal, von denen lediglich $19,8 \pm 14,6$ VIP/tdTomato-Zellen nicht mit α VIP ImmunoStar markiert sind. Somit sind $99,1 \pm 0,6\%$ der tdTomato-Zellen im Barrel-Kortex mit dem ImmunoStar VIP-Antikörper kolokalisiert (Abb. 3.7).

Die schichtenbezogene Auswertung der tdTomato-Zellen, der α VIP-positiven Zellen und der kolokalisierten Zellen ist sowohl graphisch (Abb. 3.2) als auch tabellarisch (Tab. 7.1) dargestellt.

Der VIP-Antikörper ImmunoStar zeigt eine 100%ige Kolokalisation mit den tdTomato-Zellen in den Schichten I und Va. Die niedrigste Anzahl an Kolokalisationen zeigt Schicht VI mit $98,4 \pm 2,5\%$. Alle anderen Schichten zeigen Kolokalisationen von α VIP ImmunoStar mit den tdTomato-Zellen in über 99% der Fälle (Abb. 3.7). Die größte Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen, die nicht mit dem Antikörper markiert sind, findet man in Schicht II/III. Der VIP-Antikörper hat an keine Nicht-VIP/tdTomato-Zelle gebunden (Abb. 3.2, Tab. 7.1). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der VIP-Antikörper ImmunoStar mit nahezu allen VIP/tdTomato-Zellen eine Kolokalisation aufweist.

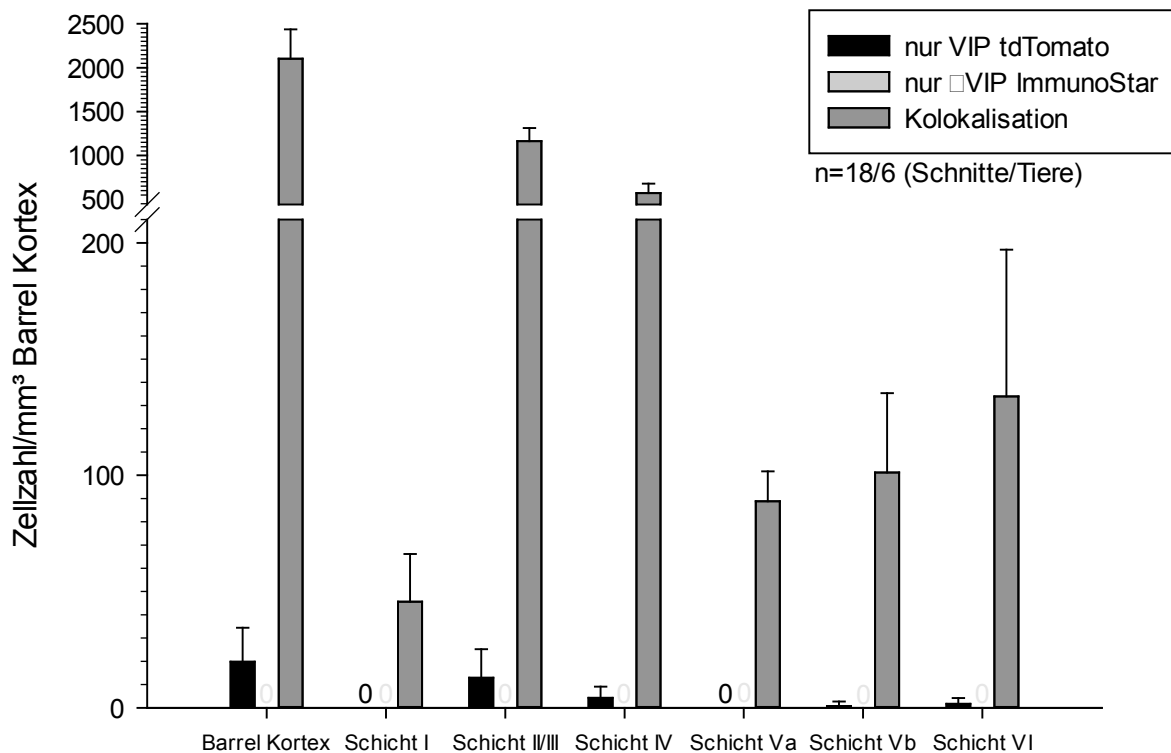


Abbildung 3.2: Kolokalisation von VIP/tdTomato mit α VIP ImmunoStar

Die Balkendiagramme stellen die Anzahl an Kolokalisationen zwischen den VIP/tdTomato-Zellen und dem VIP-Antikörper (ImmunoStar) innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex dar. Außerdem ist die Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen dargestellt, die nicht mit dem α VIP markiert sind (schwarze Balken). Der VIP-Antikörper (ImmunoStar) hat nur an VIP/tdTomato-Zellen gebunden und niemals an eine andere Zelle.

Für den VIP-Antikörper Abcam gilt ebenfalls, dass er an allen 17 frontalen Hirnschnitten eine ansprechende immunhistochemische Färbung zeigt.

In der Übersichtsaufnahme des frontalen Hirnschnittes (Abb. 3.3A) erkennt man sowohl im Hippocampus (HC) als auch im Neokortex einzelne mit α VIP und/oder tdTomato markierte Zellen. Auch hier erkennt man wieder eine starke VIP-Expression im Bereich der Amygdala (Amy). In der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex werden die tdTomato- und α VIP-positiven Zellen besonders in Schicht II/III deutlich (Abb. 3.3B). Die Übereinanderlagerung des VIP-Antikörpers Abcam mit dem tdTomato-Signal wird in der Vergrößerung (Abb. 3.3C) hervorgehoben.

In der quantitativen Analyse des VIP-Antikörpers Abcam zeigt sich, dass im Bereich des Barrel-Kortex $2207,6 \pm 209,4$ tdTomato-Zellen pro mm^3 zu finden sind. $10,3 \pm 7,9$ von ihnen zeigen keine Kolokalisation mit dem α VIP Abcam. Daraus ergibt sich eine $99,5 \pm 0,4\%$ Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und α VIP Abcam für den Barrel-Kortex.

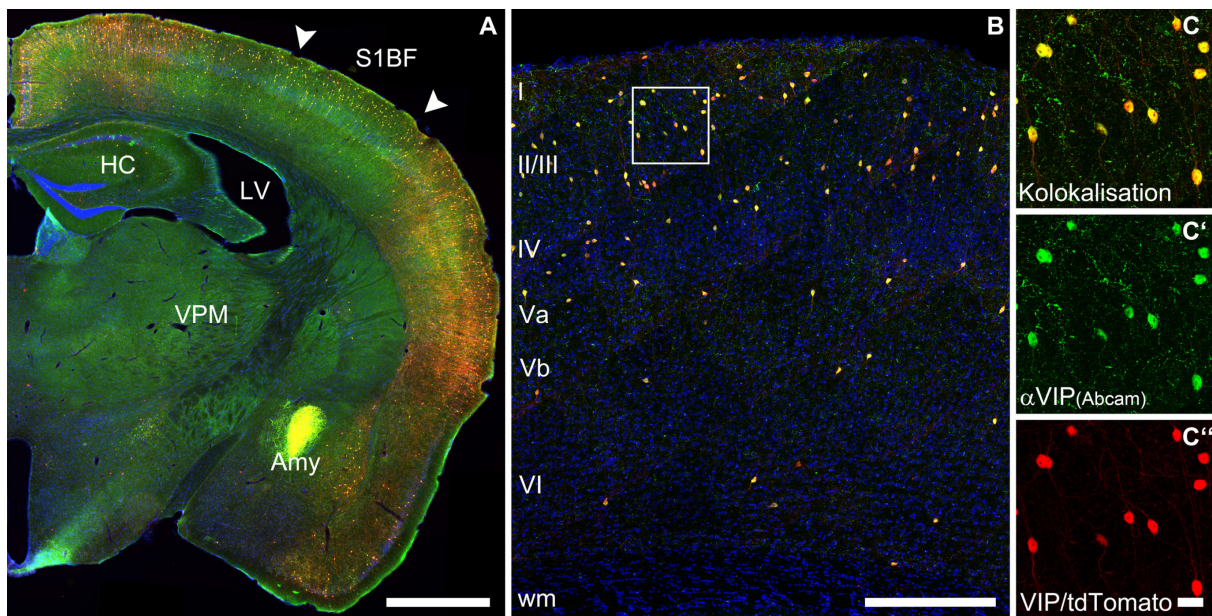


Abbildung 3.3: IHC mittels VIP-Antikörper Abcam zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

IHC des VIP-Antikörpers Abcam an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die α VIP (Abcam)-markierten Zellen, die Kolokalisation in gelb und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV), Amygdala (Amy) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μm . **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μm . In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei wird die durchgängige Kolokalisation (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den α VIP (Abcam)-positiven Zellen (**C'**) deutlich; Maßstab: 20 μm .

Beim VIP-Antikörper Abcam zeigt sich in den Schichten Va, Vb und VI, dass alle tdTomato-Zellen mit dem Antikörper markiert sind. Das niedrigste Maß an Kollokalisierungen ist in Schicht I mit $97,9 \pm 4,7\%$ zu finden. Schicht II/III und IV zeigen Kollokalisierungen von über 99% (Abb. 3.7). Die meisten VIP/tdTomato-Zellen, die nicht mit α VIP markiert sind befinden sich in Schicht II/III. Auch der VIP-Antikörper Abcam hat an keine Nicht-VIP/tdTomato-Zelle gebunden (Abb. 3.4, Tab. 7.1) und zeigt ebenfalls eine nahezu vollständige Kollokalisierung mit den VIP/tdTomato-Zellen.

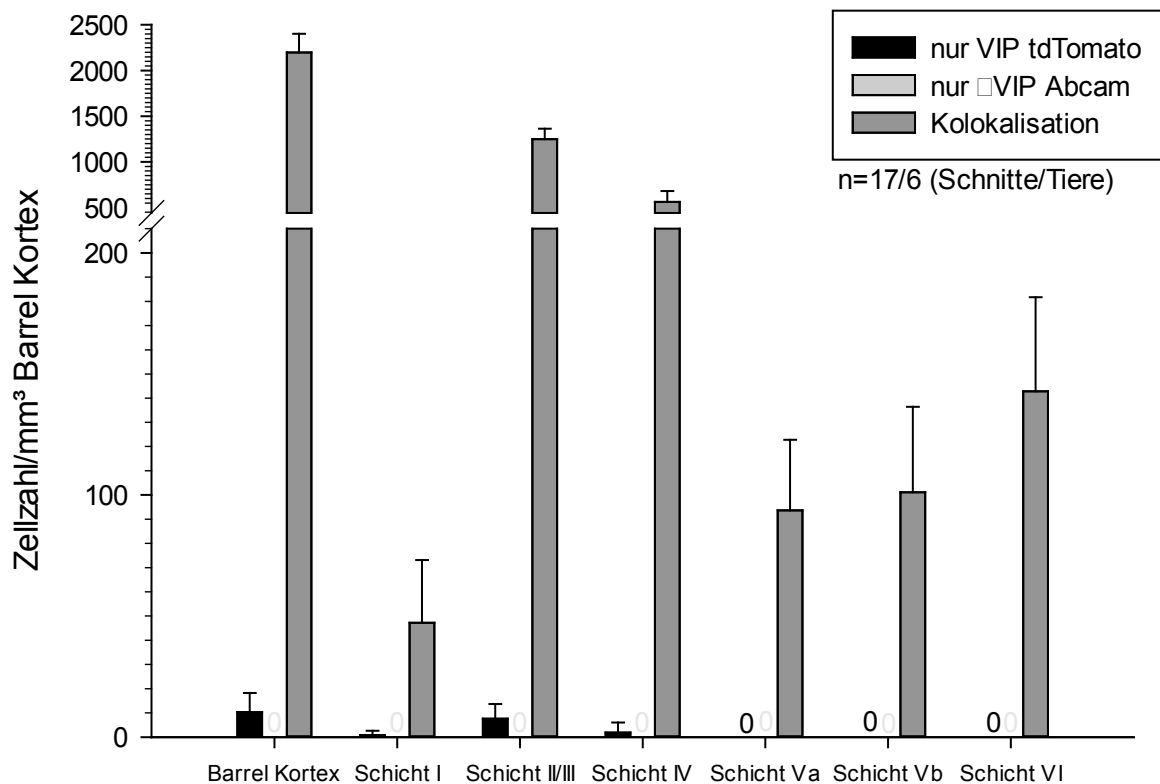


Abbildung 3.4: Kollokalisierung zwischen VIP/tdTomato und α VIP Abcam

Die Balkendiagramme stellen die Anzahl an Kollokalisierungen zwischen den VIP/tdTomato-Zellen und dem VIP-Antikörper (Abcam) innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm^3 Barrel-Kortex dar. Außerdem ist die Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen dargestellt, die nicht mit dem α VIP markiert sind (schwarze Balken). Der VIP-Antikörper (Abcam) hat nur an VIP/tdTomato-Zellen gebunden und niemals an eine andere Zelle.

Um die Ergebnisse aus der IHC mit den beiden VIP-Antikörpern zu belegen und die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde zusätzlich eine FISH durchgeführt. Wie in Material und Methoden aufgeführt, wurde nach der Behandlung der Schnitte in der FISH das native tdTomato-Signal mittels IHC amplifiziert, um eine ausreichende Detektion zu gewährleisten.

Die *Vip*-Sonde zeigt an jedem der 18 frontalen Hirnschnitte eine ausreichende Färbung. Man erkennt an einem frontalen Hirnschnitt in 10facher Vergrößerung sowohl im Hippocampus (HC) als auch im Neokortex einzelne mit der *Vip*-Sonde und/oder tdTomato markierte Zellen (Abb. 3.5A). In der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex stellen sich die mit der *Vip*-Sonde markierten Zellen, die tdTomato-positiven Zellen, als auch die Kolokalisationen von beiden deutlich dar. Auffallend ist auch hier das gehäufte Auftreten von VIP-Zellen in Schicht II/III (Abb. 3.5B). Der vergrößerte Ausschnitt aus Schicht II/III veranschaulicht das amplifizierte tdTomato-Signal, die Markierung mit der *Vip*-Sonde, sowie die Kolokalisation von beiden (Abb. 3.5C).

Betrachtet man die quantitative Analyse, so wird deutlich, dass $274,7 \pm 168,5$ von $2372,9 \pm 171,1$ tdTomato-positiven Zellen nicht mit der *Vip*-Sonde markiert sind. Umgekehrt dagegen zeigt nur eine einzige mit der *Vip*-Sonde markierte Zelle in Schicht II/III keine tdTomato-Fluoreszenz (Abb. 3.6).

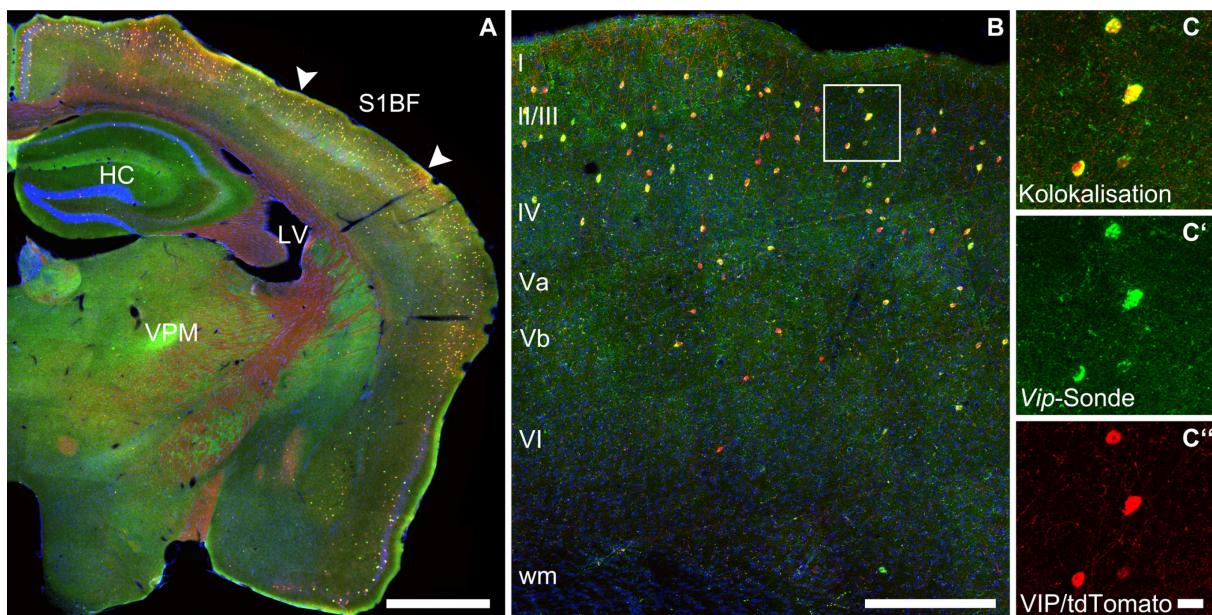


Abbildung 3.5: FISH zur Markierung der VIP-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

FISH der *Vip*-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die *VIP*-markierten Zellen, die Kolokalisation in gelb und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μ m. **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μ m. In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei wird die Kolokalisation (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den *Vip*-markierten Zellen (**C'**) deutlich; Maßstab: 20 μ m.

Im Vergleich zu den beiden VIP-Antikörpern zeigt die *Vip*-Sonde ein nicht so hohes Maß an Kolokalisationen mit den tdTomato-positiven Zellen. Die höchste Anzahl an Kolokalisationen ist in Schicht II/III mit $90,3 \pm 4,4\%$ zu finden, wohingegen Schicht I nur $64,1 \pm 25,9\%$ an Kolokalisationen zeigt. Alle anderen Schichten zeigen Kolokalisationen von mehr als 86% (Abb. 3.7).

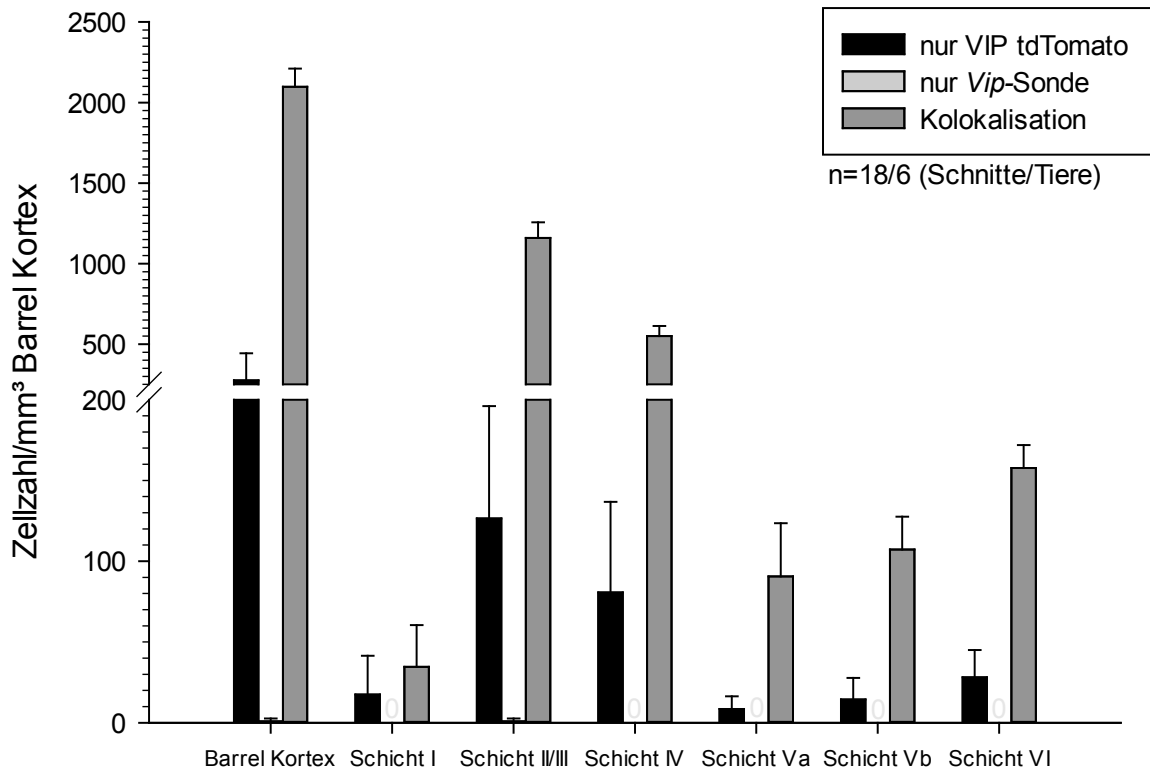


Abbildung 3.6: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Vip*-Sonde

Die Balkendiagramme stellen die Anzahl an Kolokalisationen zwischen den VIP/tdTomato-Zellen und der *Vip*-Sonde innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex dar. Außerdem ist die Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen dargestellt, die nicht mit der *Vip*-Sonde markiert sind (schwarze Balken). Die *Vip*-Sonde hat in Schicht II/III an eine Nicht-VIP/tdTomato-Zellen gebunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide VIP-Antikörper ein sehr hohes Maß an Kolokalisationen mit den tdTomato-Zellen zeigen. Es gibt keine Nicht-tdTomato-Zelle, an die die VIP-Antikörper gebunden haben. Auch bei der *Vip*-Sonde konnte nur eine Zelle gefunden werden, die zwar mit der Sonde markiert ist, aber keine tdTomato-Fluoreszenz zeigt.

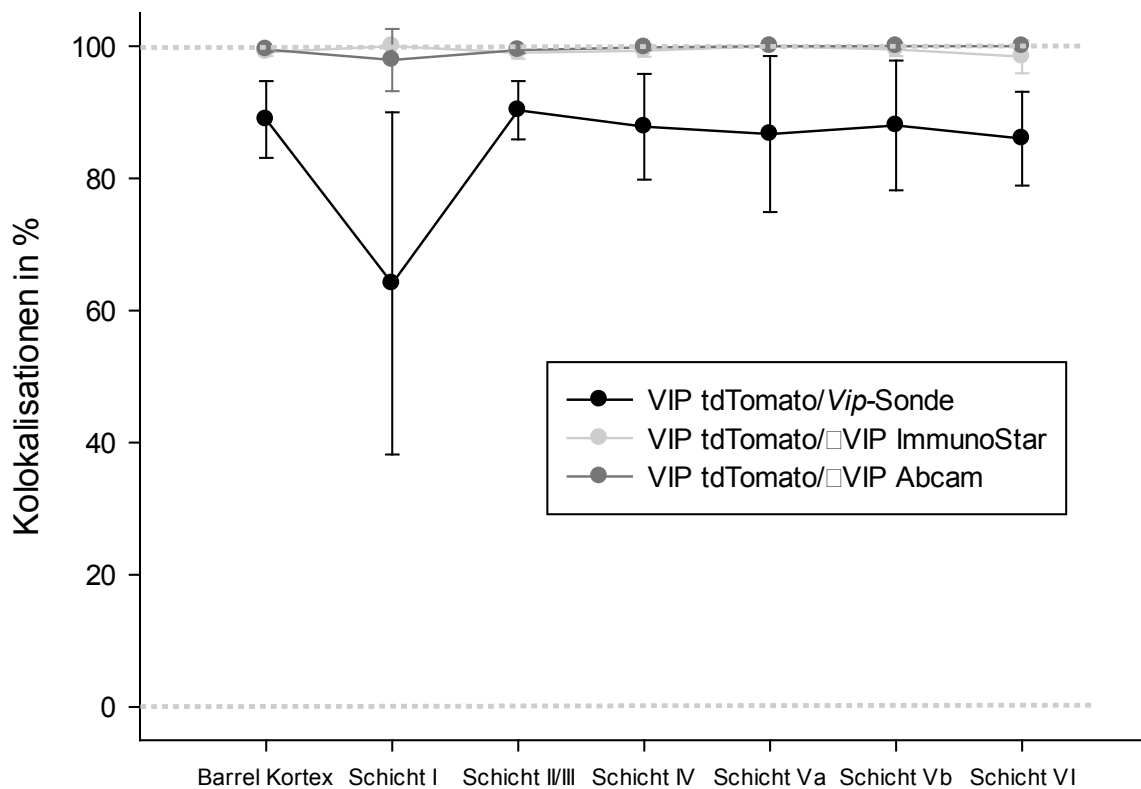


Abbildung 3.7: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Vip*-Sonde, α VIP ImmunoStar und α VIP Abcam

Die Diagramme stellen die Kolokalisationen (in %) zwischen VIP/tdTomato und der *Vip*-Sonde bzw. den beiden VIP-Antikörpern innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex dar. Die beiden VIP-Antikörper zeigen ein sehr hohes Maß an Kolokalisationen mit den VIP/tdTomato-Zellen. Mit der *Vip*-Sonde verhält es sich anders, hier zeigt sich ein geringeres Maß an kolokalisierten Zellen. Diese Diskrepanz wird vor allem für die neokortikale Schicht I deutlich.

Man unterscheidet bei den GABAergen Interneuronen drei Hauptgruppen, die PV-exprimierenden Interneurone, die SOM-exprimierenden Interneurone und die Gruppe der den 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Zellen, zu der die VIP-exprimierenden Interneurone zählen. Alle drei Gruppen zeigen keine Überschneidungen und lassen sich dank molekularer Marker gut voneinander unterscheiden (Lee et al. 2010).

Zum Nachweis, dass auch die tdTomato-Zellen im VIPcre-Tier in dieser Hinsicht ausschließlich VIP-tragend sind, wurden sowohl immunhistochemische Färbungen gegen die Proteine Parvalbumin und Somatostatin als auch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen gegen die mRNA der zuvor genannten Proteine durchgeführt.

Für den SOM-Antikörper wurden 18 Hirnschnitte und für den PV-Antikörper 16 Hirnschnitte von je 6 verschiedenen Tieren auf Kollokationen mit dem tdTomato-Signal untersucht.

Der SOM-Antikörper zeigt an allen 18 Hirnschnitten sowohl im Hippocampus (HC) als auch im Neokortex eine adäquate Färbung (Abb. 7.1A). Im Bereich des Barrel-Kortex erkennt man in der 25fachen Vergrößerung die getrennt markierten Zellpopulationen der VIP/tdTomato-positiven und der α SOM-markierten Zellen (Abb. 7.1B). Dies wird durch den vergrößerten Ausschnitt aus der kortikalen Schicht II/III besonders verdeutlicht (Abb. 7.1C).

In der quantitativen Analyse erkennt man, dass nahezu keine VIP/tdTomato-Zellen mit dem SOM-Antikörper markiert sind. Für 1 mm^3 Barrel-Kortex beträgt die Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen, die mit dem Antikörper markiert sind $0,2\pm 0,2\%$. Die höchste Anzahl befindet sich in Schicht Vb mit $0,9\pm 2,1\%$. In den Schichten I, IV und Va sind keine Kollokationen zu finden. Umgekehrt erkennt man, dass $0,1\pm 0,1\%$ aller Zellen, die den SOM-Antikörper tragen, VIP/tdTomato-Zellen sind. Die größte Anzahl davon befindet sich in Schicht II/III (Tab. 7.2).

Der PV-Antikörper zeigt eine eindrucksvolle immunhistochemische Färbung an allen 16 Hirnschnitten. Sowohl im Hippocampus (HC) als auch im Neokortex lassen sich PV-positive Zellen nachweisen (Abb. 7.3A). In der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex zeigt sich eindeutig, dass es sich bei den VIP/tdTomato-Zellen und den α PV-positiven Zellen um unabhängige Zellgruppen handelt (Abb. 7.3B). Durch die Vergrößerung aus Schicht II/III wird dies nochmals hervorgehoben (Abb. 7.3C).

Die quantitative Analyse zeigt, dass der PV-Antikörper niemals an eine tdTomato-positive Zelle gebunden hat (Tab. 7.2).

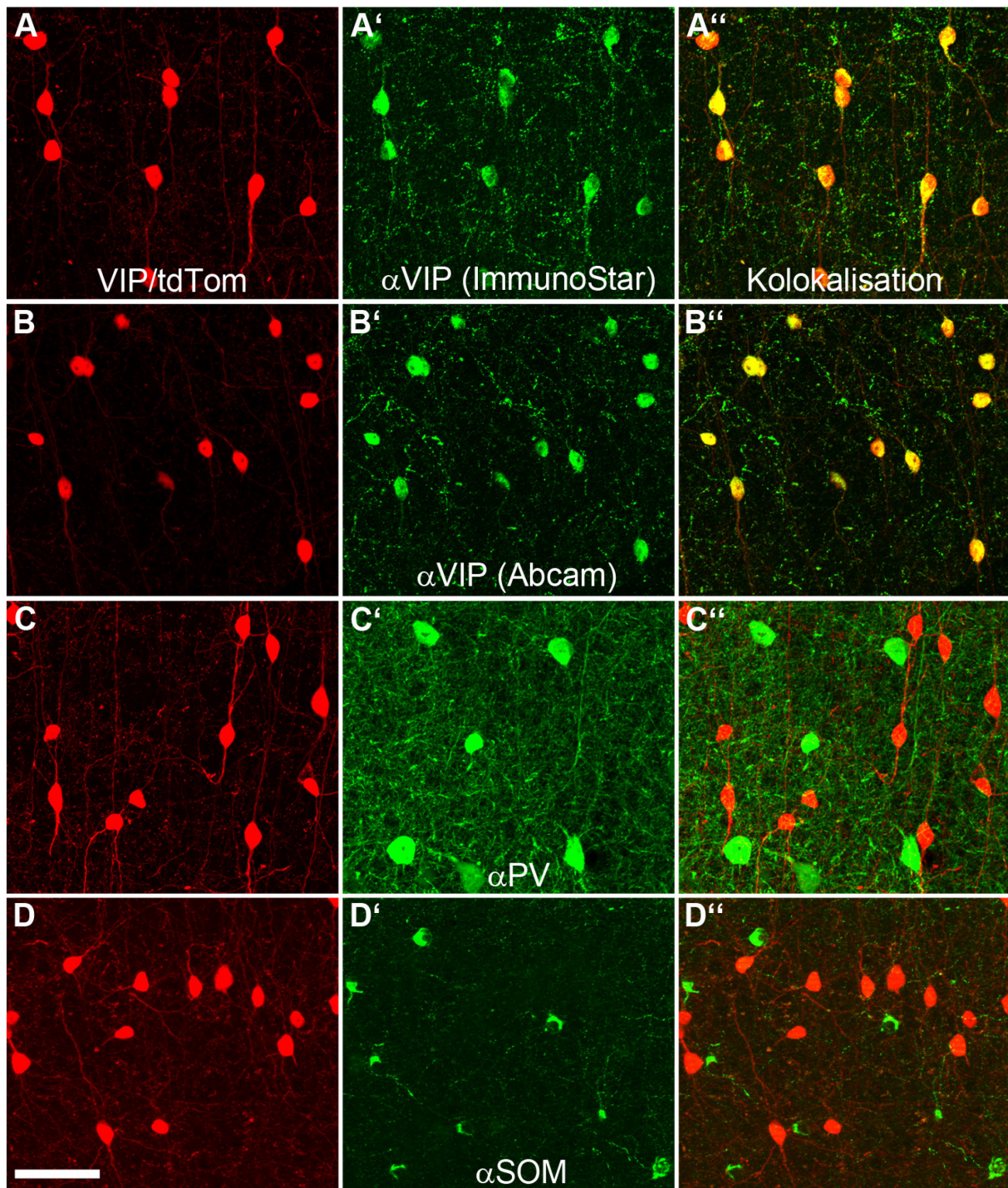


Abbildung 3.8: IHC der VIP-Antikörper ImmunoStar und Abcam, des PV- und SOM-Antikörpers

Die IHC des VIP(ImmunoStar)- (A-A''), VIP(Abcam)- (B-B''), PV- (C-C''), und SOM-Antikörpers (D-D'') an frontalen Hirnschnitten der *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal (A-D), in grün das Antikörper-Signal (A'-D') und deren Übereinanderlagerung (A''-D''). Kolokalisationen erscheinen gelb. Die Aufnahmen sind „maximum intensity projections“ im Bereich des Barrel-Kortex aus Schicht II/III. A-A'' und B-B'': Die tdTomato-positiven Zellen zeigen alle eine Kolokalisation mit den VIP-Antikörpern. Für den PV-Antikörper (C-C'') und den SOM-Antikörper (D-D'') konnten keine Kolokalisationen mit dem tdTomato-Signal festgestellt werden. Maßstab: 50 µm

Die FISH der *Sst*-Sonde zeigt deutlich die Markierung der *Sst*-positiven Zellen. In der 10fachen Vergrößerung eines frontalen Hirnschnittes erkennt man im Neokortex, im Hippocampus (HC) und im Thalamus *Sst*-markierte Zellen (Abb. 7.2A). Dabei wird in der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex deutlich, dass sich die *Sst*-positiven Zellen und die tdTomato-fluoreszenten Zellen nicht überlappen (Abb. 7.2B). Die Vergrößerung (Abb. 7.2C) verdeutlicht diese Beobachtung.

In der quantitativen Analyse zeigt sich, dass nur wenige VIP/tdTomato-Zellen mit der *Sst*-Sonde markiert sind. Für 1 mm³ Barrel-Kortex ergibt sich eine Gesamtanzahl von $0,1 \pm 0,1\%$. Mit $1,4 \pm 2,2\%$ ist die größte Anzahl in Schicht VI zu finden. Die Schichten I-Vb zeigen keinerlei Kolokalisationen. Umgekehrt zeigt sich, dass $0,1 \pm 0,2\%$ aller Zellen in Schicht VI, die mit der *Sst*-Sonde markiert sind, VIP/tdTomato-Zellen sind (Tab. 7.2).

Die *Pvalb*-Sonde zeigt in der FISH an allen 18 Hirnschnitten eine ansprechende Markierung der *Pvalb*-positiven Zellen. Man erkennt in der 10fachen Vergrößerung einer Hemisphäre *Pvalb*-positive Zellen sowohl im Hippocampus (HC) als auch im Neokortex (Abb. 7.4A). Die 25fache Vergrößerung (Abb. 7.4B) und der daraus vergrößerte Bereich (Abb. 7.4C) zeigen deutlich, dass es sich bei den *Pvalb*-positiven Zellen und den VIP/tdTomato-fluoreszenten Zellen um nicht überlappende Gruppen handelt.

Die quantitative Analyse bestätigt diese Beobachtung. Es wurde keine VIP/tdTomato-Zelle gefunden, die mit der *Pvalb*-Sonde markiert ist (Tab. 7.2).

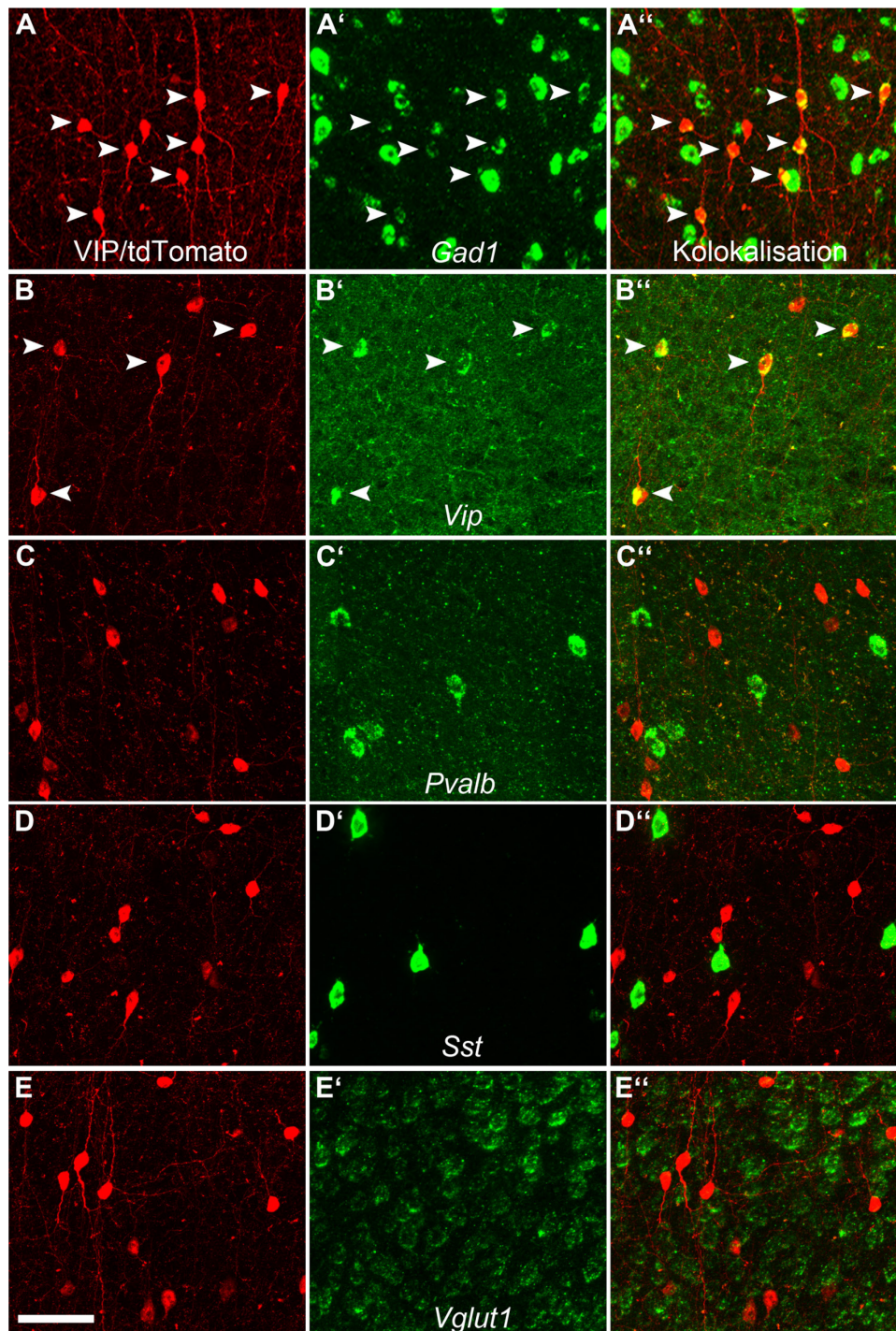


Abbildung 3.9: FISH der *Gad1*-, *Vip*-, *Pvalb*-, *Sst*- und *Vglut1*-Sonde

Die FISH der *Gad1*- (A-A''), *Vip*- (B-B''), *Pvalb*- (C-C''), *Sst*- (D-D'') und *Vglut1*-Sonde (E-E'') an frontalen Hirnschnitten der *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal (A-E), in grün das Sonden-Signal (A'-E') und deren Übereinanderlagerung (A''-E''). Die Aufnahmen sind „*maximum intensity projections*“ im Bereich des Barrel-Kortex aus Schicht II/III. Pfeile weisen auf Kolokalisationen (gelb) hin. A-A'': Die tdTomato-positiven Zellen zeigen in der Mehrzahl Kolokalisationen mit dem *Gad1*-Signal, wobei eine Zelle nicht kolokalisiert ist. B-B'': Für das Signal der *Vip*-Sonde lässt sich ebenfalls eine klare Kolokalisation beobachten. Für die *Pvalb*-Sonde (C-C''), die *Sst*-Sonde (D-D'') und die *Vglut1*-Sonde (E-E'') konnten keine Kolokalisationen mit dem tdTomato-Signal festgestellt werden. Maßstab: 50 μ m

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei SOM und VIP/tdTomato und bei PV und VIP/tdTomato um getrennte Zellgruppen handelt. Der PV-Antikörper sowie die *Pvalb*-Sonde haben niemals an eine td/Tomato-Zelle gebunden (Abb. 3.8C-C“, Abb. 3.9C-C“). Für den SOM-Antikörper und für die *Sst*-Sonde wurde gezeigt, dass fast ausschließlich Nicht-td/Tomato-Zellen markiert wurden (Abb. 3.8D-D“, Abb. 3.9D-D“). Außerdem wurde gezeigt, dass beide VIP-Antikörper ausschließlich an die td/Tomato-Zellen gebunden haben. Auch die *Vip*-Sonde hat nur die td/Tomato-Zellen markiert (Abb. 3.8A-B“, Abb. 3.9B-B“).

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den fluoreszierenden td/Tomato-Zellen um VIP-Zellen handelt und dass diese wie auch in nicht-transgenen Mäusen eine von SOM- und PV-exprimierenden Neuronen unterschiedliche Zellpopulation darstellen.

3.2 Handelt es sich bei den VIP/tdTomato-Zellen um exzitatorische oder inhibitorische Zellen?

VIP-exprimierende Zellen zählen zu den GABAergen Interneuronen und gelten in der Ratte als inhibitorisch (Kubota et al. 1994; Bayraktar et al. 1997). Um diese Aussage auch für die Maus zu überprüfen bzw. um auszuschließen, dass VIP-positive Zellen exzitatorische Eigenschaften aufzeigen, wurden Färbungen mit der *Gad1*- und der *Vglut1*-Sonde durchgeführt.

GAD katalysiert die Reaktion von Glutamat zu GABA und kann daher als Marker für GABAerge Interneurone angesehen werden.

VGLUT verpackt Glutamat in Vesikel und transportiert sie in den synaptischen Spalt. Da es sich bei Glutamat um einen exzitatorischen Neurotransmitter handelt, kann VGLUT als Marker für exzitatorische Zellen angesehen werden.

Untersucht wurden für *Gad1* 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren und für *Vglut1* 9 Schnitte von 3 verschiedenen Tieren.

Die FISH der *Gad1*-Sonde zeigt eine ansprechende Markierung der *Gad1*-positiven Zellen. Im Neokortex, Hippocampus (HC) und Thalamus lassen sich *Gad1*-positive Zellen nachweisen. Eine besonders starke *Gad1*-Expression ist dabei im Nucleus reticularis (Rt) zu finden (Abb. 3.10A). In der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex erkennt man eine gleichmäßige Verteilung der *Gad1*-positiven Zellen über die neokortikalen Schichten (Abb. 3.10B). In der vergrößerten Darstellung werden die Kollokationen zwischen dem VIP/tdTomato-Signal und der *Gad1*-Sonde deutlich (Abb. 3.10C).

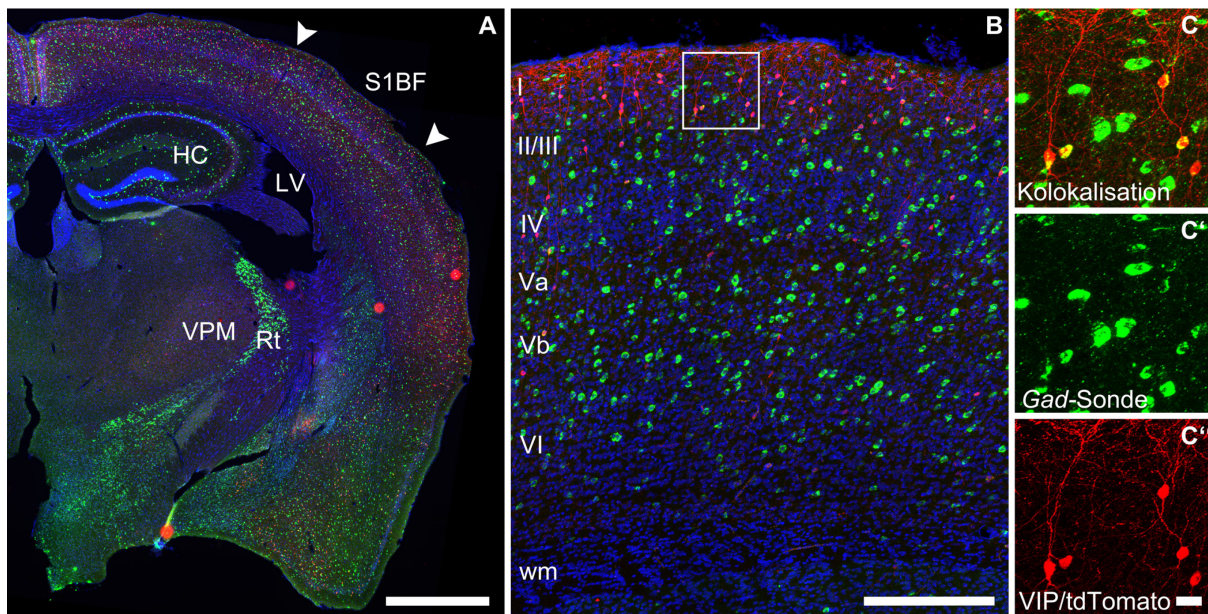


Abbildung 3.10: FISH zur Markierung der *Gad1*-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

FISH der *Gad1*-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die *Gad1*-positiven Zellen, die Kolokalisation in gelb und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV), Nucleus reticularis (Rt) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μm . **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μm . In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei wird die nahezu vollständige Kolokalisation (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den *Gad1*-positiven Zellen (**C'**) deutlich; Maßstab: 20 μm .

Die quantitative Analyse zeigt, dass in 1 mm^3 Barrel-Kortex $16869,1 \pm 1792,0$ Zellen mit der *Gad1*-Sonde markiert sind, von denen $2223,1 \pm 283,0$ zusätzlich auch das VIP/tdTomato-Signal tragen. Insgesamt sind $55,7 \pm 39,6$ VIP/tdTomato-Zellen nicht mit der *Gad1*-Sonde markiert.

Prozentual ausgedrückt sind in 1 mm^3 Barrel-Kortex $97,5 \pm 1,9\%$ der VIP/tdTomato-Zellen mit *Gad1* kolokalisiert. Schicht Vb zeigt dabei mit 100% die höchste Anzahl an Kolokalisationen von VIP/tdTomato mit *Gad1*. Die geringste Anzahl ist mit $96,3 \pm 3,4\%$ in Schicht II/III zu finden. In allen anderen Schichten sind über 98% der VIP/tdTomato-Zellen mit *Gad1* markiert. Umgekehrt zeigt sich, dass in Schicht II/III immerhin $30,2 \pm 1,7\%$ der *Gad1*-positiven Zellen, VIP/tdTomato-Zellen sind. In Schicht Vb sind allerdings nur $4,9 \pm 0,7\%$ aller *Gad1*-positiven Zellen VIP/tdTomato-Zellen. Die Schichten I-IV zeigen dabei sowohl zueinander als auch zu allen anderen neokortikalen Schichten statistisch signifikante Unterschiede in der Zellzahl. Hingegen zeigen die Schichten Va-VI zueinander keine signifikanten Unterschiede, wohl aber zu den Schichten I-IV (Abb. 3.11, Tab. 3.1, Tab. 7.3).

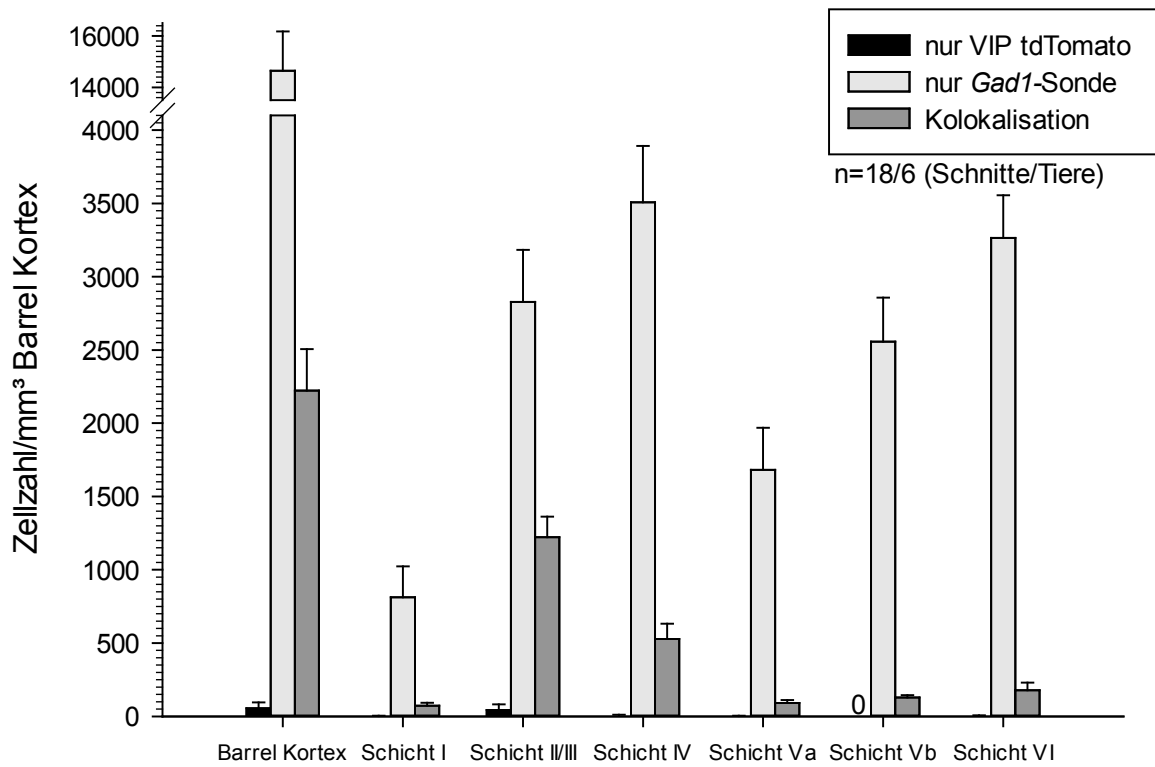


Abbildung 3.11: Kokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Gad1*-Sonde

Die Balkendiagramme stellen die Anzahl an Kokalisationen zwischen den VIP/tdTomato-Zellen und der *Gad1*-Sonde innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex dar. Die Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen, die nicht mit der *Gad1*-Sonde markiert sind und die *Gad1*-positiven Nicht-VIP/tdTomato-Zellen sind dargestellt.

Die *Vglut1*-Sonde zeigt in allen 9 Hirnschnitten eine zuverlässige Markierung. Es lassen sich vor allem im Neokortex große Mengen an *Vglut1*-positiven Zellen nachweisen (Abb. 3.12A). In der 25fachen Vergrößerung des Barrel-Kortex erkennt man die Verteilung der *Vglut1*-markierten Zellen über die einzelnen Schichten. Außerdem wird deutlich, dass VIP/tdTomato nicht mit *Vglut1* kolokalisiert ist (Abb. 3.12B). Dies wird durch den vergrößerten Ausschnitt aus Schicht II/III nochmals deutlich hervorgehoben (Abb. 3.12C).

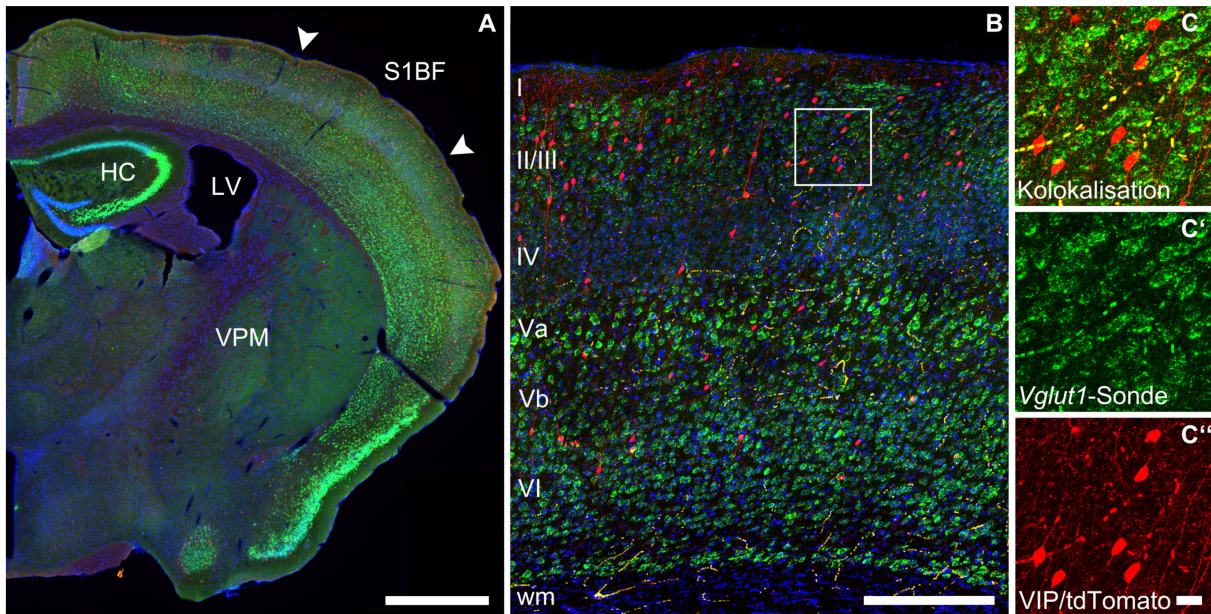


Abbildung 3.12: FISH zur Markierung der *Vglut1*-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

FISH der *Vglut1*-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die *Vglut1*-positiven Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μm . **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μm . In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei sind keine Kolokalisationen (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den *Vglut1*-positiven Zellen (**C'**) zu erkennen; Maßstab: 20 μm .

Die quantitative Analyse bestätigt diese Beobachtung. Es konnte keine Zelle nachgewiesen werden, die sowohl für VIP/tdTomato als auch für *Vglut1* positiv ist (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato mit *Gad1* oder *Vglut1*

Dargestellt sind die Kolokalisationen zwischen VIP/tdTomato und der *Gad1*-Sonde sowie der *Vglut1*-Sonde in % und ihre Verteilung über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben. Die linke Spalte zeigt die VIP/tdTomato-Zellen, die mit der *Gad1*-Sonde markiert sind. In der mittleren Spalte sind die *Gad1*-markierten Zellen dargestellt, die außerdem die tdTomato-Fluoreszenz zeigen. Die neokortikalen Schichten I-IV (*) zeigen signifikante Unterschiede zueinander und zu den restlichen Schichten. Die Schichten Va-VI zeigen zueinander keine signifikanten Unterschiede, aber zu den Schichten I-IV. In der rechten Spalte erkennt man, dass keine VIP/tdTomato-Zelle mit der *Vglut1*-Sonde kolokalisiert ist. Es wurde der Student's t-Test durchgeführt, mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Die p-Werte sind im Anhang in Tabelle 7.5 angegeben.

| | VIP/tdTomato und <i>Gad1</i> | <i>Gad1</i> und VIP/tdTomato | VIP/tdTomato und <i>Vglut1</i> |
|----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Region | Kolokalisation | Kolokalisation | Kolokalisation |
| Barrel-Kortex | 97,5±1,9 | 13,2±0,6 | 0,0±0,0 |
| Schicht I | 98,0±2,9 | 8,4±1,7* | 0,0±0,0 |
| Schicht II/III | 96,3±3,4 | 30,2±1,7* | 0,0±0,0 |
| Schicht IV | 98,9±0,9 | 13,0±2,2* | 0,0±0,0 |
| Schicht Va | 98,1±2,6 | 5,3±1,1 | 0,0±0,0 |
| Schicht Vb | 100,0±0,0 | 4,9±0,7 | 0,0±0,0 |
| Schicht VI | 98,5±2,5 | 5,0±1,1 | 0,0±0,0 |

Fasst man zusammen, so konnte gezeigt werden, dass die meisten VIP/tdTomato-Zellen mit der *Gad1*-Sonde markiert sind (Abb. 3.9A-A‘‘). Dem gegenüber ist zu sagen, dass keine VIP/tdTomato-Zelle mit der *Vglut1*-Sonde markiert ist (Abb. 3.9E-E‘‘).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den VIP-Zellen um GABAerge, inhibitorische Interneurone handelt.

3.3 Verteilung der Zellpopulationen

Der somatosensorische Kortex lässt sich in sechs Schichten unterteilen. Jede Schicht zeigt eine andere Größe und ein anderes Verteilungsmuster von Zellen. Da jeder Zelltyp andere Aufgaben und Funktionen erfüllt, können durch die Verteilung der Zellpopulationen Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Schichten gezogen werden. In dieser Studie soll die Verteilung der GABAergen Interneurone VIP, PV und SOM untersucht werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, wurden zwei verschiedene Analysemethoden angewandt.

Zuerst wurde die Verteilung innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex untersucht. Dafür wurden anhand der Zelldichten in der Zellkernfärbung die einzelnen Schichten abgegrenzt (siehe Material und Methoden).

Eine weitere Methode stellt die *Bin size*-Analyse dar. Dafür wurden im Bereich des Barrel-Kortex, von der Pia mater bis zur weißen Substanz, Bereiche mit einer Länge von 50 μm und einer Breite von 600 μm abgegrenzt und die Zellzahlen ermittelt (siehe Material und Methoden).

3.3.1 Schichtenspezifische Verteilung der VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen in der IHC

Um Aussagen über die schichtenspezifische Verteilung von VIP/tdTomato-Zellen treffen zu können, wurden insgesamt 69 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

Für 1 mm^3 Barrel-Kortex ergibt sich eine Gesamtanzahl von $2202,0 \pm 155,2$ VIP/tdTomato-Zellen. Dabei ergibt sich folgendes Verteilungsmuster für die einzelnen Schichten: In Schicht I befinden sich $40,3 \pm 9,8$ VIP/tdTomato-Zellen, was prozentual gesehen $1,8 \pm 0,4\%$ aller VIP/tdTomato-Zellen entspricht. Schicht II/III zeigt $1309,5 \pm 70,9$ VIP/tdTomato-Zellen, was $59,5 \pm 3,2\%$ entspricht.

In Schicht IV befinden sich $489,7 \pm 72,7$ VIP/tdTomato-Zellen, entsprechend $22,2 \pm 3,3\%$. Schicht Va hat $100,1 \pm 11,4$ VIP/tdTomato-Zellen, umgerechnet $4,5 \pm 0,5\%$ und Schicht Vb zeigt $107,3 \pm 23,8$ VIP/tdTomato-Zellen, was $4,9 \pm 1,1\%$ entspricht. Für Schicht VI ergibt sich eine Zellzahl von $153,7 \pm 23,5$, was $7,0 \pm 1,1\%$ entspricht. Schicht II/III zeigt deutlich die größte Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen, Schicht I hingegen die geringste. Die Schichten I, II/III, IV und VI zeigen statistisch signifikante Unterschiede in der Zellzahl, sowohl zueinander als auch zu den anderen neokortikalen Schichten. Hingegen zeigen die Schichten Va und Vb zueinander keinen signifikanten Unterschied in der Zellzahl, wohl aber zu allen anderen Schichten (Abb. 3.13, Abb. 3.15, Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Schichtenspezifische Verteilung aller kartierten VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen

Dargestellt sind die Zellzahlen sowie das prozentuale Vorkommen von VIP/tdTomato, α PV und α SOM und ihre Verteilung über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben. Für die VIP/tdTomato-Zellen lässt sich das Zellmaximum in Schicht II/III nachweisen. Die VIP/tdTomato-Zellen zeigen in den neokortikalen Schichten I, II/III, IV und VI jeweils signifikante Unterschiede in der Zellzahl zu allen anderen Schichten (*). Die Schichten Va und Vb zeigen signifikante Unterschiede in der Zellzahl zu den neokortikalen Schichten I-IV und VI. Zueinander zeigen die Schichten Va und Vb keinen signifikanten Unterschied (*¹). Die α PV-Zellen kommen am häufigsten in den neokortikalen Schichten IV und Vb vor. Schicht I zeigt zu allen anderen Schichten einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl (*). Die neokortikale Schicht II/III zeigt signifikante Unterschiede in der Zellzahl der α PV-markierten Zellen zu den Schichten I, IV und Vb, nicht aber zu Va und VI (*²). Schicht IV zeigt signifikante Unterschiede zu allen neokortikalen Schichten mit Ausnahme von Schicht Vb (*²). Signifikante Unterschiede in der Zellzahl lassen sich für Schicht Va zu den Schichten I, IV und Vb feststellen, aber nicht zu den Schichten II/III und VI (*²). Schicht Vb zeigt außer zu Schicht IV signifikante Unterschiede in der Zellzahl der α PV-markierten Zellen (*²). Für die neokortikale Schicht VI lassen sich signifikante Unterschiede der α PV-markierten Zellen zu den Schichten I, IV und Vb nachweisen, aber nicht zu den Schichten II/III und Va (*²). Die α SOM-markierten Zellen zeigen die höchste Anzahl in den Schichten Vb und VI. Schicht I zeigt dabei signifikante Unterschiede zu allen anderen neokortikalen Schichten (*). Für die Schichten II/III und IV lassen sich signifikante Unterschiede in der Zellzahl zu allen neokortikalen Schichten, mit Ausnahme von Schicht Va nachweisen (*³). Schicht Va zeigt signifikante Unterschiede zu den Schichten I, Vb und VI, nicht aber zu den Schichten II/III und IV (*³). Die neokortikalen Schichten Vb und VI zeigen signifikante Unterschiede in der Anzahl der α SOM-markierten Zellen zu allen anderen Schichten, aber nicht zueinander (*³). Es wurde der Student's t-Test durchgeführt, mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Die p-Werte sind im Anhang in Tabelle 7.5 angegeben.

| Region | VIP/tdTomato Zellen | VIP/tdTomato Verteilung in % | α PV Zellen | α PV Verteilung in % | α SOM Zellen | α SOM Verteilung in % |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Barrel-Kortex | 2202,0±155,2 | 100,0±0,0 | 6176,8±1129,4 | 100,0±0,0 | 4318,2±429,7 | 100,0±0,0 |
| Schicht I | 40,3±9,8* | 1,8±0,4 | 1,7±2,5* | 0,0±0,0 | 11,3±6,1* | 0,3±0,1 |
| Schicht II/III | 1309,5±70,9* | 59,5±3,2 | 1082,7±227,7* ² | 17,5±3,7 | 613,2±51,2* ³ | 14,2±1,2 |
| Schicht IV | 489,7±72,7* | 22,2±3,3 | 1730,5±495,4* ² | 28,0±8,0 | 721,9±68,7* ³ | 16,7±1,6 |
| Schicht Va | 100,1±11,4* ¹ | 4,5±0,5 | 810,7±170,0* ² | 13,1±2,8 | 603,6±101,0* ³ | 14,0±2,3 |
| Schicht Vb | 107,3±23,8* ¹ | 4,9±1,1 | 1558,9±200,3* ² | 25,2±3,2 | 1272,4±180,5* ³ | 29,5±4,2 |
| Schicht VI | 153,7±23,5* | 7,0±1,1 | 993,1±173,6* ² | 16,1±2,8 | 1096,6±217,9* ³ | 25,4±5,0 |

Für den PV-Antikörper wurden insgesamt 16 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht. In 1 mm³ Barrel-Kortex sind 6176,8±1129,4 Zellen mit dem PV-Antikörper markiert. In Schicht I sind es 1,7±2,5 Zellen. Schicht II/III zeigt 1082,7±227,7 Zellen, die mit α PV markiert sind. Für Schicht IV ergibt sich eine Anzahl von 1730,5±495,4 Zellen. In Schicht Va sind 810,7±170,0 und in Schicht Vb 1558,9±200,3 Zellen mit dem PV-Antikörper markiert. Schicht VI zeigt eine Anzahl von 993,1±173,6 Zellen, die den Antikörper tragen. Dadurch zeigt sich, dass die meisten Zellen, die mit α PV markiert sind in Schicht IV liegen (28,0±8,0%). Die geringste Anzahl ist in Schicht I zu finden (0,03±0,03%). Schicht I zeigt dabei zu allen neokortikalen Schichten einen statistisch signifikanten Unterschied in der Zellzahl. Für Schicht II/III lässt sich ein signifikanter Unterschied zu den Schichten I, IV und Vb feststellen. Schicht IV zeigt, mit Ausnahme von Vb, zu allen neokortikalen Schichten einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl. Signifikante Unterschiede lassen sich für Schicht Va zu den Schichten I, IV und Vb nachweisen.

Für Schicht Vb zeigen sich zu allen Schichten, außer Schicht IV, signifikante Unterschiede in der Zellzahl. Die neokortikale Schicht VI zeigt statistisch signifikante Unterschiede in der Anzahl der α PV-markierten Zellen zu den Schichten I, IV und Vb (Abb. 3.13, Abb. 7.5, Tab. 3.2).

Um Angaben über die Verteilung des SOM-Antikörpers machen zu können, wurden 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

Für 1 mm³ Barrel-Kortex zeigt sich eine Gesamtanzahl von 4318,2±429,7 Zellen, die mit dem SOM-Antikörper markiert sind. Dabei ergibt sich für die einzelnen Schichten folgendes Verteilungsmuster: 11,3±6,1 Zellen, die mit α SOM markiert sind befinden sich in Schicht I, was 0,3±0,1% der Zellen entspricht und damit die geringste Anzahl ausmacht. In Schicht II/III zeigen 613,2±51,2 (14,2±1,2%) Zellen eine Markierung mit α SOM. Schicht IV hat 721,9±68,7 Zellen, die den Antikörper tragen, entsprechend 16,7±1,6%. Für Schicht Va ergibt sich eine Anzahl von 603,6±101,0 (14,0±2,3%) und für Schicht Vb ergibt sich eine Anzahl von 1272,4±180,5 α SOM-markierte Zellen. Der prozentuale Anteil in Schicht Vb beträgt 29,5±4,2 und macht damit die größte Zellanzahl aus. In Schicht VI tragen 1096,6±217,9 der Zellen den SOM-Antikörper, was 25,4±5% entspricht. Für die neokortikale Schicht I können signifikante Unterschiede in der Zellzahl zu allen anderen Schichten nachgewiesen werden. Schicht II/III und Schicht IV zeigen zu allen Schichten signifikante Unterschiede in der Zellzahl, mit Ausnahme von Schicht Va. Für Schicht Va lassen sich statistisch signifikante Unterschiede zu den Schichten I, Vb und VI nachweisen. Die Schichten Vb und VI zeigen signifikante Unterschiede in der Anzahl der α SOM-markierten Zellen zu allen neokortikalen Schichten, aber nicht zueinander (Abb. 3.13, Abb. 7.5, Tab. 3.2).

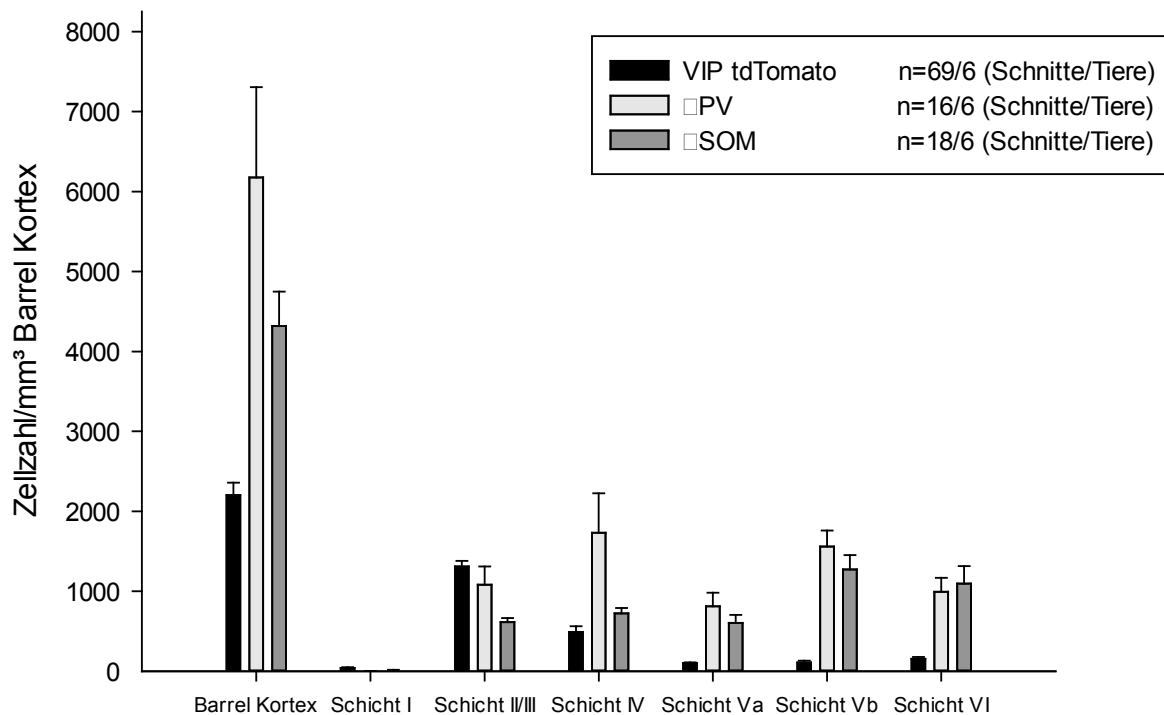


Abbildung 3.13: Verteilung aller VIP/tdTomato-, αPV- und αSOM-Zellen in der IHC

Die Balkendiagramme stellen die Verteilung der VIP/tdTomato-, αPV- und αSOM-Neurone innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex dar. Die größte Zellpopulation stellen die αPV-markierten Interneurone dar. Die VIP/tdTomato-Zellen hingegen die geringste. Für die neokortikale Schicht I lässt sich insgesamt eine sehr geringe Anzahl an Zellen finden. Die VIP/tdTomato-Zellen zeigen die größte Anzahl in Schicht II/III. Für die αPV-markierten Zellen lassen sich die meisten Zellen in den neokortikalen Schichten IV und Vb aufzeigen. Die Schichten Vb und VI enthalten die meisten αSOM-positiven Zellen. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben.

3.3.2 Schichtenspezifische Verteilung aller VIP/tdTomato-, *Gad1*-, *Pvalb*- und *Sst*-Zellen in der FISH

Um Aussagen über die Verteilung der *Gad1*-Sonde innerhalb der Schichten des Barrel Kortex treffen zu können, wurden insgesamt 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

In 1 mm³ Barrel-Kortex lassen sich 16869,1±1792,0 Zellen nachweisen, die mit der *Gad1*-Sonde markiert sind. Für die einzelnen Schichten ergibt sich dabei folgendes Verteilungsmuster: Schicht I zeigt mit 885,1±219,2 (5,2±1,3%) der *Gad1*-markierten Zellen die geringste Zellzahl. Die Schichten II-VI hingegen zeigen ein Verteilungsmuster mit Zellzahlen zwischen 3442,4±332,9 (Schicht VI) und 4460±584,7 (Schicht V), was einer prozentualen Verteilung der einzelnen Schichten zwischen 20,4±2,0% (Schicht VI) und 26,4±3,5% (Schicht V) entspricht. Es lassen sich statistisch signifikante Unterschiede in der Zellzahl nachweisen. Die Schichten I, Va, Vb und VI zeigen signifikante Unterschiede zu allen Schichten, die Schichten II/III und IV zu allen anderen Schichten, aber nicht zueinander (Tab. 3.3).

Um die Verteilung aller VIP/tdTomato-Zellen in der FISH analysieren zu können, wurden 72 Schnitte von insgesamt 6 verschiedenen Tieren untersucht.

Für 1 mm³ Barrel-Kortex lässt sich eine Gesamtzahl von 2433,1±172,6 VIP/tdTomato-Zellen nachweisen. Schicht I zeigt dabei mit 48,6±12,0 VIP/tdTomato-Zellen (entsprechend 2,0±0,5%) die geringste Anzahl. Mit 1413,9±102,1 (58,1±4,2%) VIP/tdTomato-Zellen liegt das Maximum in Schicht II/III. Auf Schicht IV fallen 552,1±68,4 VIP/tdTomato-Zellen ab, was umgerechnet 22,7±2,8% entspricht. Schicht Va zeigt 108,0±9,0 (4,4±0,4%) und Schicht Vb 126,1±15,1 (5,2±0,6%) VIP/tdTomato-Zellen. In Schicht VI sieht man wieder eine leichte Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu Va und Vb. Alle Schichten zeigen untereinander signifikante Unterschiede in der Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen (Abb. 3.14, Abb. 3.15, Tab. 3.3).

Für die Verteilung der Zellen, die mit der *Pvalb*-Sonde markiert sind, wurden insgesamt 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

In 1 mm³ Barrel-Kortex lassen sich 8601,8±942,2 Zellen nachweisen, die mit der *Pvalb*-Sonde markiert sind. Die geringste Anzahl davon befindet sich in Schicht I. 15,4±1,7% der markierten Zellen liegen in Schicht II/III. Das Maximum an *Pvalb*-markierten Zellen zeigt Schicht IV mit 2369,7±296,7 Zellen, entsprechend 27,5±3,4%. In Schicht Va liegen 1134,7±191,1 (13,2±2,2%) und in Schicht Vb 2292,8±302,5 (26,7±3,5%) der Zellen, die die *Pvalb*-Sonde tragen. 17,2±1,8% der markierten Zellen fallen auf Schicht VI ab. Schicht I zeigt dabei einen statistisch signifikanten Unterschied zu allen anderen Schichten. Für Schicht II/III können signifikante Unterschiede zu den Schichten I, IV und Vb nachgewiesen werden. Die neokortikalen Schichten IV und Vb zeigen zueinander keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Zellzahl, wohl aber zu allen anderen Schichten. Für die Schichten Va und VI lassen sich signifikante Unterschiede zu allen Schichten aufzeigen, mit Ausnahme von Schicht II/III (Abb. 3.14, Abb. 7.5, Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Schichtenspezifische Verteilung aller VIP/tdTomato-, Gad1-, Pvalb- und Sst-Zellen in der FISH

Dargestellt sind die Zellzahlen sowie das prozentuale Vorkommen von VIP/tdTomato, Gad1, Pvalb und Sst und ihre Verteilung über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben. Für die VIP/tdTomato-Zellen lässt sich das Maximum in Schicht II/III nachweisen. Alle Schichten zeigen untereinander signifikante Unterschiede in der Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen (*). Bei der Gad1-Sonde zeigt sich, dass die Schichten I, Va, Vb und VI signifikante Unterschiede zueinander zeigen (*). Die Schichten II/III und IV zeigen keinen signifikanten Unterschied zueinander, aber zu allen anderen neokortikalen Schichten (*¹). Die meisten Zellen, die mit der Pvalb-Sonde markiert sind befinden sich in den Schichten IV und Vb. Schicht I zeigt dabei zu allen anderen Schichten einen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Pvalb-markierten Zellen (*). Die neokortikale Schicht II/III zeigt signifikante Unterschiede zu den Schichten I, IV und Vb, nicht aber zu den Schichten Va und VI (*²). Schicht IV zeigt zu allen anderen Schichten einen signifikanten Unterschied, mit Ausnahme von Schicht Vb (*²). Für die neokortikale Schicht Va konnten signifikante Unterschiede zu allen anderen Schichten außer zu Schicht II/III nachgewiesen werden (*²). Schicht Vb zeigt zu allen anderen neokortikalen Schichten einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl, mit Ausnahme von Schicht IV (*²). Signifikante Unterschiede in der Zellzahl konnten für Schicht VI zu allen anderen neokortikalen Schichten gezeigt werden, außer zu Schicht II/III (*²). Für die Sst-markierten Zellen konnte die größte Anzahl in Schicht Vb und VI nachgewiesen werden. Die Schichten I und II/III zeigen dabei signifikante Unterschiede zu allen anderen Schichten (*). Die neokortikalen Schichten IV und Va zeigen signifikante Unterschiede zu allen Schichten, aber nicht zueinander (*³). Gleiches gilt für die Schichten Vb und VI. Auch hier konnten signifikante Unterschiede zu allen anderen Schichten, aber nicht zueinander nachgewiesen werden (*³). Es wurde der Student's t-Test durchgeführt, mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Die p-Werte sind im Anhang in Tabelle 7.5 angegeben.

| Region | VIP/tdTomato Zellen | VIP/tdTomato Verteilung in % | Gad1-Sonde Zellen | Gad1-Sonde Verteilung in % | Pvalb-Sonde Zellen | Pvalb-Sonde Verteilung in % | Sst-Sonde Zellen | Sst-Sonde Verteilung in % |
|----------------|---------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Barrel-Kortex | 2433,1±172,6 | 100,0±0,0 | 16869,1±1792,0 | 100,0±0,0 | 8601,8±942,2 | 100,0±0,0 | 6061,0±693,4 | 100,0±0,0 |
| Schicht I | 48,6±12,0* | 2,0±0,5 | 885,1±219,2* | 5,2±1,3 | 1,0±2,3* | 0,0±0,0 | 10,3±8,8* | 0,2±0,1 |
| Schicht II/III | 1413,9±102,1* | 58,1±4,2 | 4050,4±473,2* ¹ | 24,0±2,8 | 1323,1±143,8* ² | 15,4±1,7 | 773,7±96,5* | 12,8±1,6 |
| Schicht IV | 552,1±68,4* | 22,7±2,8 | 4036,9±425,6* ¹ | 23,9±2,5 | 2369,7±296,7* ² | 27,5±3,4 | 929,9±113,7* ³ | 15,3±1,9 |
| Schicht Va | 108,0±9,0* | 4,4±0,4 | 1773,5±298,7* | 10,5±1,8 | 1134,7±191,1* ² | 13,2±2,2 | 971,8±140,8* ³ | 16,0±2,3 |
| Schicht Vb | 126,1±15,1* | 5,2±0,6 | 2686,5±303,7* | 15,9±1,8 | 2292,8±302,5* ² | 26,7±3,5 | 1636,7±197,1* ³ | 27,0±3,3 |
| Schicht VI | 201,2±23,8* | 8,3±1,0 | 3442,4±332,9* | 20,4±2,0 | 1480,4±152,5* ² | 17,2±1,8 | 1738,6±278,3* ³ | 28,7±4,6 |

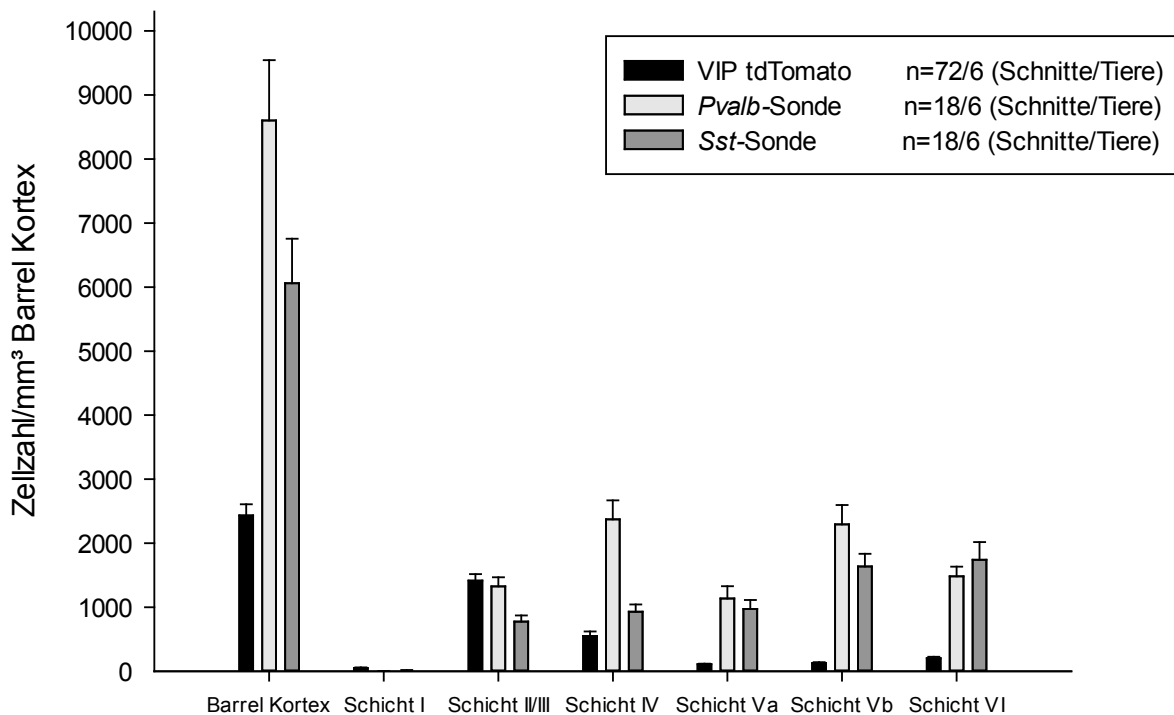


Abbildung 3.14: Verteilung aller VIP/tdTomato-, *Pvalb*- und *Sst*-Zellen in der FISH

Die Balkendiagramme stellen die Verteilung der VIP/tdTomato-, *Pvalb*- und *Sst*-Zellen innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und für 1 mm³ Barrel-Kortex dar. Die größte Zellpopulation stellen die *Pvalb*-markierten Zellen dar. Die VIP/tdTomato-Zellen hingegen die geringste. Für die neokortikale Schicht I lässt sich insgesamt eine sehr geringe Anzahl an Zellen finden. Die VIP/tdTomato-Zellen zeigen die größte Anzahl in Schicht II/III. Für die *Pvalb*-markierten Zellen lassen sich die meisten Zellen in den neokortikalen Schichten IV und Vb aufzeigen. Die Schichten Vb und VI enthalten die meisten *Sst*-positiven Zellen. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben.

Um Aussagen über die Verteilung der *Sst*-markierten Zellen treffen zu können, wurden 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

Die Gesamtzahl an Zellen, die mit der *Sst*-Sonde markiert sind beträgt 6061,0±693,4 für 1 mm³ Barrel-Kortex. Mit 10,3±8,8 *Sst*-markierten Zellen zeigt Schicht I die geringste Anzahl. Es lässt sich innerhalb der Schichten ein Anstieg an Zellen, die mit der *Sst*-Sonde markiert sind, aufzeigen. In Schicht VI wird mit 1738,6±278,3 *Sst*-markierten Zellen das Maximum erreicht. Die neokortikalen Schichten I und II/III zeigen statistisch signifikante Unterschiede in der Anzahl an *Sst*-markierten Zellen zu allen anderen Schichten. Für die Schichten IV und Va lässt sich zueinander kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl nachweisen. Beide Schichten zeigen aber einen statistisch signifikanten Unterschied zu allen anderen neokortikalen Schichten. Gleiches gilt für die Schichten Vb und VI. Zueinander ist keine statistische Signifikanz gegeben, wohl aber zu allen anderen Schichten (Abb. 3.14, Abb. 7.5, Tab. 3.3).

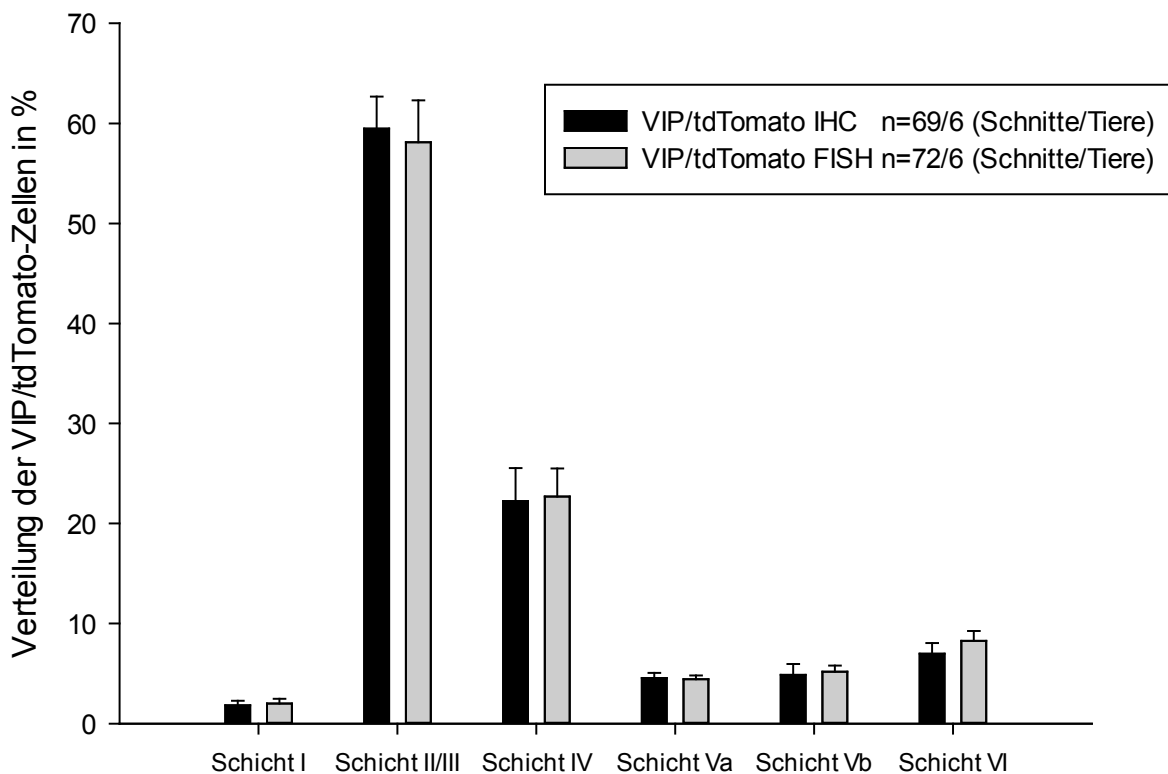


Abbildung 3.15: Verteilung aller VIP/tdTomato-Zellen innerhalb des Barrel-Kortex

Die Balkendiagramme stellen die prozentuale Verteilung aller VIP/tdTomato-Zellen innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex dar. Die Ergebnisse der IHC und der FISH sind gegenübergestellt. Sowohl für die IHC als auch für die FISH lassen sich die meisten VIP/tdTomato-Zellen in Schicht II/III nachweisen. Schicht I zeigt bei beiden Färbemethoden die geringste Anzahl an Zellen. Das Verteilungsmuster der VIP/tdTomato-Zellen stimmt zwischen IHC und FISH überein. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben.

Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass die unterschiedlichen Zellpopulationen das gleiche Verteilungsmuster in der IHC und in der FISH zeigen.

3.3.3 *Bin size*-Analyse der IHC

Um die Ergebnisse der schichtenspezifischen Analyse zu überprüfen, wurde zusätzlich die Methode der *Bin size*-Analyse angewandt. Für die Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen wurden insgesamt 69 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

Für 1 mm³ Barrel-Kortex beträgt die Gesamtanzahl an VIP/tdTomato-Zellen 2381,0±57,0. In den ersten 50 µm sind 14,5±8,8 VIP/tdTomato-Zellen nachzuweisen. Die meisten VIP/tdTomato-Zellen lassen sich in einer Entfernung von 100-350 µm zur Pia mater finden, wobei das Zellmaximum mit 415,9±36,7 in einer Distanz von 150 µm erreicht wird. Danach ist ein Absinken der Zellzahlen bis zu einer Entfernung von 850 µm zu sehen. Von 850-900 µm ist dann wieder ein geringfügiger Anstieg in der Zellanzahl (35,7±10,2 VIP/tdTomato-Zellen) zu verzeichnen. Bei einer Distanz von 1000 µm zur Pia liegt die Anzahl an VIP/tdTomato-Zellen bei 10,6±4,9 und hat damit ihr Minimum erreicht (Abb. 3.16, Tab. 7.4).

Für die Verteilung der PV-exprimierenden Zellen innerhalb des Barrel-Kortex wurden 16 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren mit der *Bin size*-Analyse untersucht.

Die Gesamtzahl an Zellen, die mit dem PV-Antikörper markiert sind, beträgt für 1 mm³ Barrel-Kortex 6888,5±1454,2. In den ersten 50 µm lassen sich keine Zellen nachweisen, an die der Antikörper gebunden hat. Von 100-450 µm steigt die Zellanzahl steil an, nimmt dann wieder bis 550 µm ab und erreicht in einer Distanz von 600 µm zur Pia ihr Maximum mit 742,7±190,3 Zellen, die mit αPV markiert sind. Danach ist ein Absinken der Zellzahlen zu verzeichnen. Das Minimum an Zellen, an die der PV-Antikörper gebunden hat, lässt sich in einer Entfernung von 1000 µm zur Pia mit 15±16,2 Zellen zeigen (Abb. 3.16, Tab. 7.4).

Um Aussagen über die Verteilung der SOM-exprimierenden Interneurone treffen zu können wurden 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren für den SOM-Antikörper untersucht.

In 1 mm³ Barrel-Kortex sind 4524,0±624,2 Zellen mit dem SOM-Antikörper markiert. In den ersten 50 µm hat der Antikörper an keine Zelle gebunden. Von 50-100 µm sind 45,7±33,9 Zellen mit dem SOM-Antikörper markiert und zeigen außerdem die geringste Anzahl an Zellen innerhalb der *Bins*, die mit αSOM markiert sind. Die Anzahl der αSOM-markierten Zellen nimmt von da an bis zu einer Distanz von 300 µm zu. Zwischen 300 und 400 µm ist ein Rückgang der Zellanzahl zu verzeichnen. Danach steigt die Zellzahl wieder an und erreicht mit 548,9±126,7 Zellen in einer Entfernung von 650 µm ihr Maximum. Die Anzahl der αSOM-markierten Zellen nimmt anschließend wieder ab (Abb. 3.16, Tab. 7.4).

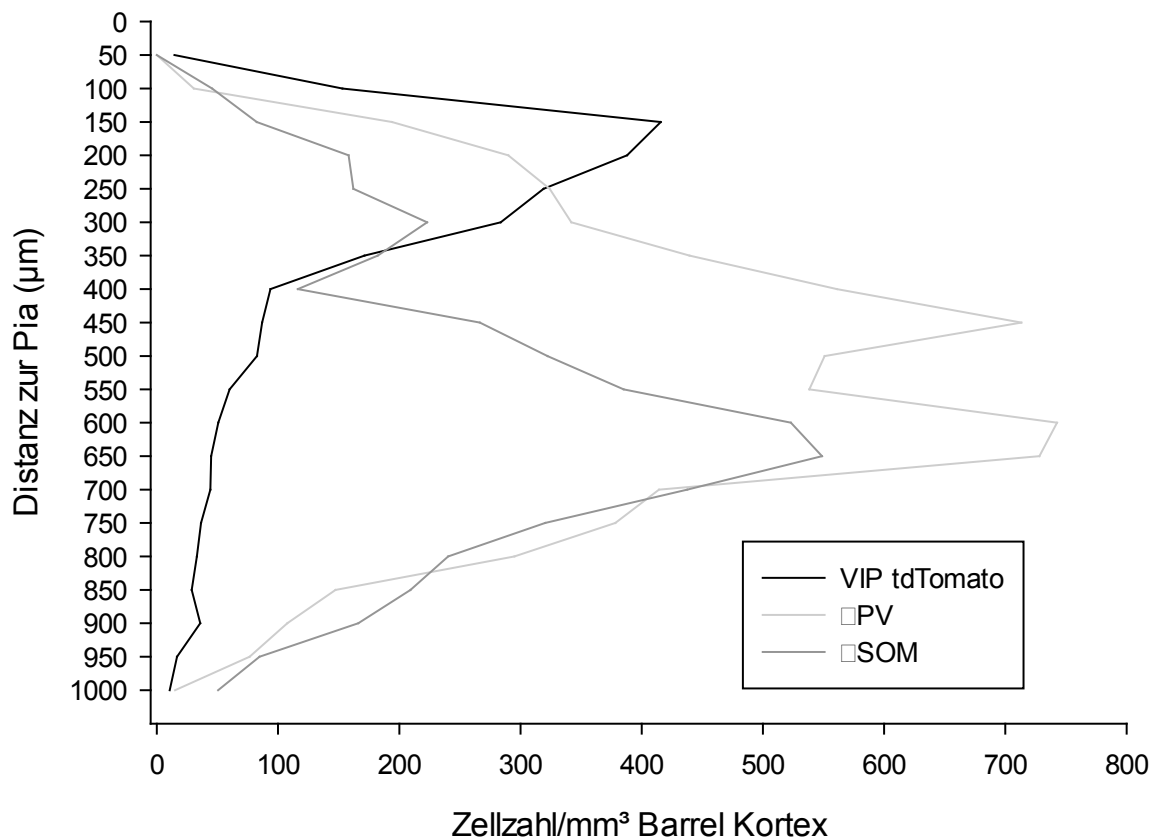


Abbildung 3.16: Verteilung aller VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen in der IHC

Die Liniendiagramme zeigen die Verteilung der VIP/tdTomato-, α PV- und α SOM-Zellen über den Barrel-Kortex. Für die VIP/tdTomato-Zellen lässt sich das Zellmaximum in einer Distanz von 150 μm zur Pia mater nachweisen. Die Verteilung der PV-markierten Zellen zeigt zwei Gipfel. Den ersten in einer Distanz von 450 μm und den zweiten bei 600 μm Entfernung zur Pia mater. Das Zellmaximum der SOM-markierten Zellen liegt bei 650 μm .

3.3.4 Bin size-Analyse der FISH

Die Ergebnisse für die FISH in der schichtenspezifischen Analyse wurden ebenfalls mithilfe der *Bin size*-Analyse überprüft. Dafür wurden für die Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen insgesamt 72 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren ausgewertet.

Die Gesamtanzahl an VIP/tdTomato-Zellen für 1 mm^3 Barrel-Kortex beträgt $2226,4 \pm 216,1$. Die Verteilung über die einzelnen *Bins* zeigt sich wie folgt: In den ersten 50 μm sind $13,4 \pm 11,3$ VIP/tdTomato-Zellen nachzuweisen. Bis zu einer Distanz von 150 μm steigt die Zellzahl steil an und erreicht dort mit $400,3 \pm 60,3$ VIP/tdTomato-Zellen ihr Maximum. Danach nimmt die Zellzahl ab und erreicht ein Minimum von $9,0 \pm 4,4$ VIP/tdTomato-Zellen in einer Entfernung von 1000 μm zur Pia. Zwei kleinere Anstiege in der Zellzahl sind außerdem in einer Distanz von 700 und 900 μm festzustellen (Abb. 3.17, Tab. 7.4).

Um die Verteilung der *Pvalb*-Zellen innerhalb des Barrel-Kortex zu analysieren, wurden 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren untersucht.

Für 1 mm³ Barrel-Kortex zeigen $8635,2 \pm 1174,8$ Zellen eine Markierung mit der *Pvalb*-Sonde. In den ersten 50 µm ist keine Zelle mit der Sonde markiert. Danach steigt die Zellzahl bis zu einer Distanz von 400 µm auf $785,5 \pm 136,0$ an, nimmt im folgenden *Bin* ab und erreicht dann bei einer Entfernung von 600 µm zur Pia mit $928,9 \pm 188,8$ markierten Zellen ihr Maximum. Anschließend nimmt die Anzahl an Zellen, die mit der *Pvalb*-Sonde markiert sind bis auf $14,1 \pm 19,2$ (Minimum an Zellen) ab. Bei 750 µm ist nochmals ein geringfügiger Anstieg der Zellzahl festzustellen (Abb. 3.17, Tab. 7.4).

Die Ergebnisse der schichtenspezifischen Analyse wurden auch für die *Sst*-exprimierenden Neurone mithilfe der *Bin size*-Analyse untersucht. Dazu wurden 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren analysiert.

In 1 mm³ Barrel-Kortex lässt sich eine Gesamtzahl von $6001,7 \pm 633,1$ Zellen nachweisen, die mit der *Sst*-Sonde markiert sind. In den ersten 50 µm befinden sich mit $4,4 \pm 6,3$ die wenigsten Zellen, die mit der Sonde markiert sind. Danach nimmt die Zellzahl auf $237,0 \pm 55,2$ bis zu einer Distanz von 300 µm zu. Zwischen 300 und 400 µm sinkt die Anzahl an Zellen, die die *Sst*-Sonde tragen, geringfügig ab. Anschließend steigt die Zellzahl auf $726,3 \pm 152,9$ an und erreicht bei einer Distanz von 600 µm zur Pia ihr Maximum. Im Folgenden ist ein stetiges Absinken der *Sst*-markierten Zellen zu verzeichnen (Abb. 3.17, Tab. 7.4).

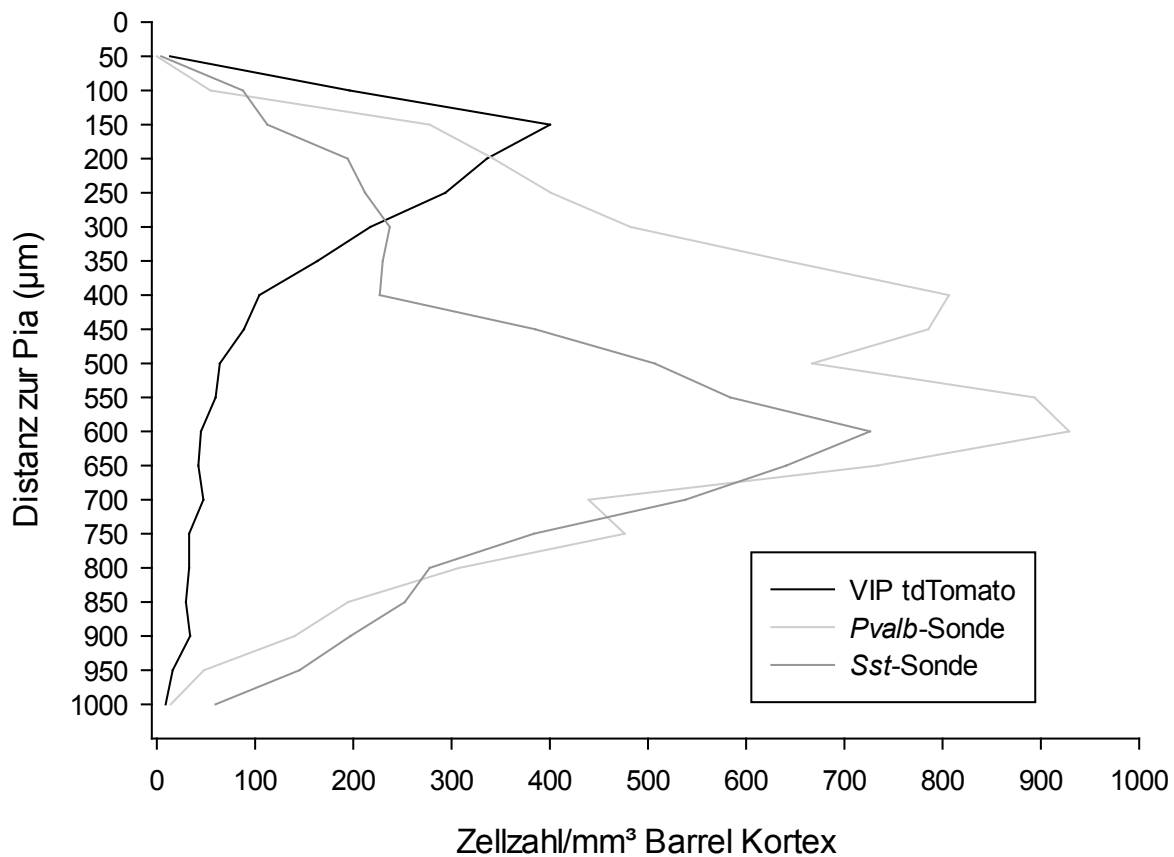


Abbildung 3.17: Verteilung aller VIP/tdTomato-, Pvalb- und Sst-Zellen in der FISH

Die Liniendiagramme zeigen die Verteilung der VIP/tdTomato-, Pvalb- und Sst-Zellen über den Barrel-Kortex. Für die VIP/tdTomato-Zellen lässt sich das Zellmaximum in einer Distanz von 150 µm zur Pia mater nachweisen. Die Verteilung der Pvalb-markierten Zellen zeigt zwei Gipfel. Den ersten in einer Distanz von 400 µm und den zweiten bei 600 µm Entfernung zur Pia mater. Das Zellmaximum der Sst-markierten Zellen liegt bei 600 µm.

Für die Verteilung der einzelnen Zellpopulationen in der *Bin size*-Analyse lässt sich zusammenfassend beschreiben, dass die einzelnen Zellgruppen die gleichen Verteilungsmuster in der IHC und in der FISH zeigen.

Vergleicht man die schichtenspezifische Verteilung der VIP/tdTomato-Zellen mit den Ergebnissen der *Bin size*-Analyse, dann erkennt man, dass in einer Entfernung von 150 µm zur Pia die Anzahl der VIP/tdTomato-Zellen am höchsten ist, was Schicht II/III entspricht. In Schicht II/III haben sich auch in der schichtenspezifischen Analyse die meisten VIP/tdTomato-Zellen nachweisen lassen. Für die PV-Zellen konnten zwei Peaks in der *Bin size*-Analyse gezeigt werden. Der erste lag bei 400-450 µm und der zweite bei 600 µm, was den Schichten IV und Vb entspricht. Vergleicht man diese Ergebnisse wiederum mit der schichtenspezifischen Analyse, so erkennt man, dass auch hier die Verteilung übereinstimmt. Das Gleiche zeigt sich auch bei den SOM-Zellen. Hier lag das Maximum an Zellen bei 600-650 µm in der *Bin size*-Analyse, was den Schichten Vb und VI entspricht und auch die Ergebnisse der schichtenspezifischen Analyse zeigen das gleiche Resultat.

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die *VIPcre/tdTomato*-Mauslinie neurochemisch im primären somatosensorischen Kortex zu charakterisieren. Es sollten sowohl Aussagen über die Spezifität und Sensitivität der fluoreszierenden tdTomato-Zellen getroffen werden als auch deren Verteilung schichtenspezifisch und durch die Methodik der *Bin size*-Analyse untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde außerdem der Unterschied der Verteilung von 2 anderen Hauptklassen von GABAergen Interneuronen analysiert, nämlich der PV- und SOM-Zellen. Die Markierung der VIP-, PV- und SOM-Zellen erfolgte mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Für GAD1 und VGLUT1 wurden ausschließlich Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen durchgeführt.

Anhand der Ergebnisse der Untersuchung können folgende Hauptaussagen getroffen werden:

1. Es handelt sich bei den fluoreszierenden tdTomato-Zellen in der *VIPcre/tdTomato*-Maus um VIP-Zellen.
2. VIP-Zellen sind inhibitorische GABAerge Interneurone.
3. Die meisten VIP-Zellen sind in Schicht II/III zu finden.

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Epifluoreszenz- und konfokale Mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist sowohl für immunhistochemische Färbungen als auch für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen einsetzbar. Fluoreszenzfarbstoffe werden mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlen Licht einer anderen Wellenlänge ab. Durch bestimmte Filter wird nur das abgestrahlte Licht beobachtet und aufgenommen. Mit Hilfe des ApoTomes, einem speziellen Zusatzinstrument für Epifluoreszenzmikroskope, soll sichergestellt werden, dass nur Licht aus der gerade eingestellten optischen Fokusebene abgebildet wird und Überstrahlungen aus anderen Ebenen eliminiert werden. Jedoch konnte in Experimenten gezeigt werden, dass dies bei zunehmender Dicke des zu scannenden Präparates immer schwieriger wird. Die Problematik beginnt ab einer Tiefe von 27 μm (Weigel et al. 2009). Für diese Studie wurden 40 μm dicke Gehirnschnitte verwendet. Durch die Färbungen mittels IHC und FISH und die damit verbundene Belastung für die Schnitte, hatten diese am Ende der Färbung im Mittel nur noch eine Dicke von 20 μm nach der IHC und 21 μm nach der FISH. Somit stellte die Schnittdicke keine größere Problematik für die Epifluoreszenzmikroskopie dar.

Ein Vorteil des für diese Studie verwendeten AxioImager.M2 mit ApoTome ist, dass am Ende der Aufnahme ein kompletter 3D-Bildstapel des gesamten gescannten Areals vorliegt, in dem dann virtuell mikroskopiert und quantitativ analysiert werden kann.

Das Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie besteht darin, dass ein Laserstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge das zu scannende Präparat abrastert. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird von einem Photomultiplier aufgenommen und gemessen. Jedes Fluoreszenzsignal wird einem Bildpunkt zugeordnet, wodurch mit spezieller Computersoftware ein vollständiges Bild entsteht. Im Strahlengang des detektierten Lichtes befindet sich eine Lochblende, die dafür sorgt, dass nur Licht aus einer schmalen Schicht um die Fokusebene zum Detektor gelangt. Dadurch erhöht sich der Kontrast des aufgenommenen Bildes. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bietet die Möglichkeit von sequenziellen Scans. Dadurch ist immer nur ein Laser einer bestimmten Wellenlänge aktiv, um die Fluoreszenz anzuregen. Fluoreszenzen anderer Wellenlängen können so nicht wesentlich angeregt werden und es kann nicht zum sogenannten „Durchbluten“ (engl. *bleed through*) der unterschiedlichen Farbkanäle kommen. Dies hat besondere Relevanz für Kollokationen. Für diese Studie wurden für jeden Antikörper bzw. für jede Sonde eine Aufnahme am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop SP2 in 20facher Vergrößerung angefertigt. Ziel dieser Aufnahmen war es, die Verlässlichkeit der Epifluoreszenzaufnahmen zu überprüfen, da diese eine wesentlich stärkere Ausbleichung des Fluoreszenzsignals aufwiesen und es filtertechnisch eine größere Gefahr des Durchblutens gab. Es konnte durch die konfokalen Aufnahmen jedoch gezeigt werden, dass es sich bei den Kollokationen tatsächlich um Überlagerungen von Antikörper bzw. Sonde und den VIP/tdTomato-Zellen handelt und nicht um Artefakte, die durch das „Durchbluten“ der einzelnen Farbkanäle entstanden sind (Abb 4.1).

Wie Weigel et al. bereits 2009 beschrieben haben, ist bei richtiger Einstellung des Epifluoreszenzmikroskops mit ApoTome und dünnen histologischen Schnitten die Qualität der Aufnahmen mit der am konfokalen Mikroskop vergleichbar.

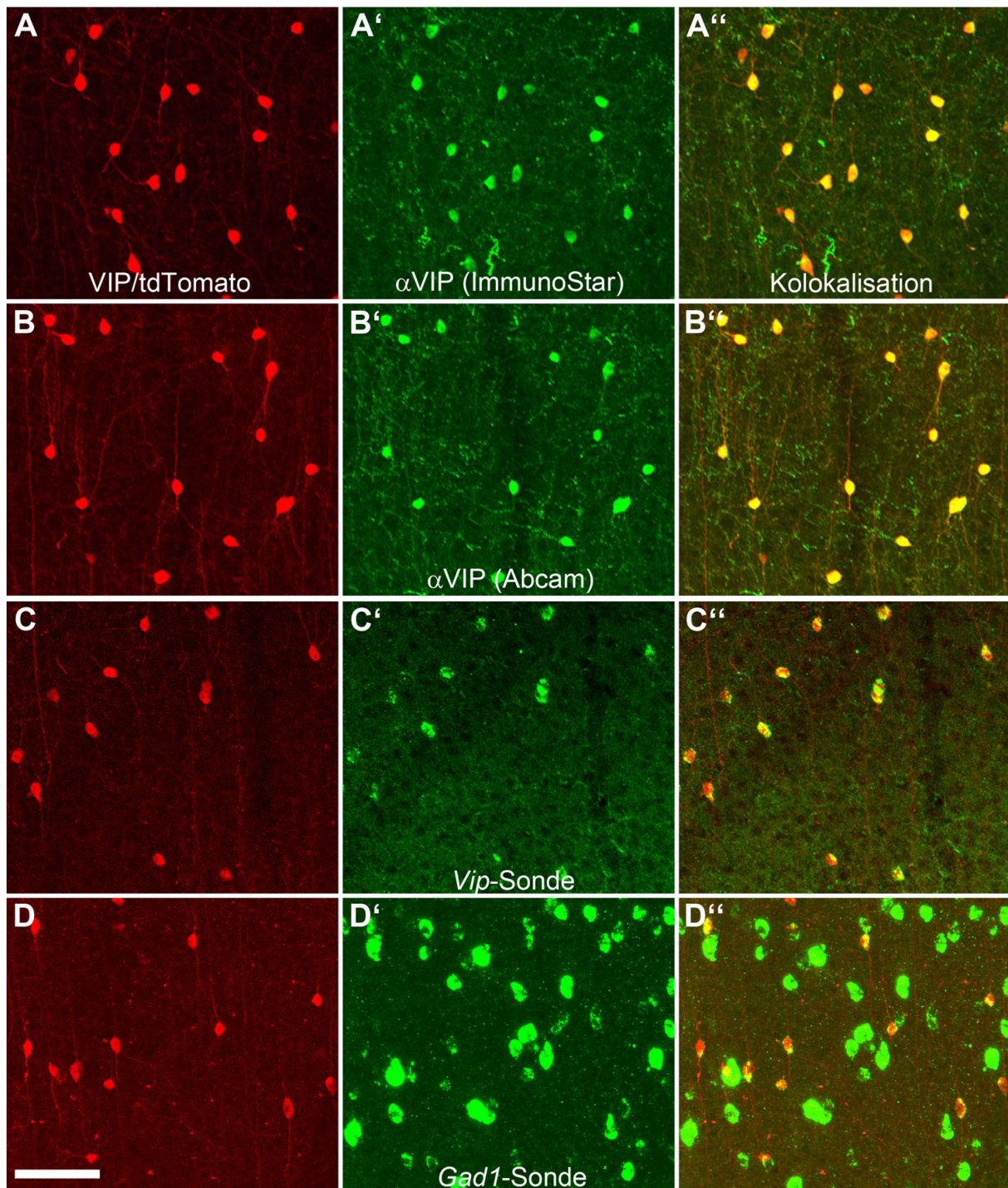


Abbildung 4.1: Konfokale Aufnahmen der IHC und FISH

Die IHC des VIP(ImmunoStar)- (A-A'') und VIP(Abcam)-Antikörpers (B-B'') und die FISH der *Vip*- (C-C'') und *Gad1*-Sonde (D-D'') an frontalen Himschnitten der *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal (A-D), in grün das Antikörper/Sonden-Signal (A'-D') und deren Übereinanderlagerung (A''-D''). Kollaborationen erscheinen gelb. Die Aufnahmen sind „*maximum intensity projections*“ im Bereich des Barrel-Kortex. Alle tdTomato-positiven Zellen zeigen jeweils eine Kollaboration mit den VIP-Antikörpern, der *Vip*- und der *Gad1*-Sonde. Maßstab: 50 µm

4.1.2 Manuelles Abgrenzen der Schichten und *Bin size*-Analyse

Die Unterteilung der einzelnen Schichten erfolgte manuell anhand der unter 1.1 aufgeführten Kriterien.

Kurz zusammengefasst lässt sich die Größe der Schichten folgendermaßen beschreiben: Schicht I macht 5,7% der gesamten Kortexdicke, Schicht II/III 19,4%, Schicht IV 17,2%, Schicht V 20,5% und Schicht VI 37,3% aus (DeFelipe et al. 2002).

Die Methode des manuellen Einzeichnens der kortikalen Schichten ist sicherlich als kritisch zu betrachten, da Ungenauigkeiten in ca. 5-10% der Fälle zu falschen Ergebnissen führen können.

Deshalb wurde zusätzlich zur Einteilung des Barrel-Kortex in neokortikale Schichten dessen gleichmäßige Einteilung mit einer konstanten Länge durchgeführt. Die Kortexdicken wurden von der Pia mater bis zur weißen Substanz in 50 μm lange und 600 μm breite *Bins* unterteilt. Innerhalb dieser *Bins* wurde die Zellanzahl der verschiedenen Zellpopulationen mit der Software Neuroexplorer bestimmt. Durch die *Bin size*-Analyse war somit eine Überprüfung der Verlässlichkeit der schichtenspezifischen Analyse möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die Resultate der schichtenspezifischen Analyse mit denen der *Bin size*-Analyse sehr gut übereinstimmen.

In einer Entfernung von 150 μm zur Pia lassen sich die meisten VIP-Zellen nachweisen, was nach DeFelipe et al. Schicht II/III entspricht. Für die schichtenspezifische Analyse ergab sich ein korrespondierendes Ergebnis. Auch hier konnten die meisten VIP-Zellen in Schicht II/III nachgewiesen werden. Für die PV-positiven Zellen konnten zwei Zellmaxima gezeigt werden. Das erste lag in einer Entfernung von 400-450 μm zur Pia und das zweite bei 600 μm . Nach DeFelipe et al. entspricht das den Schichten IV und Vb. Die schichtenspezifische Analyse spiegelt genau dieses Ergebnis wieder. Das Zellmaximum der SOM-positiven Zellen liegt in einer Distanz von 600-650 μm zur Pia, was Schicht Vb bzw. VI entspricht (DeFelipe et al. 2002). Das Ergebnis der schichtenspezifischen Analyse stimmt mit diesem Resultat überein.

4.1.3 Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei der für diese Studie durchgeführten IHC handelt es sich um eine indirekte Immunmarkierung. Der Primärantikörper bindet an die entsprechenden Epitope der Zielzellen. In einem zweiten Schritt bindet der Sekundärantikörper, der mit einem Farbstoff gekoppelt ist, an den Primärantikörper. Der Vorteil der indirekten Immunmarkierung besteht darin, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können und es somit zur Signalverstärkung kommt.

In dieser Studie wurden nur polyklonale Primärantikörper eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass sie in hoher Zahl an die Epitope der Zielzellen binden können und es so zu einer stärkeren Markierung kommt.

Dagegen wird bei der eingesetzten FISH die mRNA für ausgewählte Gene in den Zielzellen nachgewiesen. Dies geschieht über Paarung komplementärer Basen auf zwei Nukleinsäure-Einzelsträngen. Ein Nukleinsäurestrang, in diesem Fall eine RNA-Sequenz, kommt von der zuvor hergestellten Sonde. Der andere Strang ist die zu untersuchende mRNA in den Zielzellen. Die an die mRNA gebundenen Sondenmoleküle werden dann über eine indirekte Markierung mit Biotin und Avidin, an das Fluorophore gebunden sind, nachgewiesen.

Vergleicht man die Ergebnisse der IHC mit denen der FISH, erkennt man, dass die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellpopulationen über die kortikalen Schichten nahezu identisch ist.

So konnte sowohl für die IHC als auch für die FISH gezeigt werden, dass ca. 60% aller VIP-Zellen in Schicht II/III des somatosensorischen Kortex zu finden sind. Auch die anderen kortikalen Schichten zeigen vergleichbare Prozentzahlen für die IHC und die FISH. Vergleicht man die Ergebnisse des PV-Antikörpers mit denen der *Pvalb*-Sonde erkennt man auch hier, dass die prozentuale Verteilung zwischen IHC und FISH übereinstimmt. Vergleichbares findet man auch beim SOM-Antikörper und der *Sst*-Sonde.

Betrachtet man hingegen die absoluten Zahlen der drei Zellpopulationen, erkennt man, dass die Werte in der FISH höher sind als in der IHC. Bei den VIP-Zellen sind die Werte in der FISH ungefähr 10% höher als in der IHC. Für die PV- und SOM-positiven Zellen liegen die Werte in der FISH sogar ca. 30% über denen in der IHC. Dieses Phänomen lässt sich mit Hilfe der Proteinbiosynthese erklären. Während der Proteinbiosynthese wird mRNA in ein Protein translatiert. Das bedeutet, dass die mRNA am Anfang des Prozesses steht, während das fertige Protein das Endprodukt darstellt. Für jedes Protein, das am Ende in der Zelle vorhanden ist, muss also vorher mRNA vorhanden gewesen sein.

Allerdings wird nicht notwendigerweise jedes einzelne mRNA-Molekül in ein Protein translatiert. Daher ist es möglich, dass durch die FISH mehr Zellen nachgewiesen werden, in denen die zu untersuchende mRNA vorkommt, jedoch im weiteren Biosyntheseweg das fertige Protein nicht mehr oder in geringerem Ausmaß enthalten ist. Demzufolge war es zwingend erforderlich, beide Untersuchungsmethoden durchzuführen. Durch den Vergleich zwischen mRNA und Protein konnte eine bessere Abschätzung der Werte erfolgen.

4.1.4 VIP-Antikörper der Firmen Abcam und ImmunoStar

Für die vorliegende Studie wurden zwei VIP-Antikörper von verschiedenen Firmen eingesetzt. Bei beiden Antikörpern handelt es sich um routinemäßig eingesetzte polyklonale Antikörper, die mittels indirekter Immunmarkierung VIP-Zellen nachweisen. In der hier vorliegenden Studie führten beide Antikörper zu einem sehr ähnlichen Ergebnis. Für 1 mm³ Barrel-Kortex zeigten 2103,5±332,9 Zellen eine Kollokalisierung zwischen dem VIP/tdTomato-Signal und dem VIP-Antikörper ImmunoStar. Nur 19,8±14,6 VIP/tdTomato-Zellen zeigten keine Markierung mit dem VIP-Antikörper ImmunoStar. Für den Antikörper der Firma Abcam zeigten in 1 mm³ Barrel-Kortex 2197,3±204,6 VIP/tdTomato-Zellen eine Markierung mit dem Antikörper. Bei 10,3±7,9 VIP/tdTomato-Zellen konnte keine Kollokalisierung mit dem VIP-Antikörper Abcam nachgewiesen werden. In den 35 untersuchten Schnitten markierten beide Antikörper keine Nicht-VIP/tdTomato-Zellen. Aufgrund der hohen Kollokalisationsrate von über 99% werden beide Antikörper als verlässliche Marker für VIP-Zellen angesehen. Auch in anderen Studien wurden die erwähnten Antikörper eingesetzt und führten auch dort zu einer verlässlichen Markierung der VIP-Zellen sowohl im Kortex als auch in anderen Hirnregionen (Zhang et al. 2009; Xu et al. 2010; Kulkarni et al. 2011; Becker et al. 2013; Hioki et al. 2013; Liang et al. 2013; Pi et al. 2013).

4.1.5 Eingesetzte Sonden

Die Basensequenzen der für diese Studie eingesetzten *Sst*-, *Vglut1*- und *Vip*-Sonde stimmen mit den entsprechenden Basensequenzen des *Allen Institute for Brain Science* überein. Die Sequenzen der für diese Studie verwendeten *Gad1*- und *Pvalb*-Sonde zeigen eine optimierte Basensequenz von der im *Allen Institute for Brain Science* angegebenen Sequenz. Vergleicht man die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierungen der in dieser Arbeit verwendeten *Gad1*- bzw. *Pvalb*-Sonde mit den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierungen des *Allen Institute for Brain Science*, erkennt man, dass beide eine vergleichbare Qualität zeigen. Die Sense aller Sonden wurde ebenfalls kontrolliert, und es konnte keine Bindung an mRNA festgestellt werden. Daher werden alle Sonden als verlässlicher Marker für die entsprechenden Zellpopulationen angesehen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Bei den GABAergen Interneuronen des Neokortex handelt es sich um inhibitorische Zellen. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Gleichgewicht der kortikalen Erregung. GABAerge Interneurone sind mitverantwortlich für die Kontrolle des Feuermusters von Pyramidenzellen, bei dynamischen Änderungen in der Erregung, bei der Begünstigung von synchroner Aktivität und auch bei der Unterdrückung unkontrollierter Erregung (McBain und Fisahn 2001; Pouille und Scanziani 2001; Markram et al. 2004; Trevelyan et al. 2006; Klausberger und Somogyi 2008). Veränderungen oder Fehlfunktionen der GABAergen Interneurone führen zu Fehlfunktionen des Gehirns wie Epilepsie (Cossart et al. 2001), Autismus (Tabuchi et al. 2007), Angststörungen (Freund und Katona 2007) oder Schizophrenie (Gonzalez-Burgos und Lewis 2008). Man unterscheidet bei den GABAergen Interneuronen zwischen drei distinkten Klassen, (i) die PV-exprimierenden Interneurone, (ii) die SOM-exprimierenden Interneurone und (iii) Interneurone, die den ionotropen Serotonin-Rezeptor 5HT3a exprimieren. Die 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Interneurone sind eine sehr heterogene Gruppe und machen ca. 30% der GABAergen Interneurone aus. 40% von ihnen exprimieren VIP. SOM wird von ca. 30% der GABAergen Interneurone exprimiert und PV von ca. 40% (Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011).

4.2.1 Verteilung der PV-, SOM- und VIP-exprimierenden Interneurone

Die PV-exprimierenden Interneurone repräsentieren zumeist Korb- und Chandelierzellen (Markram et al. 2004), gelten als schnell feuernd (Cauli et al. 1997) und inhibieren sich gegenseitig (Pfeffer et al. 2013). Sie sind die größte Gruppe der GABAergen Interneurone. Dies kann sowohl in der vorliegenden Studie gezeigt werden als auch durch die Ergebnisse anderer Studien belegt werden (Gonchar und Burkhalter 1997; Gonchar et al. 2007; Lee et al. 2010; Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011). Für 1 mm³ Barrel-Kortex konnten 6176,8±1129,4 (IHC) bzw. 8601,8±942,2 (FISH) PV-positive Zellen nachgewiesen werden. Die meisten PV-exprimierenden Interneurone sind dabei in Schicht IV und Vb zu finden. Rudy et al. zeigten 2011 ebenfalls, dass sich die meisten PV-Zellen in Schicht IV des primären somatosensorischen Kortex befinden. Auch für den primär visuellen Kortex (V1) wurden die meisten PV-exprimierenden Interneurone in den Schichten IV und V gefunden (Gonchar et al. 2007; Pfeffer et al. 2013). Xu et al. beschrieben in ihrer Studie 2010, dass sich im primär somatosensorischen, primär visuellen und frontalen Kortex die meisten PV-Zellen in Schicht V befinden, was dadurch erklärt werden kann, dass sie Schicht Va und Schicht Vb miteinander poolten.

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die verschiedenen Kortextareale der Ratte gefunden werden. So zeigten Staiger et al. bereits 1997, dass sich die meisten PV-Zellen in Schicht IV des Barrel-Kortex befinden.

Für den medialen präfrontalen Kortex (Gabbott et al. 1997) und sensomotorischen Kortex (Cauli et al. 1997) wurden die meisten PV-exprimierenden Interneurone in Schicht V gefunden.

In Schicht I konnte in der vorliegenden Studie nur eine ganz geringe Anzahl an PV-exprimierenden Interneuronen nachgewiesen werden. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen aus dem V1 von Pfeffer et al. (2013) überein. Xu et al. und Rudy et al. haben in Schicht I sogar keine PV-exprimierende Zelle nachweisen können.

Betrachtet man die Verteilung der PV-exprimierenden Interneurone über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und vergleicht dieses Ergebnis mit dem Ergebnis der *Bin size*-Analyse, so erkennt man ein übereinstimmendes Verteilungsmuster. In der *Bin size*-Analyse zeigen die PV-exprimierenden Interneurone zwei Häufigkeitsmaxima, das erste in einer Distanz von 400-450 μm und das zweite in einer Distanz von 600 μm zur Pia mater. Die beiden Zellmaxima entsprechen den Schichten IV und Vb (DeFelipe et al. 2002). Wie die schichtenspezifische Analyse zeigen konnte, befinden sich genau in diesen beiden Schichten die meisten PV-exprimierenden Interneurone.

Vergleicht man die Ergebnisse der IHC mit denen der FISH erkennt man, dass beide Färbemethoden das gleiche Verteilungsmuster der PV-exprimierenden Interneurone zeigen. In der IHC befinden sich $0,0 \pm 0,0\%$ der PV-exprimierenden Interneurone in Schicht I des Barrel-Kortex. Die FISH zeigt exakt dasselbe Ergebnis. Auf die neokortikale Schicht II/III fallen in der IHC $17,5 \pm 3,7\%$ der PV-Zellen ab. Mit der FISH lassen sich dort $15,4 \pm 1,7\%$ aller PV-exprimierender Interneurone nachweisen. Schicht IV zeigt mit $28,0 \pm 8,0\%$ in der IHC ein Zellmaximum an PV-exprimierenden Interneuronen. Auch bei den Ergebnissen der FISH zeigt sich hier ein Maximum an PV-Zellen mit $27,5 \pm 3,4\%$. Auf Schicht Va fallen $13,1 \pm 2,8\%$ der PV-exprimierenden Interneurone in der IHC und $13,2 \pm 2,2\%$ in der FISH ab. Schicht Vb des Barrel-Kortex zeigt mit $25,2 \pm 3,3\%$ der PV-Zellen in der IHC bzw. $26,7 \pm 3,5\%$ in der FISH ein weiteres Zellmaximum. $16,1 \pm 2,8\%$ der PV-exprimierenden Interneurone konnten durch die IHC in der neokortikalen Schicht VI nachgewiesen werden und $17,2 \pm 1,8\%$ wurden dort mittels FISH gefunden.

Vergleicht man die Kurven von IHC und FISH der *Bin size*-Analyse, so erkennt man auch hier, dass die Kurvenverläufe, die dem Verteilungsmuster entsprechen, übereinstimmen.

Betrachtet man allerdings die absoluten Zahlen der IHC und der FISH, so erkennt man deutlich höhere Zellzahlen an PV-exprimierenden Interneuronen in der FISH. So beträgt die Zellzahl für 1 mm³ Barrel-Kortex in der FISH 8601,8±942,2, in der IHC hingegen nur 6176,8±1129,4. Diese Differenz in der Zellzahl lässt sich auf die unterschiedlichen Methoden der FISH und IHC zurückführen.

Weder in der IHC noch in der FISH wurde eine VIP/tdTomato-Zelle gefunden, die eine Kolokalisation mit PV aufweist. Auch andere Studien zeigten keinerlei Kolokalisation (Kawaguchi und Kubota 1997; Porter et al. 1999; Cauli et al. 2000; Ekstrand et al. 2001; Toledo-Rodriguez et al. 2005; David et al. 2007).

Bei den SOM-exprimierenden Interneuronen unterscheidet man zwischen Martinotti- und Nicht-Martinotti-Zellen (Ma et al. 2006). SOM-exprimierende Interneurone zeigen ein kontinuierlich adaptierendes Feuermuster (Halabisky et al. 2006; Ma et al. 2006) und hemmen VIP- und PV-Zellen (Pfeffer et al. 2013). Sie sind die zweitgrößte Gruppe der GABAergen Interneurone. Dies wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Gonchar und Burkhalter 1997; Gonchar et al. 2007; Lee et al. 2010; Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011) und kann auch für die vorliegende Studie gezeigt werden. Für 1 mm³ Barrel-Kortex lassen sich 4318,2±429,7 (IHC) bzw. 6061,0±693,4 (FISH) SOM-exprimierende Interneurone nachweisen. Dabei befinden sich die meisten SOM-positiven Zellen in den neokortikalen Schichten Vb und VI. Auch Rudy et al. zeigten 2011 in ihrer Studie, dass die meisten SOM-exprimierenden Interneurone in Schicht V und VI des Barrel-Kortex zu finden sind. Xu et al. fanden 2010 die meisten SOM-positiven Zellen in den Schichten IV und V des primär somatosensorischen und des primär visuellen Kortex. Für den frontalen Kortex konnten sie die meisten SOM-exprimierenden Interneurone in den Schichten V und VI nachweisen. Pfeffer et al. zeigten 2013 für den visuellen Kortex, dass sich die meisten SOM-exprimierenden Interneurone in Schicht V befinden. Auch für die Ratte konnten Cauli et al. 1997 nachweisen, dass die meisten SOM-exprimierenden Zellen in Schicht V zu finden sind. Für Schicht I konnte sowohl durch die vorliegende Studie als auch durch andere Studien gezeigt werden, dass sich dort nur wenige SOM-exprimierende Interneurone finden lassen (Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013).

Vergleicht man die Verteilung der SOM-exprimierenden Interneurone über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex mit der Verteilung in der *Bin size*-Analyse, so erkennt man ein ähnliches Verteilungsmuster. In der *Bin size*-Analyse zeigt sich das Zellmaximum der SOM-exprimierenden Interneurone in einer Distanz von 600-650 μm zur Pia mater. Dies entspricht den neokortikalen Schichten Vb und VI (DeFelipe et al. 2002). In der schichtenspezifischen Analyse konnte genau dieses Ergebnis widerspiegelt werden, denn auch hier befinden sich die meisten SOM-positiven Zellen in den Schichten Vb und VI.

Betrachtet man die Ergebnisse von IHC und FISH, so wird deutlich, dass beide Methoden das gleiche Verteilungsmuster von SOM-exprimierenden Interneuronen zeigen. Schicht I des Barrel-Kortex zeigt in der IHC $0,3 \pm 0,1\%$ aller SOM-exprimierenden Interneurone und in der FISH $0,2 \pm 0,1\%$. Auf Schicht II/III fallen mit der Methode der IHC $14,2 \pm 1,2\%$ der SOM-positiven Zellen ab und $12,8 \pm 1,6\%$ mit der FISH. In der IHC lassen sich $16,7 \pm 1,6\%$ der SOM-exprimierenden Interneurone in Schicht IV finden. Die FISH zeigt dort $15,3 \pm 1,9\%$ der Zellen. In der neokortikalen Schicht Va befinden sich $14,0 \pm 2,3\%$ aller SOM-exprimierenden Interneurone in der IHC und $16,0 \pm 2,3\%$ in der FISH.

Schicht Vb des Barrel-Kortex zeigt in der IHC $29,5 \pm 4,2\%$ der SOM-positiven Zellen und in der FISH $27,0 \pm 3,3\%$. $25,4 \pm 5,0\%$ aller SOM-exprimierenden Interneurone befinden sich in der IHC in Schicht VI und $28,7 \pm 4,6\%$ lassen sich dort mit der FISH nachweisen.

Vergleicht man die Kurven von IHC und FISH der *Bin size*-Analyse so erkennt man, dass beide Kurven sich ähneln und mit dem Verteilungsmuster der schichtenspezifischen Analyse übereinstimmen.

Beim Vergleich der absoluten Zahlen der IHC und der FISH erkennt man deutlich höhere Zellzahlen an SOM-exprimierenden Interneuronen in der FISH. Die Zellzahl beträgt in der FISH $6061,0 \pm 693,4$ für 1 mm^3 Barrel-Kortex, in der IHC hingegen nur $4318,2 \pm 429,7$.

Bei den VIP/*tdTomato*-Zellen konnte für 1 mm^3 Barrel-Kortex in $0,2 \pm 0,2\%$ der Fälle eine Kolokalisation mit dem SOM-Antikörper nachgewiesen werden und zu $0,1 \pm 0,1\%$ eine Markierung mit der *Sst*-Sonde. Auch Cauli et al. haben bereits 1997 Kolokalisationen zwischen VIP und SOM beschrieben.

Für die Untersuchung der Verteilung der SOM- und PV-exprimierenden Interneurone wurde nur auf die Markierung der Zellen mit den Antikörpern bzw. Sonden zurückgegriffen. Um die Ergebnisse dieser Untersuchung überprüfen zu können, wäre es sinnvoll, die Verteilung der SOM- bzw. PV-exprimierenden Interneurone in der *SOMcre/tdTomato*-Maus und *PVcre/tdTomato*-Maus zu analysieren.

Morphologisch lassen sich bei den VIP-exprimierenden Interneuronen Korbzellen, bipolare Zellen, Doppelbouquetzellen und doppelt gebüschelte Zellen voneinander unterscheiden (Bayraktar et al. 2000; Markram et al. 2004). Die VIP-exprimierenden Interneurone zeigen ein unregelmäßiges Feuermuster (Cauli et al. 1997) und inhibieren SOM- (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013) und PV-Zellen (David et al. 2007; Hioki et al. 2013). Sie gehören zur Gruppe der 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Interneurone und machen 40% dieser Gruppe aus (Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011). Für 1 mm³ Barrel-Kortex konnten in der vorliegenden Studie 2202,0±155,2 (IHC) bzw. 2433,1±172,6 (FISH) VIP-exprimierende Interneurone nachgewiesen werden. Die meisten von ihnen befinden sich dabei in Schicht II/III. Auch die Studien von Xu et al. (2010) und Rudy et al. (2011) zeigen, dass sich die größte Anzahl an VIP-exprimierenden Interneuronen in Schicht II/III befindet. Für den primär visuellen Kortex und für den frontalen Kortex wurde das gleiche Resultat beschrieben (Gonchar et al. 2007; Xu et al. 2010; Pfeffer et al. 2013). Im Barrel-Kortex und visuellen Kortex der Ratte konnten ebenfalls die meisten VIP-exprimierenden Interneurone in Schicht II/III gefunden werden (Morrison et al. 1984; Staiger et al. 1996b; Staiger et al. 1997; Staiger et al. 2004b).

Betrachtet man die Verteilung der VIP-exprimierenden Interneurone über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex und in der *Bin size*-Analyse, so erkennt man, dass die Verteilungsmuster übereinstimmen. In der *Bin size*-Analyse zeigen die VIP-exprimierenden Interneurone ein Zellmaximum in einer Distanz von 150 µm zur Pia mater. Dies entspricht der neokortikalen Schicht II/III (DeFelipe et al. 2002). Wie in der schichtenspezifischen Analyse gezeigt werden konnte, befinden sich genau dort die meisten VIP-positiven Zellen.

Vergleicht man die Ergebnisse von IHC und FISH, erkennt man, dass beide Färbemethoden das gleiche Verteilungsmuster von VIP-exprimierenden Interneuronen zeigen. In der IHC befinden sich 1,8±0,4% der VIP-exprimierenden Interneurone in der neokortikalen Schicht I. In der FISH sind hier 2,0±0,5% aller VIP-positiven Zellen zu finden. Schicht II/III zeigt mit 59,5±3,2% in der IHC und 58,1±4,2% in der FISH das Zellmaximum. Auf Schicht IV des Barrel-Kortex fallen in der IHC 22,2±3,3% und in der FISH 22,7±2,8% aller VIP-exprimierenden Interneurone ab. 4,5±0,5% der VIP-positiven Zellen konnten durch die IHC und 4,4±0,4% durch die FISH in Schicht Va nachgewiesen werden. Für Schicht Vb wurden durch die Methode der IHC 4,9±1,1% und durch die FISH 5,2±0,6% aller VIP-exprimierenden Interneurone gefunden. In der neokortikalen Schicht VI lassen sich für die IHC 7,0±1,1% und für die FISH 8,3±1,0% der VIP-exprimierenden Interneurone nachweisen.

Betrachtet man die Kurven von IHC und FISH in der *Bin size*-Analyse, so erkennt man, dass beide Kurvenverläufe übereinstimmen.

Schaut man nun auf die absoluten Zahlen von IHC und FISH, so wird deutlich, dass die Zellzahlen in der FISH höher sind als in der IHC.

Die Zellzahl für 1 mm³ Barrel-Kortex beträgt in der IHC 2202,0±155,2, in der FISH hingegen 2433,1±172,6. Die Differenz der Zellzahlen erklärt sich, wie bereits beschrieben, durch die unterschiedlichen Färbemethoden.

4.2.2 VIP-Zellen als inhibitorische Interneurone

In der Literatur werden VIP-exprimierende Zellen als GABAerge inhibitorische Interneurone beschrieben (Kubota et al. 1994; Bayraktar et al. 1997). Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, zeigen zu können, dass es sich bei den VIP-exprimierenden Zellen in dieser transgenen Mauslinie tatsächlich um inhibitorische GABAerge Interneurone handelt. Zunächst sollen exzitatorische Eigenschaften von VIP-Zellen ausgeschlossen werden. Dafür wurden in der vorliegenden Studie Färbungen mit der *Vglut1*-Sonde durchgeführt. VGLUT verpackt den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat in Vesikel und transportiert diese in den synaptischen Spalt. Für den Neokortex übernimmt VGLUT1 diese Aufgabe und eignet sich daher hervorragend als Marker für exzitatorische Zellen (Fremeau et al. 2004). In der vorliegenden Studie konnte in keinem einzigen Interneuron eine Kolo-kalisation zwischen VIP und *Vglut1* nachgewiesen werden. Von daher kann in dieser Studie keine glutamaterg-exzitatorische Eigenschaft von VIP-Neuronen nachgewiesen werden. Allerdings konnten Cauli et al. bereits 1997 die mRNA von ChAT in Subpopulationen von VIP-exprimierenden Zellen nachweisen. Das Enzym ChAT ist an der Synthese von Acetylcholin beteiligt, welches wiederum häufig exzitatorisch wirkt.

Deshalb lassen sich an dieser Stelle die exzitatorischen Eigenschaften der VIP-exprimierenden Interneurone nicht 100%ig ausschließen. Mit großer Erwartung darf man also noch auf zukünftige Studien zu diesem Thema hoffen.

Nun sollte gezeigt werden, dass VIP-exprimierende Zellen zu den GABAergen Interneuronen zählen. Dafür wurden Färbungen mit einem GABA-Antikörper (rb- α -GABA, SigmaA2052, Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri) durchgeführt. Obwohl die Verlässlichkeit dieses Antikörpers bereits in vielen Studien eindrucksvoll belegt werden konnte (Kubota et al. 1994; Kawaguchi und Kubota 1996; Gonchar und Burkhalter 1997; Gonchar et al. 2007; Suzuki und Bekkers 2010), führte die Verwendung dieses Antikörpers in unserem Labor zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Die Färbungen missglückten wiederholt, es konnte keine Zelle im Barrel-Kortex mit α GABA markiert werden. Um dennoch nachweisen zu können, dass es sich bei den VIP-Zellen um GABAerge Interneurone handelt, wurden Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen mit der *Gad1*-Sonde durchgeführt.

GAD katalysiert die Umwandlung von Glutamat zu GABA und kann daher durchaus als Marker für GABAerge Interneurone angesehen werden. Für die vorliegende Studie konnten 18 Schnitte von 6 verschiedenen Tieren mit der *Gad1*-Sonde markiert und ausgewertet werden. Betrachtet man also nun die Markierung der VIP/tdTomato-Zellen mit der *Gad1*-Sonde, so erkennt man, dass $97,5 \pm 1,9\%$ der VIP-Zellen auch *Gad1* positiv sind. Es bleibt also die Frage zu klären, warum nicht alle VIP-Zellen auch GAD67 exprimieren. Eine wahrscheinliche Antwort ist, dass nicht genügend mRNA vorhanden war, an die die *Gad1*-Sonde binden konnte. Außerdem lässt sich vermuten, dass die VIP/tdTomato-Zellen, die nicht GAD67 exprimieren, eine Expression für GAD65 zeigen. In Studien am Rattengehirn konnte bereits gezeigt werden, dass VIP-exprimierende Interneurone auch eine Expression für GAD65 aufweisen können (Cauli et al. 1997; Porter et al. 1998; Karagiannis et al. 2009).

4.3 Funktionelle Relevanz

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Charakterisierung der *VIPcre/tdTomato*-Mauslinie unter besonderer Berücksichtigung mehrerer Gesichtspunkte. Es sollte zum einen nachgewiesen werden, dass es sich bei den fluoreszenten Zellen in dieser transgenen Mauslinie tatsächlich und ausschließlich um VIP-Zellen handelt. Dies konnte eindrucksvoll anhand der durchgeführten Experimente gezeigt werden. Doch welche Notwendigkeit steckt nun dahinter? Die Tatsache, dass es sich bei den fluoreszenten Zellen auch wirklich um VIP-Zellen handelt, ist gleich aus mehrerlei Hinsicht relevant. Für nachfolgende immunhistochemische oder andere färbetechnische Untersuchungen ist es nun möglich, zu verlässlichen Ergebnissen zu gelangen. So können beispielsweise neue VIP-Antikörper oder auch Sonden entwickelt und getestet werden.

Für die Elektrophysiologie ist die Erkenntnis, dass die fluoreszenten Zellen tatsächlich VIP exprimieren ein ganz entscheidender Faktor. Bei der Auswahl der abzuleitenden Zelle muss sich der Elektrophysiologe auf die genetisch determinierte Fluoreszenz der noch lebenden Zelle verlassen können. Würden auch andere Zellen eine Fluoreszenz aufweisen, wären die elektrophysiologischen Daten falsch bzw. unbrauchbar. Dies gilt selbstverständlich für jede Art der elektrophysiologischen Ableitung. Es ist dabei unerheblich, ob von einer, zwei oder mehreren Zellen gleichzeitig abgeleitet wird. Die Resultate wären bei einer falsch fluoreszenten Zelle, von der abgeleitet wurde, nicht korrekt interpretierbar und daher zu verwerfen.

Für Konnektivitätsuntersuchungen mittels optogenetischen Verfahren, bei denen die VIP-Zelle die präsynaptische Zelle darstellt und auf eine unbekannt postsynaptische Zelle projiziert (David et al. 2007; Hioki et al. 2013; Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013), muss sichergestellt sein, dass der cre-abhängige Virus auch wirklich VIP-Zellen transfiziert. Andernfalls würden auch die Ergebnisse aus diesen Experimenten zu falschen Rückschlüssen führen.

Die vorangegangenen Beispiele konnten eindrucksvoll zeigen, wie wichtig ein funktionierendes und verlässliches Tiermodell ist. Durch die vorliegende Studie konnte gezeigt werden, dass es sich bei der *VIPcre/tdTomato*-Mauslinie um ein solches Tiermodell handelt, mit dem VIP-Zellen verlässlich untersucht werden können.

Zur Charakterisierung der *VIPcre/tdTomato*-Maus wurde auch die Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen untersucht. So konnten die meisten VIP-exprimierenden Interneurone in Schicht II/III, die meisten PV-exprimierenden Interneurone in den Schichten IV und Vb und die meisten SOM-exprimierenden Interneurone in den Schichten Vb und VI nachgewiesen werden.

Doch warum ist diese Zellverteilung so wichtig? Zum einen sicherlich aus dem Grund, dass die verschiedenen Zelltypen auch unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. VIP ist mitverantwortlich für Vasodilatation, Hypotonie und Hypotension. Es hat also einen entscheidenden Einfluss auf die zerebralen Blutgefäße (Said und Mutt 1970). Außerdem zeigt VIP einen metabolischen Effekt auf die Aktivität von Astrozyten (Magistretti et al. 1998). Genauso wie PV- und SOM-exprimierende Interneurone nehmen auch VIP-exprimierende Interneurone inhibitorische Aufgaben wahr (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013). Dadurch lassen sich vielleicht bestimmte Funktionen vermehrt in bestimmten Schichten des Kortex nachweisen. Möglicherweise könnte man sogar von einer schichtenspezifischen Funktionsweise im Kortex sprechen.

Ein anderer Grund, warum die Zellverteilung eine Rolle spielen könnte, stellen die verschiedenen Signalübertragungswege dar. Der Barrel-Kortex erhält mindestens vier verschiedene thalamische Eingänge, darunter einen lemniskalen und einen paralemniskalen (Ahissar et al. 2000; Ahissar und Arieli 2001; Bureau et al. 2006; Brecht 2007). Der lemniskale Weg beginnt an der Vibrisse und stellt den ersten synaptischen Kontakt im Nucleus principalis nervi trigemini (Pr5) her und zieht zum Nucleus ventralis posteromedialis thalami (VPM). Von dort projizieren die Axone besonders stark in Schicht IV des Barrel-Kortex, aber auch in die Schichten Vb und VI.

Der paralemniskale Weg stellt den ersten synaptischen Kontakt im Nucleus spinalis nervi trigemini her, genauer gesagt in der pars interpolaris (Sp5i). Von dort zieht er zur pars medialis des Nucleus posterior thalami (POM), wo der zweite synaptische Kontakt zu stande kommt. Schließlich projizieren die Axone in Schicht Va des Barrel-Kortex und von dort weiter in Schicht I (Ahissar et al. 2000; Ahissar und Arieli 2001; Bureau et al. 2006; Brecht 2007). Möglicherweise spielen hier die unterschiedlichen Populationen von GABAergen Interneuronen und ihr vermehrtes Auftreten in den verschiedenen Schichten die entscheidende Rolle für die Funktion der einzelnen Signalübertragungswege.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Neurone des Neokortex lassen sich in exzitatorische und inhibitorische Neurone unterteilen. Bei den inhibitorischen Neuronen, die 20-30% der Neurone ausmachen, handelt es sich um GABA freisetzende Interneurone, die anhand ihrer morphologischen, elektrophysiologischen und molekularen Merkmale voneinander unterschieden werden können. Man unterscheidet drei große Gruppen von GABAergen Interneuronen, die Parvalbumin (PV)-exprimierenden, die Somatostatin (SOM)-exprimierenden und die ionotropen Serotonin-Rezeptor 5HT3a-exprimierenden Interneurone. Die 5HT3a-Rezeptor-exprimierenden Interneurone stellen eine sehr heterogene Gruppe dar und bestehen zu 40% aus vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)-exprimierenden Interneuronen.

Für die vorliegende Studie wurde die transgene *VIPcre/tdTomato*-Maus verwendet, die mit Hilfe der Cre/loxP-Technik generiert wurde. In dieser Maus sollten VIP-exprimierende Zellen mit dem fluoreszenten tdTomato-Protein markiert sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die VIP-exprimierenden Neurone im somatosensorischen Kortex (Barrel-Kortex) mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung neurochemisch zu charakterisieren. Dafür wurden die Proteine vasoaktives intestinales Polypeptid, Somatostatin, Parvalbumin, Glutamatdecarboxylase (GAD 67) und der vesikuläre Glutamattransporter 1 (VGLUT1) als zu identifizierende molekulare Bestandteile genutzt. Ferner konnten Aussagen über die Zelldichte und Zellverteilung von VIP/tdTomato-positiven Zellen in den Schichten I-VI des Barrel-Kortex getroffen werden, um eine schichtenspezifische Charakterisierung der *VIPcre/tdTomato*-Maus durchzuführen. Außerdem wurde nach möglichen Kollokationen zwischen VIP und SOM und VIP und PV gesucht. Durch den Einsatz der Sonden *Gad1* und *Vglut1* konnten Rückschlüsse auf die exzitatorischen bzw. inhibitorischen Eigenschaften von VIP-exprimierenden Interneuronen gezogen werden.

Durch den Einsatz zweier verschiedener VIP-Antikörper und einer *Vip*-Sonde konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den tdTomato-fluoreszenten Zellen tatsächlich um VIP-exprimierende Interneurone handelt. Zwischen den VIP/tdTomato-positiven Zellen und dem PV-Antikörper bzw. der *Pvalb*-Sonde wurde niemals eine Kollokation nachgewiesen. Für den SOM-Antikörper bzw. die *Sst*-Sonde konnte nur eine ganz geringe Anzahl an Kollokationen mit den VIP/tdTomato-Zellen gezeigt werden. Dadurch bestätigt sich, dass es sich bei der *VIPcre/tdTomato*-Maus um ein verlässliches Mausmodell zur Untersuchung von VIP-exprimierenden Interneuronen handelt. Die *Vglut1*-Sonde hatte niemals eine VIP/tdTomato-Zelle markiert, wodurch sich exzitatorische Eigenschaften der VIP-Zellen nicht nachweisen ließen.

Hingegen markierte die *Gad1*-Sonde den Großteil aller VIP/tdTomato-Zellen, wodurch sich bestätigen lässt, dass es sich bei den VIP-exprimierenden Interneuronen um inhibitorische GABAerge Interneurone handelt.

Die größte Population an GABAergen Interneuronen in der *VIPcre/tdTomato*-Maus stellen die PV-exprimierenden Interneurone dar. In den Schichten IV und Vb wurden die meisten PV-positiven Zellen nachgewiesen. Die SOM-exprimierenden Interneurone stellen die zweitgrößte Zellpopulation dar. Die meisten SOM-positiven Zellen befinden sich in den neokortikalen Schichten Vb und VI. Bei den VIP-exprimierenden Interneuronen konnte die größte Anzahl an Zellen in Schicht II/III gefunden werden.

6 ABSTRACT

The neurons of the neocortex can be subdivided into excitatory and inhibitory neurons. The inhibitory neurons, which make up 20-30% of the neurons are GABAergic interneurons, which can be distinguished by morphological, electrophysiological and molecular characteristics from each other. There are three distinct groups of GABAergic interneurons, the parvalbumin (PV)-expressing, the somatostatin (SOM)-expressing and the ionotropic serotonin receptor 5HT3a-expressing interneurons. The 5HT3a-receptor-expressing interneurons represent a very heterogeneous group. 40% of this group express vasoactive intestinal polypeptide (VIP).

In the present study, the transgenic *VIPcre/tdTomato* mouse was used. The transgenic mouse was generated by using the Cre/loxP technology. In this mouse, VIP-expressing cells are marked with the fluorescent protein tdTomato.

The aim was to characterize the VIP-expressing neurons in the somatosensory cortex (barrel cortex) by immunohistochemistry and fluorescence-in-situ-hybridization. The proteins vasoactive intestinal polypeptide, somatostatin, parvalbumin, glutamate decarboxylase (GAD67) and the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) were used as molecular markers. Statements about the cell density and cell distribution in the layers I-VI of the barrel cortex could be made for a layer-specific characterization of the *VIPcre/tdTomato* mouse. It was also searched for possible colocalisation between VIP and SOM and VIP and PV. By using the probes *Gad1* and *Vglut1*, conclusions about the excitatory or inhibitory properties of VIP-expressing interneurons could be drawn.

Through the use of two different VIP antibodies and a *Vip* probe it could be demonstrated that the tdTomato fluorescent cells are indeed VIP-expressing interneurons. Between the VIP/tdTomato positive cells and the PV antibody or *Pvalb* probe no colocalization was detected. For the SOM antibody or *Sst* probe only a very small number of colocalisation could be shown with the VIP/tdTomato cells. This confirms that the *VIPcre/tdTomato* mouse is a reliable mouse model.

The *Vglut1* probe had never marked a VIP/tdTomato cell, so that excitatory properties of the VIP cells could not be detected. In contrast the *Gad1* probe marked the majority of VIP/tdTomato cells. This confirms that the VIP cells are inhibitory GABAergic interneurons. The largest population of GABAergic interneurons in the *VIPcre/tdTomato* mouse are the PV-expressing interneurons. In the layers IV and Vb, most PV positive cells were detected. The SOM-expressing interneurons are the second largest cell population. The majority of SOM positive cells are located in the neocortical layers Vb and VI. For the VIP-expressing interneurons the largest number of cells could be found in layer II/III.

7 ANHANG

Tabelle 7.1: Koloalokalisation zwischen VIP/tdTomato, α VIP(ImmunoStar), α VIP(Abcam) und der Vip-Sonde

Dargestellt sind die Koloalokalisationen zwischen VIP/tdTomato mit α VIP(ImmunoStar), α VIP(Abcam) bzw. der Vip-Sonde und ihre Verteilung über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Der erste Teil der Tabelle (hellgrau) bezieht sich auf die Koloalokalisationen zwischen VIP/tdTomato und α VIP(ImmunoStar). Es zeigen nur wenige Zellen keine Markierung mit dem VIP-Antikörper ImmunoStar. Der VIP-Antikörper ImmunoStar hat an keine Nicht-VIP/tdTomato Zelle gebunden. Der zweite Teil der Tabelle (weiß) bezieht sich auf den VIP-Antikörper Abcam und die Koloalokalisationen mit den VIP/tdTomato-Zellen. Auch für α VIP Abcam gibt es nur wenige VIP/tdTomato-Zellen, die nicht mit dem Antikörper markiert sind. Der Antikörper Abcam hat ebenfalls an keine Nicht-VIP/tdTomato-Zelle gebunden. Der dritte Teil der Tabelle (hellgrau) zeigt die Koloalokalisationen zwischen VIP/tdTomato und der Vip-Sonde. Hierbei wird deutlich, dass mehrere VIP/tdTomato-Zellen keine Markierung mit der Sonde zeigen. Außerdem hat die Vip-Sonde an eine Nicht-VIP/tdTomato-Zelle gebunden.

| Region | VIP/tdTomato | α VIP (ImmunoStar) | Koloalokalisation | VIP/tdTomato | α VIP (Abcam) | Koloalokalisation | VIP/tdTomato | Vip-Sonde | Koloalokalisation |
|----------------|-----------------|---------------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|-------------------|---------------|-------------------|
| Barrel-Kortex | 19,8 \pm 14,6 | 0,0 \pm 0,0 | 2103,5 \pm 332,9 | 10,3 \pm 7,9 | 0,0 \pm 0,0 | 2197,3 \pm 204,6 | 274,7 \pm 168,5 | 0,8 \pm 1,8 | 2098,3 \pm 113 |
| Schicht I | 0,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 45,6 \pm 20,5 | 0,8 \pm 1,8 | 0,0 \pm 0,0 | 47,2 \pm 25,9 | 17,5 \pm 23,9 | 0,0 \pm 0,0 | 34,6 \pm 25,8 |
| Schicht II/III | 12,9 \pm 12,3 | 0,0 \pm 0,0 | 1163,7 \pm 148,2 | 7,6 \pm 6,1 | 0,0 \pm 0,0 | 1249,3 \pm 114,3 | 126,5 \pm 69,6 | 0,8 \pm 1,8 | 1159,4 \pm 97,5 |
| Schicht IV | 4,3 \pm 4,8 | 0,0 \pm 0,0 | 570,2 \pm 109,2 | 1,9 \pm 4,1 | 0,0 \pm 0,0 | 561,4 \pm 120,5 | 80,6 \pm 56,1 | 0,0 \pm 0,0 | 550,1 \pm 62,7 |
| Schicht Va | 0,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 88,8 \pm 12,9 | 0,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 93,6 \pm 29,2 | 8,5 \pm 7,9 | 0,0 \pm 0,0 | 90,6 \pm 32,9 |
| Schicht Vb | 0,8 \pm 1,9 | 0,0 \pm 0,0 | 101,2 \pm 34,2 | 0,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 101,1 \pm 35,4 | 14,4 \pm 13,3 | 0,0 \pm 0,0 | 107,2 \pm 20,3 |
| Schicht VI | 1,7 \pm 2,5 | 0,0 \pm 0,0 | 134,0 \pm 63,1 | 0,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 142,9 \pm 38,8 | 28,1 \pm 16,9 | 0,0 \pm 0,0 | 157,7 \pm 14,2 |

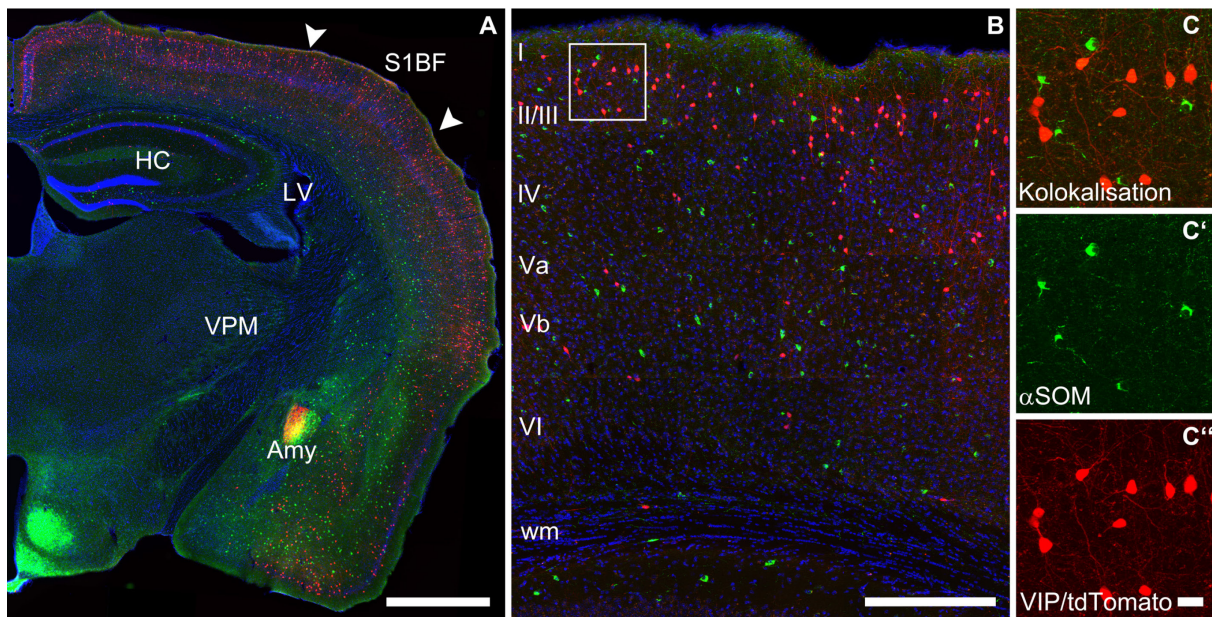


Abbildung 7.1: IHC zur Markierung der SOM-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

IHC des SOM-Antikörpers an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die α SOM-markierten Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV), Amygdala (Amy) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μ m. **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μ m. In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei sind keine Kolokalisationen (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den α SOM-positiven Zellen (**C'**) zu erkennen; Maßstab: 20 μ m.

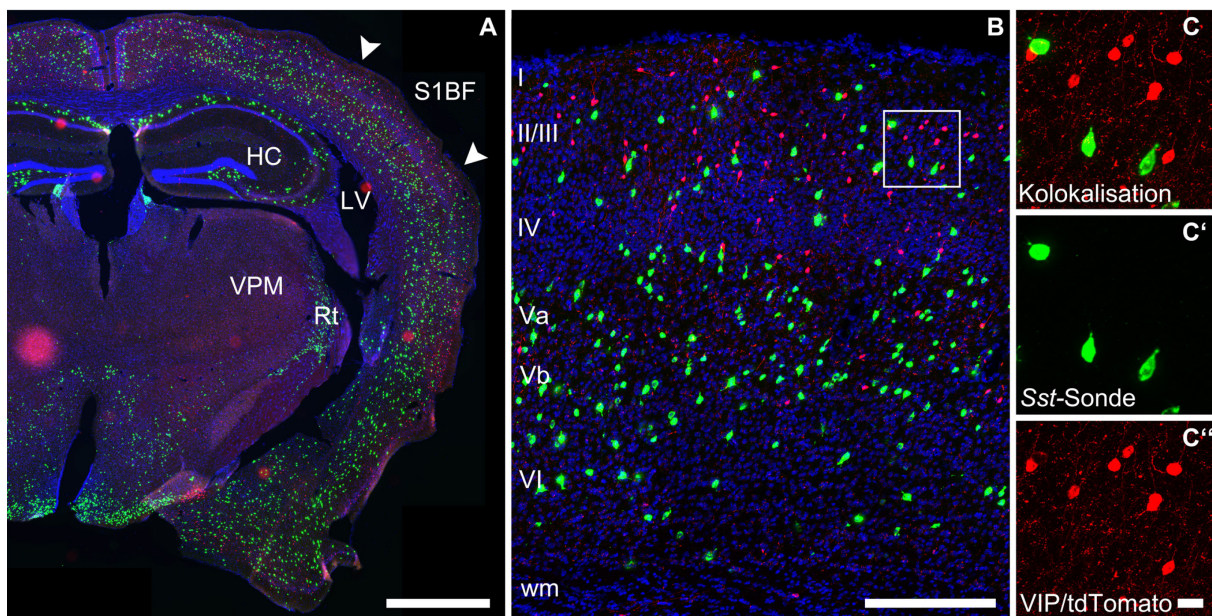


Abbildung 7.2: FISH zur Markierung der Sst-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

FISH der *Sst*-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die *Sst*-positiven Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV), Nucleus reticularis (Rt) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μ m. **B** zeigt die „maximum intensity projection“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μ m. In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei sind keine Kolokalisationen (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den *Sst*-positiven Zellen (**C'**) zu erkennen; Maßstab: 20 μ m.

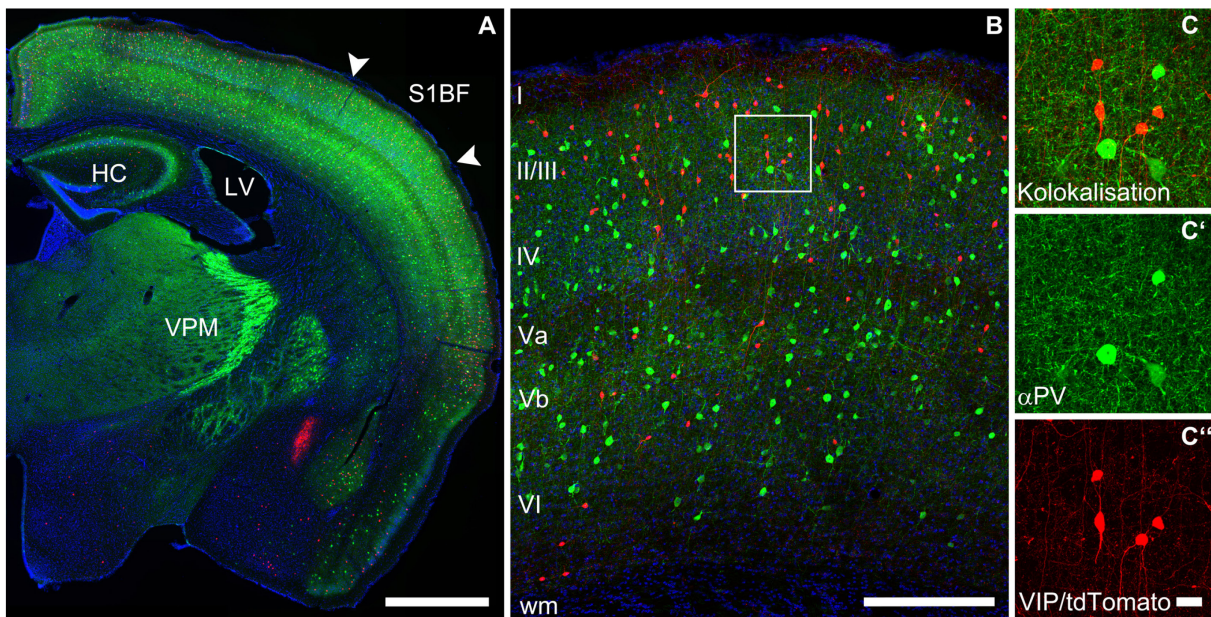


Abbildung 7.3: IHC zur Markierung der PV-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

IHC des PV-Antikörpers an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die α PV-markierten Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μ m. **B** zeigt die „*maximum intensity projection*“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μ m. In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei sind keine Kolokalisationen (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den α PV-positiven Zellen (**C'**) zu erkennen; Maßstab: 20 μ m.

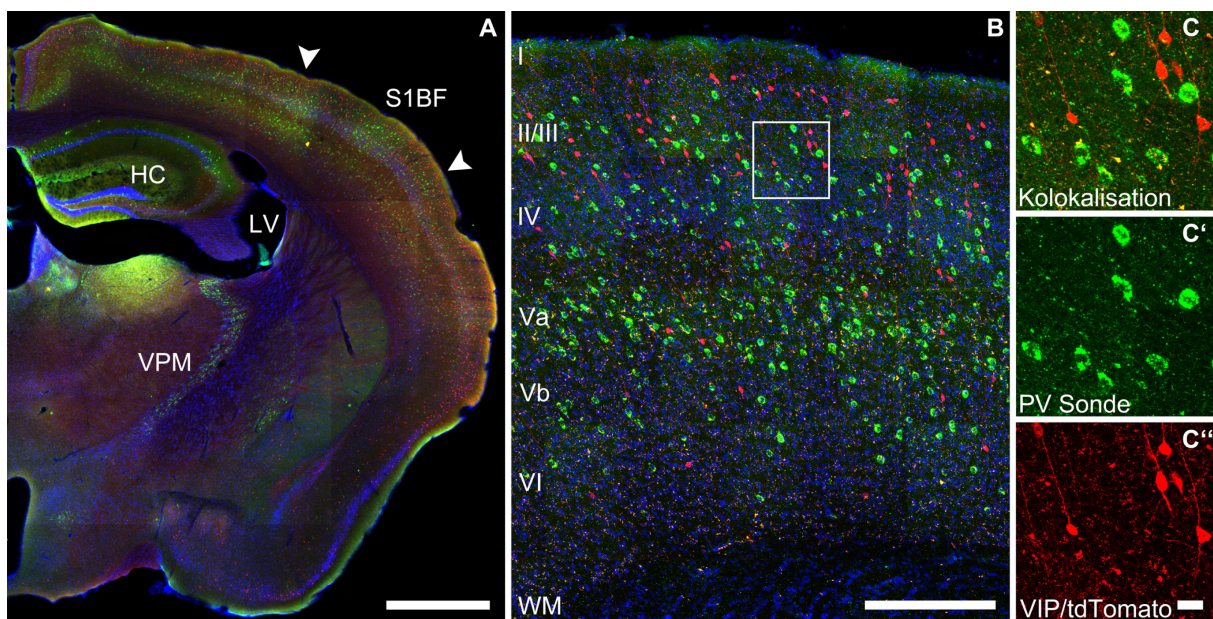


Abbildung 7.4: FISH zur Markierung der *Pvalb*-positiven Zellen im Bereich des Barrel-Kortex

FISH der *Pvalb*-Sonde an frontalen Hirnschnitten einer *VIPcre/tdTomato*-Maus zeigt in rot das transgene tdTomato-Signal, in grün die *Pvalb*-positiven Zellen und die Zellkerne (DAPI) in blau. In **A** ist die linke Hemisphäre als Einzelebene im Bereich des Barrel-Kortex (Pfeilspitzen; S1BF) dargestellt. Als weitere Strukturen erkennt man: Hippocampus (HC), lateraler Ventrikel (LV) und Nucleus ventralis posteromedialis (VPM); Maßstab: 1000 μ m. **B** zeigt die „*maximum intensity projection*“ des Barrel-Kortex. Die Schichten des Kortex sind mit römischen Zahlen markiert; Maßstab: 250 μ m. In **C-C''** ist die Vergrößerung des umrahmten Areals aus **B** dargestellt. Dabei sind keine Kolokalisationen (**C**) des transgenen tdTomato-Signals (**C''**) mit den *Pvalb*-positiven Zellen (**C'**) zu erkennen; Maßstab: 20 μ m.

Tabelle 7.2: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und SOM oder PV

Dargestellt sind die Kolokalisationen zwischen VIP/tdTomato und SOM oder PV in % und ihre Verteilung über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben. Die linke Spalte zeigt die VIP/tdTomato-Zellen, die mit dem SOM-Antikörper markiert sind. In der zweiten Spalte sind die α SOM-markierten Zellen dargestellt, die außerdem die tdTomato-Fluoreszenz zeigen. Die dritte Spalte zeigt die VIP/tdTomato-Zellen, die mit der *Sst*-Sonde kolokalisiert sind. In der vierten Spalte sind die Zellen dargestellt, die die *Sst*-Sonde tragen und die VIP/tdTomato-Fluoreszenz zeigen. Die letzte Spalte zeigt, dass keine VIP/tdTomato-Zelle mit dem PV-Antikörper oder der *Pvalb*-Sonde markiert ist.

| | VIP/tdTomato und α SOM | α SOM und VIP/tdTomato | VIP/tdTomato und <i>Sst</i> -Sonde | <i>Sst</i> -Sonde und VIP/tdTomato | VIP/tdTomato und α PV/ <i>Pvalb</i> -Sonde |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| Region | Kolokalisation | Kolokalisation | Kolokalisation | Kolokalisation | Kolokalisation |
| Barrel-Kortex | 0,2±0,2 | 0,1±0,1 | 0,1±0,1 | 0,0±0,1 | 0,0±0,0 |
| Schicht I | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| Schicht II/III | 0,1±0,2 | 0,3±0,4 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| Schicht IV | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| Schicht Va | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| Schicht Vb | 0,9±2,1 | 0,1±0,2 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| Schicht VI | 0,4±0,9 | 0,1±0,2 | 1,4±2,2 | 0,1±0,2 | 0,0±0,0 |

Tabelle 7.3: Kolokalisation zwischen VIP/tdTomato und der *Gad1*-Sonde

Dargestellt sind die Kolokalisationen zwischen VIP/tdTomato und der *Gad1*-Sonde und ihre Verteilung über die einzelnen Schichten des Barrel-Kortex. Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben. **VIP/tdTomato**: Zelle, die nur die tdTomato-Fluoreszenz zeigt, aber nicht mit der *Gad1*-Sonde markiert ist; ***Gad1***: Zelle, die mit der *Gad1*-Sonde markiert ist, aber keine tdTomato-Fluoreszenz zeigt; **Kolokalisation**: Zelle, die sowohl die tdTomato-Fluoreszenz zeigt, als auch mit der *Gad1*-Sonde markiert ist.

| Region | VIP tdTomato | <i>Gad1</i> -Sonde | Kolokalisation |
|----------------|--------------|--------------------|----------------|
| Barrel-Kortex | 55,7±39,6 | 14646,0±1531 | 2223,1±283,0 |
| Schicht I | 1,7±2,4 | 812,2±211,7 | 72,9±19,7 |
| Schicht II/III | 43,3±38,3 | 2828,4±354,8 | 1222,0±140,6 |
| Schicht IV | 5,8±4,9 | 3508,5±384,3 | 528,3±104,3 |
| Schicht Va | 1,9±2,7 | 1681,6±286,7 | 91,9±19,5 |
| Schicht Vb | 0,0±0,0 | 2557,9±299,2 | 128,6±15,7 |
| Schicht VI | 3,1±4,6 | 3264,5±292 | 177,9±51,8 |

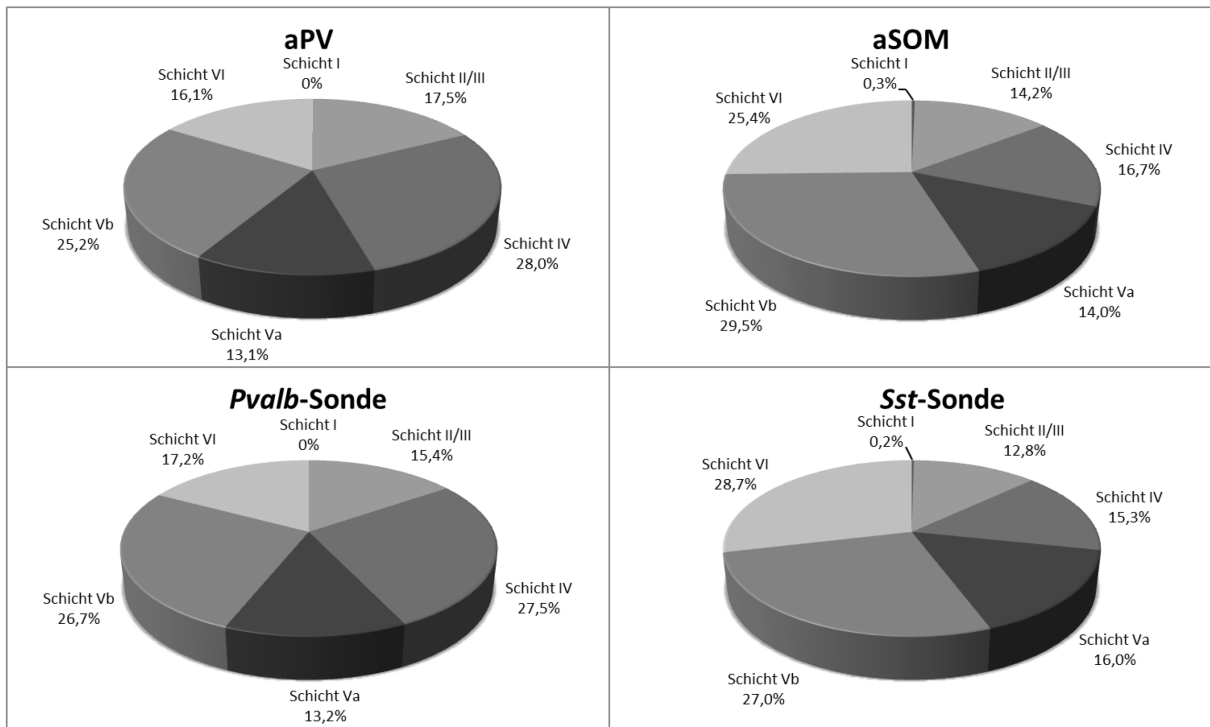


Abbildung 7.5: Prozentuale Verteilung von PV und SOM

Die Tortendiagramme zeigen die prozentuale Verteilung von α PV, α SOM, der *Pvalb*- und *Sst*-Sonde innerhalb der einzelnen Schichten des Barrel-Kortex. Die meisten α PV-positiven Zellen befinden sich in den neokortikalen Schichten IV und Vb. Für die α SOM-positiven Zellen wurden die meisten Zellen in den Schichten Vb und VI nachgewiesen. Die *Pvalb*-Sonde zeigt das gleiche Verteilungsmuster wie der PV-Antikörper. Auch hier befinden sich die meisten *Pvalb*-markierten Zellen in den Schichten IV und Vb. Das Verteilungsmuster der *Sst*-Sonde stimmt mit dem Verteilungsmuster des SOM-Antikörpers überein. Die meisten Zellen, die mit der *Sst*-Sonde markiert sind befinden sich in den neokortikalen Schichten Vb und VI.

Tabelle 7.4: Verteilung aller VIP/tdTomato-, PV- und SOM-Zellen

Dargestellt sind die Zellzahlen von VIP/tdTomato, PV und SOM und ihre Verteilung über den Barrel-Kortex in der IHC (links) und FISH (rechts). Die Werte sind als Mittelwerte±Standardabweichung angegeben. In der IHC erkennt man, dass die meisten VIP/tdTomato-Zellen in einer Distanz von 150 µm zur Pia mater zu finden sind. Die αPV-markierten Zellen zeigen zwei Maxima. Das erste bei 450 µm und das zweite bei 600 µm Entfernung zur Pia mater. Bei den αSOM-positiven Zellen befindet sich das Zellmaximum in einer Distanz von 650 µm zur Pia mater. In der FISH befinden sich ebenfalls die meisten VIP/tdTomato-Zellen in einer Distanz von 150 µm zur Pia mater. Die meisten Zellen, die mit der *Pvalb*-Sonde markiert sind, konnten in 400 und 600 µm Entfernung zur Pia mater nachgewiesen werden. In einer Distanz von 600 µm lassen sich die meisten Zellen finden, die mit der *Sst*-Sonde markiert sind.

| Distanz zur Pia (µm) | VIP/tdTomato | αPV | αSOM | VIP/tdTomato | <i>Pvalb</i> -Sonde | <i>Sst</i> -Sonde |
|-----------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------------|-------------------|
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| 50 | 14,5±8,8 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 13,4±11,3 | 0,0±0,0 | 4,4±6,3 |
| 100 | 153,1±68,2 | 30,6±41,9 | 45,7±33,9 | 196,4±47,2 | 54,6±26,9 | 87,6±31,5 |
| 150 | 415,9±36,7 | 193,9±44,4 | 82,5±54,2 | 400,3±60,3 | 277,7±25,5 | 112,6±35,0 |
| 200 | 387,9±30,4 | 289,8±51,3 | 158,2±51,9 | 335,9±35,7 | 342,6±106,6 | 194,2±40,3 |
| 250 | 319,0±42,2 | 324,1±119,3 | 162,2±36,6 | 293,7±28,9 | 401,2±57,7 | 212,1±46,0 |
| 300 | 283,7±25,9 | 341,9±99,6 | 222,9±32,1 | 217,3±32,6 | 482,1±139,1 | 237,0±55,2 |
| 350 | 171,3±35,6 | 439,6±132,4 | 182,2±33,5 | 163,5±48,6 | 640,9±110,0 | 229,9±54,7 |
| 400 | 93,8±15,7 | 561,1±174,2 | 116,3±25,1 | 104,5±26,8 | 806,5±153,0 | 227,0±37,8 |
| 450 | 86,9±8,7 | 713,1±196,5 | 266,5±42,7 | 88,6±33,5 | 785,5±136,0 | 385,1±92,1 |
| 500 | 82,5±20,2 | 551,0±118,4 | 322,2±44,1 | 64,1±12,4 | 667,3±143,0 | 507,0±111,7 |
| 550 | 60,0±11,4 | 538,3±146,7 | 385,1±95,7 | 59,9±13,7 | 893,6±198,0 | 583,8±112,7 |
| 600 | 50,8±13,0 | 742,7±190,3 | 523,1±148,8 | 44,9±5,4 | 928,9±188,8 | 726,3±152,9 |
| 650 | 44,7±14,3 | 728,2±156,1 | 548,9±126,7 | 42,2±12,8 | 733,6±166,5 | 640,8±109,9 |
| 700 | 44,2±16,2 | 414,4±71,8 | 437,6±99,9 | 47,3±10,0 | 439,6±70,2 | 538,1±45,2 |
| 750 | 36,5±10,5 | 378,3±113,5 | 320,2±40,0 | 32,8±10,4 | 476,2±60,4 | 383,8±87,9 |
| 800 | 33,0±7,9 | 294,9±87,9 | 240,3±67,8 | 32,9±13,9 | 307,9±97,8 | 277,7±62,6 |
| 850 | 28,8±12,1 | 147,3±30,8 | 209,2±31,4 | 29,7±5,5 | 194,7±55,7 | 252,4±36,4 |
| 900 | 35,7±10,2 | 107,6±30,8 | 166,2±66,2 | 33,9±12,9 | 140,4±34,5 | 197,0±60,9 |
| 950 | 16,6±6,8 | 76,6±49,9 | 84,8±39,4 | 16,1±7,1 | 48,1±45,5 | 145,2±34,4 |
| 1000 | 10,6±4,9 | 15,0±16,2 | 50,5±17,8 | 9,0±4,4 | 14,1±19,2 | 59,6±33,9 |
| Gesamtzellzahl | 2381,0±57,0 | 6888,5±1454,2 | 4524,4±624,2 | 2226,4±216,1 | 8635,2±1174,8 | 6001,7±633,1 |

Tabelle 7.5: Ergebnisse des Student's t-Test

Dargestellt sind die Ergebnisse des Student's t-Test mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Signifikante Werte sind schwarz dargestellt, nicht signifikante rot.

| Statistik IHC VIP/tdTomato | | | | | | |
|----------------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = 0,557) | (P = 0,001) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,557) | -- | (P = 0,011) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,001) | (P = 0,011) | -- |

| Statistik FISH VIP/tdTomato | | | | | | |
|-----------------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = 0,045) | (P = <0,001) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,045) | -- | (P = <0,001) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- |

| Statistik IHC αPV | | | | | | |
|-------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = 0,024) | (P = 0,058) | (P = 0,006) | (P = 0,500) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = 0,024) | -- | (P = 0,003) | (P = 0,489) | (P = 0,010) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = 0,058) | (P = 0,003) | -- | (P = <0,001) | (P = 0,124) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = 0,006) | (P = 0,489) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = 0,500) | (P = 0,010) | (P = 0,124) | (P = <0,001) | -- |

| Statistik FISH Pvalb | | | | | | |
|----------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = 0,109) | (P = <0,001) | (P = 0,124) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = 0,693) | (P = <0,001) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = 0,109) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = 0,010) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,693) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = 0,124) | (P = <0,001) | (P = 0,010) | (P = <0,001) | -- |

| Statistik IHC αSOM | | | | | | |
|--------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = 0,018) | (P = 0,854) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = 0,018) | -- | (P = 0,056) | (P = <0,001) | (P = 0,004) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = 0,854) | (P = 0,056) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = 0,195) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,004) | (P = <0,001) | (P = 0,195) | -- |

| Statistik FISH Sst | | | | | | |
|--------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = 0,041) | (P = 0,027) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = 0,041) | -- | (P = 0,615) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = 0,027) | (P = 0,615) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = 0,519) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,519) | -- |

| Statistik FISH Gad1 | | | | | | |
|---------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = 0,963) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,041) |
| Schicht IV | (P = <0,001) | (P = 0,963) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,034) |
| Schicht Va | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Vb | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = 0,004) |
| Schicht VI | (P = <0,001) | (P = 0,041) | (P = 0,034) | (P = <0,001) | (P = 0,004) | -- |

| Statistik Gad1 mit VIP kolokalisiert in % | | | | | | |
|---|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Schicht I | Schicht II/III | Schicht IV | Schicht Va | Schicht Vb | Schicht VI |
| Schicht I | -- | (P = <0,001) | (P = 0,006) | (P = 0,007) | (P = 0,002) | (P = 0,006) |
| Schicht II/III | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht IV | (P = 0,006) | (P = <0,001) | -- | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = <0,001) |
| Schicht Va | (P = 0,007) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | -- | (P = 0,495) | (P = 0,863) |
| Schicht Vb | (P = 0,002) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,495) | -- | (P = 0,647) |
| Schicht VI | (P = 0,006) | (P = <0,001) | (P = <0,001) | (P = 0,863) | (P = 0,647) | -- |

Tabelle 7.6: Eingesetzte Sonden

Dargestellt sind die für die FISH eingesetzten Sonden mit Angabe der Länge und den entsprechenden Primer-Sequenzen. Die Sequenzen der Sst-, Vglut1- und Vip-Sonde stimmen mit den Sequenzen des Allen Institute for Brain Science überein.

| Gen | Länge | Forward primer | Reverse primer | Nested primer (forward) | Nested primer (reverse) |
|--------|--------|----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Gad1 | 320 BP | GGCACGACTGTTTACGGAGC | GCCTTGTCCTCCGGTGTGCATA | - | - |
| Pvalb | 349 BP | TCTTCCAGATGGTGGGCCTG | CAGGAGATATCGGGCGTTG | - | - |
| Sst | 514 BP | ACGCTACCGAAGCCGTC | GGGGCCAGGATTAAGGA | - | - |
| Vglut1 | 296 BP | CAGAGCCGGAGGAGATGA | TTCCCTCAGAAACGCTGG | GCTGGCAGTGACGAAAGTGA | TGAGAGGGAAAGAGGGCTGG |
| Vip | 367 BP | CCTGGCATTCTGATACTCTC | ATTCTCTGATTCAGCTCTGCC | CTGTCTCTCAGTCGCTGGC | GCTTCTGAGGCGGGTGTAG |

Anmerkung:

Bezüglich der Groß-, Klein- oder Kursivschreibweise von Genen und deren Abkürzungen sowie von transgenen Mauslinien hält sich die vorliegende Arbeit an die Vorschläge des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for mice* (Stand Mai 2014).

Die Schreibweise und Abkürzung der Proteinnamen richtet sich nach der *NCBI Protein Database* (Stand Mai 2014).

Die Abkürzungen für anatomische Strukturen entstammen dem Paxinos-Atlas für das Mausgehirn (Paxinos und Franklin 2001).

Selbständigkeitserklärung:

Die in dieser Arbeit beschriebenen Perfusionen wurden nicht von der Autorin selbst, sondern von Herrn Dr. Martin Möck durchgeführt.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Ahissar E, Sosnik R, Haidarliu S (2000): Transformation from temporal to rate coding in a somatosensory thalamocortical pathway. *Nature* 406, 302-306

Ahissar E, Arieli A (2001): Figuring space by time. *Neuron* 32, 185-201

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

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

Becker L, Peterson J, Kulkarni S, Pasricha PJ (2013): Ex vivo neurogenesis within enteric ganglia occurs in a PTEN dependent manner. *PLoS One* 8, e59452

Brecht M (2007): Barrel cortex and whisker-mediated behaviors. *Curr Opin Neurobiol* 17, 408-416

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

Bryant MG, Polak MM, Modlin I, Bloom SR, Albuquerque RH, Pearse AG (1976): Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *Lancet* 1, 991-993

Bureau I, von Saint Paul F, Svoboda K (2006): Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol* 4, e382

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

Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E (2000): Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6144-6149

Conti F, Rustioni A, Petrusz P, Towle AC (1987): Glutamate-Positive Neurons in the Somatic Sensory Cortex of Rats and Monkeys. *Journal of Neuroscience* 7, 1887-1901

Cossart R, Tyzio R, Dinocourt C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, Bernard C (2001): Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron* 29, 497-508

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

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

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

- Ekstrand JJ, Domroese ME, Feig SL, Illig KR, Haberly LB** (2001): Immunocytochemical analysis of basket cells in rat piriform cortex. *J Comp Neurol* 434, 308-328
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ** (1991): Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7, 91-100
- Erlander MG, Tobin AJ** (1991): The Structural and Functional-Heterogeneity of Glutamic-Acid Decarboxylase - a Review. *Neurochem Res* 16, 215-226
- Feldmeyer D** (2012): Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Frontiers in neuroanatomy* 6, 24
- 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
- Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marin O, Pachnis V, Kessar N** (2007): Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* 27, 10935-10946
- Freneau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH** (2004): VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27, 98-103
- Freund TF, Katona I** (2007): Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33-42
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ** (1997): Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 377, 465-499
- Giachetti A, Said SI, Reynolds RC, Koniges FC** (1977): Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3424-3428
- Gonchar Y, Burkhalter A** (1997): Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cerebral cortex* 7, 347-358
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A** (2007): Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* 1, 3
- Gonzalez-Burgos G, Lewis DA** (2008): GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 34, 944-961
- Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA** (2006): Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96, 834-845
- Hamilton DL, Abremski K** (1984): Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178, 481-486
- Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T** (2013): Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *J Neurosci* 33, 544-555

- Hoess RH, Ziese M, Sternberg N** (1982): P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3398-3402
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B** (2009): Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 29, 3642-3659
- Kawaguchi Y, Kubota Y** (1996): Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16, 2701-2715
- Kawaguchi Y, Kubota Y** (1997): GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral cortex* 7, 476-486
- Klausberger T, Somogyi P** (2008): Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53-57
- Krnjevic K, Phillis JW** (1963): Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *J Physiol* 165, 274-304
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y** (1994): Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649, 159-173
- Kulkarni S, Zou B, Hanson J, Micci MA, Tiwari G, Becker L, Kaiser M, Xie XS, Pasricha PJ** (2011): Gut-derived factors promote neurogenesis of CNS-neural stem cells and nudge their differentiation to an enteric-like neuronal phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G644-655
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H** (1992): Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6236
- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B** (2010): The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30, 16796-16808
- Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B** (2013): A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 16, 1662-1670
- Liang ZL, Zhang L, Wang XC, Gao F, Wang XN, Zhou S, Yu SY, Zhan RZ** (2013): Distribution and neurochemical features of neuronal nitric oxide synthase-expressing interneurons in the rat dentate gyrus. *Brain Res* 1505, 11-21
- Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, Bjorklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F** (1979): Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4, 1953-1976
- 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, Zeng H** (2010): A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13, 133-140
- Magistretti PJ, Cardinaux JR, Martin JL** (1998): VIP and PACAP in the CNS: regulators of glial energy metabolism and modulators of glutamatergic signaling. *Ann N Y Acad Sci* 865, 213-225

- 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
- Martin JL, Feinstein DL, Yu N, Sorg O, Rossier C, Magistretti PJ** (1992): VIP receptor subtypes in mouse cerebral cortex: evidence for a differential localization in astrocytes, microvessels and synaptosomal membranes. *Brain Res* 587, 1-12
- McBain CJ, Fisahn A** (2001): Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2, 11-23
- Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G** (2010): Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30, 1582-1594
- Morrison JH, Magistretti PJ, Benoit R, Bloom FE** (1984): The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP-positive cell: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 292, 269-282
- Mutt V, Said SI** (1974): Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem* 42, 581-589
- Nagy A** (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109
- Orban PC, Chui D, Marth JD** (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-6865
- Paxinos G, Franklin KBJ** (2001): The mouse brain in stereotaxic coordinates. Second edition. Academic Press
- Pasternak JR, Woolsey TA** (1975): The number, size and spatial distribution of neurons in lamina IV of the mouse Sml neocortex. *J Comp Neurol* 160, 291-306
- Petersen CC** (2007): The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56, 339-355
- Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M** (2013): Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* 16, 1068-1076
- Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A** (2013): Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*
- Porter JT, Cauli B, 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
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E** (1999): Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19, 5228-5235
- Pouille F, Scanziani M** (2001): Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293, 1159-1163
- 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, 1-14

- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J** (2011): Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71, 45-61
- Said SI, Mutt V** (1970): Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 169, 1217-1218
- Sauer B, Henderson N** (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170
- Schubert D, Kotter R, Luhmann HJ, Staiger JF** (2006): Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer IV in the primary somatosensory cortex. *Cerebral cortex* 16, 223-236
- Simons DJ** (1978): Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41, 798-820
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF** (1996a): Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. *Eur J Neurosci* 8, 2273-2285
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF** (1996b): Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat. *J Comp Neurol* 367, 194-204
- 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, Flaggmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kotter R, Luhmann HJ** (2004a): Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb Cortex* 14, 690-701
- Staiger JF, Masannek C, Schleicher A, Zusratter W** (2004b): Calbindin-containing interneurons are a target for VIP-immunoreactive synapses in rat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 468, 179-189
- Suzuki N, Bekkers JM** (2010): Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers. *J Comp Neurol* 518, 1670-1687
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Sudhof TC** (2007): A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318, 71-76
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ** (2011): A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995-1013
- Tillakaratne NJ, Medina-Kauwe L, Gibson KM** (1995): gamma-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 112, 247-263
- Toledo-Rodriguez M, Goodman P, Illic M, Wu C, Markram H** (2005): Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J Physiol* 567, 401-413
- Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R** (2006): Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *J Neurosci* 26, 12447-12455

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

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

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

Zhang C, Truong KK, Zhou QY (2009): Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS One* 4, e7151

DANKSAGUNGEN

Für die Entstehung der vorliegenden Doktorarbeit bin ich vielen Menschen zu Dank verpflichtet.

An erster Stelle möchte ich mich natürlich bei meinem Doktorvater Prof. Jochen Staiger bedanken, der es mir ermöglicht hat, im Institut für Neuroanatomie zu promovieren. Für seine Unterstützung und Betreuung bin ich sehr dankbar. Außerdem danke ich ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Besonderen Dank möchte ich Dr. Mirko Witte für die hervorragende Betreuung und konstruktive Unterstützung in allen Aspekten dieser Arbeit aussprechen. Außerdem danke ich ihm für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Dr. Robin Wagener möchte ich mich für das zur Verfügungstellen der Sonden, das geduldige Einarbeiten in verschiedene Techniken und Geräte und für die Weitergabe seines Wissens bedanken.

Alvar Prönneke danke ich für die umfangreiche technische und sonstige Unterstützung.

Herrn Dr. Martin Möck danke ich für die durchgeführten Perfusionen.

Bei den technischen Assistentinnen Patricia Sprysch, Sandra Heinzl, Heike Faust und Anna Dudek möchte ich mich für die kompetente Hilfe und Unterstützung im Labor bedanken, wobei ein ganz besonderer Dank an Patricia Sprysch und Sandra Heinzl geht.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Neuroanatomie möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, die wertvollen Dialoge und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

