

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Abteilung für Neuroanatomie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.

# **Der primäre somatosensorische 'Barrel' Kortex der *reeler*-Maus**

Funktionell aktivierbare und somatotop  
organisierte Module im hochgradig  
desorganisierten Neokortex

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg i.Br.

Vorgelegt 2013  
von Jan Robin Wagener  
geboren in Duisburg



Dekan	Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Hubert E. Blum
1. Gutachter	Prof. Dr. med. Jochen F. Staiger
2. Gutachter	Prof. Dr. rer. nat. Carola Haas

Jahr der Promotion 2013

If the human brain were so simple that we could understand it, we would be so simple that we couldn't.

Emerson M. Pugh

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DER 'WHISKER-TO-BARREL PATHWAY'	1
1.1.1	'Whisking'	1
1.1.2	Somatotopie	1
1.1.3	Anatomie und Physiologie paralleler Signalübertragungswege	2
1.1.4	Entwicklung kortikaler Module	5
1.2	DIE REELER-MAUS	6
1.2.1	Reelin	6
1.2.2	Reelin-Signalwege und neuronale Migration	6
1.2.3	Anatomie des <i>reeler</i> -Gehirns	7
1.2.4	Der primäre somatosensorische 'Barrel' Kortex im <i>reeler</i> -Gehirn	9
1.3	MOLEKULARE WERKZEUGE ZUR STRUKTURELLEN UND FUNKTIONELLEN UNTERSUCHUNG DER KOLUMNE	11
1.3.1	'immediate early genes'	11
1.3.2	Molekulare Determination des 'Schichtenschicksals' individueller Zellen	12
1.4	ZIELE UND GLIEDERUNG DER STUDIE	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1	VERSUCHSTIERE	16
2.2	VIBRISSENMANIPULATION UND SENSORISCHE STIMULATION	16
2.3	FIXATION UND AUFARBEITUNG DES GEWEBES	17
2.4	IMMUNFÄRBUNGEN	19
2.4.1	Immunhistochemie und Cytochromoxidase (CO)-Färbung	19
2.4.2	Immunfluoreszenz und fluoreszente Nissl-Färbung	20
2.4.3	Doppelmarkierung in der Immunfluoreszenz	20
2.5	IN SITU-HYBRIDISIERUNG	20
2.5.1	Sondenherstellung	20
2.5.1.1	Bakterienanzucht und Plasmidpräparation	21
2.5.1.2	Linearisierung, in vitro Transkription und alkalische Hydrolyse	21
2.5.2	Hybridisierung der Sonden	22
2.5.3	Kombination von Immunhistochemie und <i>in situ</i> -Hybridisierung	23
2.6	DATENGEWINNUNG, ANALYSE UND STATISTIK	23
2.6.1	Morphologische Rekonstruktion von Modulen des WTBP	24
2.6.2	Analyse der Position von Zellen mit definiertem 'Schichtschicksal'	25
2.6.3	Neuronale Aktivierung und ihre Verteilung auf die laminären Kompartimente	25
2.6.4	Quantifizierung der Verteilung vGluT2 immunreaktiver Boutons	26
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1	HIRNSTAMM	27
3.1.1	Morphologie trigeminaler Hirnstammkerne – wt vs. <i>rl</i> -/- Ncl. principalis nervi trigemini und Ncl. spinalis nervi trigemini	27 27

---

3.1.2	Funktionelle Aktivierung trigeminaler Hirnstammkerne – wt vs. <i>rl</i> -/- Ncl. principalis nervi trigemini und Ncl. spinalis nervi trigemini	31 31
<b>3.2</b>	<b>THALAMUS</b>	<b>33</b>
3.2.1	Morphologie im Ncl. ventralis posteromedialis thalami – wt vs. <i>rl</i> -/-	33
3.2.2	Funktionelle Aktivierung im Ncl. ventralis posteromedialis thalami – wt vs. <i>rl</i> -/-	35
<b>3.3</b>	<b>KORTEX</b>	<b>37</b>
3.3.1	Morphologie des primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex	37
3.3.1.1	Die Struktur des S1BF Areal im Wildtyp-Gehirn	37
3.3.1.2	Die Struktur des S1BF Areal im <i>reeler</i> -Gehirn	39
3.3.2	Funktionelle physiologische Aktivierung umschriebener neuronaler Netzwerke im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex	43
3.3.2.1	Funktionelle Aktivierung im S1BF Areal des Wildtyp-Gehirns	43
3.3.2.2	Funktionelle Aktivierung im S1BF Areal des <i>reeler</i> -Gehirns	45
3.3.3	Vergleichende morphologische Rekonstruktion des primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex und seiner Module – wt vs. <i>rl</i> -/-	48
3.3.4	Analyse des molekularen Schichtenschicksals individueller Zellen in der rekonstruierten Kolumne mittels RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung – wt vs. <i>rl</i> -/-	49
3.3.5	Funktionelle Aktivierung in Kompartimenten mit definiertem molekularem Schichtenschicksal – wt vs. <i>rl</i> -/-	54
3.3.6	Lemniskale thalamische Endigungsfelder im primären somatosensorischen Kortex – wt vs. <i>rl</i> -/-	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
4.1	DIE INTAKTHEIT DER SUBKORTIKALEN ANTEILE DES WTBP IM REELER-GEHIRN UND DIE ETABLIERUNG THALAMOKORTIKALER VERBINDUNGEN	64
4.2	INVERTIERUNG VERSUS CHAOS: EFFEKTE DES NEURONALEN MIGRATIONSDEFEKTES AUF DIE ZELLULÄRE ARCHITEKTONIK DES NEOKORTEX DER REELER-MAUS	69
4.3	FUNKTIONELLE MODULE IM DESORGANISIERTEN KORTEX	72
4.4	DIE ROLLE VON REELIN IN DER KORTEXENTWICKLUNG UNTER DER ANNAHME EINER VOLLSTÄNDIGEN NICHTAUSBILDUNG KORTIKALER SCHICHTEN	76
4.4.1	Das 'Ablöse und Stopp-Modell'	76
4.4.2	Das 'Ablöse und Start-Modell'	78
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>GLOSSAR</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATION</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>101</b>

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNG 1</b>	'Whisker-to-Barrel Pathway' (WTBP)	<b>3</b>
<b>ABBILDUNG 2</b>	Kortikogenese	<b>8</b>
<b>ABBILDUNG 3</b>	Vibrissenmanipulation und angereicherte Umgebung	<b>17</b>
<b>ABBILDUNG 4</b>	Trigeminale Hirnstammkerne	<b>28</b>
<b>ABBILDUNG 5</b>	Trigeminale Thalamuskern	<b>34</b>
<b>ABBILDUNG 6</b>	Funktionelle Module im S1BF Areal	<b>38</b>
<b>ABBILDUNG 7</b>	Funktionelle Module im S1BF Areal	<b>40</b>
<b>ABBILDUNG 8</b>	Funktionelle Module im S1BF Areal	<b>42</b>
<b>ABBILDUNG 9</b>	Aktivierete Neurone in deprivierten und stimulierten funktionellen Kolumnen	<b>44</b>
<b>ABBILDUNG 10</b>	Aktivierete Neurone in deprivierten- und Kontrollkolumnen	<b>46</b>
<b>ABBILDUNG 11</b>	Molekulare Schichtschicksalsmarker im adulten Kortex	<b>51</b>
<b>ABBILDUNG 12</b>	Verteilung der molekularen Schichtschicksalsmarker im adulten Kortex	<b>53</b>
<b>ABBILDUNG 13</b>	Molekulare Schichtschicksalsmarker und neuronale Aktivierung	<b>54</b>
<b>ABBILDUNG 14</b>	Molekulare Schichtschicksalsmarker und neuronale Aktivierung	<b>56</b>
<b>ABBILDUNG 15</b>	Molekulare Schichtschicksalsmarker und neuronale Aktivierung	<b>57</b>
<b>ABBILDUNG 16</b>	Die laminäre Verteilung akt. Neurone in depr. und stim. Wildtyp-Kolumnen	<b>58</b>
<b>ABBILDUNG 17</b>	Inverse Korrelation	<b>59</b>
<b>ABBILDUNG 18</b>	Verteilung der thalamischen Boutons über die kortikalen Schichten	<b>61</b>
<b>TABELLE 1</b>	Quantifizierung von Größe und Symmetrie der verschiedenen Anteile des WTBP	<b>30</b>



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DER 'WHISKER-TO-BARREL PATHWAY'

### 1.1.1 'Whisking'

Die Vibrissen (i.e. Schnurhaare) von Nagetieren sind Teil eines hoch entwickelten Sinnes- bzw. Tastorgans (Vincent, 1912; Brecht et al., 1997). Unter Zuhilfenahme der Vibrissen können die Tiere Objekte und Oberflächen erkennen und sind in der Lage, sich räumlich zu orientieren (Guic-Robles et al., 1989; Carvell and Simons, 1990; Kleinfeld and Deschenes, 2011). Der aktive Gebrauch der großen, lateralen Vibrissen der Schnauze wird als 'whisking' bezeichnet. Bei diesem motorisch komplex gesteuerten Prozess wird sensorische Information generiert, die peripher und zentral weiterverarbeitet wird (Deschenes et al., 2012). Die beschriebenen Prozesse induzieren verschiedene Formen Hebbischer- und nicht Hebbischer Plastizität, was schließlich zur Speicherung bleibender Gedächtnisinhalte, unter anderem auch im primären somatosensorischen Kortex, führen kann (Fox, 2002; Feldman and Brecht, 2005).

Die durch das 'whisking' induzierte neuronale Aktivität wird über anatomisch genau identifizierte Schaltkreise durch das zentrale Nervensystem geleitet. Dabei werden die neuronalen Signale in Hirnstamm und Thalamus modifiziert und dem primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex zur bewussten Wahrnehmung zugeleitet. Die Gesamtheit der an der Informationsleitung und -verarbeitung beteiligten Strukturen und Leitungsbahnen wird als 'Whisker-to-Barrel Pathway' (WTBP) bezeichnet (Waite, 2004; Petersen, 2007; Feldmeyer et al., 2012).

### 1.1.2 Somatotopie

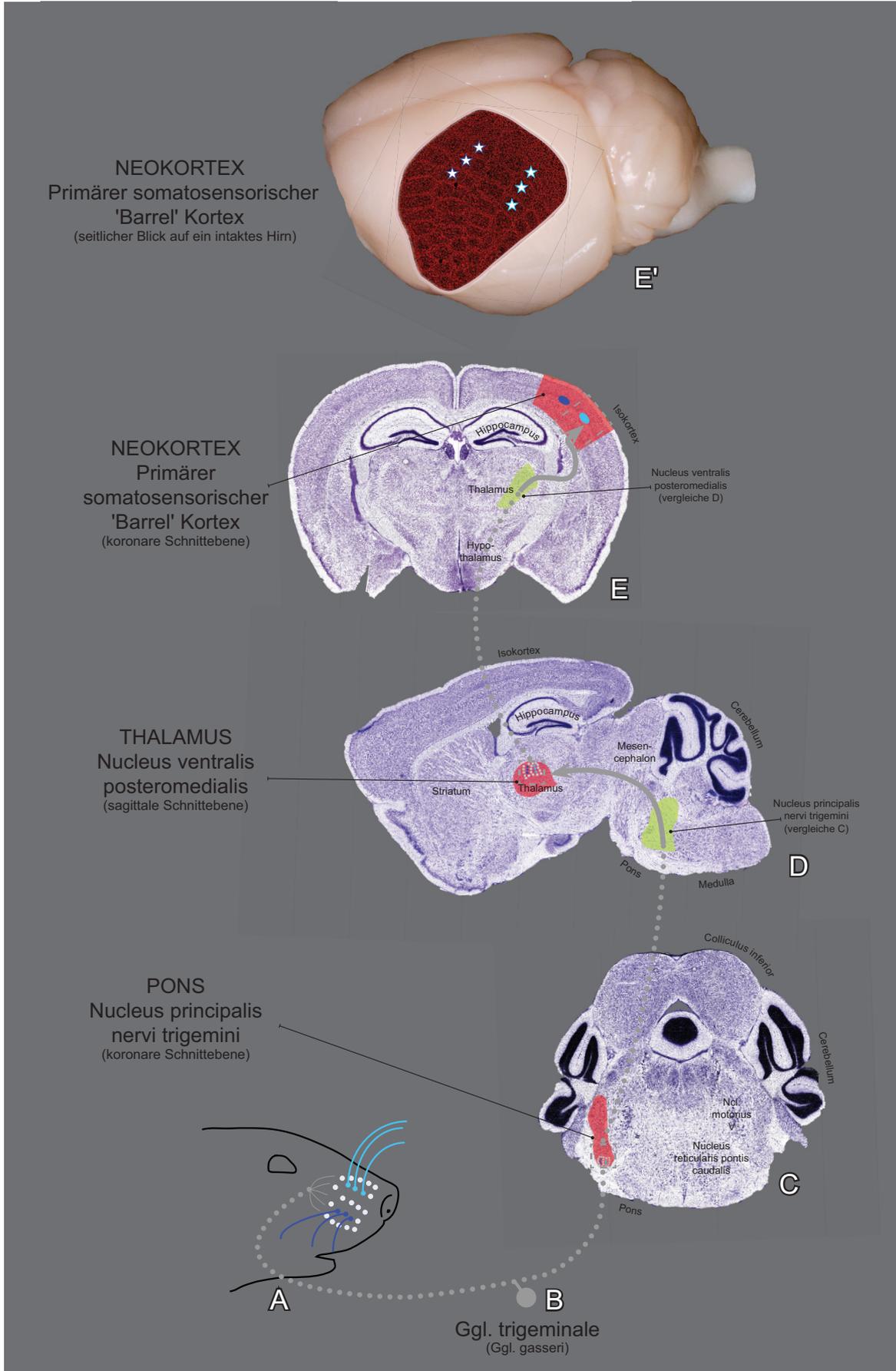
Die großen (Makro-)Vibrissen sind nicht willkürlich auf der Schnauze der Nager angeordnet, sondern gliedern sich in genetisch determinierte Reihen und Bögen (Abb. 1A, 3A). Das Vibrissenfeld umfasst die Reihen A - E, die sich von dorsal nach ventral erstrecken. Die einzelnen Reihen setzen sich aus 4 (A-Reihe) bis 7 (E-Reihe) Makrovibrissen zusammen. Die Vibrissen werden von kaudal nach rostral nummeriert. Vibrissen mit der jeweils gleichen Nummer bilden einen gemeinsamen

vertikalen Bogen. Am kaudalen Ende des Vibrissenfeldes findet sich zwischen den Reihen jeweils eine besonders mächtige Vibrisse. Diese sogenannten 'Straddler' werden mit Alpha, Beta, Gamma und Delta bezeichnet (Woolsey and Van der Loos, 1970; Brecht et al., 1997).

Die Tatsache, dass die dargestellte räumliche Ordnung der sensorischen Peripherie auf allen Ebenen des WTBP beibehalten wird, wird als Somatotopie bezeichnet. Sie ist ein wichtiges Ordnungsprinzip im sensorischen System (Welker, 1971; Simons, 1978). Selbst die Speicherung von Erinnerungen einer erkundeten Umgebung erfolgt im WTBP somatotopisch und stellt möglicherweise ein besonderes Charakteristikum des sensorischen Wahrnehmungslernens dar (Harris et al., 1999).

### **1.1.3 Anatomie und Physiologie paralleler Signalübertragungswege**

Der neuronale Anteil des WTBP beginnt in den einzelnen Follikeln der Vibrissen (Abb. 1A). Mit jedem Haarbalg sind die dendritischen Axone von etwa 200 Zellen aus dem Ganglion trigeminale assoziiert (Abb. 1B), welche die mechanischen Signale aus der Deflektion der Vibrissen in elektrische Nervenimpulse umwandeln (Dorfl, 1985). Die verschiedenen Qualitäten der afferenten Information werden über mindestens 3 räumlich getrennte parallele Signalübertragungswege vor allem dem primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex zugeleitet (Diamond et al., 2008). Die lemniskale Bahn leitet detaillierte Informationen über das stattgehabte 'whisking' und die protopathische und epikritische Berührungsinformationen (Ahissar et al., 2000). Die Zellen aus dem Ganglion trigeminale bilden ihre erste Synapse in der Pons aus, genauer im darin gelegenen Nucleus principalis nervi trigemini (Pr5). Jede Makrovibrisse wird hier von einem eigenen funktionellen Modul, dem 'Barrelette' repräsentiert. Die Gesamtheit der Barrelettes bildet eine somatotope Karte (Abb. 1C; Belford and Killackey, 1979; Ma, 1991). Die lemniskale Information kreuzt die Mittellinie, um im dorsomedialen Anteil des Ncl. ventralis posteromedialis thalami (VPM) den zweiten synaptischen Kontakt herzustellen. Die Repräsentation einer Makrovibrisse wird hier als 'Barreloid' bezeichnet. Die Gesamtheit der Barreloids bildet ebenfalls eine vollständige somatotope Karte der sensorischen Rezeptorperipherie (Abb. 1D; Van der Loos, 1976). Die thalamischen Axone aus dem dorsomedialen VPM projizieren vor allem in die Schicht IV des primären somatosensorischen Kortex. Sie enden dort im Zentrum von fassförmigen zellulären Aggregaten, den



'Barrels' ([engl.] = Tonne). Barrels bilden das Zentrum eines senkrecht organisierten Moduls, der Barrel-assoziierten Kolumne (Abb. 1E). Diese Module sind horizontal über den Kortex verteilt. Ihre Gesamtheit bildet das wiederum somatotop organisierte primäre somatosensorische 'Barrelfield' (S1BF; dt. Tönnchenfeld; Abb. 1E'), welches die erste kortikale Ebene der Informationsverarbeitung darstellt (Woolsey and Van der Loos, 1970). Die Module des S1BF besitzen ein rezeptives Feld, welches sie funktionell mit mehreren peripheren Vibrissen verbindet. Allerdings hat jeweils die sensorische Information der somatotop genau korrespondierenden Vibrisse einen überdurchschnittlich starken Einfluss auf die Feuerrate der Neurone einer Barrel-assoziierten Kolumne (Petersen, 2007; Schubert et al., 2007). Sie wird daher 'Hauptvibrisse' (principal whisker) genannt, während die anderen Vibrissen des rezeptiven Feldes als 'Nebenvibrissen' (adjacent/non-principal whisker) bezeichnet werden (Welker, 1971; Welker, 1976; Ito, 1985; Armstrong-James and Fox, 1987).

Der extralemniskale Signalübertragungsweg leitet spezielle sensorische Information, insbesondere über die zeitliche Koordination der Berührung (Yu et al., 2006; Diamond et al., 2008). Er formt seine erste Synapse in der Medulla oblongata mit Neuronen vom kaudalen Anteil des Nucleus spinalis nervi trigemini (pars interpolaris) und wird im ventrolateralen Anteil des VPM erneut umgeschaltet. Schließlich projiziert er in die zwischen den Barrels befindlichen Septen des S1BF Areal und in den sekundären somatosensorischen Kortex (Pierret et al., 2000).

Der dritte derzeit bekannte Informationsweg im trigeminalen System wird als paralemniskaler Weg bezeichnet. Er leitet Information über die Bewegung des Sensors, genauer über die Kinematik des 'whisking' und wirkt als Integrator der Information multipler Vibrissen (Ahissar et al., 2000; Ahissar et al., 2001). Folglich ist er nicht oder nur sehr bedingt somatotop organisiert. Im Hirnstamm wird er im mittleren Anteil des Nucleus spinalis nervi trigemini (pars interpolaris) umgeschaltet,

**Abbildung 1.** (Seite 3) **'Whisker-to-Barrel Pathway' (WTBP).** **A** Schemazeichnung des Vibrissenfeldes. Die Vibrissen B 1-3 (Türkis) und D 1-3 (Blau) sind erhalten, die korrespondierenden Module im WTBP werden durch Exploration einer neuen Umgebung aktiviert. Alle anderen Vibrissen sind getrimmt (vergleiche Abb. 3B). **B** Schematisiertes Ganglion trigeminale. **C-E** Nissl-Färbung koronarer bzw. sagittaler Hirnschnitte. Quelle: Allen Brain Atlas. **E'** Stereomikroskopische Hellfeldfotografie eines intakten Mäusegehirns (Bulbi olfactorii entfernt). Das überlagerte Bild zeigt die fluoreszente Nissl-Färbung (NeuroTrace) eines Schnittes durch den Barrel-Kortex, der tangential durch Schicht IV gelegt wurde. Die verschiedenen Anteile (synaptischen Umschaltstationen) des WTBP sind in den Hirnschnitten jeweils rot hervorgehoben. 'Barrelette Field' (**C**; Pons) und 'Barreloid Field' (**D**; Thalamus) sind schematisch eingezeichnet, die Topographie des 'Barrelfield' ist im NeuroTrace gefärbten Tangentialschnitt (**E'**) sichtbar. Es befindet sich in *loco typico*, ist jedoch übertrieben groß dargestellt. Die Position der aktivierten Module ist den korrespondierenden Vibrissen entsprechend farbkodiert.

im Thalamus im Nucleus posterior (pars medialis) thalami (POm), bevor er vor allem Schicht Va und I des S1BF Areal erreicht. Außerdem projiziert er in den sekundären somatosensorischen Kortex und den Motorkortex (Koralek et al., 1988; Pierret et al., 2000).

#### **1.1.4 Entwicklung kortikaler Module**

Die Entwicklung der Barrel-assoziierten Kolumne folgt einerseits einem genetisch determinierten Programm, ist andererseits aber auch abhängig von der korrekten Etablierung des thalamischen Eingangs und der damit verbundenen neuronalen Aktivität (Molnar and Blakemore, 1995; Erzurumlu and Gaspar, 2012; Molnar et al., 2012).

Genetisch gesteuerte Signalzentren rufen im embryonalen Kortex eine erste räumliche Orientierung hervor, indem sie Transkriptionsfaktoren exprimieren und Signalmoleküle sekretieren. Sie leisten die Vorarbeit zur topographischen Anordnung der unterschiedlichen Kortexareale und Module (O'Leary and Nakagawa, 2002; Grove and Fukuchi-Shimogori, 2003). Thalamische Fasern werden von Gradienten verschiedener Liganden- und Rezeptorsysteme zu- und in den embryonalen Kortex geleitet. Zielführungsmoleküle wie Semaphorine und Ephrine, aber auch Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine spielen dabei eine wichtige Rolle (Skaliora et al., 1998; Huntley and Benson, 1999; Uziel et al., 2008). Das frühe Einsprossen thalamischer Fasern ist dabei noch unabhängig von neuronaler Aktivität, die endgültige und korrekte Etablierung und Reifung thalamokortikaler Synapsen erfolgt dann aber zunehmend aktivitätsabhängig (Catalano and Shatz, 1998; Yamada et al., 2010).

## 1.2 DIE REELER-MAUS

### 1.2.1 Reelin

Die *Rein* <sup>-/-</sup> Mutante (im Folgenden als *reeler*-Maus bezeichnet) trägt ihren Namen aufgrund ihres ausgeprägten ataktischen Gangbildes (reeling [engl.] = taumeln) (Falconer, 1951). Makroskopisch ist eine Hypotrophie des gesamten Hirns mit besonderer Ausprägung beim Kleinhirn auffällig. Histologisch dominiert eine Störung der zellulären Architektur laminär aufgebauter Hirnareale, insbesondere des Neokortex (Caviness, 1988; D'Arcangelo, 2005).

Der Defekt kommt durch eine homozygote Mutation des *reelin*-Gens (*Rein*) zustande, die zum Funktionsverlust führt (Nullallel). Das *Rein*-Genprodukt ist ein großes (400 kDa), extrazelluläres Matrixprotein, das in komplexen räumlichen Mustern und zeitlichen Rhythmen gebildet wird (D'Arcangelo et al., 1995; D'Arcangelo et al., 1997). Im embryonalen Gehirn wird reelin-Protein von Cajal-Retzius Zellen in der Marginalzone des Kortex gebildet. Postnatal findet in einer Subgruppe GABAerger Neurone weiterhin eine reelin-Produktion statt (D'Arcangelo et al., 1995; Hirotsune et al., 1995; Alcántara et al., 1998).

### 1.2.2 Reelin-Signalwege und neuronale Migration

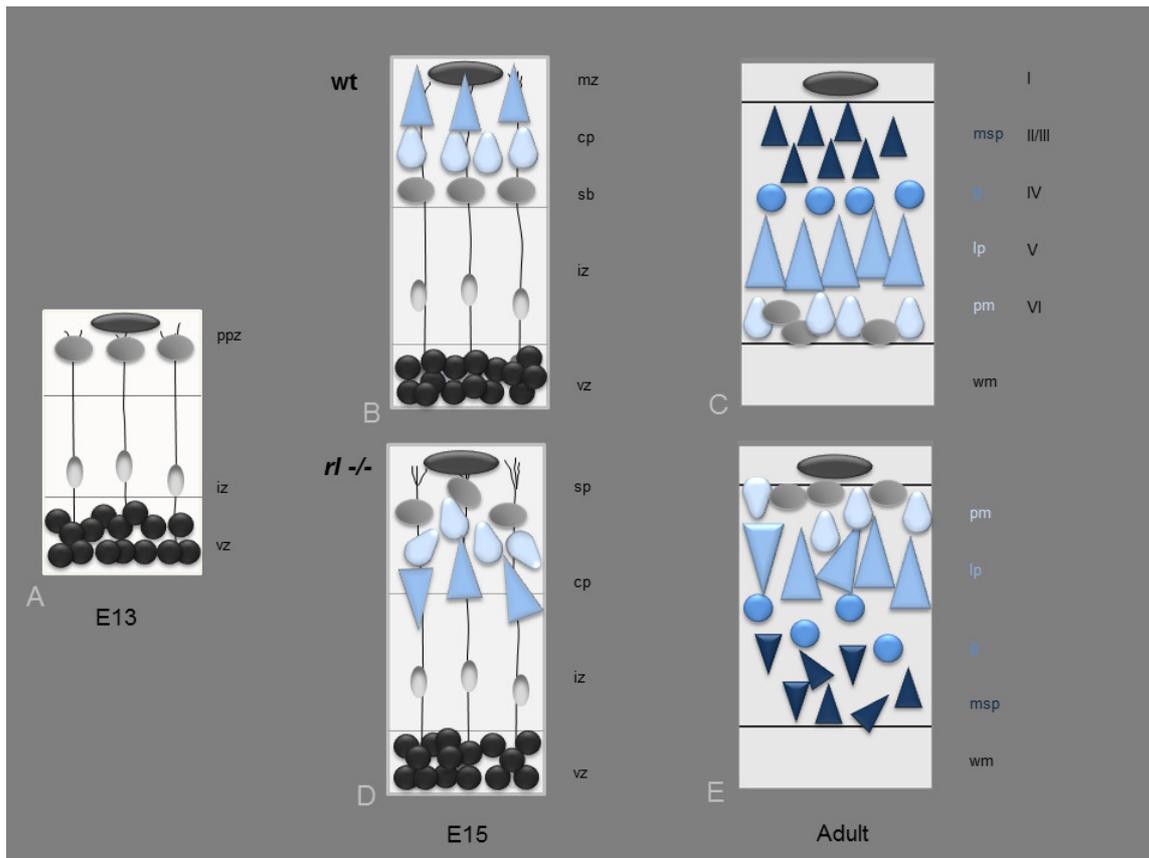
Dem reelin-Protein wird eine Schlüsselrolle bei neuronalen Migrationsprozessen und der vertikalen Positionierung von Neuronen insbesondere in Kortex und Hippocampus zugesprochen. Dazu bindet es an den Apolipoprotein-E Rezeptor 2 (apoER2) und den very-low-density lipoprotein Rezeptor (VLDLR), was via Tyrosinkinase Src und Fyn zur Phosphorylierung des Adapterproteins Disabled 1 (Dab1) führt (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; Howell et al., 1999; Keshvara et al., 2001; Bock and Herz, 2003). Der weitere reelin-Signalweg war und ist Gegenstand zahlreicher Studien, dennoch ist die genaue Rolle des reelin-Proteins bei der Migration und korrekten Etablierung kortikaler Schichten nur unzureichend verstanden (Cooper, 2008; Förster et al., 2010; Frotscher, 2010). Vieles deutet aber darauf hin, dass dem Protein in verschiedenen zeitlichen Phasen der Kortexentwicklung unterschiedliche Rollen zukommen (Cooper, 2008; Frotscher et al., 2009; Frotscher and Zhao, 2010). In der frühen Phase der Kortexentwicklung

findet Migration vor allem durch somale Translokation statt, welche durch reelin gefördert werden könnte (Sheppard and Pearlman, 1997; Nadarajah et al., 2001). In der späten Phase der Kortexentwicklung ist dann die Glia-gestützte Lokomotion der vornehmliche Migrationsmechanismus, wobei dem reelin wohl divergente Rollen zukommen: Vor Erreichen der Marginalzone werden migrierenden Neuronen von reelin wahrscheinlich angezogen, mit dem Erreichen der Marginalzone wirkt reelin dann aber als Stoppsignal (Cooper, 2008; Frotscher and Zhao, 2010).

### 1.2.3 Anatomie des *reeler*-Gehirns

Im *reeler*-Gehirn sind grundsätzlich alle anatomischen Strukturen auffindbar und topographisch korrekt zueinander positioniert. Dennoch finden sich mit einer massiven Hypotrophie des Kleinhirns und einem meist deutlich ausgeprägten Hydrozephalus bereits makroskopische Auffälligkeiten (Caviness, 1988; D'Arcangelo, 2005). Auf zellulärer Ebene werden weitere pathologische Veränderungen sichtbar, die vor allem laminär organisierte Hirnareale betreffen. Neben der besonders prominenten Desorganisation der neokortikalen Schichtung sind vor allem Hippocampus und Cerebellum deutlich in ihrer zellulären Struktur verändert (Meier and Hoag, 1962; Hamburgh, 1963; Caviness and Sidman, 1973b; Caviness, 1988; D'Arcangelo, 2005). Darüber hinaus finden sich auch in subkortikalen Hirnanteilen strukturelle Anomalien, die hier jedoch deutlich subtiler ausfallen. Die Bulbi olfactorii, sowie Nucleus facialis und Nucleus cochlearis sind nur einige wenige Beispiele für die zahlreichen weiteren Strukturen, für die Störungen der zellulären Integrität beschrieben sind (Caviness and Sidman, 1972; Martin, 1981; Goffinet, 1984b).

Besonders schwerwiegende Auswirkungen hat die *Reln*-Mutation auf die Architektur des Neokortex. Dieser weist eine deutliche Störung des sogenannten 'inside-out' Musters auf (Abb. 2). Mit 'inside-out' wird der Aufbau des Kortex im Hinblick auf seine Entwicklung beschrieben. Demnach liegen im adulten Wildtyp-Kortex die am spätesten entstandenen Zellen außen (Abb. 2C). Dies erreichen sie, indem sie ältere, innenliegenden Zellschichten durchwandern (Abb. 2B; Angevine and Sidman, 1961; Marin-Padilla, 1978). Für das *reeler*-Gehirn wird eine Umkehrung dieses Prinzips angenommen. Das bedeutet, neu entstandene Zellen haben die Fähigkeit verloren, früher generierte Zellschichten zu passieren und stauen sich jeweils unter ihnen an (Abb. 2D). Als Resultat wird eine Invertierung der kortikalen Schichtung beschrieben,



**Abbildung 2. Kortexgenese: Die 'inside-out' Sequenz im Wildtyp-Kortex und das 'outside-in' Modell für den *reeler*-Kortex.** Modifiziert nach Caviness, 1988. **A** Neue Neurone entstehen in beiden Genotypen in der 'Ventricular Zone' (vz). Sie migrieren in Richtung der kortikalen Oberfläche. Neurone, die vor dem embryonalen Tag 12 (E12) entstanden sind, bilden die 'Preplate' (ppz), Neurone, die später entstanden sind, bilden die transiente 'Intermediate Zone' (iz), in der sich migrierende Neurone befinden. Diese bilden um E15 herum die 'Cortical Plate' (cp). **B** Die Zellen der ppz werden von der cp auseinandergedrängt, dabei wird die ppz einerseits zur 'Marginal Zone' (mz), welche unter anderem die Cajal-Retzius Zellen enthält und zur 'Subplate' (sb), die später Teile der Schicht VI bildet. Nach Etablierung der cp positionieren sich alle nachfolgenden Neurone zwischen mz und cp und bilden dabei die Schichten II-V. **C** Da die neu entstandenen Neurone dabei stets die älteren Zellgruppen durchwandern entsteht das typische 'inside-out' Muster. **D** Im *reeler*-Kortex sind die migrierenden Neurone nicht in der Lage, die ppz zu durchdringen. Die cp bildet sich unterhalb der ppz, die damit zur 'Superplate' (sp) wird. **E** Das 'outside-in' Modell geht davon aus, dass die im Folgenden generierten Zellpopulationen jeweils nicht in der Lage sind, ältere Zellschichten zu durchwandern und sich unter diesen aufstauen. Die aus dem Modell theoretisch resultierende Inversion der Schichten II-VI konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Abkürzungen: wm: white matter, msp: medium-to-small pyramidal cells, g: granule cells, lp: large pyramidal cells, pm: polymorphic cells. Die römischen Ziffern markieren die kortikalen Schichten.

die als 'outside-in' Muster bezeichnet wird (Abb. 2E; Caviness and Sidman, 1973a; Caviness, 1982a; Goffinet, 1995; Rakic and Caviness, 1995). Das genaue Ausmaß des beschriebenen Defektes ist aber kontrovers. Vor allem mit der Anordnung kortikospinaler Projektionsneurone im *reeler*-Kortex lässt sich das Konzept der

'outside-in' Organisation nur sehr bedingt in Einklang bringen. In den dadurch notwendigen Modifikationen des Modells wird in späteren Arbeiten insbesondere eine Auflockerung der Schichtengrenzen mit einer Durchmischung von Zellen aus eigentlich unterschiedlichen Schichtkompartimenten zunehmend herausgestellt (Terashima et al., 1983; Hoffarth et al., 1995; Polleux et al., 1998; Yamamoto et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte das Modell der 'outside-in' Organisation für den adulten Kortex nicht verifiziert werden (s. u.).

#### **1.2.4 Der primäre somatosensorische 'Barrel' Kortex im *reeler*-Gehirn**

Der dargestellte Migrationsdefekt im *reeler*-Gehirn kann als interessantes 'Experiment der Natur' verstanden werden (Caviness, 1988), das Einsichten in die molekularen und zellulären Mechanismen der neuronalen Migration und die Entstehung der kortikalen Schichten gewährt. Entsprechend umfangreich ist die vorliegende Literatur zum *reeler*-Kortex. In diesem Zusammenhang war auch der primäre somatosensorische Kortex und das S1BF Areal bereits Gegenstand früherer Untersuchungen (Cragg, 1975; Caviness et al., 1976; Welt and Steindler, 1977; Obrien et al., 1987; Ferrere et al., 2006; Strazielle et al., 2006). Als sichtbares Korrelat der funktionellen Kolumne war dabei vor allem die Frage nach dem Vorhandensein von Barrels oder entsprechenden Äquivalenten zentral. Die Auswirkung der *Reln*-Mutation auf die Struktur des S1BF Areals kann aber keinesfalls als geklärt betrachtet werden. Von einer völligen Abwesenheit von Barrels (Cragg, 1975) über einen unterschiedlich stark ausgeprägten strukturellen Defekt (Welt and Steindler, 1977; Obrien et al., 1987; Strazielle et al., 2006) bis hin zur weitgehend normalen Struktur von Barrels im lediglich invertierten Kortex (Caviness et al., 1976) sind sämtliche Befunde vertreten.

Die Struktur der Barrel-assoziierten Kolumne ist eng mit der Organisation des Kortex in seine 6 Schichten verbunden (Schubert et al., 2007; Feldmeyer et al., 2012). Das Wissen um die genaue Beschaffenheit des kortikalen *reeler*-Defektes muss also als entscheidend für die korrekte Interpretation der Strukturen von Barrels oder äquivalenter Module betrachtet werden. Für die dargestellte Literatur muss jedoch davon ausgegangen werden, dass viele der Arbeiten durch die fälschlicherweise angenommene Invertierung des *reeler*-Kortex mit ihrer Aussage voreingenommen waren.

Im *reeler*-Kortex ist also bereits die reine strukturelle Existenz Barrel-assoziiierter Kolumnen zumindest als strittig zu betrachten. Gleiches gilt für die somatotope Organisation eventuell vorhandener Module. Die Untersuchung funktioneller Eigenschaften des S1BF Areals im *reeler*-Kortex fehlte bis zur vorliegenden Untersuchung vollständig.

### 1.3 MOLEKULARE WERKZEUGE ZUR STRUKTURELLEN UND FUNKTIONELLEN UNTERSUCHUNG DER KOLUMNE

#### 1.3.1 'immediate early genes'

'Immediate early genes' (IEGs) werden in kurzem zeitlichen Abstand zu einem geeigneten Stimulus exprimiert, ohne dass für ihre Transkription eine *de novo* Proteinexpression notwendig ist. Sämtliche notwendigen Transkriptionsmodulatoren liegen bereits in der Zelle vor (Yamamoto and Alberts, 1976; Herschman, 1991). IEGs sind eine Gruppe von Genen, die über kurzfristige Expression regulatorischer Proteine die mittel- bis langfristige Expression von Effektorgenen kontrollieren. Damit sind sie molekulare Vermittler struktureller und funktioneller Adaptation an sich verändernde Umweltbedingungen und Träger der neuronalen Plastizität (Morgan and Curran, 1989; Sheng and Greenberg, 1990; Staiger, 2006; Fowler et al., 2011).

Die basale Transkription der IEGs ist im gesamten WTBP charakteristischerweise gering, wohingegen ein geeigneter Stimulus zu teilweise massiver Transkription führt (Staiger et al., 2000). Induzierbar ist diese Transkription vor allem durch Neurotransmitter und elektrische Aktivität (Greenberg et al., 1986; Morgan and Curran, 1986). Die dargestellten Eigenschaften machen IEGs zu idealen Markern physiologisch bedeutsamer neuronaler Aktivität. Entsprechend sind IEGs wie *Fos*, *krox-24* oder *arc/arg 3.1* etablierte molekulare Werkzeuge zur strukturellen und funktionellen Untersuchung von Hirnarealen. Sie sind in der Lage, polysynaptisch aktivierte neuronale Netzwerke und funktionelle Systeme mit zellulärer Auflösung zu visualisieren (Sagar et al., 1988; Dragunow and Faull, 1989; Staiger, 2006).

In der vorliegenden Arbeit kommt das IEG *Fos-FBJ osteosarcoma oncogene* zum Einsatz, bzw. ein Antikörper gegen das entsprechende Proteinprodukt c-fos (Van Beveren et al., 1983). Dabei handelt es sich um einen besonders gut etablierten Aktivitätsmarker, der in der Lage ist, durch neuartige taktile Reize aktivierte neuronale Netzwerke im primären somatosensorischen Kortex zu visualisieren (Filipkowski et al., 2000; Staiger et al., 2000; Bisler et al., 2002; Staiger et al., 2002; Yassin et al., 2010).

### 1.3.2 Molekulare Determination des 'Schichtschicksals' individueller Zellen

Die Entdeckung schichtenspezifischer mRNA Expressionsprofile im Wildtyp-Gehirn lieferte einen neuen und interessanten Ansatzpunkt für die Untersuchung kortikaler Laminierungsdefekte in diversen Mutanten und transgenen Mauslinien (Gold et al., 1997; Schaeren-Wiemers et al., 1997; Ferrere et al., 2006; Yoneshima et al., 2006; Lein et al., 2007). Mit Hilfe der RNA *in situ*-Hybridisierung mit entsprechenden Sonden lässt sich die molekulare Schichtzugehörigkeit individueller Zellen bestimmen. Dabei kann das einzelne Neuron einer normalerweise laminär organisierten Population zugeordnet werden, auch wenn es in der jeweiligen Mauslinie ektop positioniert ist. Folglich werden die entsprechenden Sonden als molekulare 'Schichtschicksalsmarker' bezeichnet (Hevner et al., 2003; Lein et al., 2007; Molyneaux et al., 2007).

Bei der konventionellen Methode zur Bestimmung der Schichtzugehörigkeit wird mittels Bromdesoxyuridin (BrdU) oder H3-Thymidin-Injektion zum pränatalen Entstehungszeitpunkt der betrachteten Neuronenpopulation ein DNA-Marker in die trächtige Maus eingebracht, anhand dessen die Zellpopulation im adulten Kortex der Nachkommen wiedergefunden werden kann (Sidman et al., 1959; Nowakowski et al., 1989; Duque and Rakic, 2011). Die Theorie der 'outside-in' Organisation des *reeler*-Kortex basiert in weiten Teilen auf dieser Methodik (Caviness and Sidman, 1973a; Caviness, 1982a; Rakic and Caviness, 1995). Das Problem dieses sogenannten 'birth-dating' Verfahrens ist jedoch, dass die Schichtzugehörigkeit einer Zelle eher von ihrem molekularen Phänotyp als von ihrem genauen Entstehungszeitpunkt abzuhängen scheint (Takahashi et al., 1999; Hevner et al., 2003). Vor diesem Hintergrund ist die RNA *in situ*-Hybridisierung mit geeigneten Schichtschicksalsmarkern ein hervorragendes und geeigneteres Werkzeug zur Reevaluation des beschriebenen kortikalen Laminierungsdefektes im *reeler*-Gehirn.

In der vorliegenden Arbeit kam jeweils ein Schichtschicksalsmarker stellvertretend für jedes der 3 zentralen zellulären Kompartimente zum Einsatz: Der Schicht II/III Marker '*regulator of G-protein signaling 8*' (*Rgs8*) für das supragranuläre Kompartiment (Gold et al., 1997), der Schicht IV Marker '*RAR-related orphan receptor beta*' (*RORB*) für das granuläre Kompartiment (Schaeren-Wiemers et al., 1997) und der Schicht V Marker '*ets variant gene 1*' (*Er81* bzw. *Etv1*) für das infragranuläre Kompartiment (Yoneshima et al., 2006; Watakabe et al., 2007).

## 1.4 ZIELE UND GLIEDERUNG DER STUDIE

Die Tatsache, dass der Barrel-Kortex ein somatotop organisiertes Abbild seiner sensorischen Peripherie liefert, macht ihn zum gut definierten Modellsystem, in dem Manipulationen des WTBP an topographisch exakt definierter Stelle ausgelesen werden können. Darüber hinaus ist er anatomisch überaus gut charakterisiert. Auf dieser Grundlage wurde er zum beliebten Studienobjekt in der Untersuchung neuronaler Plastizität. Über zahlreiche Studien im S1BF Areal konnte eine Fülle fundierter Erkenntnisse über Bauplan, Funktion sowie Molekular- und Entwicklungsbiologie des sensorischen Neokortex gewonnen werden (cf. Feldman and Brecht, 2005; Inan and Crair, 2007; Petersen, 2007; Schubert et al., 2007; Erzurumlu and Gaspar, 2012; Feldmeyer et al., 2012).

Reelin spielt eine zentrale Rolle in der Kortexentwicklung (Cooper, 2008; Frotscher and Zhao, 2010; Kwan et al., 2012). Das Verständnis der Prozesse, die zur gestörten Kortexentwicklung im *reeler*-Gehirn führen, wird als Schlüssel zum Verständnis der physiologischen Funktion des reelin-Proteins verstanden. Die gegenwärtigen Beschreibungen zum Ausmaß des kortikalen *reeler*-Defektes müssen bestenfalls als unstimmig, vielleicht sogar als falsch betrachtet werden.

Die vorliegende Arbeit soll mit Hilfe molekularer Methoden die genaue Position von Zellen mit definierten molekularen Schichtenschicksalen im *reeler*-Kortex bestimmen und das Ausmaß der kortikalen Desorganisation reevaluieren. Eine genaue Beschreibung des Phänotyps soll eine kritische Hinterfragung der gängigen Modelle zur Funktion von reelin in der Kortikogenese ermöglichen und neue Erklärungsmöglichkeiten aufzeigen.

Die Betrachtung des S1BF Areals im desorganisierten *reeler*-Kortex erlaubt indes die Untersuchung einer zentralen neurobiologischen Fragestellung, die in der bisherigen, ausgiebigen Beforschung des Barrel-Kortex weitestgehend unbeachtet blieb: Die Untersuchung der Bedeutung der vertikalen Positionierung einer Zelle bzw. des sie umgebenden Milieus für die funktionelle Integrität des betrachteten Neurons. Auf der Basis der gegenwärtigen Literatur muss als unklar erachtet werden, welche Bedeutung der Lage einer Zelle für ihre Integration in ein kortikales Netzwerk zukommt, bzw. ob sich komplexe Netzwerke und somit funktionale Module in der Abwesenheit einer generischen vertikalen Organisation überhaupt ausbilden können. Auch ist unklar, ob ektopt gelegenen Zellen überhaupt einen intakten peripheren (thalamischen) Eingang erhalten. Diesen Fragen möchte sich die vorliegende Arbeit

annähern und soll klären, ob auch im desorganisierten *reeler*-Kortex das Potential zur Entwicklung komplex organisierter funktioneller Module besteht. Die Untersuchung der funktionellen Aktivierbarkeit definierter Areale des desorganisierten Kortex erlaubt indes Einblicke in die funktionelle Notwendigkeit der kortikalen Gliederung. Im größeren Zusammenhang wird somit die Frage beleuchtet, ob die Gliederung des Kortex in Schichten ein Relikt der Phylogenese oder ein sinnvolles und notwendiges Prinzip zur effektiven Informationsverarbeitung darstellt. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche histologische und molekulare Methoden mit einem Stimulationsparadigma kombiniert, das die Expression von c-fos in definierten Schaltkreisen induziert, die mit der Prozessierung taktiler Information befasst sind.

Im ersten Teil der Studie erfolgt ein detaillierter anatomischer Vergleich der verschiedenen Anteile des WTBP im Wildtyp- und *reeler*-Gehirn. In Hirnstamm, Thalamus und Kortex wird die Struktur der verschiedenen Module beschrieben und verglichen, sowie ihre Gliederung in somatotope Karten untersucht. Für die subkortikalen Module steht dabei die Frage im Mittelpunkt, ob ihre Struktur mit einem geordneten Eingang peripherer Information in den primären somatosensorischen *reeler*-Kortex vereinbar ist, während im Kortex das bloße Vorhandensein und die veränderte Struktur funktioneller Module untersucht wird. Als zweiter wichtiger Aspekt wird die funktionelle Aktivierbarkeit sämtlicher vorgefundener Module in Folge eines physiologischen Stimulationsparadigmas untersucht und die gewonnenen Resultate werden zwischen den Genotypen verglichen.

Der zweite Teil der Studie widmet sich einer Evaluation des Ausmaßes des strukturellen Defektes im *reeler*-Kortex. Für repräsentative Schichten der drei grundlegenden Kompartimente (supragranulär, granulär, infragranulär) wird mittels eines 'Schichtenschicksalsmarkers' die genaue Verteilung individueller, markierter Zellen untersucht. Die physiologische Aktivität der Kolumnen wird den unterschiedlichen laminären Kompartimenten zugeordnet. Somit wird neben der generellen Aktivierbarkeit der Kolumne auch die zelluläre Komposition der Aktivierung untersucht, was weitere Rückschlüsse auf die physiologische Aktivierbarkeit des *reeler*-Kortex zulässt.

Unsere Befunde legen nahe, dass ein intakter thalamischer Eingang in den

desorganisierten *reeler*-Kortex über ausgeprägte entwicklungsabhängige Plastizitätsmechanismen in der Lage ist, die Bildung funktionaler somatotop organisierter Module zu induzieren. Innerhalb der Module sind umschriebene neuronale Netzwerke durch physiologische Stimulation aktivierbar.

Die Untersuchung des laminären Defektes des *reeler*-Kortex zeigt eine unerwartet starke strukturelle Ausprägung und lässt sich nicht mit dem vorherrschend beschriebenen Muster der 'outside-in' Organisation in Einklang bringen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERSUCHSTIERE

Für die vorliegende Studie wurden 47 adulte Mäuse aus dem Freiburger Universitätstierstall verwendet. Es handelte sich um B6C3Fe Wildtyp- (24) und *reeler*- (23) Mäuse männlichen und weiblichen Geschlechts. Das Mindestalter der Tiere betrug 3 Monate. Sämtliche Versuchsprotokolle stehen im Einklang mit dem Deutschen Tierversuchsgesetz und sind darauf optimiert das Leiden der Tiere zu minimieren und die Anzahl der Versuchstiere gering zu halten. Die Tiere wurden unter Standard-Laborbedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

### 2.2 VIBRISSENMANIPULATION UND SENSORISCHE STIMULATION

Die Tiere wurden jeweils abends ins Labor gebracht und durch intraperitoneale Ketamingabe (0,1 mg/g Körpergewicht) sediert. Unter zur Hilfenahme eines Operationsmikroskopes (Zeiss) wurden durch vollständiges Abschneiden bestimmter Schnurhaare verschiedene Vibrissensmuster generiert. Standardmäßig blieben die Vibrissen C 1 bis 3 auf der rechten Seite der Schnauze, sowie B 1 bis 3 und D 1 bis 3 auf der linken Seite der Schnauze intakt (Abb. 3 A/B). In Einzelfällen wurden für Kontrollversuche auch andere Vibrissensmuster generiert.

Am Morgen nach der Vibrissenmanipulation wurden die Tiere in eine angereicherte Umgebung verbracht. Diese befand sich jeweils in einer Box (60x40x40 cm), die mit verschiedenen natürlichen und künstlichen Materialien bestückt war: Einem kleinen Labyrinth, Ästen, Steinen, Eicheln, sowie Styroporkugeln und Pappstückchen (Abb. 3C). Diese Umgebung wurde von den Versuchstieren in völliger Dunkelheit für 2 Stunden frei exploriert. Anschließend fanden sich sowohl bei Wildtyp- als auch bei *reeler*-Tieren immer offensichtliche Zeichen ausgeprägter explorativer Aktivität, zum Beispiel Positionsveränderungen verschiedener Objekte, Knabberspuren an den Objekten und Tierkot an verschiedenen Stellen der angereicherten Umgebung. Unmittelbar nach der Exploration wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketamin (1 mg/g Körpergewicht) erneut anästhesiert und damit auf die Perfusion vorbereitet.



**Abbildung 3. Vibrissenmanipulation und angereicherte Umgebung.** **A** Intaktes Vibrissenfeld einer adulten Maus. Die weißen Punkte markieren die Haarfollikel und damit den Ursprung der einzelnen Vibrissen. Die Vibrissenreihen werden von dorsal nach ventral mit A-E benannt. **B** Vibrissenfeld nach der Manipulation. Die Ursprünge der verbliebenen Vibrissen B 1-3 und D 1-3 sind durch Sternchen hervorgehoben, alle anderen Vibrissen sind bis knapp über Hautniveau entfernt. Mit diesem Vibrissensatz wurde die angereicherte Umgebung erkundet. **C** Die Umgebung

enthielt verschiedene natürliche und künstliche Materialien sowie Futter und Wasser (runde Glasschale). Sie wurde von den Versuchstieren für 2 Stunden in völliger Dunkelheit exploriert.

### 2.3 FIXATION UND AUFARBEITUNG DES GEWEBES

Die Perfusion erfolgte transkardial mit hydrostatischem Druck. Das Blut wurde mit 15 ml physiologischer Kochsalzlösung aus dem Gefäßsystem gespült. Zur Fixation folgte 150 ml 4-prozentiges Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) pH 7,4. Das Gehirn wurde unmittelbar nach der Perfusion herauspräpariert und für 2 Stunden in derselben Lösung bei 4°C nachfixiert.

Für Immunfärbungen wurden die Gehirne zu Vorderhirnblöcken, welche den somatosensorischen Kortex enthielten, zurechtgeschnitten. Die Blöcke wurden auf den Objekthalter eines Vibratoms (Microm) geklebt und in koronarer Orientierung zu 50 µm dicken Hirnschnitten verarbeitet.

Für *in situ*-Hybridisierungen wurde nach der Fixation nur noch mit RNase freien Materialien gearbeitet (Pinzetten, Messzylinder etc.). RNase Freiheit wurde durch

vierstündiges 'Backen' bei 180°C erreicht. Materialien, die diesen Temperaturen nicht standhalten (z.B. Kunststoff 'well' Platten) wurden bereits RNase frei erworben. Sämtliche Lösungen wurden (soweit möglich) durch 12-stündige Behandlung mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) und anschließendem Autoklavieren RNase frei gemacht.

Für *in situ*-Hybridisierungen wurden die Vorderhirnblöcke zunächst einer Kryoprotektion mit 20-prozentiger Sucroselösung unterzogen (in 0,1 M PB, mit 0,9 % NaCl; PBS). Im Anschluss wurden die Blöcke mit Tissue Tec (O.C.T.) auf den Objekthalter eines Kryostats (Leica) aufgefroren und bei -20°C zu 40 µm dicken Hirnschnitten verarbeitet.

Zur Herstellung von Tangentialschnitten (nur für Immunfärbungen) wurde der tangential abgetrennte Kortex vor der Postfixierung zwischen zwei Glasplättchen leicht zusammengedrückt und damit abgeflacht. Nach 2-stündiger Postfixierung (s.o.) wurden mit dem Vibratom konsekutive Schnittserien von 50 µm Dicke angefertigt, wodurch die Schnittebene parallel zu den kortikalen Schichten verlief (Welker and Woolsey, 1974).

Um einen vollständigen Überblick über das 'Barreloid Field' zu bekommen, wurden einige Hirne in einer speziellen Orientierung senkrecht zur langen Achse der Barreloids des VPM geschnitten (nur für Immunfärbungen). Der rostrale Pol der Vorderhirnblöcke wurde um 5° von der Horizontalebene abgehoben (Woolsey et al., 1979), danach wurden beide Hemisphären von dorsal betrachtet im 30° Winkel zur mediosagittalen Ebene geschnitten, und zwar die rechte Hemisphäre im, und die linke Hemisphäre gegen den Uhrzeigersinn (der rostrale Hirnpol befand sich in der dorsalen Ansicht auf der 12 Uhr Position). Anschließend wurde, von kaudal betrachtet, im 50° Winkel zur neu entstandene mediale Fläche geschnitten, erneut die rechte Hemisphäre im und die linke Hemisphäre gegen den Uhrzeigersinn. Letztgenannter Schnitt wurde einmal oberhalb und einmal unterhalb des VPM ausgeführt (Haidarliu and Ahissar, 2001). Die ventrale Seite der so entstandenen Hirnblöcke wurde auf einen Objekthalter geklebt und mit dem Vibratom eine konsekutive Schnittserie von 50 µm dicken Schnitten angefertigt.

Die bei der Anfertigung der Vorderhirnblöcke übriggebliebenen kaudalen Hirnanteile (insbesondere der Hirnstamm) durchliefen ebenfalls eine Kryoprotektion, bevor sie mit dem Kryostat koronar auf 50 µm Dicke geschnitten wurden. Mit ihnen erfolgte die immunhistochemische Anfärbung der trigeminalen Hirnstammkerne (s.u.).

## 2.4 IMMUNFÄRBUNGEN

### 2.4.1 Immunhistochemie und Cytochromoxidase (CO)-Färbung

Die Schnitte wurden frei flottierend 2 x 15 Minuten in PB gespült. Danach erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit 1 %  $H_2O_2$  (10 min in PB) und erneutes Spülen in PB für 20 Minuten, sowie jeweils 20 Minuten mit 0,05 M Tris-gepufferter Saline-Lösung pH 7,6 (TBS) und TBS mit 0,4 % Triton X100 (TBST). Nachfolgend wurden durch 45-minütige Inkubation in 10 % Ziegenserum (in TBST) unspezifische Antigene blockiert. Zwischen jedem der folgenden 3 Schritte wurden die Schnitte 4 x 15 Minuten in TBST gespült.

Schritt 1) Inkubation für 48-72 Stunden bei 8°C in polyklonalem c-fos-Antiserum (Kaninchenserum, Santa Cruz Biotechnology), 1:5000 in TBST.

Schritt 2) Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur in biotinyliertem Ziegen-anti-Kaninchenserum (Vector), 1:200 in TBST.

Schritt 3) Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem Komplex aus Avidin-Biotin gekoppelter Peroxidase (ABC; Vector), 1:200 in TBST. Nachfolgend wurde jeweils 15 Minuten mit TBST und TBS gespült, sowie 2 x 15 Minuten mit 0,05 M Tris Puffer, pH 8,2 (der alkalische pH stabilisiert die DAB Nickel-Färbung).

Schritt 4) Inkubation der Schnitte in TB pH 8,2 und den Färbekomponenten: 0,015 % 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Sigma) und 0,4 % Ammonium-Nickelsulfat (Fluka). Die eigentliche Färbereaktion wurde durch das Hinzufügen von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gestartet, die  $H_2O_2$ -Konzentration der endgültigen Färbelösung betrug 0,006 %. Das Fortschreiten der Färbereaktion wurde durch intermittierendes Mikroskopieren der Schnitte beurteilt und durch Spülen mit TB pH 8,2 gestoppt.

Der Immunfärbung folgte eine Cytochromoxidase (CO) Enzymhistochemie. Die Schnitte wurden mit Cytochrom C, Sucrose, Katalase und DAB in PB inkubiert (10 ml der Färbelösung enthielten: 1 ml 10x-DAB, 6 mg Cytochrom C, 444 mg Sucrose, 30  $\mu$ l Katalase 0,3 %, 9 ml PB pH 7,4). Die Entwicklung der Färbereaktion dauerte bis zu 48 Stunden bei 40°C an. Die Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop überprüft und mit PB abgestoppt. Die dargestellte Färbemethode führt zu einer Braunfärbung von Hirnarealen mit hoher metabolischer Aktivität und ist geeignet, funktionelle Module im WTBP zu visualisieren (Wong-Riley and Welt, 1980). Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen, luftgetrocknet und in Entellan (Merck) eingedeckt.

## 2.4.2 Immunfluoreszenz und fluoreszente Nissl-Färbung

Für die Immunfluoreszenz wurde der c-fos-Antikörper 1:1000 in TBST verdünnt. Inkubation und Waschschritte entsprachen dem oben dargestellten Immunhistochemie-Protokoll. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte in diesem Falle aber durch Inkubation in Alexa 488 konjugiertem Sekundärantikörper (Eselserum; Invitrogen), 1:400 in TBST für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dem Spülen in TBS, TB und PB (alle pH 7,6) erfolgte die fluoreszente Nissl-Färbung (NeuroTrace 530/615; Invitrogen). Dazu wurde zunächst jeweils 10 Minuten in PBS, PBS mit 0,4 % Triton X100 (PBST) und erneut in PBS gespült. Im Anschluss erfolgte die 20-minütige Inkubation in der NeuroTrace Lösung 1:100 in PBS verdünnt. Es folgten weitere Waschschritte in PBST, PBS und PB für jeweils 20 Minuten.

## 2.4.3 Doppelmarkierung in der Immunfluoreszenz

Zur Visualisierung thalamischer Boutons wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Eine Mischung aus vGluT2- (Spezies Meerschweinchen, 1:10.000; Millipore) und c-fos- (siehe oben) Antikörpern wurde dem obigen Protokoll entsprechend mit den Schnitten inkubiert. Die Visualisierung erfolgte simultan durch Inkubation mit Esel-anti-Meerschweinchen-Alexa 488 gekoppeltem Antikörper und Esel-anti-Kaninchen-Alexa 594 gekoppeltem Antikörper (beide von Invitrogen; 1:500).

Die immunfluoreszenten Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und mit Aqua-Poly/Mount (Polyscience) unter Deckgläsern eingebettet.

## 2.5 IN SITU-HYBRIDISIERUNG

### 2.5.1 Sondenherstellung

Die *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit den Schichtenschicksalsmarkern *Rgs8*, *RORB* (Synonym: *ROR-BETA*) und *Er81* (Synonym: *Etv1*) wurden mit Digoxigenin (DIG)-markierten c-RNA Sonden durchgeführt.

Als Vorlage für die *in vitro* Transkription dienten Plasmide mit den entsprechenden mRNA Sequenzen. Die Plasmide wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für

Genomforschung (Ressourcenzentrum Primärdatenbank; RZPD) hergestellt und in Bakterien transfiziert geliefert: *Rgs8* (RZPD Nr.: IRAVp968E09162D; Entrez Gene ID: 67792), *RORB* (RZPD Nr.: IRATp970B11105D; Entrez Gene ID: 6096), *ER81* (RZPD Nr.: IRAKp961E106Q; Entrez Gene ID: 14009).

### 2.5.1.1 Bakterienanzucht und Plasmidpräparation

Die Plasmide wurden durch Kultivierung der gelieferten *E. coli* Bakterien auf Fest- und Flüssignährmedien vermehrt. Jeweils eine Kolonie aus den gelieferten Festkulturen wurde auf einer LB (= lysogeny broth) Agarplatten mit Ampicillin als Selektions-Antibiotikum (Endkonzentration 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde eine der gewachsenen Kolonien in ein LB/ Ampicillin-Flüssigmedium überbracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert (5000 rpm, 4°C, 5 Minuten), der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet resuspendiert (Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 10 mM EDTA, RNaseA 100 µg/ml). Anschließend wurden die Bakterien für 3 Minuten lysiert (Lysispuffer: 200 mM NaOH, 1 % SDS), bevor die Reaktion mit Neutralisationspuffer (3 M NaOAc, pH 5.5) gestoppt wurde. Die Bakterentrümmer wurden in den Bodensatz zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 10 Minuten) und die DNA im Überstand mit Isopropanol bei -80°C für eine Stunde gefällt. Die DNA wurde anschließend zwei weitere Male zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 10 Minuten) und zunächst in 70 % Ethanol und nach Trocknung schließlich in destilliertes Wasser aufgenommen.

### 2.5.1.2 Linearisierung, in vitro Transkription und alkalische Hydrolyse

Die Linearisierung der Plasmid DNA erfolgte für *RORB* und *ER81* mit dem Restriktionsenzym Not I als Matrize für die sp6 RNA Polymerase (Herstellung der Antisense-Sonde) und mit Sal I für die T7 RNA Polymerase (Herstellung der Sense-Sonde). Das *Er81* enthaltende Plasmid wurde ebenfalls mit Not I und Sal I geschnitten, jedoch für die T7 (Sense) und T3 RNA Polymerasen (Antisense). Die linearisierte DNA wurde mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungssystems (QIAquick, Qiagen) aufgereinigt.

Jeweils 1 µg der linearisierten Plasmidmatrizen wurde bei den folgenden in vitro

Transkriptionen eingesetzt, außerdem ATP, GTP, CTP und digoxigenin-11-UTP (DIG RNA labeling mix; Roche), RNasin (Amersham), Transkriptionspuffer und T3, T7 oder SP6 RNA Polymerase (Roche) bei 37°C für 2 Stunden.

Die Länge der RNA Sonden wurde mittels alkalischer Hydrolyse auf ca. 350 Basenpaare reduziert. Hydrolyse von 50 µl RNA-Lösung (200 ng/µl) in 30 µl 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 20 µl 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> bei 60°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 0,2 M Natriumacetat/ Eisessig abgestoppt.

Berechnung der Inkubationszeit (t) für die alkalische Hydrolyse:

$$t \text{ (min)} = \frac{\text{Transkriptlänge (Kb)} - \text{gewünschte Länge (Kb)}}{0,11 \times \text{Transkriptlänge} \times \text{gewünschte Länge}}$$

## 2.5.2 Hybridisierung der Sonden

Die Kryostat Schnitte wurden nach 3-maligem Waschen in 2x Standard Saline Citratpuffer (1x SSC= 0.15 M NaCl, 0.015 M Natriumcitrat, pH 7.0) für 15 Minuten in einer 1:1 Mischung aus 2x SSC und Hybridisierungspuffer (HB= 50 % Formamid, 4x SSC, 250 µg/ml denaturierte Lachsspermien DNA, 100 µg/ml tRNA, 5 % Dextransulfat und 1 % Denhardts Reagenz) vorbehandelt. Es folgte eine Prähybridisierung in reinem Hybridisierungspuffer bei 55°C für 1 Stunde. Für die eigentliche Hybridisierung wurden jeweils 50 ng/ml der Digoxigenin markierten Antisense-Proben von *Rgs8* und *Er81* und 100 ng/ml von *RORB* eingesetzt, beziehungsweise dem HB zugegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Es folgten Waschschrte in 2x SSC (2x 15 Minuten; Raumtemperatur), 2x SSC mit 50 % Formamid (15 Minuten; 65°C), 0.1x SSC mit 50 % Formamid (15 Minuten; 65°C) und schließlich 0.1x SSC (2x 15 Minuten; 65°C).

Der Nachweis der DIG-markierten Proben erfolgte mit anti-DIG Fab Antikörper-Fragmenten, die mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt waren (aus Schafserum; Roche). Diese wurden 1:1500 in TBS mit Blockier-Reagenz (Roche) bei 4°C über Nacht inkubiert und mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT; Roche) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP; Roche) angefärbt. Die Entwicklung erfolgte im Dunkeln und die Intensität der Färbung wurde durch Inspektion unter dem Stereomikroskop

beurteilt. Nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität wurde die Reaktion durch Spülen in TBS abgestoppt. Als Eindeckmedium für Schnitte aus der *in situ*-Hybridisierung diente Kaisergelatine (VWR).

### 2.5.3 Kombination von Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung

Die Immunfärbung folgte dem oben dargestellten Protokoll, wegen der notwendigen RNase Freiheit (und der Problematik, dass sich TB Puffer nicht autoklavieren lässt) wurden jedoch andere Puffer verwendet: PB 0.1 M anstelle von TB und PBS 0.01 M anstelle von TBS und TBST. Der pH Wert der Lösungen betrug durchgehend 7,4. Die Färbung erfolgte ohne Triton X100, stattdessen wurden die Hirnschnitte zunächst eine weitere Stunde einer Kryoprotektion unterzogen (20 % Sucrose in PBS), bevor sie durch 3 maliges Frieren und Tauen über flüssigem Stickstoff permeabilisiert wurden. Einen weiteren Unterschied zu obigem Protokoll stellte die verwendete Färbelösung dar. Das alleinige Verwenden von DAB anstelle von DAB-Nickel resultierte in einer braunen Färbung. Die nachfolgende ISH entsprach dem oben dargestellten Protokoll.

## 2.6 DATENGEWINNUNG, ANALYSE UND STATISTIK

Die morphologische Rekonstruktion der einzelnen Anteile des WTBP in Hirnstamm, Thalamus und Kortex wurde jeweils in 6 Wildtyp- und 5 *reeler*-Hirnen durchgeführt (Tabelle 1). Die Analysen der Verteilung der Schichtenschicksalsmarker (Abb. 11, 12) sowie die Aktivierung innerhalb der mit den Markern definierten Kompartimente (Abb. 13, 14, 15) erfolgten in jeweils 6 Hirnen jedes Genotyps. Die Quantifizierung der Verteilung lemniskaler thalamischer Synapsen in aktivierten Kolumnen erfolgte in 3 Hirnen jedes Genotyps (Abb. 18). Die Daten zu jedem einzelnen Tier wurden in 2 unabhängigen Hirnschnitten des gleichen Tieres gewonnen und untereinander gemittelt, bevor sie in die statistische Analyse eingingen.

Sämtliche quantitative Daten wurden via Live-Mikroskopie (Nikon Eclipse 80i) mit der NeuroLucida Software (MBF Bioscience) generiert und mit dem Neuroexplorer (MBF Bioscience) exportiert. Die Statistik wurde mit Excel 2007 (Microsoft) und Mystat

(Systat) angefertigt. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um Mittelwerte aus oben genannten Tierzahlen, die jeweils mit der positiven und negativen Standardabweichung präsentiert werden.

Die abgebildeten mikroskopischen Fotoaufnahmen (Hellfeld und Fluoreszenz) wurden an einem Nikon Eclipse 80 i mit einer Mikroskopkamera (mbf cx 9000, MBF Bioscience) und der Neurolucida Software aufgenommen. Die Helligkeit und Schärfe der Bilder wurde mit Photoshop Cs6 (Adobe) angepasst.

Einige der abgebildeten *in situ*-Hybridisierungsbilder (Abb. 11, 12, 15) sind in Falschfarben dargestellt. Zur Umwandlung der Farben und Überlagerung der einzelnen Bilder wurde ebenfalls Photoshop verwendet.

### 2.6.1 Morphologische Rekonstruktion von Modulen des WTBP

Die unterschiedlichen anatomischen Strukturen des WTBP wurden an konsekutiven Hirnschnitten 2-dimensional rekonstruiert. Dafür wurden die Schnitte mit kombinierter CO / c-fos-Färbung verwendet, die in beiden Genotypen eine Identifikation der Module ermöglichten. Zum Auffinden des jeweils geeigneten Hirnschnitts wurde die rostro-kaudale oder dorso-ventrale Position der Schnitte mit Hilfe eines Mäusegehirn-Atlas bestimmt (Paxinos and Franklin, 2001). Für sämtliche Strukturen wurde nach der Rekonstruktion die von ihnen belegte Fläche gemessen. Als quantitativer Wert für die Symmetrie einer Struktur wurde darüber hinaus der Formfaktor verschiedener Module berechnet. Er berücksichtigt die Beziehung von belegter Fläche zum Durchmesser einer Struktur und ist damit ein Maß für die Komplexität einer Form ( $= 4 \pi \times \text{Area} / \text{Perimeter}^2$ ; Neuroexplorer).

Um eine Vergleichbarkeit der Größe anatomischer Strukturen aus dem Wildtyp-Gehirn und dem hypotrophen *reeler*-Gehirn zu gewährleisten, wurde in unserem Labor mit den gleichen Methoden eine Analyse des Volumens von Hirnstamm, Thalamus und Kortex der beiden Gehirne vorgenommen (unveröffentlichte Daten; Cs. Dávid). Dazu wurden an koronaren Schnitten von 4 Wildtyp- und 3 *reeler*-Gehirnen die entsprechenden Strukturen mit Hilfe der Neurolucida Software rekonstruiert. Als Resultat ergaben sich keine Volumenunterschiede im Hirnstamm und Thalamus. Für den Neokortex konnte ein Korrekturfaktor von 1,33 bestimmt werden, der zwecks Vergleichbarkeit auf die rekonstruierten Flächen des *reeler*-Kortex angewendet wurde.

### 2.6.2 Analyse der Position von Zellen mit definiertem 'Schichtenschicksal'

Die Position der für die unterschiedlichen Schichtenschicksalsmarker positiven Zellen wurde innerhalb rekonstruierter kortikaler Kolumnen markiert. Nach Normalisierung der geringfügig unterschiedlichen Kortexdicken wurden die Daten zunächst in sinnvolle Größenabschnitte zusammengefasst ('binning'). Dafür wurden 50 µm dicke Streifen mit aufsteigendem Abstand zur Pia mater gewählt. Für jeden Streifen ('Bin') wurde die Dichte der enthaltenen Marker pro mm<sup>2</sup> bestimmt und die erhaltenen Dichteprofile für jeden Marker gegen den Abstand zur Pia aufgetragen (Abb. 12 C/D).

### 2.6.3 Neuronale Aktivierung und ihre Verteilung auf die laminären Kompartimente

Die Daten zur neuronalen Aktivierung innerhalb stimulierter Kolumnen sowie der quantitative Vergleich der Schichtenschicksalsmarker und die Aktivierung innerhalb der mit den verschiedenen Schichtenschicksalsmarkern definierten Kompartimente (Abb. 9, 13) entstammen Neurolucida-Rekonstruktionen stimulierten Kolumnen. Die Daten wurden zwischen der Wildtyp- und *reeler*-Gruppe auf Unterschiede hin untersucht. Die statistische Signifikanz wurde mit t-Tests bzw. bei Notwendigkeit mit Bonferroni korrigierten t-Tests bestimmt. Die Daten werden als Boxplot Analyse präsentiert. Die Anzahl *Rgs8*-positiver Zellen wurde außerdem gegen die Anzahl aktivierter Zellen in diesem Kompartiment aufgetragen und eine inverse Korrelation aufgezeigt (Abb. 17). Beide Werte wurden vor dem Auftragen normalisiert (niedrigster Wert= 0, höchster Wert= 1).

In der stimulierten Wildtyp-Kolumne wurde außerdem die Verteilung aktivierter (c-fos-positiver) Zellkerne in den verschiedenen Kompartimenten bestimmt (Abb. 16). Dafür wurden das granuläre (GR) sowie das supra- (SG) und infragranuläre (IG) Kompartiment anhand zytoarchitektonischer Kriterien (unabhängig von den Schichtenschicksalsmarkern) abgegrenzt.

Da die tatsächliche Spezifität der verschiedenen Schichtenschicksalsmarker in der Literatur nicht beschrieben ist, wurde mit der gleichen Methode ihre Spezifität für ihr jeweiliges natives Kompartiment bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Werte: 71 % der *Rgs8*-positiven Neurone sind supragranulär lokalisiert, 78 % der *RORB*-positiven

Neurone sind granulär lokalisiert und 87 % der *ER81*-positiven Neurone sind infragranulär lokalisiert. Es fanden sich keine Änderungen am Signifikanzniveau beim Vergleich von *reeler*- und Wildtyp-Daten, wenn entweder alle Schichtenschicksalsmarker der Wildtyp-Kolumne in die Analyse eingingen oder nur die Daten der Schichtenschicksalsmarker, die sich in der Wildtyp-Kolumne in ihrem nativen Kompartiment befanden. Da sich die äquivalenten *reeler*-Kompartimente nicht anhand zytoarchitektonischer Kriterien identifizieren lassen, gingen in beiden Genotypen die Daten aller gefundenen Schichtenschicksalsmarker in die in dieser Studie gezeigten Analysen ein.

In Doppel-Immunfärbungen von *c-fos* und 'glial fibrillary acidic protein' (GFAP) sowie von *c-fos* und '2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase' (CNPase) wurde in 6 Wildtyp- und 6 *reeler*-Kortizes jeweils keine Kolo-kalisation der Marker gefunden. Somit kann eine Expression von *c-fos* in Astrozyten und Oligodendrozyten weitestgehend ausgeschlossen werden.

#### **2.6.4 Quantifizierung der Verteilung vGluT2 immunreaktiver Boutons**

Die Doppelmarkierung von *c-fos* und vesikulärem Glutamat Transporter 2 (vGluT2) erfolgte entsprechend der oben dargestellten Methode (Doppelmarkierung in der Immunfluoreszenz). Die vGluT2 Färbungen wurden fotografiert und als 8-Bit Graustufenbilder mit der Image J (NIH) Software auf die Verteilung ihrer optische Dichte hin analysiert. Nach Bildung von 50 µm breiten Bins (mit aufsteigendem Abstand zur Pia mater) wurden sowohl die Dicken der Kortizes als auch die Intensitätsunterschiede der Dichte zwischen den analysierten Schnitten normalisiert. An diesen normalisierten Daten wurde die integrierte Dichte jedes Bins bestimmt und gegen den Abstand zur Pia aufgetragen (Abb. 18 C/D).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 HIRNSTAMM

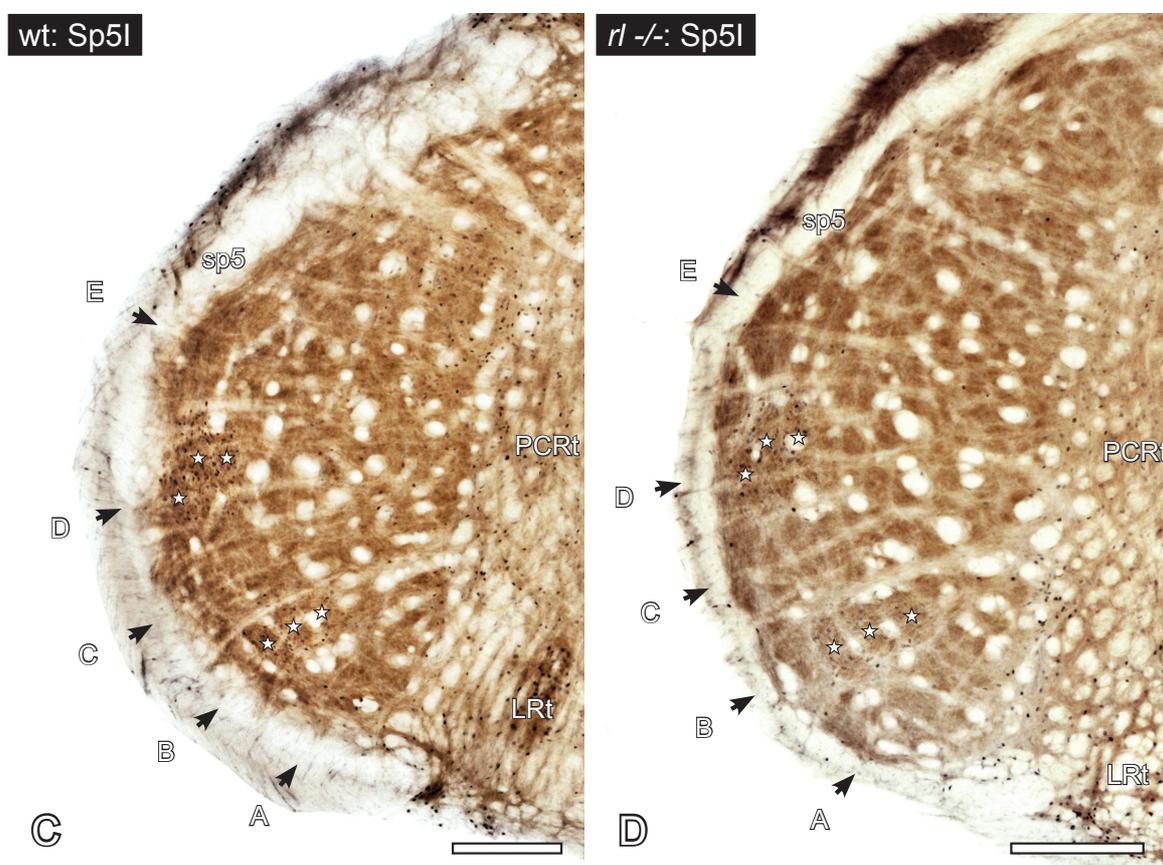
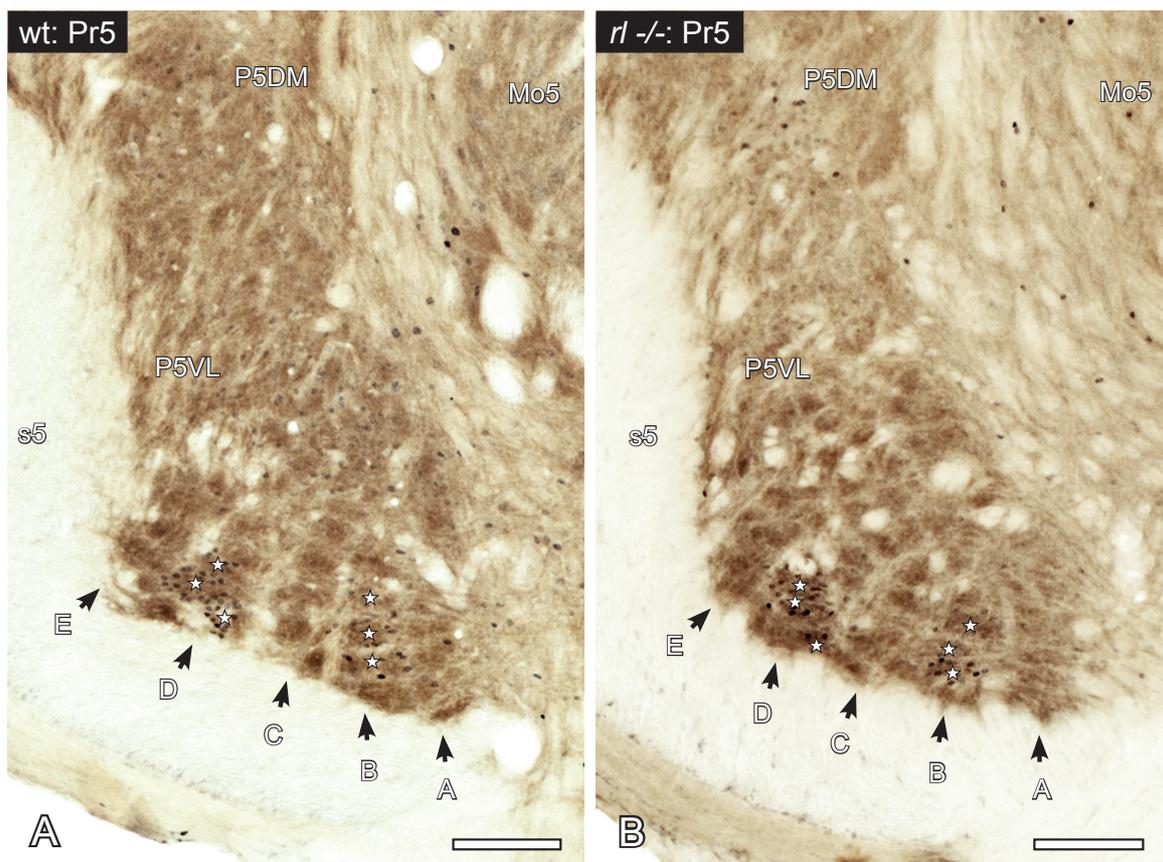
##### 3.1.1 Morphologie trigeminaler Hirnstammkerne – wt vs. *rl* *-/-*

###### **Ncl. principalis nervi trigemini und Ncl. spinalis nervi trigemini**

Der Nucleus principalis nervi trigemini (Pr5) ist in der Pons gelegen. Von der Peripherie her kommend ist er die erste Ebene synaptischer Verschaltung im lemniskalen Anteil des WTBP (Belford and Killackey, 1979; Ma, 1991, 1993). Sowohl der Gesamtkern als auch die in ihm enthaltenen Module können im koronar geschnittenen Wildtyp-Gehirn mit Hilfe von Cytochromoxidase (CO)-Färbungen sichtbar gemacht werden (Abb. 4A; braune Färbung). Der Pr5 hebt sich durch seine intensive Anfärbung deutlich von den ihn umgebenden Strukturen ab.

Die Repräsentation einer einzelnen Vibrisse wird im Pr5 als 'Barrelette' bezeichnet (Ma, 1991). Diese Module befinden sich im ventrolateralen Anteil des Kerns (Pr5VL). Barrelettes stellen sich als besonders dunkle CO-Flecken dar, die von mäßig bis gar nicht angefärbten Septen unvollständig umschlossen werden. Sie sind rechteckig bis elliptisch und durch die Septen insbesondere an den Schmalseiten gut voneinander abgrenzbar. In ihrer Gesamtheit bilden die Barrelettes ein somatotop organisiertes Muster. Die Barrelette-Reihen, welche die Anordnung der Vibrissenreihen auf der Schnauze des Tieres widerspiegeln, breiten sich von medial nach lateral aus. Die

**Abbildung 4.** (Seite 28) **Trigeminaler Hirnstammkerne.** Anatomie und c-fos-Expression nach Exploration der angereicherten Umgebung (ipsilateral geschonte Vibrissen: B 1-3 & D 1-3). **A** Wildtyp- und **B** *reeler*-Koronarschnitt durch den linken Teil der Pons (Bregma -5,30 mm). Im Nucleus principalis nervi trigemini (Pr5) wird durch Cytochromoxidase (CO)-Färbung (Braun) die Topographie der Barrelettes sichtbar. Die Benennung der Reihen A-E erfolgt von medial nach lateral. Die c-fos-Immunhistochemie (Schwarz) visualisiert aktivierte Barrelettes (mit Sternchen markiert). **C** Wildtyp und **D** *reeler*-Koronarschnitte durch den linken Teil der Medulla oblongata (Bregma -7,20 mm). Auch im kaudalen Anteil des Nucleus spinalis nervi trigemini (Pars interpolaris; SP5I) visualisiert die CO-Färbung einzelne Barrelettes. Diese lassen sich aufgrund der weniger gut ausgeprägten Septen etwas schlechter voneinander abgrenzen. Die Benennung der Reihen A-E erfolgt von ventral nach dorsal. Die c-fos-Immunhistochemie visualisiert aktivierte Barrelettes (mit Sternchen markiert). Beachte die jeweils gleichartige Konfiguration der Areale im Wildtyp- und *reeler*-Hirnstamm. Andere Strukturen: Pr5DM/Pr5VL: Ncl. principalis nervi trigemini (dorsomedialer Anteil/ ventrolateraler Anteil), Mo5: Ncl. motorius nervi trigemini, s5: Nervus trigeminus (sensorische Wurzel), sp5: Tractus spinalis nervi trigemini, LRt: Nucleus reticularis lateralis medullae oblongatae, PCRT: Nucleus reticularis parvocellularis. Maßstabsbalken: 250 µm



Repräsentation der Vibrissenbögen erstreckt sich von ventral nach dorsal.

Wie eingangs bereits erwähnt, beeinträchtigt die *Reln*-Mutation vor allem die Entwicklung laminierte Hirnareale. Aber auch in nicht laminierten subkortikalen Zentren sind Strukturveränderungen beschrieben worden. In der Pons ist mit einer überdurchschnittlich starken Versprengung von Motorneuronen im Ncl. motorius nervi trigemini offenbar sogar ein trigeminaler Kern von der *Reln*-Mutation betroffen (Terashima et al., 1994). Zur Struktur des Pr5 im *reeler*-Gehirn lagen bis zur vorliegenden Untersuchung keine Ergebnisse vor. Die CO-Färbungen dieses Kerns im *reeler*-Gehirn zeigt in der vorliegenden Studie auf den ersten Blick eine normale Konfiguration des Kerns (Abb. 4B; braune Färbung). Lage, Form und äußere Grenzen entsprechen den Wildtyp-Befunden, auch die im Kern enthaltenen Module entsprechen ihren Wildtyp-Äquivalenten. Die Barrelettes sind durch Septen abgrenzbare rechteckige bis elliptische Strukturen, die in Ihrer Gesamtheit eine vollständige und korrekte somatotope Karte bilden.

Durch die Rekonstruktion des Gesamtkerns und der in ihm enthaltenen Module in aufeinander folgenden Hirnschnitten lässt sich der qualitative Eindruck einer gleichartigen Konfiguration von Wildtyp- und *reeler*-Pr5 quantitativ bestätigen (Tab. 1). Sowohl der vollständige Pr5 als auch einzelne Barrelettes der B- und D-Reihe zeigen gleichartige räumliche Ausdehnungen im Wildtyp- und *reeler*-Hirn. Darüber hinaus zeigt auch der Formfaktor als quantitatives Maß für die Symmetrie einer Struktur (siehe Material und Methoden) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

Auch der kaudale Teil des Pars interpolaris des Nucleus spinalis nervi trigemini (Sp5I) hebt sich im Wildtyp nach CO-Färbung deutlich von seiner Umgebung ab (Abb. 4C; braune Färbung). Er ist in der Medulla oblongata gelegen und gehört zum extralemniskalen System (Pierret et al., 2000). Die Abgrenzbarkeit einzelner Barrelettes ist durch die dünnen Septen unterschiedlich gut ausgeprägt. Ihre Form ist auch in diesem trigeminalen Hirnstammkern rechteckig bis elliptisch. Die Barrelette-Reihen erstrecken sich von ventral nach dorsal, die Bögen von lateral nach medial. Wie in der Pons, sind auch in der Medulla oblongata subtile Veränderungen im zellulären Aufbau von Hirnstammkernen im Zusammenhang mit der *Reln*-Mutation beschrieben, so zum Beispiel Störungen des zellulären Aufbaus von Nucleus facialis und Nucleus vestibularis (Martin, 1981; Goffinet, 1984b). Der Sp5I wurde im *reeler*-

Gehirn bisher nicht untersucht. Die vorliegende Studie zeigt im Sp5l, wie bereits im Pr5 keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen nach CO-Färbung von Koronarschnitten des *reeler*-Hirnstammes (Abb. 4D; braune Färbung). Form, Lage und Größe sowohl des vollständigen Kerns als auch einzelner Barrelettes unterscheiden sich nicht offensichtlich von der Morphologie im Wildtyp. Verifiziert wird dieser Eindruck erneut durch die Ergebnisse der Rekonstruktion des Kerns und seiner Module. Die vom Sp5l belegte Fläche und auch die Fläche eines einzelnen Barrelettes zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Wildtyp- und *reeler*-Strukturen (Tab. 1).

	<b>WILDTYPE</b>		<b>REELER</b>		
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	t-Test
<b>HIRNSTAMM (Bregma -5,30) NclPr [µm<sup>2</sup>]</b>					
Nucleus principalis nervi trigemini	448498	17666	461351	46968	n.s.
B-Reihen Barrelette (Mittelwert B1-3)	2419	252	2320	713	n.s.
D-Reihen Barrelette (Mittelwert B1-3)	2534	311	2622	356	n.s.
Barrelette Formfaktor	0,77	0,02	0,76	0,04	n.s.
<b>HIRNSTAMM (Bregma -7,20) Sp5l [µm<sup>2</sup>]</b>					
Nucleus spinalis nervi trigemini	825452	65655	833157	91332	n.s.
Barrelette (Mittelwert A-E, 1-3)	35521	1654	32268	5869	n.s.
Barrelette Formfaktor	0,88	0,03	0,89	0,02	n.s.
<b>THALAMUS [µm<sup>2</sup>]</b>					
VPM (Reihen B-D, Bögen 1-3)	100739	15656	110834	8303	n.s.
B-Reihen Barreloid (Mittelwert B1-3)	9199	2028	10404	562	n.s.
D-Reihen Barreloid (Mittelwert D1-3)	10218	928	11047	643	n.s.
Barreloid Formfaktor	0,71	0,03	0,68	0,05	n.s.
<b>KORTEX [µm<sup>2</sup>]</b>					
Barrelfield (S1BF; A-E, 1-3)	906889	40092	1237480	151540	* p <0,001
B-Reihen Barrel (Mittelwert B 1-3)	55473	7478	52059	6625	n.s.
D-Reihen Barrel (Mittelwert D 1-3)	62390	8652	65677	17629	n.s.
Barrel (Mittelwert A-E, 1-4)	51774	3731	53373	8023	n.s.
Septum (Mittelwert A-E, 1-3)	8609	828	30453	10184	* p <0,001
Barrel Formfaktor	0,83	0,02	0,78	0,04	* p <0,05

**Tabelle 1. Rekonstruktion / Quantifizierung von Größe und Symmetrie der verschiedenen Anteile (synaptischen Umschaltstationen) des 'Whisker-to-Barrel Pathway' (WTBP) und der jeweils enthaltenen funktionellen Module (wt vs. *rl*-/-)**

### 3.1.2 Funktionelle Aktivierung trigeminaler Hirnstammkerne – wt vs. *rl-/-* Ncl. principalis nervi trigemini und Ncl. spinalis nervi trigemini

Der lemniskale Pr5 wurde nicht nur auf seine morphologische Integrität hin untersucht, sondern auch auf die funktionelle Aktivierbarkeit seiner Module. Die Aktivierung der Barrelettes in Folge physiologischer Stimulation wurde im Wildtyp- und *reeler*-Hirn betrachtet und verglichen.

Die Erkundung einer neuartigen Umgebung mit den Vibrissen führt bei Nagern zur funktionellen Aktivierung der verschiedenen Anteile des WTBP, so auch von Neuronengruppen in den einzelnen Barrelettes (Bisler et al., 2002). Diese Aktivierung kann, unter anderem, durch die immunhistochemische Visualisierung von Proteinprodukten des 'immediate-early' Gens *c-fos* nachgewiesen werden (Staiger et al., 2000).

Die Erkundung der angereicherten Umgebung erfolgte mit einem manipulierten Vibrissensatz: Auf der linken Seite der Schnauze blieben die Vibrissen B 1-3 und D 1-3 erhalten, auf der rechten Seite C 1-3 (Abb. 3B; für Einzelheiten siehe Material und Methoden). In Folge 2-stündiger Exploration zeigt der Pr5 der Wildtypiere ein entsprechendes Aktivierungsmuster der Barrelettes (Abb. 4A; schwarze Färbung): Im linken Pr5 finden sich *c-fos*-Protein exprimierende und damit aktivierte Zellkerne in den Barrelettes B 1-3 und D 1-3 (i.e. stimulierte Module). Diese repräsentieren die ipsilateral nicht beschnittenen Vibrissen. Barrelettes, welche zuvor entfernte Vibrissen repräsentieren, zeigen eine fast vollständige Abwesenheit von *c-fos*-Protein (i.e. deprivierte Module).

Die räumliche Verteilung aktivierter Neurone ist im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Feinstruktur der Barrelettes. Die große Mehrheit der immunhistochemisch angefärbten Zellkerne findet sich am Rand der CO-Flecken. Dieser Barrelette-Rand gilt als besonders zellreich und umgibt die zellarmen Barrelette-Zentren (Ma, 1993).

Bei gleichem experimentellem Vorgehen wie im Wildtyp unterscheidet sich das Aktivierungsmuster der Barrelettes im *reeler*-Pr5 nicht von der Aktivierung im entsprechenden Wildtypkern (Abb. 4B; schwarze Färbung). Im linken Pr5 finden sich aktivierte Neurone nahezu ausschließlich in den stimulierten Barrelettes B 1-3 und D 1-3, auch die Anzahl aktivierter Kerne und ihre Verteilung um die Barrelette-Zentren herum entsprechen den Befunden im Wildtyp.

Die physiologische Stimulation des trigeminalen Systems führt offenbar zu einer Aktivierung gleichartiger neuronaler Netzwerke im Pr5 von Wildtypen und *Rein-*defizienten Tieren.

Auch im kaudalen Teil des Sp5I führt die Exploration der angereicherten Umgebung im Wildtyp zu einem Aktivierungsmuster, bei dem die stimulierte Barrelettes B 1-3 und D 1-3 aktiviert werden (Abb. 4C; schwarze Färbung). Erneut finden sich aktivierte Zellen vornehmlich am Barrelette-Rand. Nicht stimulierte Barrelettes zeigen praktische keine c-fos-Expression.

Auch für den Sp5I im *reeler*-Gehirn gilt, dass von einer Aktivierung gleichartiger neuronaler Netzwerke ausgegangen werden kann (Abb. 4D; schwarze Färbung). Die Barrelettes B 1-3 und D 1-3 zeigen c-fos-Expression in vergleichbarer Stärke und Verteilung, während nicht stimulierte Barrelettes nahezu keine c-fos-Expression zeigen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich weder im für epikritische und protopathische Sensibilität zuständigen lemniskalen Pr5, noch im für die zeitliche Koordination des 'whiskings' zuständigen extralemniskalen Sp5I Unterschiede zwischen Wildtyp- und *reeler*-Mutante in der Struktur oder der physiologischen Aktivierbarkeit der Module ausmachen lassen.

## 3.2 THALAMUS

### 3.2.1 Morphologie im Ncl. ventralis posteromedialis thalami – wt vs. *rl* -/-

Der Nucleus ventralis posteromedialis thalami (VPM) ist einer der beiden Anteile des ventrobasalen Komplexes des Thalamus, der im Wesentlichen mit dem somatosensorischen Thalamus gleichzusetzen ist. Nach der Umschaltung im Hirnstamm bildet der VPM die zweite Ebene synaptischer Verschaltung im WTBP (Van der Loos, 1976).

Aufgrund der komplizierten räumlichen Orientierung des Kerns bedarf die übersichtliche Darstellung seiner Module einer speziellen Orientierung der histologischen Schnittebene (siehe Material und Methoden). Die Repräsentation einer Vibrisse wird im Thalamus als Barreloid bezeichnet (Van der Loos, 1976). Die im Folgenden besprochenen Abbildungen zeigen einen Tangentialschnitt durch das 'Barreloid Field'; einzelne Barreloids sind senkrecht zu ihrem Verlauf von rostro-dorsomedial nach kaudo-ventrolateral, etwa in ihrer Mitte, angeschnitten. Die CO-Färbung eines in dieser Weise orientierten Schnittes zeigt eine hohe CO-Aktivität im gesamten Thalamus, wobei sich der VPM, durch unwesentlich stärkere Anfärbung, nur sehr bedingt von den umliegenden Thalamuskernen abgrenzen lässt (Abb. 5A; braune Färbung). Substrukturen innerhalb des VPM werden durch die Färbung nicht sichtbar. Erst durch die zusätzliche *c-fos*-Immunhistochemie (welche die Visualisierung aktivierter Neurone ermöglicht) werden die stimulierten Barreloid-Reihen B 1-3 und D 1-3 deutlich sichtbar (Abb. 5A; schwarze Färbung). Die einzelnen stimulierten Module gehen ineinander über. Sie sind, anders als die Barrelettes im Hirnstamm, nicht durch klar definierten Septen getrennt. Trotzdem lassen sich einzelne Barreloids verhältnismäßig gut abgrenzen, da sich die Anzahl der aktivierten Kerne zu den Barreloid-Rändern hin deutlich verdichtet, während das Barreloid-Zentrum weitestgehend frei bleibt. In der gewählten Schnittebene stellen sich Barreloids als querovale bis rechteckige Module dar, die in ihrer Gesamtheit erneut eine vollständige somatotope Karte bilden. Die Barreloid-Reihen erstrecken sich von kaudal nach ventral, die Bögen von dorsolateral nach ventromedial. Durch das gewählte Vibrissenmuster während der Stimulation sind von der somatotopen Karte jedoch nur die stimulierten Reihen B 1-3 und D 1-3 sichtbar.

Untersuchungen im *reeler*-Thalamus beziehen sich in den meisten Fällen auf die thalamokortikalen Projektionen. Aber auch in den Thalamuskernen selbst wurden



Nach Rekonstruktion des VPM in seriellen Schnittserien finden sich auch keine quantitativen Unterschiede zwischen den Konfigurationen der Kerne im *reeler*- und Wildtyp-Gehirn. Da die angewendete Färbemethode keine klare Identifikation der Außengrenzen des VPM erlaubt, wurde behelfsweise ein genau umschriebenes Subkompartiment rekonstruiert: Die von den Reihen B, C und D jeweils mit den Bögen 1-3 belegte Fläche ist im Wildtyp- und *reeler*-VPM vergleichbar groß (Tab.1). Auch die Flächen einzelner Barreloids der B- und D-Reihe entsprechen sich im Wildtyp- und *reeler*-Gehirn. Gleiches gilt für die Symmetrie der Strukturen, die mit Hilfe des Formfaktors quantifiziert wurde.

### **3.2.2 Funktionelle Aktivierung im Ncl. ventralis posteromedialis thalami – wt vs. *rl* -/-**

Nach zweistündiger Exploration der angereicherten Umgebung finden sich c-fos-Protein exprimierende Zellen und damit aktivierte neuronale Netzwerke ganz überwiegend in solchen Wildtyp-Barreloids, die während der Exploration verwendete Vibrissen repräsentieren (Abb. 5A; schwarze Färbung). Durch die Kreuzung der trigeminalen Nervenbahnen oberhalb der Hirnstammkerne findet sich die Repräsentation der auf der linken Seite stimulierten Vibrissenreihen B 1-3 und D 1-3 kontralateral, also im rechten VPM. Die korrespondierenden Barreloids zeigen eine deutliche Aktivierung; insbesondere an ihren Außenrändern finden sich viele aktivierte Zellkerne (s.o.). In Barreloids, die abgetrennte Vibrissen repräsentieren, finden sich nahezu keine aktivierten Zellen. Somit darf auch im Thalamus davon ausgegangen werden, dass es sich um eine transkriptionale Antwort spezifischer, durch die Verhaltensstimulation aktivierter Netzwerke handelt.

Die Exploration der angereicherten Umgebung führt im *reeler*-Thalamus zu einem sehr ähnlichen Aktivierungsmuster. Auch im rechten *reeler*-VPM führt die linksseitige Stimulation der Vibrissen B 1-3 und D 1-3 zu einer Aktivierung der entsprechenden kontralateralen Barreloids (Abb. 4B; schwarze Färbung). Die Verteilung der aktivierten Zellkerne innerhalb der Barreloids unterscheidet sich ebenfalls nicht vom Wildtyp. Die korrekte Aktivierung spezifischer Netzwerke in Folge der Verhaltensstimulation darf also auch für den *reeler*-Thalamus angenommen werden.

Der *reeler*-VPM zeigt also keine Auffälligkeiten in seinem strukturellen Aufbau und ist in der Lage, spezifische neuronale Netzwerke in Folge physiologischer Stimulation zu aktivieren. Damit sind wesentliche Grundvoraussetzungen für einen normalen thalamischen Eingang in den primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex erfüllt.

### 3.3 KORTEX

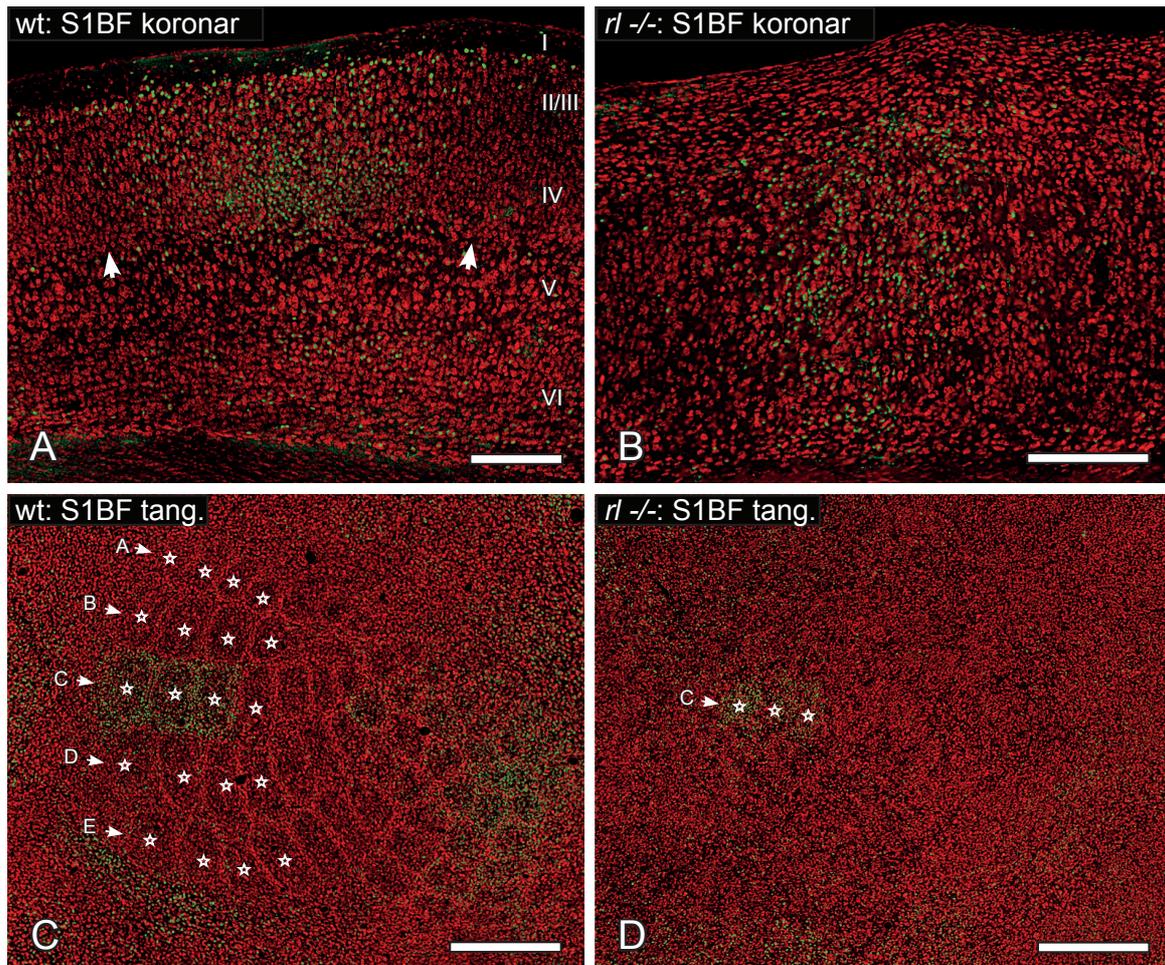
#### 3.3.1 Morphologie des primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex

##### 3.3.1.1 Die Struktur des S1BF Arealis im Wildtyp-Gehirn

Im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex enden die thalamischen Afferenzen des WTBP. Hier werden über die Vibrissen gewonnene Sinneswahrnehmungen lokalisatorisch zugeordnet und in ihrer Stärke und Art interpretiert (Welker, 1971; Simons, 1978). Das funktionelle Modul im Barrel-Kortex ist die Barrel-bezogene Kolumne. Sie erstreckt sich von der Pia mater bis zur weißen Substanz und repräsentiert jeweils eine einzelne Vibrisse der Peripherie. Das Zentrum einer solchen Kolumne bildet das Barrel, hierbei handelt es sich um eine fassförmige Verdichtung von Neuronen in der neokortikalen Schicht IV, die auch den Hauptteil der thalamischen Afferenzen erhält (Woolsey and Van der Loos, 1970).

Im koronar geschnittenen Wildtyp-Gehirn lassen verschiedene Färbemethoden vor allem die Barrels der kortikalen Kolumnen sichtbar werden. In der fluoreszenten Nissl-Färbungen (NeuroTrace) wird die typische 6-Schichtigkeit des Neokortex deutlich (Abb. 6A, rote Färbung). Barrels erscheinen als annähernd elliptische Verdichtung von Schicht IV Neuronen. Ihre Unterseite wird besonders hervorgehoben, da das Zellband der oberen Schicht V sehr locker ist. Weitere Anteile der Kolumne lassen sich nicht abgrenzen. In der CO-Färbung sind Barrels besonders gut abgrenzbar (Abb. 7A, braune Färbung). Sie erscheinen als dunkle, ovale bis rechteckige Flecken in Schicht IV, die durch hellere Bereiche voneinander getrennt sind. Darüber hinaus findet sich ein dunkles CO-Band an der Schicht Vb/VI Grenze, das jedoch kontinuierlich die Barrel-Grenzen überspannt.

Führt man einen Schnitt parallel zur Pia durch den geplätteten Wildtyp-Kortex (siehe Material und Methoden), so erhält man auf der Höhe von Schicht IV einen Überblick über das gesamte Barrellfeld. Sowohl in der NeuroTrace- (Abb. 6C, rote Färbung) als auch in der CO-Färbung (Abb. 7C, 8A/C/D; braune Färbung) werden sämtliche Reihen und Bögen des posteromedialen 'Barrel Subfield' sichtbar. Die so entstehende somatotope Karte ähnelt auf verblüffende Weise der Anordnung der Vibrissen auf der Schnauze des Tieres (Abb. 3A). Auch im Tangentialschnitt imponieren Barrels als elliptisch bis rechteckige Module. In der NeuroTrace-Färbung wird darüber hinaus die Zytoarchitektonik einzelner Barrels sichtbar (Abb. 6C): Ein Barrel besteht aus einem schmalen, zellreichen Rand und dem etwas weniger



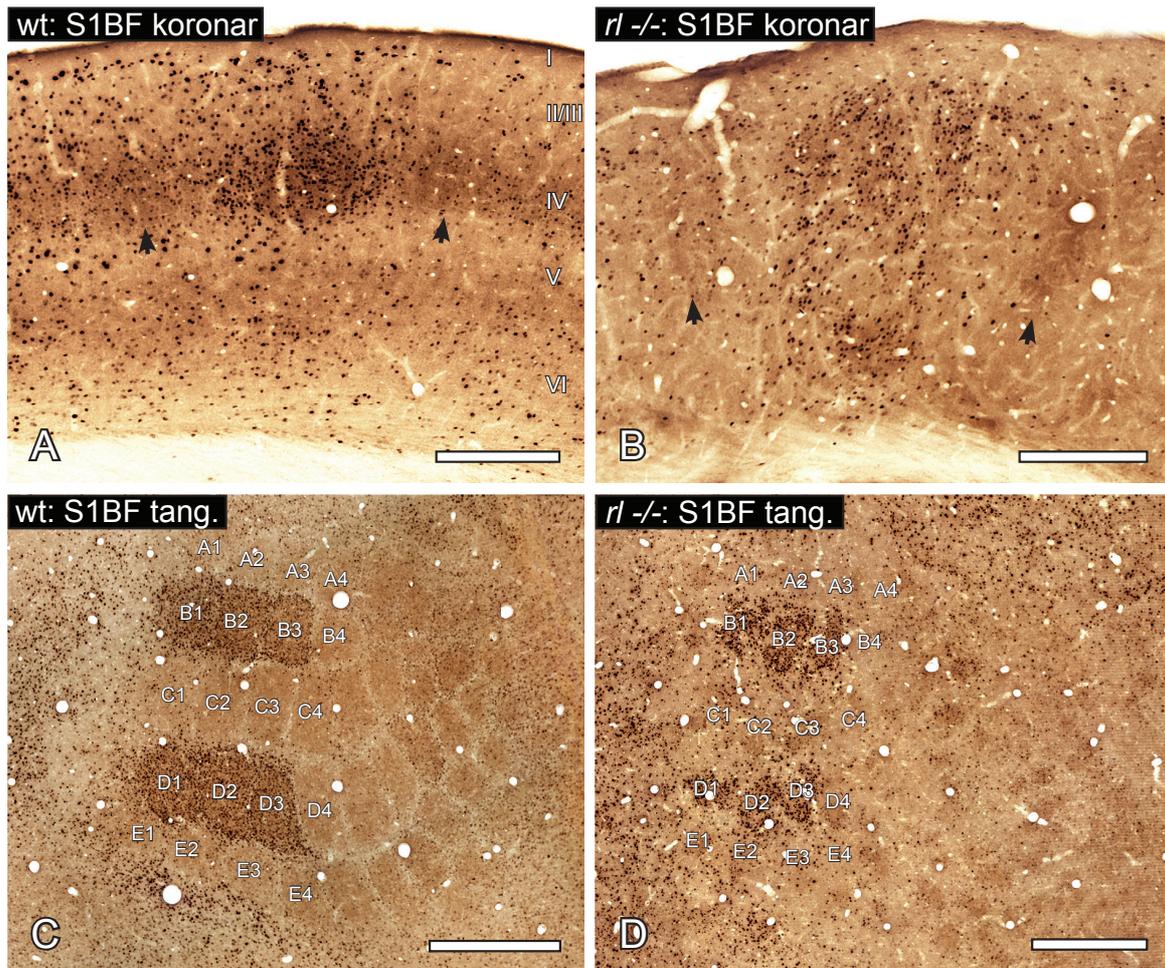
**Abbildung 6. Funktionelle Module im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex (S1BF).** Anatomie und *c-fos*-Expression nach Exploration der angereicherten Umgebung (Linke Hemisphäre; kontralateral geschonte Vibrissen: C 1-3). **A** Koronare Darstellung von drei Barrel-assoziierten Kolumnen im Wildtyp-Gehirn. Die Barrels werden durch eine höhere Dichte von fluoreszente Nissl (NeuroTrace)-Zellen in Schicht IV sichtbar (Rot; nicht-stimulierte Barrels sind durch Pfeile an der Schicht IV/Va Grenze markiert). Die stimulierte C-Reihen-Kolumne wird durch die ausgeprägte *c-fos*-Expression (insbesondere im Barrel) visualisiert (Grün). **B** Korrespondierendes Areal im *reeler*-Kortex. Die NeuroTrace-Färbung visualisiert weder Barrels noch andere umschriebene Strukturen. Das stimulierte C-Reihen-Modul wird aber durch aktivierte *c-fos*-positive Zellkerne sichtbar. Es hat wenig strukturelle Gemeinsamkeit mit dem Wildtyp-Modul und stellt eine 'Barrelteiläquivalente-enthaltende *reeler*-Kolumne' dar. **C** Tangentialschnitt durch Schicht IV des Barrel-Kortex im Wildtyp. Die NeuroTrace-Färbung macht unterschiedliche Zelldichten sichtbar. Dadurch werden die zellreichen Barrel-Ränder und die zellarmen Barrel-Zentren unterscheidbar (einzelne Barrels sind durch Sternchen in ihren Zentren markiert). Das 'Barrelfield' ist somatotop organisiert. Die *c-fos*-Färbung visualisiert aktivierte Barrels, diese repräsentieren die während der Exploration verwendeten kontralateralen Vibrissen C 1-3. **D** Tangentialschnitt durch den Barrel-Kortex im *reeler*-Hirn. Der histologische Schnitt hat den gleichen Abstand zur Pia wie der entsprechende Wildtyp-Schnitt. Die NeuroTrace Färbung führt zu keinem interpretierbaren Muster. *c-fos* visualisiert die somatotop organisierten stimulierten Barrel-Äquivalente C 1-3 (durch Sternchen in den Zentren markiert). Die römischen Ziffern markieren die kortikalen Schichten. Maßstabsbalken A, B 250 µm; C, D 500 µm

zellreichen Zentrum. Getrennt werden Barrels von einem dünnen, in der NeuroTrace-Färbung kaum sichtbaren Septum. An Stellen, an denen die Septen von drei und mehr Barrels aneinanderstoßen, bilden sich zellarme septale Verbindungen (Woolsey and Van der Loos, 1970).

In der CO-Färbung sind die einzelnen Barrels deutlich besser voneinander unterscheidbar (Abb. 7C, 8A/C/D). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass vor allem das Zentrum der Barrels eine hohe CO-Aktivität zeigt, während nicht nur die Barrel-Septen, sondern auch die Barrel-Ränder nur schwach CO-aktiv sind. Die CO-Färbung zeigt also streng genommen eine Karte der Barrel-Zentren, was die breiten Zwischenräume und die gute Abgrenzbarkeit einzelner Barrels erklärt (Wong-Riley and Welt, 1980).

### 3.3.1.2 Die Struktur des S1BF Areals im *reeler*-Gehirn

Der Barrel-Kortex der *reeler*-Maus war bereits Gegenstand zahlreicher Studien und ist von der *Reln*-Mutation schwer betroffen. Dennoch kann seine morphologische Organisation nicht als entschlüsselt betrachtet werden. Die bisher vorliegenden Studien ergeben ein heterogenes Bild bezüglich des Organisationsgrades oder dem Auftreten von Barrels (Cragg, 1975; Caviness et al., 1976; Welt and Steindler, 1977). In der NeuroTrace-Färbung des koronar geschnittenen *reeler*-Kortex findet sich keine Gliederung des Kortex in Schichten, darüber hinaus wird auch keine anders geartete Gliederung deutlich (Abb. 6B, rote Färbung). Die völlig willkürlich erscheinende Anordnung der Zellen verdeutlicht den eingangs beschriebenen Laminierungsdefekt. Es werden keine Barrels oder Barrel-ähnliche Module sichtbar. Anders verhält es sich in CO-Färbungen mit gleicher Orientierung (Abb. 7B, braune Färbung). Areale mit starker CO-Aktivität bilden dunkle Flecken unterschiedlicher Form, Größe und Lokalisation, die sich verhältnismäßig gut abgrenzen lassen. Die Areale haben auf den ersten Blick keine Gemeinsamkeit mit der Struktur von Barrels, jedoch vermitteln jeweils mehrere von ihnen, über Serienschritte hinweg verfolgt, einen kolumnären Eindruck. Eine solche Kolumne besteht zumeist aus 2-4 unscharf voneinander getrennten Flecken und erstreckt sich nahezu über die vollständige Dicke des Kortex. Sie hat damit wenig strukturelle Gemeinsamkeiten mit der klassischen Barrel-assoziierten Wildtyp-Kolumne, dennoch entsteht auf diese Weise auch im *reeler*-Hirn der Eindruck von visualisierbaren Modulen.

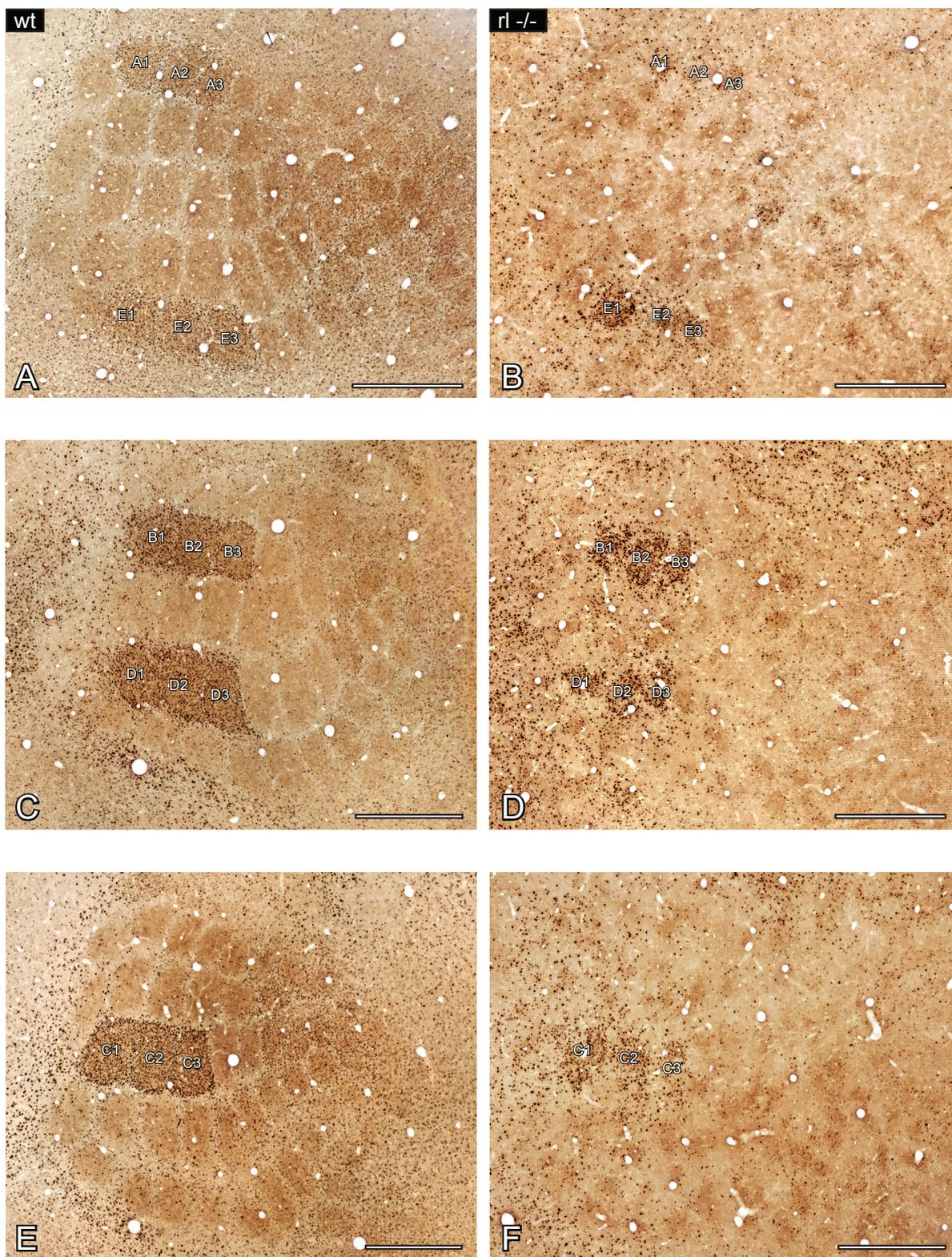


**Abbildung 7. Funktionelle Module im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex (S1BF).** Anatomie und *c-fos*-Expression nach Exploration der angereicherten Umgebung (Rechte Hemisphäre; kontralateral geschonte Vibrissen: B 1-3 & D 1-3). **A** Koronare Darstellung von drei Barrel-assoziierten Kolumnen im Wildtyp-Gehirn. Die Barrels werden durch starke Cytochromoxidase (CO)-Aktivität sichtbar (Braun; nicht-stimulierte Barrels sind durch Pfeile an der Schicht IV/Va Grenze markiert). Die stimulierte B-Reihen Kolumne wird durch die aktivierten *c-fos*-positiven Zellkerne dargestellt (Schwarz), dabei wird vor allem das Barrel sichtbar. **B** Korrespondierendes Areal im *reeler*-Kortex. Die CO-aktiven Areale stellen Barrelteiläquivalente dar. Diese sind über die ganze Dicke des Kortex verteilt. Jeweils mehrere von ihnen bilden das Barreläquivalent und visualisieren eine funktionelle *reeler*-Kolumne (die Pfeile zeigen auf einzelne Barrelteiläquivalente in nicht stimulierten Kolumnen). Die aktivierten *c-fos*-positiven Kerne visualisieren eine stimulierte 'Barrelteiläquivalente-enthaltende B-Reihen Kolumne'. **C** Tangentialschnitt durch Schicht IV des Barrel-Kortex im Wildtyp. Die Topographie des 'Barrelfield' wird durch die CO-Färbung deutlich (Beschriftung der Barrels entsprechend der Standardnomenklatur). Die *c-fos*-Färbung visualisiert aktivierte Barrels. Diese repräsentieren die während der Exploration verwendeten kontralateralen Vibrissen B1-3 und D1-3. **D** Tangentialschnitt durch den Barrel-Kortex im *reeler*-Hirn. Der histologische Schnitt hat den gleichen Abstand zur Pia wie der entsprechende Wildtyp-Schnitt. Die Barrel-Äquivalente der einzelnen Module sind deutlich unregelmäßiger begrenzt als im Wildtyp. Zwischen den Modulen finden sich breitere und weniger regelmäßige Septen. Das Barrelfield ist jedoch somatotop gegliedert und die aktivierten Module der kontralateral stimulierten Vibrissen (B 1-3 und D1-3) sind in der *c-fos*-Färbung gut zu erkennen. Die römischen Ziffern markieren die kortikalen Schichten. Maßstabsbalken A, B 250  $\mu\text{m}$ ; C, D 500  $\mu\text{m}$

In Tangentialschnitten des abgeflachten *reeler*-Kortex ergibt sich in der NeuroTrace-Färbung erneut kein erkennbares Muster (Abb. 6D, rote Färbung). Die Zellen des posteromedialen Barreffield scheinen sich zwar zu vielen kleinen Aggregaten zusammen zu lagern, in der Gesamtheit lassen sich aber weder einzelne Module noch das posteromediale Barreffield erkennen. Wesentlich aufschlussreicher sind CO-Färbungen in gleicher Orientierung (Abb. 7D, 8B/D/F; braune Färbung): Sie visualisieren zahlreiche dunkle Areale hoher CO-Aktivität, deren Anordnung auf den ersten Blick willkürlich erscheint. Bei eingehender Betrachtung wird aber deutlich, dass sie Module bilden. Diese können aus einem oder mehreren CO-aktiven Arealen bestehen, die äußerst variabel in Form und Größe sind. Die Module werden identifizierbar, da sie von breiten, weniger CO-aktiven Bereichen umfasst werden. Da die Module, anders als im Wildtyp, teilweise aus mehreren CO-Flecken bestehen, treten auch innerhalb von ihnen helle, wenig CO-aktive Bereiche auf. Eine Zuordnung von CO-Fleck und Modul ist somit schwierig. In der Regel sind die hellen Bereiche innerhalb von Modulen jedoch schmaler als zwischen den Modulen, außerdem verschmelzen die einzelnen CO-Flecken innerhalb der Module häufig miteinander. Bei Betrachtung des gesamten posteromedialen Barreffield lassen sich die Module deshalb mit etwas Übung voneinander abgrenzen. Man erkennt eine somatotope Karte, die einen wesentlich geringeren Ordnungsgrad als im Wildtyp aufweist. Dennoch enthält sie alle Reihen und Bögen und spiegelt räumlich korrekt die Anordnung der Vibrissen auf der Schnauze des Tieres wieder.

Anders als im Wildtyp ist eine derartige Karte auf nahezu allen konsekutiven Tangentialschnitten durch den Kortex sichtbar. Die CO-aktiven Areale finden sich also nicht nur auf einer bestimmten Höhe des Kortex, sondern erstrecken sich von der Pia Mater bis zur weißen Substanz. Dieser Befund ist auch im Koronarschnitt sichtbar (s.o.).

**Abbildung 8.** (Seite 42) **Funktionelle Module im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex (S1BF).** Verschiedene Muster stimulierter Module nach Exploration der angereicherten Umgebung. Die Abbildung zeigt Tangentialschnitte durch Schicht IV des Wildtyp-Kortex **A**, **C**, **E** bzw. in entsprechender Tiefe im *reeler*-Kortex **B**, **D**, **F**. Die Cytochromoxidase-Färbung visualisiert das somatop organisierte Barreffield. Aktivierte Zellkerne werden durch die c-fos-Immunhistochemie sichtbar. Es wird deutlich, dass sich in beiden Genotypen (analog zu Abbildung 7) beliebige Vibrissen stimulieren lassen, was kontralateral jeweils eine gut sichtbare Aktivierung in den korrespondierenden kortikalen Modulen nach sich zieht. Die aktivierten Module sind nach Standardnomenklatur beschriftet. Maßstabsbalken 500 µm



### **3.3.2 Funktionelle physiologische Aktivierung umschriebener neuronaler Netzwerke im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex**

#### **3.3.2.1 Funktionelle Aktivierung im S1BF Areal des Wildtyp-Gehirns**

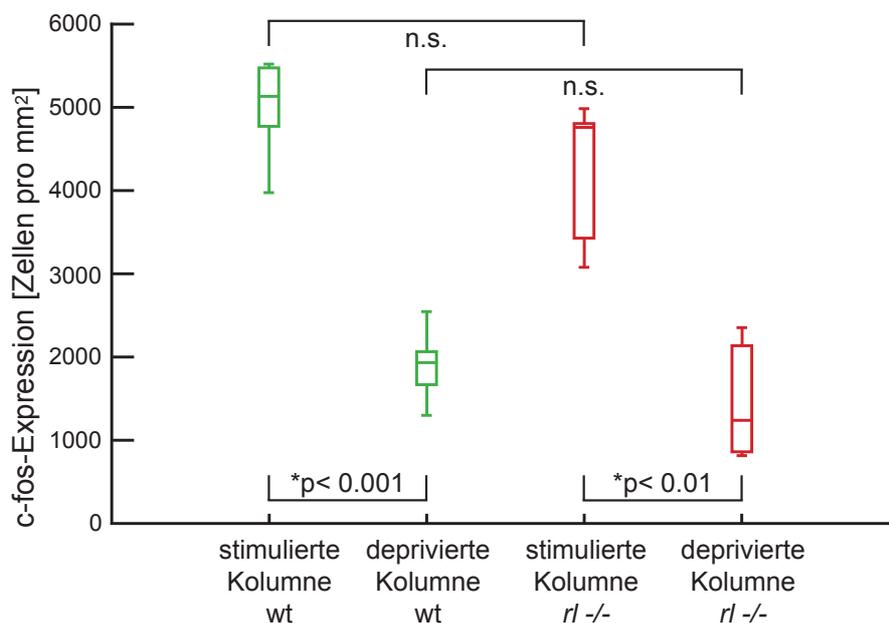
Die funktionelle Aktivierung spezifischer neuronaler Netzwerke kann im koronar geschnittenen Wildtyp-Gehirn besonders gut beobachtet werden (Abb. 6A, grüne Färbung; 7A, schwarze Färbung). Nach zweistündiger Exploration der angereicherten Umgebung lassen sich stimulierte Barrel-assoziierten Kolumnen durch ihre starke c-fos-Expression identifizieren. Die c-fos-exprimierenden Kerne aktivierter Zellen finden sich vor allem in Schicht IV, wo sie die elliptische Form der Barrels deutlich hervorheben. Außerdem finden sich Kerne aktivierter Zellen an der Schicht Vb/VI Grenze und in der oberen Schicht II, hier färben sich die einzelnen Zellkerne besonders intensiv. Das beschriebene Expressionsmuster führt dazu, dass erstmals die ganze Kolumne und nicht nur ihr Barrel strukturell sichtbar wird.

Im Tangentialschnitt durch den Wildtyp-Kortex auf Höhe von Schicht IV werden stimulierte Barrels in Form von Ansammlungen c-fos-positiver Zellkerne deutlich sichtbar (Abb. 6C, grüne Färbung; 7C, schwarze Färbung). Die Kombination aus c-fos-Immunhistochemie und NeuroTrace-Färbung gibt darüber hinaus Aufschluss über die Zytoarchitektonik der stimulierten Barrels (Abb. 6C). In der gleichzeitigen Darstellung der beiden Färbungen wird deutlich, dass sich die Kerne aktivierter Zellen sowohl im Barrel-Zentrum als auch im Barrel-Rand befinden. Tendenziell befinden sich im Rand etwas mehr aktivierte Zellkerne, außerdem zeigen sie hier eine besonders kräftige Anfärbung. Im Tangentialschnitt wird auch deutlich, dass die aktivierten Wildtyp-Module sich an somatotop korrekter Position befinden: Die Repräsentation der auf der linken Seite erhaltenen Vibrissen B 1-3 und D 1-3 findet sich kontralateral, also im Barreland der rechten Hemisphäre (Abb. 7C), die Repräsentation der auf der rechten Seite erhaltenen Vibrissenreihe C 1-3 findet sich im Barreland der linken Hemisphäre (Abb. 6C) in Form von aktivierten Barrels in eben diesen Reihen. Das Prinzip der gezielten Stimulation von Kolumnen lässt sich aber auch auf jede andere Reihe des Barreland anwenden (Abb. 8 A/C/E).

Der beschriebene Stimulationseffekt kommt auch in der quantitativen Analyse zum Ausdruck, also in Form einer höheren Anzahl c-fos-exprimierender und damit aktivierter Zellkerne in rekonstruierten stimulierten Kolumnen (Abb. 9). Deprivierte

Kolumnen zeigen entsprechend weniger aktivierte Kerne, ihre Expressionsstärke ist aber sehr variabel. In Abbildung 7A befindet sich links und rechts von der stimulierten Kolumne jeweils eine deprivierte Kolumne. Obwohl beide deprivierte Kolumnen jeweils eine vor der Exploration entfernte Vibrisse repräsentieren, zeigt die linke Kolumne eine deutlich höhere *c-fos*-Expression als die Rechte. Wegen ihrer überaus starken Aktivierung sind stimulierten Kolumnen aber stets von deprivierten Kolumnen unterscheidbar.

Die Expressionsstärke des *c-fos*-Proteins in einer deprivierten Kolumne entspricht dem basalen *c-fos*-Expressionsniveau im nicht stimulierten primären somatosensorischen Kortex. Statistisch unterscheidet sich die Anzahl aktivierter Zellen in einer deprivierten Kolumne nicht von der Anzahl aktivierter Zellen in einer Kontrollkolumne (Abb. 10). Kontrollkolumnen stammen aus Hirnen von Tieren, die ohne Manipulation der Vibrissen aus ihrem gewohnten, reizarmen Käfig entnommen und unmittelbar danach perfundiert wurden.



**Abbildung 9. Aktivierte Neurone in deprivierten und stimulierten funktionellen Kolumnen.**

Die Boxplots stellen die Anzahl aktivierter (*c-fos*-positiver) Zellkerne innerhalb der verschiedenen Kolumnen dar (stimulierte Kolumne: korrespondierende Vibrissen während der Exploration verwendet; deprivierte Kolumne: korrespondierende Vibrissen vor der Exploration entfernt). In beiden Genotypen ist die stärkere Aktivierung der stimulierten gegenüber der deprivierten Kolumnen hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Sowohl bei den stimulierten Kolumnen als auch bei den deprivierten Kolumnen unterscheidet sich die Anzahl aktivierter Neurone jeweils nicht signifikant beim Vergleich von Wildtyp und *reeler*-Modul. Ober- und Unterseiten der Boxen zeigen jeweils die 25. bzw. 75. Perzentile. Der jeweilige Median ist als Strich in den Boxen erkennbar. Die Antennen zeigen die maximalen bzw. minimalen Werte der jeweiligen Daten.

### 3.3.2.2 Funktionelle Aktivierung im S1BF Areal des *reeler*-Gehirns

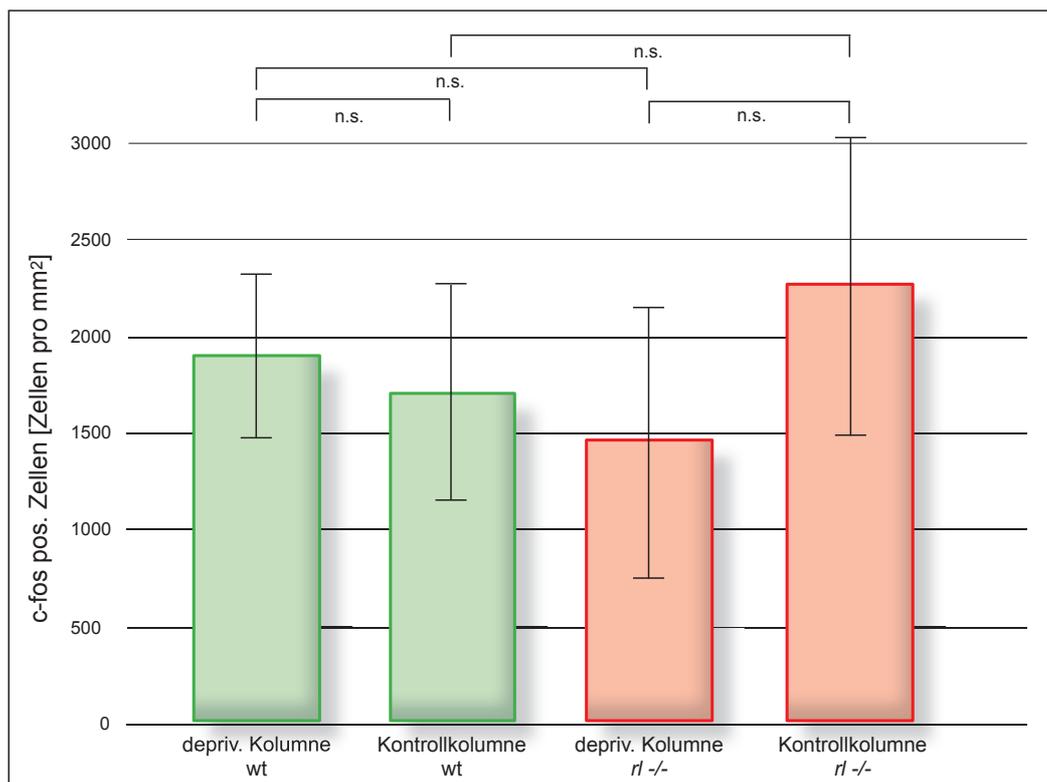
Im koronar geschnittenen *reeler*-Gehirn kann trotz des strukturellen Defektes die funktionelle Aktivierung spezifischer neuronaler Netzwerke sichtbar gemacht werden (Abb. 6B, grüne Färbung; 7B, schwarze Färbung). Nach Exploration der angereicherten Umgebung werden stimulierte kolumnär organisierte Module durch die c-fos-Protein exprimierenden Kerne aktivierter Zellen hervorgehoben. Die Struktur der kolumnären Module unterscheidet sich allerdings deutlich von der Wildtyp-Kolumne. Anstelle des zentralen Barrels lagern sich aktivierte Zellkerne zu mehreren, teilweise miteinander verschmolzenen Arealen von variabler Form und Größe zusammen. Diese c-fos Zellgruppen sind deckungsgleich mit den stark CO-aktiven Arealen (s.o.). Zwischen ihnen ist die Dichte aktivierter Zellkerne geringer, wodurch die c-fos-Zellgruppen verhältnismäßig gut abgrenzbar werden. Zwei bis vier dieser stark c-fos-exprimierenden Bereiche bilden eine Kolumne, die sich über die vollständige Dicke des Kortex erstreckt und in ihrem Aufbau der Kolumne in der zuvor schon beschriebenen CO-Färbung gleicht.

Im Tangentialschnitt durch den *reeler*-Kortex werden die stimulierten Module ebenfalls sichtbar, doch auch hier zeigen sie nur wenig Gemeinsamkeiten mit den klar organisierten Barrels der Wildtyp-Kolumne (Abb. 6D, grüne Färbung ; 7D, schwarze Färbung). Areale mit starker Expression des c-fos-Proteins bilden asymmetrische Strukturen, die aus miteinander verschmolzenen c-fos-Zellgruppen von variabler Form und Größe bestehen. Die einzelnen c-fos-Areale sind erneut deckungsgleich mit den stark CO-aktiven Arealen. Zwischen ihnen finden sich nur vereinzelt c-fos-positive Kerne, wodurch die stimulierten Module relativ gut abgrenzbar sind. Sie sind jedoch deutlich unschärfer begrenzt als im Wildtyp. An den Rändern zeigen die stark c-fos-aktiven Areale etwas mehr und besonders stark angefärbte Zellkerne.

Die beschriebenen stimulierten Module repräsentieren auch im *reeler*-Kortex die während der Exploration verwendeten Vibrissen. Innerhalb der somatotopen Karte befinden sie sich an topographisch korrekter Position. Die stimulierten Vibrissen B 1-3 und D 1-3 auf der linken Seite der Schnauze finden sich im kontralateralen Kortex als stimulierte Module der B- und der D-Reihe wieder (jeweils 1-3; Abb. 7D), gleiches gilt für die Vibrissen C1-3 auf der rechten Seite der Schnauze, die im Kortex kontralateral als stimulierte Module der C-Reihe repräsentiert werden (Abb. 6D).

Auch bei *reeler*-Tieren lässt sich ein entsprechendes Stimulationsparadigma auf alle Reihen des Barrel- und Vibrissenfeldes anwenden (Abb.8 B/D/F).

Die beschriebene Aktivierung der Module ist auch im *reeler*-Gehirn quantitativ darstellbar. Die Anzahl aktivierter Zellkerne ist in stimulierten Kolonnen signifikant höher als in Deprivierten (Abb. 9). Die Expressionsstärke des c-fos-Proteins ist wie im Wildtyp auch in deprivierten *reeler*-Kolonnen sehr variabel, liegt jedoch stets deutlich unter der von stimulierten Kolonnen. Und schließlich gilt auch für *reeler*-Kolonnen, dass ihre Aktivität mit der basalen Aktivität im nicht stimulierten primären somatosensorischen Kortex gleichgesetzt werden kann. Die Anzahl c-fos-exprimierender Zellkerne in deprivierten Kolonnen entspricht der Anzahl c-fos-exprimierender Kerne in Kontrollkolonnen (Abb. 10).



**Abbildung 10. Aktivierte Neurone in deprivierten- und Kontrollkolonnen.** Das Balkendiagramm stellt die Anzahl aktivierter (c-fos-positiver) Zellkerne innerhalb der verschiedenen Kolonnen dar (deprivierte Kolonne: korrespondierende Vibrissen vor der Exploration entfernt; Kontrollkolonne: keine Vibrissenmanipulation, keine sensorische Stimulation). In beiden Genotypen unterscheidet sich die Stärke der Aktivierung zwischen deprivierter und Kontrollkolonne nicht signifikant. Auch beim Vergleich der deprivierten- und der Kontrollkolonnen jeweils zwischen Wildtyp- und *reeler*-Modulen finden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Antennen zeigen +/- eine Standardabweichung.

Vergleicht man die Aktivierung neuronaler Netzwerke in Wildtyp- und *reeler*-Kolumnen untereinander, so ergibt sich ein erstaunlicher Befund: Die Anzahl aktivierter Neurone bei den deprivierten und den stimulierten Kolumnen zeigt jeweils keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb.9). Physiologische Stimulation aktiviert in der *reeler*-Kolumne also trotz der massiven strukturellen Desorganisation die gleiche Anzahl an Neuronen wie im hoch organisierten Wildtyp-Kortex. Die funktionelle Aktivierung erfolgt damit nicht nur lokalisatorisch (Somatotopie) sondern auch quantitativ gleichwertig.

Eine Barrel-assoziierten Wildtyp-Kolumne ist ein vertikal organisiertes Modul im primären somatosensorischen Kortex. Das enthaltene Barrel ist durch seine hohe CO-Aktivität charakterisierbar. Durch physiologische Stimulation der Kolumne werden neuronale Netzwerke stimuliert, deren Zellkörper sich präferenziell im Barrel befinden. Im Barrel überlagert sich also das CO-aktive Areal mit dem Areal, in dem sich nach Stimulation besonders viele c-fos-Protein exprimierende Zellkerne befinden.

Auch die *reeler*-Module sind vertikal beziehungsweise kolumnär organisiert und befinden sich an typischer Stelle im primären somatosensorischen Kortex. Die Kolumne besteht aus mehreren Arealen mit hoher CO-Aktivität. Die Zellkörper der bei der physiologischen Stimulation aktivierten Neurone befinden sich präferenziell innerhalb dieser Areale. Die Überlagerung CO-aktiver und c-fos-positiver Areale sollte in der *reeler*-Kolumne folglich als Korrelat der Barrels betrachtet werden. Dieses Konzept wird durch die quantitativ gleichwertige funktionelle Aktivierung der Wildtyp-Module und ihrer *reeler*-Äquivalente unterstrichen.

Das *reeler*-Korrelat der Barrels besteht aus mehreren, über die Kolumne verteilten Abschnitten. Ein isolierter Abschnitt kann also nur als Barrelteiläquivalent betrachtet werden. Erst die Gesamtheit der Teiläquivalente eines Moduls stellt das vollständige Barreläquivalent dar.

Die Wildtyp-Kolumne enthält in Schicht IV das Barrel als klar gliederndes Element, folglich wird sie als 'Barrel-assoziierte Kolumne' bezeichnet (Woolsey and Van der Loos, 1970). Die *reeler*-Kolumne besitzt kein solches gliederndes Element und charakterisiert sich erst durch die Gesamtheit ihrer Teiläquivalente, folglich sollte sie einfach als 'Barrelteiläquivalente-enthaltende Kolumne' bezeichnet werden.

### 3.3.3 Vergleichende morphologische Rekonstruktion des primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex und seiner Module – wt vs. rl -/-

Die 2-dimensionale Rekonstruktion der Wildtyp-Barrels und ihrer *reeler*-Äquivalente erfolgte in 3 konsekutiv aufeinanderfolgenden Tangentialschnitten auf der Höhe von Schicht IV im Wildtyp- und in gleicher Tiefe im *reeler*-Kortex. Die Rekonstruktion erfolgte auf Basis der kombinierten CO / c-fos-Färbung und ermöglicht einen quantitativen Vergleich der Morphologie der sehr unterschiedlich strukturierten Module. Problematisch ist dabei die bekannte Hypotrophie des *reeler*-Hirns, wodurch die Vergleichbarkeit der beiden Datensätze gestört wird (Caviness, 1988; D'Arcangelo, 2005). Aus diesem Grund wurde ein durch Rekonstruktion der gesamten Kortexareale gewonnener Korrekturfaktor auf die *reeler*-Daten angewendet (Korrekturfaktor: 1,33; siehe Material und Methoden).

Nach Anwendung dieses Korrekturfaktors entspricht die im Tangentialschnitt von den Barrel-Äquivalenten belegte Fläche der Fläche der Wildtyp-Barrels (Tab. 1). Diese Aussage stimmt sowohl für die durchschnittliche Fläche aller rekonstruierten Barrels als auch für die Einzelbetrachtung von Barrels der B- oder der D-Reihe.

Dabei ist zu bedenken, dass sich das solide Wildtyp-Barrel nur über die ca. 3 ausgewerteten konsekutiven Tangentialschnitten auf Höhe von Schicht IV erstreckt, während sich die Barrel-Äquivalente über die gesamte Dicke des Kortex verteilen. Belegen Barrels und Barrel-Äquivalente in den 2-dimensionalen Rekonstruktionen also gleich große Flächen, so ist davon auszugehen, dass die Barrel-Äquivalente auf die gesamte Kolumne gerechnet ein deutlich größeres Volumen einnehmen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer geringeren Packungsdichte der Schicht IV äquivalenten Zellen innerhalb der Barrel-Äquivalente liegen. Zum Beispiel wäre denkbar, dass in den Barrel-Äquivalenten, anders als im Wildtyp, nicht ausschließlich Schicht IV äquivalente Zellen vorkommen. Diese Theorie wird belegt durch die Darstellung von Zellpopulationen mit unterschiedlichen Schichtenschicksalen in der *in situ*-Hybridisierung (s.u.).

Auch beim quantitativen Vergleich der von den Barreelsepten belegten Flächen müssen ähnliche Überlegungen angestellt werden. In der für die Rekonstruktion verwendeten Färbung visualisiert zumindest die c-fos-Komponente sowohl das Barrel-Zentrum als auch den Barrel-Rand (s.o.). Entsprechend kann im Wildtyp die zwischen den Barrels befindliche Fläche mit dem Barrel-Septum gleichgesetzt

werden. Dieses Areal ist im Wildtyp signifikant kleiner als das zwischen den Barrel-Äquivalenten befindliche Areal im *reeler*-Kortex (Tab. 1). Allerdings sind die beiden Areale nur sehr bedingt vergleichbar. Im Wildtyp betrachten wir erneut einen Tangentialschnitt durch die solide Schicht IV, zwischen den Barrels befindet sich nur das Septum. Im *reeler*-Kortex sind hingegen die Barrel-Äquivalente über den gesamten Kortex verteilt und reichen nicht notwendigerweise bis an den Rand eines Moduls. Dementsprechend findet sich zwischen den Barrel-Äquivalenten nicht nur das Septum, sondern auch Zellen mit diversen anderen Schichtenschicksalen. Der Befund von breiteren Räumen zwischen den Barrel-Äquivalenten ist also erwartbar. Belegen Barrels und Barrel-Äquivalente gleich große Flächen und findet sich gleichzeitig eine signifikant größere Fläche zwischen den *reeler*-Barrel-Äquivalenten, so ist damit dem nächsten Befund bereits vorgegriffen: Die vom gesamten Barreffeld eingenommene Fläche ist im *reeler*-Kortex signifikant größer (Tab. 1). Der Barrel-Kortex im *reeler*-Hirn belegt also in Bezug auf den gesamten Kortex eine prozentual größere Fläche als im Wildtyp. Erreichen kann er diese Expansion auf Kosten anderer Kortexareale.

Der Formfaktor als quantitativer Wert für die Symmetrie einer Struktur bestätigt den offensichtlichen Befund einer geringeren Symmetrie der Barrel-Äquivalente im Vergleich zu den Wildtyp-Barrels (Tab. 1).

Die detaillierte und quantitative Analyse der Struktur von Wildtyp- und *reeler*-Modulen verdeutlicht noch einmal die massiven morphologischen Unterschiede im primären somatosensorischen Kortex. Umso beeindruckender wirken die funktionellen Gemeinsamkeiten der gar so unterschiedlich organisierten Module.

### **3.3.4 Analyse des molekularen Schichtschicksals individueller Zellen in der rekonstruierten Kolumne mittels RNA *in situ*-Hybridisierung – wt vs. *rl* -/-**

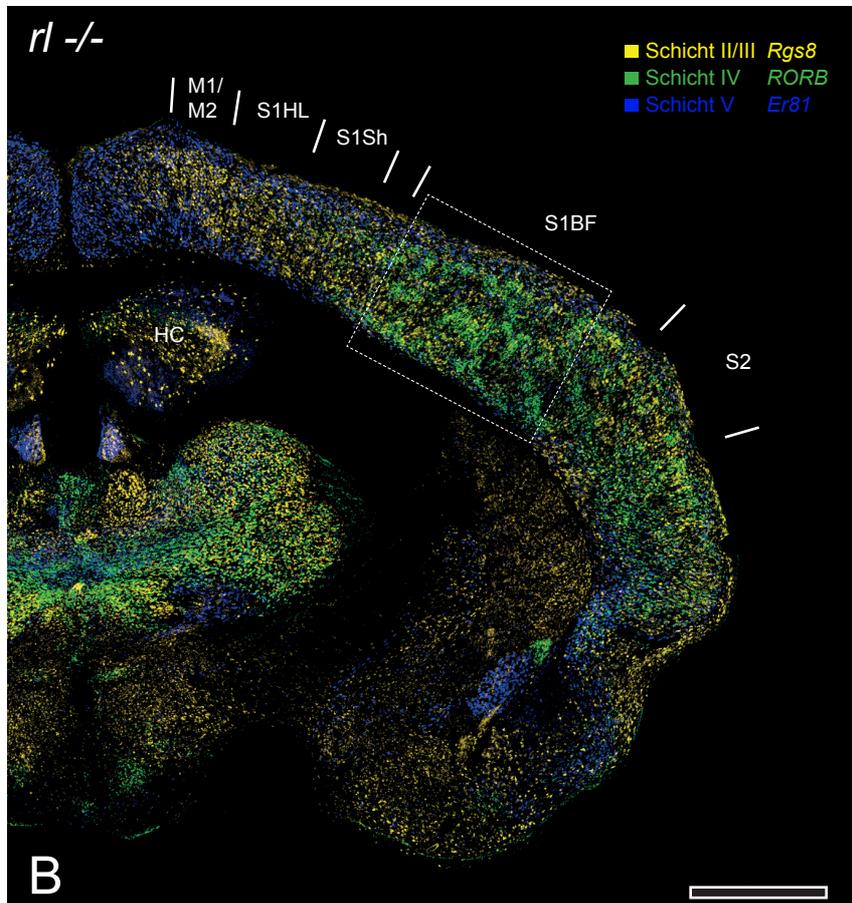
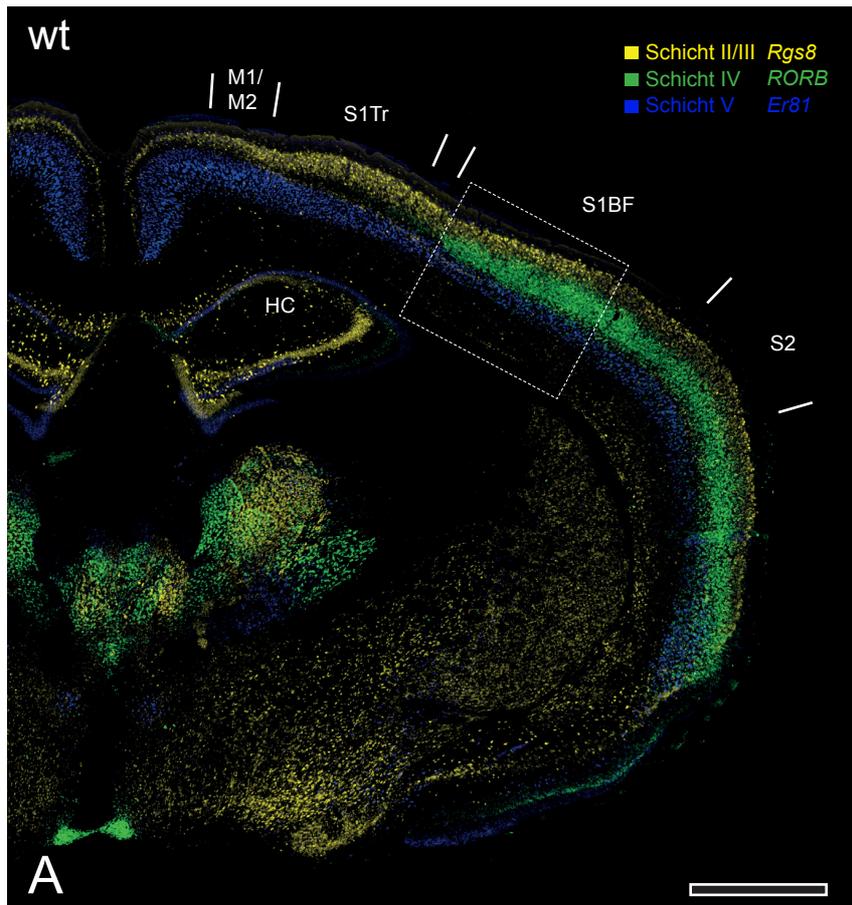
Die Anordnung der Zellpopulationen, welche die 6 kortikalen Schichten im *reeler*-Gehirn repräsentieren, wird in der Literatur auf Grundlage verschiedener birth-dating Experimente als invertiert betrachtet. Darüber hinaus finden sich Konzepte, die eine zusätzliche Durchmischung von Zellen mit Zugehörigkeiten zu verschiedenen kortikalen Schichten beschreiben. Die massive Desorganisation der

Barrelteiläquivalente-enthaltenden Kolumne im *reeler*-Kortex legt jedoch einen wesentlich grundlegenderen strukturellen Defekt nahe.

Die Entdeckung schichtenspezifischer mRNA Expressionsprofile lieferte einen völlig neuen Ansatzpunkt für eine detaillierte Analyse laminärer Organisation im Neokortex mit Hilfe der RNA *in situ*-Hybridisierung (Lein et al., 2007; Molyneaux et al., 2007). Die entsprechenden Marker werden als 'Schichtschicksalsmarker' bezeichnet (Hevner et al., 2003). Für die vorliegende Studie wurden die 3 zentralen zellulären Kompartimente jeweils stellvertretend von einem Schichtschicksalsmarker visualisiert: Das supragranuläre Kompartiment von dem Schicht II/III Marker *Rgs8*, das granuläre Kompartiment von dem Schicht IV Marker *RORB* und das infragranuläre Kompartiment von dem Schicht V Marker *Er81*.

Die Verwendung dieser Sonden an koronaren Schnitten des Wildtyp-Gehirns führt zur Visualisierung von Zellen der Schichten II/III, IV und V in jeweils typischer Lage. Die Schichten sind in allen dargestellten neokortikalen Arealen klar ausgebildet und relativ gut voneinander abgrenzbar (Abb. 11A, 12A). Ein völlig anderes Bild ergibt eine Hybridisierung der Sonden im *reeler*-Gehirn (Abb. 11B, 12B): im primären somatosensorischen Kortex und den angrenzenden Kortexarealen findet sich eine willkürlich erscheinende Verteilung der durch die Marker visualisierten Zellgruppen. Zellen mit ganz unterschiedlichen molekularen Schichtschicksalen finden sich jeweils über die vollständige Dicke des Kortex verstreut, ohne ein auch nur entfernt als Schicht zu bezeichnendes Organisationsmuster erkennen zu lassen. Lediglich eine grobe Zusammenlagerung *RORB*-positiver Zellen fällt deutlich ins Auge, die entsprechenden Zellnester verteilen sich aber wiederum ausgiebig über den Kortex. Zur Aufdeckung eines möglichen subtileren Organisationsprinzips im *reeler*-Kortex wurde die Verteilung der für die unterschiedlichen Schichtschicksalsmarker positiven Zellen auch quantitativ untersucht (Abb. 12 C/D). Dafür wurde in rekonstruierten Kolumnen des S1BF Areals, für die mit den verschiedenen Markern visualisierten Zellen, ihr individueller Abstand zur Pia bestimmt.

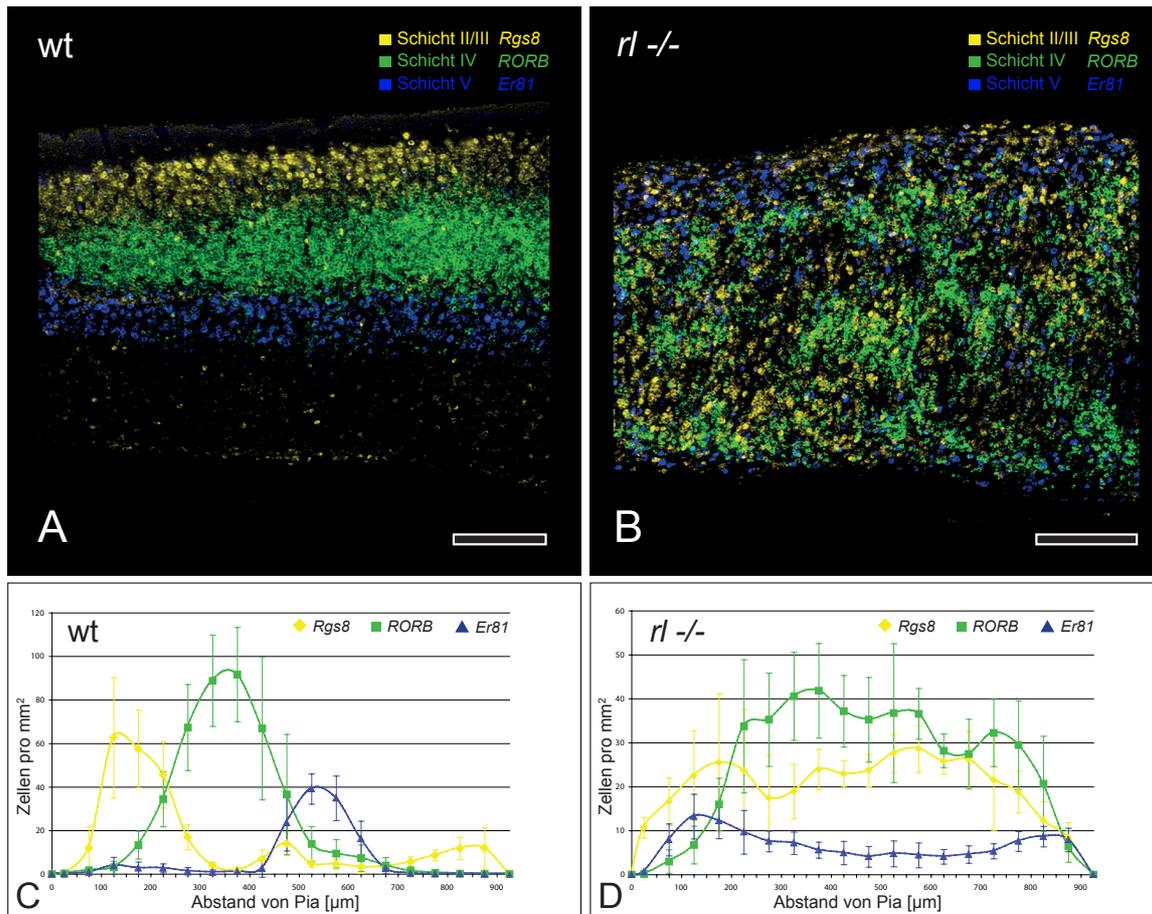
Im Wildtyp-Kortex spiegeln die Verteilungskurven der Marker die laminäre Gliederung und die verhältnismäßig geringe Überlappung von Zellen mit Zugehörigkeiten zu den unterschiedlichen Schichten wieder (Abb. 12C). *Rgs8* markierte Zellen repräsentieren Schicht II/III und finden sich vor allem 50-300 µm unterhalb der Pia. Mit *RORB* markierte Zellen der Schicht IV finden sich 200-500 µm unterhalb der Pia und *Er81* markierte Zellen der Schicht V finden sich in 450-650 µm Tiefe.



Im *reeler*-Kortex wird auch in der quantitativen Analyse der untersuchten Zellgruppen keine Gliederung in räumlich zusammenhängende Kompartimente oder gar Schichten deutlich (Abb. 12D). Die *Rgs8*-positiven Zellen verteilen sich besonders willkürlich über die ganze Dicke des Kortex. *RORB*-positive Zellen konzentrieren sich auf einen breiten Bereich in der Mitte des Kortex und meiden lediglich die ersten 100 µm unterhalb der Pia und die letzten 50 µm oberhalb der weißen Substanz, während *Er81* markierte Zellen in genau diesen Regionen geringfügig verdichtet vorkommen, sich insgesamt aber auch über die ganze Dicke des Kortex verteilen. Der *reeler*-Kortex weist also nicht nur keine Invertierung der kortikalen Schichtung auf, sondern muss insgesamt als nicht laminär organisiert betrachtet werden.

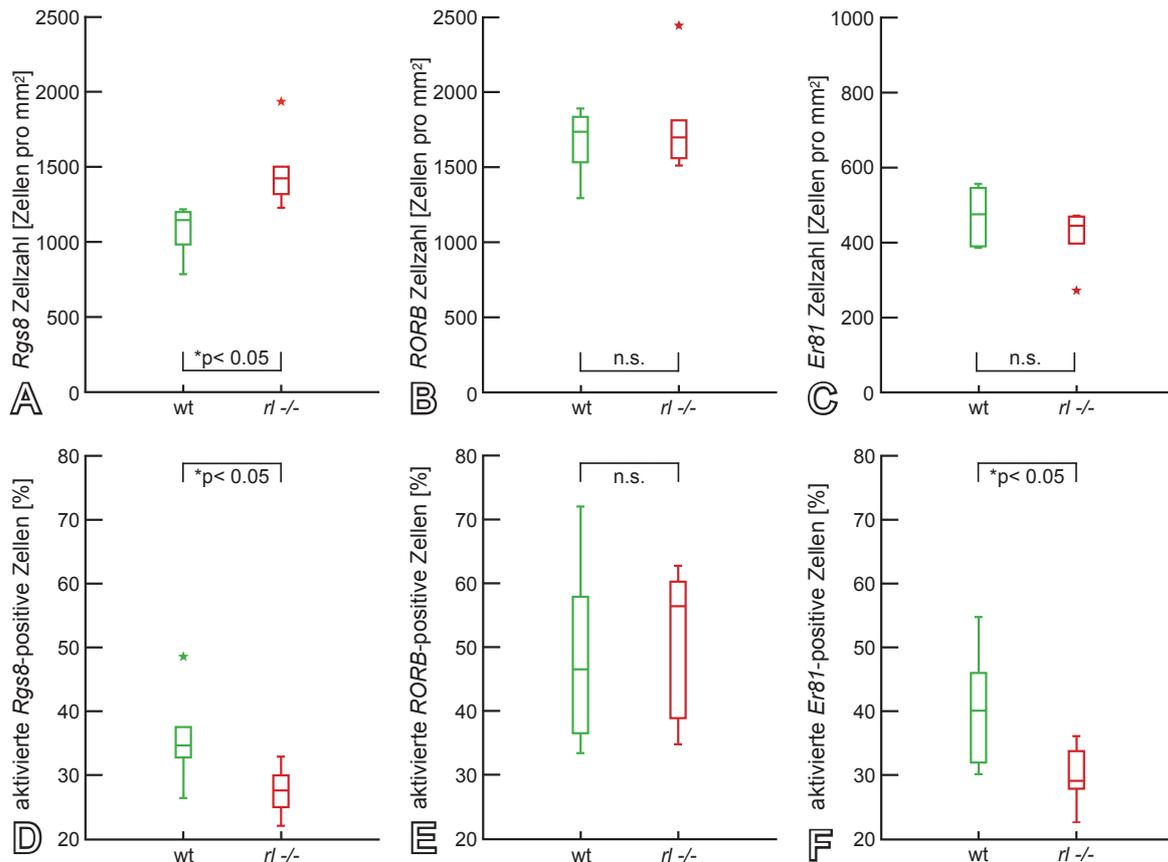
Die vertikale Positionierung eines Neurons steht in Zusammenhang mit dem Ende der Migration, dem Zellzyklus und dem Zeitpunkt der Entstehung der jeweiligen Zelle (Takahashi et al., 1999; Duque and Rakic, 2011). Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Entstehung von Neuronen werden unterschiedliche Mengen von Zellen produziert (Takahashi et al., 1999). Die enge regulatorische Vergesellschaftung dieser Prozesse macht vor dem Hintergrund des ausgeprägten Positionierungsdefekts im *reeler*-Kortex also auch eine Untersuchung der Populationsgröße der betrachteten Zellgruppen in den beiden Genotypen notwendig. Die Anzahl *RORB*- und *Er81*-positiver Zellen zeigt zwischen Wildtyp- und *reeler*-Kortizes jeweils keine signifikanten Unterschiede (Abb.13 B/C). Die Regulation der Anzahl dieser beiden Zellpopulationen bleibt also von der *Reln*-Mutation unbeeinflusst. Die in der Kortexentwicklung später entstandenen *Rgs8* Zellen mit, Schicht II/III-Schicksal stellen im *reeler*-Kortex hingegen eine signifikant größere Zellpopulation dar (Abb.13A). Dieser Befund ist im Einklang mit früheren birth-dating Studien, bei denen ebenfalls ein Anstieg in der Anzahl spätgeborenen Neuronenpopulationen im *reeler*-Kortex gefunden wurde (Polleux et al., 1998).

**Abbildung 11.** (Seite 51) **Molekulare Schichtenschicksalsmarker im adulten Kortex.** *In situ*-Hybridisierungen der verschiedenen Marker im **A** Wildtyp- und **B** *reeler*-Kortex. Gezeigt sind koronare Schnitte auf Höhe des primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex (S1BF). Die jeweils drei konsekutiven Schnitte sind als überlagerte Falschfarbenbilder dargestellt. Der Rahmen im S1BF Areal zeigt den Bereich, der in Abb. 12 in höherer Vergrößerung dargestellt ist. Andere Strukturen: M1/M2: Primärer/Sekundärer Motorkortex; S1Tr/HL/Sh: Primärer somatosensorischer Kortex Rumpf ([engl.] trunk), Hinterbein ([engl.] hindlimb), Schulter ([engl.] shoulder); S2: Sekundärer somatosensorischer Kortex; HC: Hippocampus. Maßstabsbalken 1000 µm



**Abbildung 12. Verteilung der molekularen Schichtenschiedsmarker im adulten Kortex.** Höhere Vergrößerung des Areals, das in Abb. 11 umrahmt ist (S1BF). **A** Der Wildtyp-Kortex zeigt die bekannte Schichtung. Die Lage der Schichtenmarker stimmt mit der bekannten Position der jeweiligen Schicht überein. **B** Im *reeler*-Hirn lassen sich keine kortikalen Schichten visualisieren. Die Zusammenlagerungen der *RORB*-Zellen entsprechen Barreiläquivalenten. **C, D** Die Diagramme zeigen eine Quantifizierung der Verteilung der molekularen Marker im Wildtyp (**C**) und im *reeler*-Kortex (**D**). Anders als im gängigen 'outside-in' Modell vorhergesagt, deuten die Verteilungskurven im *reeler*-Kortex nicht auf eine Inversion der kortikalen Schichten, sondern auf einen deutlich ausgeprägteren Laminierungsdefekt hin. Die Antennen zeigen +/- eine Standardabweichung. Maßstabsbalken 250 µm

Neben dem Prozess der Neuronenmigration ist also auch der komplex regulierte Prozess der Neuronenbildung zumindest teilweise von der *Reln*-Mutation betroffen. Dennoch konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Gesamtanzahl der Neurone in der kortikalen *reeler*-Kolumne keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Wildtyp-Kolumne aufweist (Goffinet, 1984a; Polleux et al., 1998). Somit scheint im *reeler*-Hirn vor allem der zeitliche Ablauf der Neuronenbildung gestört zu sein, und zwar in dem Sinne, dass sich die Anzahl der neu generierten kortikalen Neurone zu den unterschiedlichen Entstehungszeitpunkten (E 11-16) vom Wildtyp unterscheidet.



**Abbildung 13. Molekulare Schichtschicksalsmarker und neuronale Aktivierung.** Aus der vollständigen Rekonstruktion stimulierter Wildtyp- und *reeler*-Kolumnen ergibt sich die Populationsgröße der für die verschiedenen Marker positiven Zellen (**A**, **B**, **C**) und die Anzahl aktivierter Zellen in den verschiedenen (mit den Markern definierten) Kompartimenten (**D**, **E**, **F**). **A–C** Zeigt die Anzahl *Rgs8*-, *RORB*- und *Er81*-positiver Zellen als Boxplots. Die entwicklungsgeschichtlich jüngste Zellschicht (II/III) zeigt als einzige Population statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- (Grün) und *reeler*-Zellpopulationen (Rot). Die abweichende Skalierung der Y-Achse in (**C**) ist auf die relativ geringe Populationsgröße *Er81*-positiver Zellen zurückzuführen. **D–F** Prozentualer Anteil aktivierter (c-fos)-positiver Zellen in den *Rgs8*-, *RORB*- und *Er81*-Zellpopulationen in stimulierten Wildtyp- und *reeler*-Kolumnen. Nur bei den (thalamisch direkt innervierten) *RORB*-positiven Zellen ist der prozentuale Anteil c-fos-positiver Zellen in den stimulierten Wildtyp- und *reeler*-Kolumnen statistisch gleichwertig. Ober- und Unterseiten der Boxen zeigen jeweils die 25. bzw. 75. Perzentile. Der jeweilige Median ist als Strich in den Boxen erkennbar. Die Antennen zeigen die maximalen bzw. minimalen Werte der jeweiligen Daten. Ausreißerverdächtige Werte sind als Sternchen dargestellt.

### 3.3.5 Funktionelle Aktivierung in Kompartimenten mit definiertem molekularem Schichtschicksal – wt vs. *rl* -/-

Die weitgehend normal erscheinende funktionelle Aktivierbarkeit der Barrelteiläquivalente-enthaltenden Kolumne im *reeler*-Kortex steht im krassen Gegensatz zu ihrer massiven morphologischen und laminären Desorganisation. Vor diesem Hintergrund ist die Bestimmung des Schichtschicksals der aktivierten

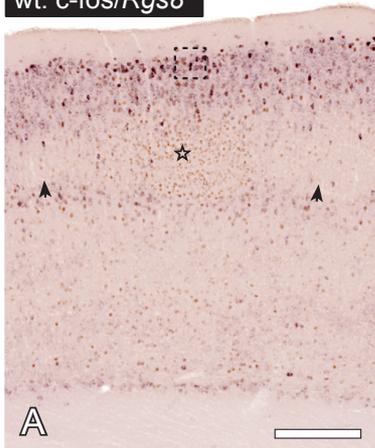
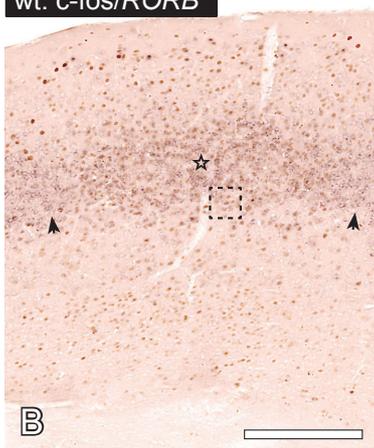
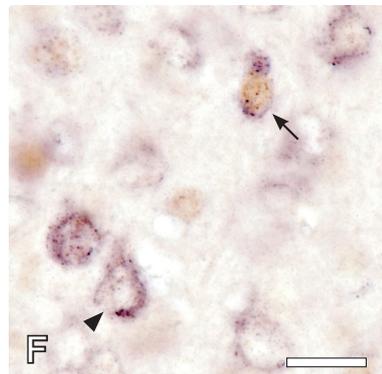
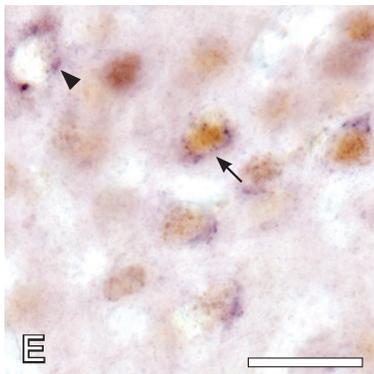
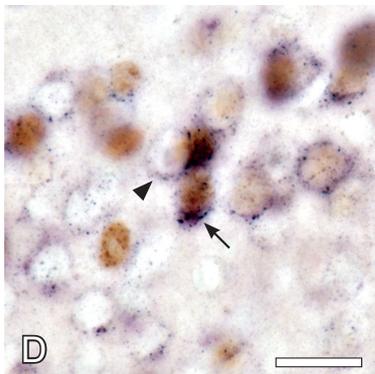
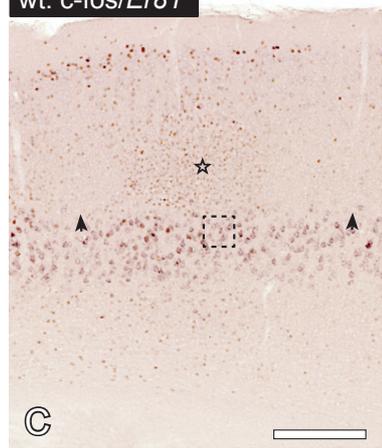
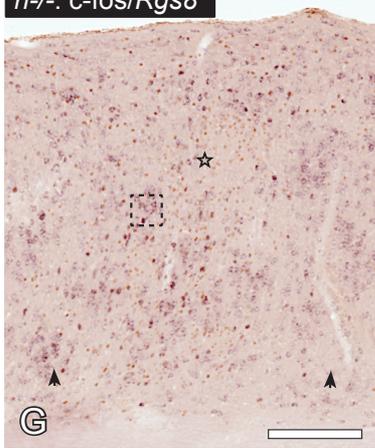
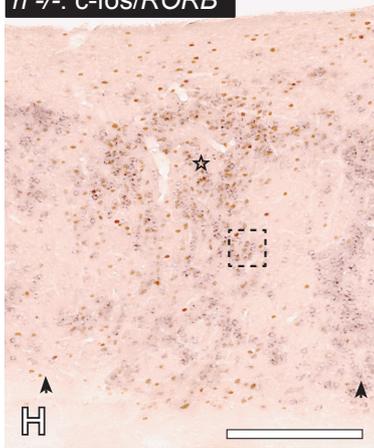
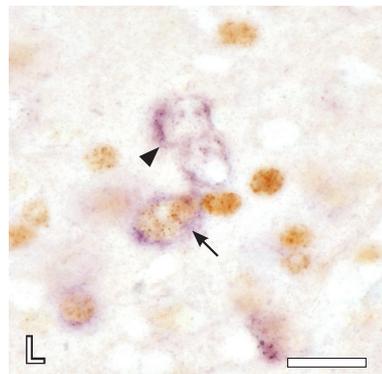
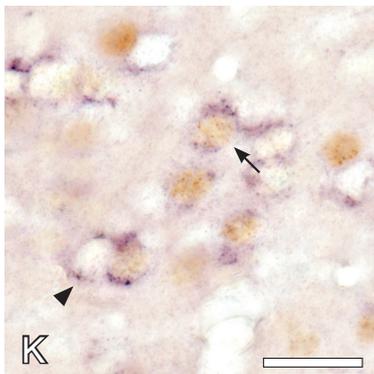
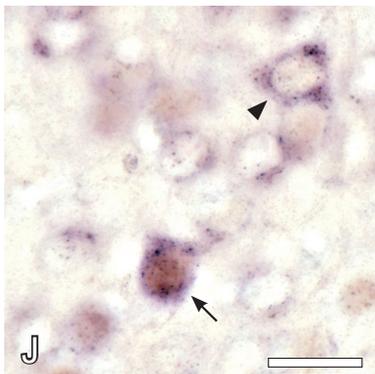
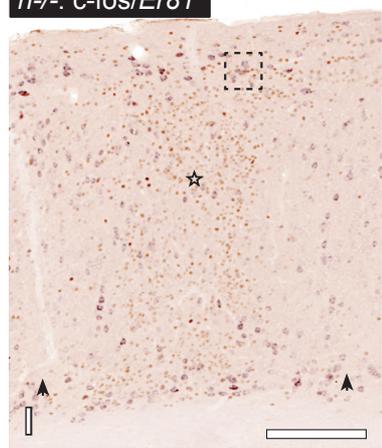
ektopen Neurone besonders interessant. Sie liefert Auskunft über den Beitrag verschiedener Kompartimente an der Aktivierung innerhalb der Kolumne. Zu diesem Zweck wurden Schnitte mit stimulierten Kolumnen zunächst immunhistochemisch gegen das c-fos-Protein gefärbt, gefolgt von einer *in situ*-Hybridisierung für die unterschiedlichen Schichtenschicksalsmarker (Abb. 14, 15). Die Kolokalisation der beiden Marker, im Verhältnis zur Gesamtanzahl der für einen Schichtenmarker positiven Zellen, gibt Aufschluss über den Prozentsatz aktivierter Zellen in einem Kompartiment mit definiertem Schichtenschicksal (Abb. 13 D/E/F).

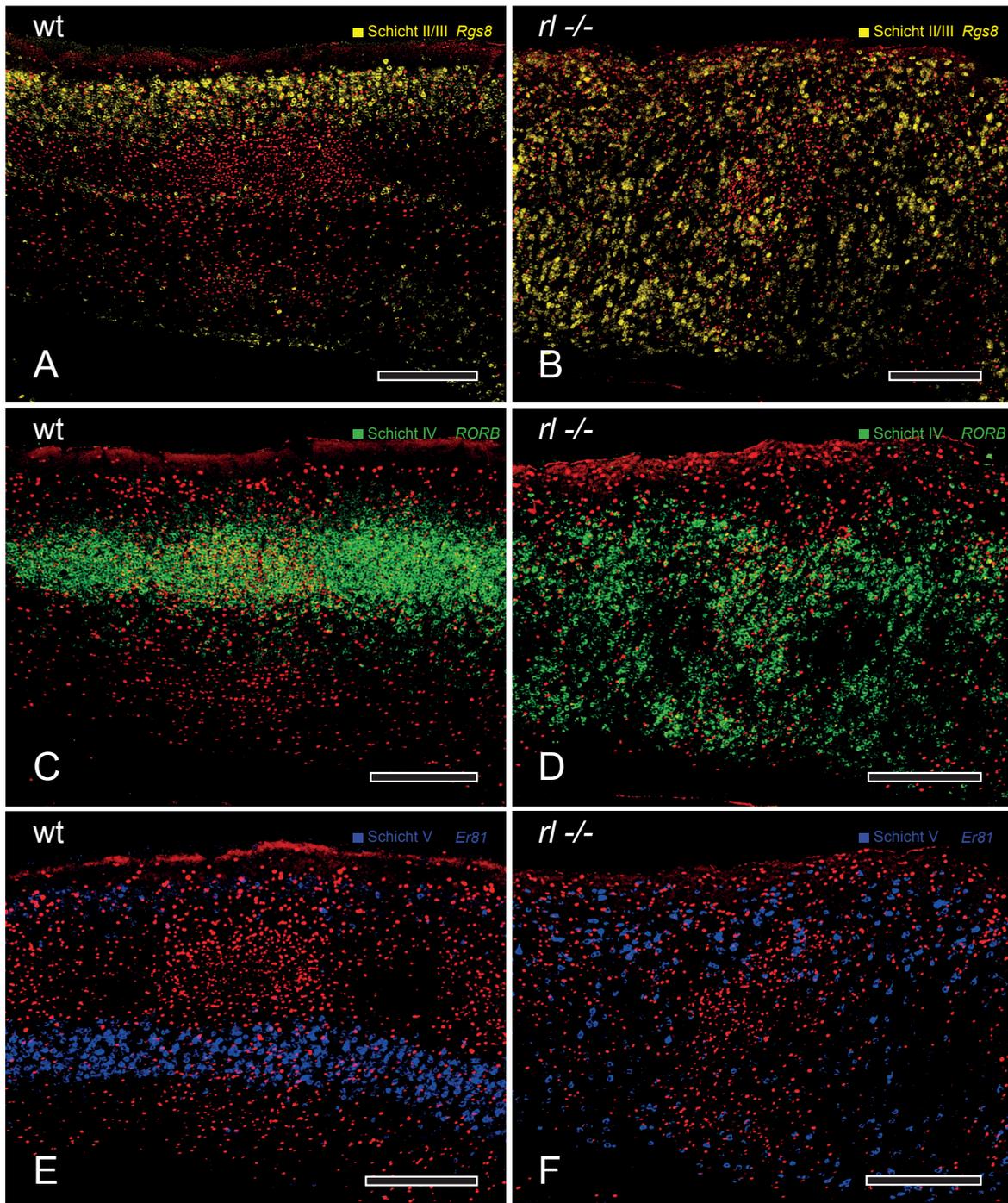
Die Zellen der Schicht IV sind im Wildtyp-Barrel-Kortex das primäre Ziel der lemniskalen thalamischen Axone (Killackey, 1973; Killackey and Leshin, 1975; Wimmer et al., 2010). Der thalamische Eingang ist in der Lage, kortikale Zellen nach Stimulation der Rezeptorperipherie direkt zu aktivieren. Entsprechend interessant ist es, diese potentiell direkt aktivierte Zellpopulation in der Wildtyp- und *reeler*-Kolumne vergleichend zu betrachten (Abb. 14 B/E vs. H/K; 15 C vs. D). Trotz ihrer chaotischen Anordnung unterscheidet sich die Anzahl aktivierter *RORB*-positiver *reeler*-Zellen nicht signifikant von der Anzahl aktivierter *RORB*-positiver Schicht IV Zellen im Wildtyp (Abb. 13E). Die entsprechenden Zellgruppen zeigen nach der 2 stündigen Exploration in beiden Genotypen eine gleich starke c-fos-Expression in stimulierten Kolumnen. *RORB*-positive Zellen nehmen also in beiden Genotypen in vergleichbarer Stärke an der Aktivierung funktionaler kolumnär organisierter Netzwerke teil.

Die Tatsache, dass etwa die Hälfte aller *RORB*-positiven Zellen auch c-fos-positiv ist, führt zu einer ausgeprägten räumlichen Überlagerung c-fos und *RORB*-positiver Zellgruppen. Die Tatsache, dass diese ausgeprägte Aktivierung nicht nur in Schicht IV bzw. dem Wildtyp-Barrel zu finden ist, sondern auch in Zellen mit

**Abbildung 14.** (Seite 56) **Molekulare Schichtschicksalsmarker und neuronale Aktivierung.**

Die Koronarschnitte zeigen stimulierte und deprivierte Kolumnen im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex des Wildtyp- (**A–F**) und *reeler*-Gehirns (**G–L**). Immunhistochemische c-fos-Färbungen (Braun) und *in situ*-Hybridisierungen der verschiedenen schichtspezifischen Marker (Violett). **A–C** Barrel-assoziierte Wildtyp-Kolumnen. Aktivierte Kolumnen sind (im Zentrum ihres Barrels) mit Sternchen markiert, deprivierte Kolumnen (an der Schicht IV/Va Grenze) mit Pfeilköpfen. Die Bilder **G–I** zeigen das entsprechende Areal im *reeler*-Hirn. Aktivierte Kolumnen sind mit Sternchen markiert, deprivierte Kolumnen mit Pfeilköpfen. **D–F** und **J–K** zeigen eine Vergrößerungen des umrahmten Areals aus dem jeweils darüber befindlichen Bild. Die Pfeile markieren Zellen, in denen c-fos und jeweils ein Schichtschicksalsmarker kolokalisiert sind, die Pfeilköpfe weisen auf Zellen, die nur den Schichtschicksalsmarker exprimieren. Maßstabsbalken: A–C, G–I 250 µm; D–F, J–L 20 µm.

wt: *c-fos/Rgs8*wt: *c-fos/RORB*wt: *c-fos/Er81**rl*<sup>-/-</sup>: *c-fos/Rgs8**rl*<sup>-/-</sup>: *c-fos/RORB**rl*<sup>-/-</sup>: *c-fos/Er81*

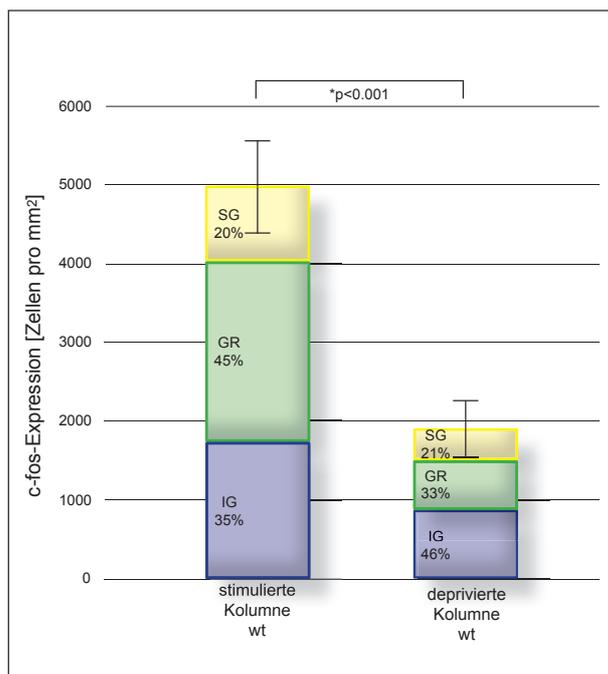


**Abbildung 15. Molekulare Schichtschicksalsmarker und neuronale Aktivierung.** Die Koronarschnitte zeigen stimulierte und deprivierte Kolonnen im primären somatosensorischen 'Barrel' Kortex des Wildtyp- (**A**, **C**, **E**) und *reeler*-Gehirns (**B**, **D**, **F**). Immunhistochemische *c-fos*-Färbungen (rot) und *in situ*-Hybridisierungen der verschiedenen schichtenspezifischen Marker (gelb, grün, blau). Die Bilder zeigen jeweils zwei konsekutive Schnitte, die als überlagerte Falschfarbenbilder dargestellt sind. Im Zentrum der Abbildungen **A**, **C**, **E** findet sich jeweils eine stimulierte Barrel-assoziierte Wildtyp-Kolumne, die äußeren Kolonnen sind jeweils depriviert. Im Zentrum der Abbildungen **B**, **D**, **F** findet sich jeweils eine stimulierte 'Barrelteiläquivalente' enthaltende *reeler*-Kolumne; auch hier sind die äußeren Kolonnen jeweils depriviert. Maßstabsbalken: 250 µm

Schicht IV Schicksal in der *reeler*-Kolumne, ist ein weiteres Indiz dafür, dass sowohl die c-fos- also auch die *RORB*-positiven Zellnester der *reeler*-Kolumne als Barrel-Äquivalente betrachtet werden sollten (s.o.).

In der kortikalen Wildtyp-Kolumne führt physiologische Stimulation zu komplexen direkten und indirekten Aktivierungsvorgängen in allen laminären Kompartimenten der Kolumne (Abb. 16). In der desorganisierten *reeler*-Kolumne stellt sich die Frage, ob die Aktivierung auch hier in allen entsprechenden Kompartimenten mit den jeweils äquivalenten Schichtschicksalen stattfindet, oder ob das Modul funktionell betrachtet aus aktivierten Barrelteiläquivalenten besteht, die aufgrund ihrer ausgedehnten Verteilung über den Kortex nur morphologisch den Eindruck einer vollständigen, d.h. Zellen aus allen Schichten umfassenden Kolumne hervorrufen.

Mit einem kleinen Gedankenspiel und den vorliegenden Daten lässt sich diese Frage jedoch weitestgehend beantworten: Fünfundvierzig Prozent aller c-fos-positiven Zellen sind in der stimulierten Wildtyp-Kolumne granulär lokalisiert. Die verbleibenden 55 % finden sich entsprechend im supra- und infragranulären Kompartiment (Abb. 16). *RORB*-positive Zellen des granulären Kompartiments zeigen in der stimulierten Wildtyp- und *reeler*-Kolumne eine vergleichbare

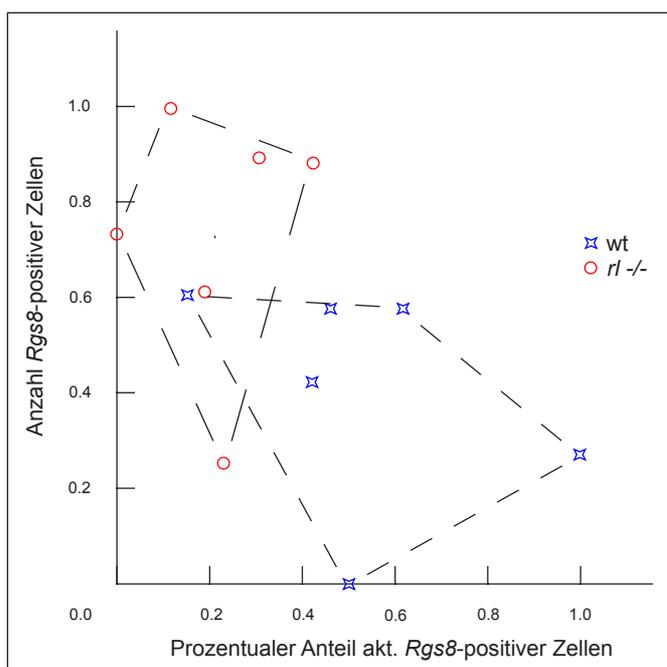


**Abbildung 16. Die laminäre Verteilung aktivierter Neurone in deprivierten und stimulierten Wildtyp-Kolumnen.** Die Balkendiagramme stellen die Anzahl aktivierter (c-fos-positiver) Zellkerne innerhalb der verschiedenen Kolumnen dar (stimulierte Kolumne: korrespondierende Vibrissen während der Exploration verwendet; deprivierte Kolumne: korrespondierende Vibrissen vor der Exploration entfernt). Die Kolumne ist anhand zytoarchitektonischer Kriterien (unabhängig von den Schichtschicksalsmarkern) in ihre grundlegenden laminären Kompartimente aufgeteilt (SG, supragranuläres Kompartiment; GR, granuläres Kompartiment; IG, infragranuläres Kompartiment). Der prozentuale Anteil der einzelnen Kompartimente an der gesamten c-fos-Expression ist aufgeschlüsselt. Die Antennen zeigen +/- eine Standardabweichung (bezogen auf die gesamte Kolumne).

c-fos-Expression (Abb. 13E). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass (I) die Anzahl der *RORB* Zellen zwischen beiden Genotypen vergleichbar ist (Abb. 13B) und (II) die absolute c-fos-Expression der Wildtyp- und der *reeler*-Kolumne keine signifikanten Unterschiede zeigt (Abb. 9), ist es damit hoch wahrscheinlich, dass auch in der *reeler*-Kolumne etwa 55 % der zellulären Aktivierung in Äquivalenten des supra- und infragranulären Kompartiments stattfindet.

Die Barreiläquivalente-enthaltende Kolumne ist also auch im *reeler*-Kortex tatsächlich eine funktionelle Kolumne, in der unterschiedliche Kompartimente funktionell aktivierbar sind und erweckt nicht allein morphologisch einen kolumnären Eindruck.

Dennoch zeigt nicht jedes extragranuläre *reeler*-Kompartiment nach der physiologischen Stimulation den jeweils gleichen Grad an Aktivierung wie das entsprechende Wildtyp-Äquivalent. *Rgs8*-positive *reeler*-Zellen zeigen einen signifikant niedrigeren Anteil aktivierter Zellen als das entsprechende Schicht II/III Kompartiment im Wildtyp (Abb. 13D). Dabei kommt jedoch verkomplizierend hinzu, dass die betrachteten Zellpopulationen quantitativ heterogen sind. Es finden sich signifikant mehr *Rgs8*-positive Zellen im *reeler*- als im Wildtyp-Kortex (Abb. 13A). Betrachtet man also nur den prozentualen Anteil aktivierte *Rgs8* Zellen im *reeler*-Kortex, so ist dieser geringer. Die Gesamtanzahl der *Rgs8*-positiven Zellen korreliert



**Abbildung 17. Die Anzahl *Rgs8*-positiver Zellen im Wildtyp- und *reeler*-Kortex und ihre funktionelle Aktivierung.** Inverse Korrelation zwischen der Anzahl *Rgs8*-positiver Zellen und der prozentualen Anzahl aktivierter Zellen in der *Rgs8*-Zellpopulation (Die Daten sind normalisiert; niedrigster Wert= 0, höchster Wert= 1). Im *reeler*-Kortex finden sich mehr *Rgs8*-positive Zellen. Mit ihrem vermehrten Auftreten sinkt aber auch ihre prozentuale Aktivierung. Die zusätzlich generierten Zellen werden in der *reeler*-Kolumne also nicht gleichwertig in die neuronale Aktivierung eingebunden.

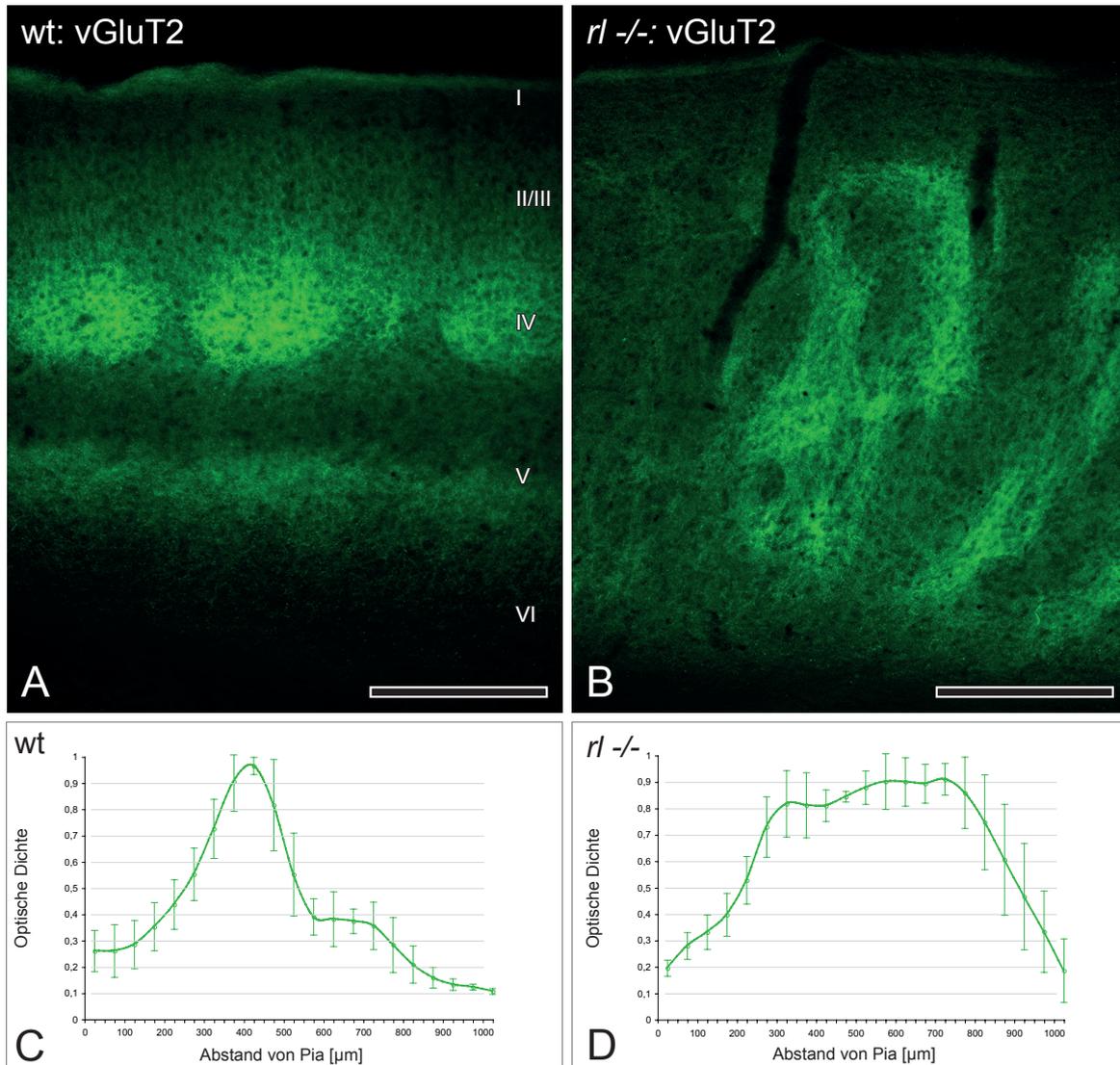
jedoch negativ mit der prozentualen Anzahl aktivierter Zellen in der *Rgs8* Zellpopulation (Abb. 17). Entsprechend muss man vermuten, dass die zusätzlich generierten Zellen im *reeler*-Kortex nicht gleichwertig in die neuronale Aktivierung eingebunden werden, und zwar möglicherweise auf Grund fehlerhafter oder unausgereifter intrakortikaler Verbindungen.

*Er81*-positive *reeler*-Zellen zeigen ebenfalls niedrigere prozentuale Raten aktivierter Neurone in stimulierten Kolumnen als entsprechende Wildtyp-Zellen (Abb. 13F). Die Gesamtzahl *Er81*-positiver Zellen zeigt aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 13C). In der *reeler*-Kolumne werden also tatsächlich weniger *Er81*-positive Zellen mit einem Schicht V Schicksal aktiviert. Mögliche Gründe könnten eine gestörte oder veränderte Ausreifung der Zellen in ihrer ektopen Position oder eine fehlerhafte oder veränderte Einbindung in das kortikale Netzwerk sein.

### **3.3.6 Lemniskale thalamische Endigungsfelder im primären somatosensorischen Kortex – wt vs. *rl* -/-**

Lemniskale thalamische Axone aus dem VPM Kern des Thalamus übermitteln durch whisking aufgenommene protopathische und epikritische Berührungsinformationen an den Kortex (Ahissar et al., 2000). Im Wildtyp innervieren die lemniskalen thalamischen Endigungen bevorzugt die in der Schicht IV befindlichen Barrels (Killackey, 1973; Killackey and Leshin, 1975; Wimmer et al., 2010). Für den *reeler*-Kortex entspricht das bisher berichtete Innervationsmuster dem Modell der laminären Invertierung. Auf Höhe der erwarteten Schicht IV wurde eine deutliche Verdichtung der thalamischen Projektion beschrieben (Welt and Steindler, 1977; Caviness and Frost, 1983). Diese mit Hilfe der anterograden Axondegenerationstechnik gewonnenen Befunde lassen sich nicht mit der tatsächlichen Position von Zellen mit molekularem Schicht IV Schicksal im *reeler*-Kortex in Deckung bringen (Abb. 12 B/D). Insbesondere die normal erscheinende funktionelle Aktivierung eben dieser Zellen legt jedoch nahe, dass sie einen exakten thalamischen Eingang erhalten müssen, um auf Vorgänge in der sensorischen Peripherie angemessen reagieren zu können (Abb. 9).

Für Antikörper gegen den vesikulären Glutamattransporter 2 (vGluT2) konnte eine weitgehende Spezifität für lemniskale thalamische Boutons gezeigt werden (Graziano et al., 2008; siehe außerdem Diskussion). Dies ermöglichte für die vorliegende Studie



**Abbildung 18. Verteilung der thalamischen Boutons über die kortikalen Schichten.** **A** Im Wildtyp reflektiert das Muster der vGluT2-Immunhistochemie vor allem die bekannte Verteilung lemniskaler thalamischer Endigungsfelder im Barrel-Kortex. Schicht IV sticht besonders hervor und die Form einzelner Barrels wird deutlich sichtbar. Ein weiteres Band thalamischer Boutons findet sich an der Schicht V/VI Grenze, etwas diskreter auch in der Schicht I. **B** Im *reeler*-Kortex findet sich ein völlig anderes Bild. Vertikal orientierte Bänder aus terminalen Boutons bilden ineinander verwobene kolumnär organisierte Strukturen, die sich über die ganze Dicke des Kortex erstrecken. **C** und **D** Quantifizierung der optischen Dichte der immunreaktiven thalamischen Boutons. Im Wildtyp (**C**) zeigt sich der erwartete Kurvengipfel auf Höhe von Schicht IV, im *reeler*-Tier (**D**) ist die Kurve flach und deckt weite Teile der vertikalen Ausdehnung des Kortex ab. Beide Kurven ähneln stark der Verteilung *RORB*-positiver Zellen im jeweiligen Genotyp (Abb. 12 C/D). Die römischen Ziffern markieren die kortikalen Schichten. Maßstabsbalken A, B 250  $\mu\text{m}$

eine selektive Visualisierung der axonalen Endigungsfelder des VPM in der kortikalen Kolumne und eine Reevaluierung des Musters der thalamischen Projektion in den primären somatosensorischen *reeler*-Kortex.

Die thalamischen Boutons konzentrieren sich im Wildtyp vor allem auf Schicht IV, wo sie deutlich die Form der Barrels nachbilden (Abb. 18A). Dieses Muster entspricht der starken thalamischen Innervation insbesondere der Barrel-Zentren (Wimmer et al., 2010). Darüber hinaus findet sich ein etwas schwächeres Band thalamischer Boutons an der Schicht V/VI Grenze, etwas diskreter auch in der Schicht I.

Der *reeler*-Kortex zeigt unterdessen keine schichtenspezifische Lokalisation der lemniskalen Boutons. Stattdessen verdichten sie sich zu bandartigen Formationen, die sich nahezu über die ganze Breite des Kortex erstrecken (Abb. 18B).

Das Muster der über den Kortex verteilten vGlut2-positiven Areale erinnert stark an die Verteilung der Cytochromoxidase aktiven Areale (Abb. 7B) und die Zusammenlagerung *RORB*-positiver Neurone (Abb. 12B).

Die Auswertung der optischen Dichteprofile thalamischer Boutons über die vertikale Ausdehnung des Kortex spiegelt im Wildtyp die deutliche Fokussierung auf die Schicht IV wieder (Abb. 18C). Im *reeler*-Kortex verdeutlicht das Dichteprofil die ausgeprägte Verteilung über die ganze Breite des Kortex, mit einer niedrigeren Dichte unmittelbar unterhalb der Pia und oberhalb der weißen Substanz (Abb. 18D).

Die Dichteprofile ähneln somit in beiden Genotypen deutlich den Verteilungskurven *RORB*-positiver Zellen mit Schicht IV Schicksal (Abb. 12 C/D). Das Muster der thalamischen Innervation ist also in beiden Genotypen weitreichend deckungsgleich mit Markern, die Barrels beziehungsweise Barrel-Äquivalente repräsentieren. Dies deutet stark darauf hin, dass nicht nur im Wildtyp, sondern auch im *reeler*-Kortex primär Zellen mit einem Schicht IV Schicksal direkt thalamisch innerviert werden.

Die dargestellten Befunde legen also eine weitgehend normale thalamische Innervation von Zellen mit Schicht IV Schicksal im *reeler*-Kortex nahe. Demnach finden die thalamischen Axone die ausgedehnt über den Kortex verteilten Zielzellen auch in ihrer ektopen Position. Der Mechanismus der thalamischen Zielfindung muss also auch in Abwesenheit umschriebener Kompartimente funktionieren.

## 4 DISKUSSION

Die vorliegende Studie zeigt eine regelhafte Konfiguration der subkortikalen Anteile des WTBP im *reeler*-Gehirn. Dieser Befund bezieht sich auf den jeweiligen Hirnstamm- oder Thalamuskern im Ganzen, aber auch auf seine Module, ihren zellulären Aufbau und ihre funktionelle Aktivierbarkeit. Damit scheinen die Kerne des WTBP nicht von den zahlreichen beschriebenen Störungen der zellulären Morphologie subkortikaler Anteile des *reeler*-Gehirns betroffen zu sein (Caviness, 1988; D'Arcangelo, 2005). Die Grundlage für einen intakten thalamischen Eingang in den *reeler*-Kortex ist damit gegeben. Dieser stellt wiederum die Grundlage für jede Art kortikaler Informationsverarbeitung dar (Lopez-Bendito and Molnar, 2003; Molnar et al., 2003; Molnar et al., 2012). Auch die Verteilung lemniskaler thalamischer Boutons im *reeler*-Kortex deutet auf einen regelhaften thalamischen Eingang in den desorganisierten Kortex hin. Die entwicklungsabhängige Plastizität thalamischer Fasern scheint damit auszureichen, um die kortikalen Zielzellen auch in ektopter Lage aufzuspüren, was die Frage nach den Faktoren und Mechanismen dieser Zielfindung und –erkennung aufwirft (Molnar and Blakemore, 1995; Molnar et al., 1998).

Im Kortex der *reeler*-Mutante ist die Störung der kortikalen Laminierung unerwartet stark ausgeprägt. Anstelle des beschriebenen 'outside-in' Musters mit einer Invertierung der kortikalen Schichten findet sich eine so starke Durchmischung von Zellen mit unterschiedlichen molekularen Schichtzugehörigkeiten, dass weder laminäre noch anders organisierte kompakte Kompartimente auszumachen sind. Dieser Befund steht im krassen Gegensatz zu vielen vorherigen Analysen des kortikalen *reeler*-Defektes (Caviness and Sidman, 1973a; Rakic and Caviness, 1995; D'Arcangelo, 2005) und macht es notwendig die gängigen Theorien zur Rolle von *reelin* während der Kortikogenese kritisch zu hinterfragen (Frotscher, 1997; Cooper, 2008; Frotscher and Zhao, 2010).

Trotz des ausgeprägten strukturellen Defektes im *reeler*-Kortex führt physiologische sensorische Stimulation zur regelhaften Aktivierung morphologisch definierter Module. Die geordnete Funktion komplexer neuronaler Netzwerke ist daher trotz Abwesenheit kortikaler Schichten prinzipiell möglich. Dieser Befund ist umso erstaunlicher, da Erkrankungen, die mit Störungen der Neuronenmigration vergesellschaftet sind, in der Regel drastische phänotypische Auswirkungen haben (Liu, 2011; Folsom and Fatemi, 2012)

#### 4.1 DIE INTAKTHEIT DER SUBKORTIKALEN ANTEILE DES WTBP IM REELER-GEHIRN UND DIE ETABLIERUNG THALAMOKORTIKALER VERBINDUNGEN

Die *Reln* *-/-* Mutation hat einen deutlichen pathologischen Einfluss auf die Struktur laminiertes Hirnareale. Damit sind Cerebellum, Hippocampus (Archikortex), und Neokortex besonders schwer betroffen (Hamburgh, 1963; Caviness and Sidman, 1973a; Caviness, 1988). Während ihrer normalen Entwicklung exprimieren diese Strukturen deutlich messbare *Reln*-Mengen (Schiffmann et al., 1997). Der pathologische Einfluss der *Reln* *-/-* Mutation auf subkortikale Hirnanteile ist weniger gut untersucht, was einerseits an dem subtileren Phänotyp, andererseits aber auch an einer deutlich geringeren *Reln*-Expression dieser Regionen liegen mag (Schiffmann et al., 1997). Dennoch finden sich in Hirnstamm und Thalamus sowohl umschriebene reelin-positive Kerne und Areale als auch pathologische strukturelle Veränderungen, die im Zusammenhang mit der *Reln* *-/-* Mutation beschrieben wurden. Die zytoarchitektonischen Veränderungen in Nucleus motorius und mesencephalicus nervi trigemini betreffen sogar unmittelbar Strukturen des trigeminalen Systems. Für beide Kerne sind im *reeler*-Gehirn ungewöhnlich lockere Packungsdichten der Zellen beschrieben (Terashima et al., 1994; Terashima, 1996). Im Thalamus der *reeler*-Mutante scheint sich der strukturelle Defekt eher in Form aberranter Faserverläufe in einzelnen Kernarealen wieder zu spiegeln (Caviness and Frost, 1983).

Die Struktur des Pr5 wurde im *reeler*-Hirnstamm bisher nicht untersucht. Der VPM des *reeler*-Thalamus wurde zumindest orientierend in der koronaren Schnittebene untersucht. Bis auf eine generelle Volumenschumpfung von etwa 20 %, die jedoch den gesamte Thalamus betreffen soll, wurde er allerdings als strukturell unauffällig beschrieben (Welt and Steindler, 1977; Caviness and Frost, 1983). Pr5 und VPM exprimieren zu keinem Zeitpunkt ihrer Entwicklung *Reln* (Schiffmann et al., 1997).

In der vorliegenden Studie wurden die subkortikalen Anteile vor allem des lemniskalen WTBP im *reeler*-Gehirn 2-dimensional rekonstruiert und auf Unterschiede zu den Wildtyp-Strukturen hin untersucht. Als Gesamtkern finden sich weder im Pr5 noch im VPM signifikante Abweichungen von der Wildtyp-Struktur. Dieser Befund bezieht sich explizit auch auf die Größe des VPM, der sich entgegen der vorherigen Berichte nicht signifikant kleiner als sein Wildtyp-Gegenstück darstellt. Der abweichende Befund mag einerseits durch eine bessere Beurteilbarkeit des

Kerns in der von uns gewählten Schnittebene zustande kommen (Woolsey et al., 1979; Haidarliu and Ahissar, 2001), andererseits muss aber auch berücksichtigt werden, dass bei den unterschiedlichen Forschergruppen unterschiedliche *reeler*-Linien mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen zum Einsatz kamen, was ebenfalls Einfluss auf die erhobenen Befunde haben kann (Goffinet, 1990). Für die funktionellen Module innerhalb von Pr5 und VPM konnten ebenfalls keine Unterschiede zum Wildtyp in Struktur, Größe oder zytologischem Aufbau gefunden werden. Damit besteht zumindest auf struktureller Ebene die Möglichkeit für einen regelhaften thalamischen Eingang in den desorganisierten *reeler*-Kortex.

Um die Intaktheit eines solchen Eingangs besser beurteilen zu können, wurden die *reeler*-Module erstmals auch im Hinblick auf ihre funktionellen Eigenschaften untersucht. Dafür kam ein physiologisches sensorisches Stimulationsparadigma zum Einsatz, bei dem die Aktivierung funktionaler neuronaler Netzwerke mit Hilfe eines molekularen Markers, nämlich *c-fos*, nachgewiesen wird (Bisler et al., 2002; Staiger et al., 2002; Staiger, 2006). Auch auf funktioneller Ebene fand sich in subkortikalen WTBP-Strukturen im *reeler*-Gehirn ein physiologisches Aktivierungsmuster, das keine offensichtlichen Unterschiede zur Aktivierung der Wildtyp-Module aufzeigt. Dieser Befund ist wichtig, da eine korrekte Verarbeitung sensorischer Signale in den subkortikalen Zentren als Grundlage der korrekten kortikalen Informationsverarbeitung gesehen werden muss (Ahissar et al., 2000; Diamond et al., 2008).

Um die thalamischen Efferenzen schließlich auch in ihren kortikalen Zielregionen beurteilen zu können, kam mit der vGluT2-Immunhistochemie ein Antikörper zum Einsatz, der die Boutons der Projektion aus den ventrobasisalen Thalamuskernen weitestgehend selektiv darstellt (Graziano et al., 2008). Die Verteilung der entsprechenden thalamischen Fasern konzentriert sich im Wildtyp vor allem auf die Barrels der Schicht IV Neurone, weniger ausgeprägt auch auf die Schicht V/VI Grenze und auf die Schicht I. Bis auf die deutlich sichtbare Schicht I Projektion, die vermutlich auf die Nuclei intralaminare thalami zurückzuführen ist (Graziano et al., 2008), entspricht das Projektionsmuster damit dem lemniskalen Projektionsmuster des VPM, das aus Tracingexperimenten bekannt ist (Killackey, 1973; Killackey and Leshin, 1975; Wimmer et al., 2010). Die über den ventrolateralen Anteil des VPM verschaltete extralemniskale Projektion, die im S1BF Areal präferenziell in die Barrel-

Zwischenräume projiziert, scheint in der vGluT2-Färbung anteilmäßig weniger stark ins Gewicht zu fallen (Pierret et al., 2000).

Die gefundene Verteilung vGluT2-positiver Boutons über weite Teile des *reeler*-Kortex entspricht der Verteilung der *RORB*-positiven Zellen mit molekularem Schicht IV Schicksal. Die Dichteprofile der beiden Marker ähneln sich stark. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass die thalamischen Efferenzen ihre Zielzellen mit molekularem Schicht IV Schicksal auch im desorganisierten Kortex identifizieren können. Der thalamische Eingang wäre also in der Lage, ektop gelegene Zellen zu erkennen.

Die Frage nach einem möglicherweise korrekten thalamischen Eingang in den *reeler*-Kortex lässt Rückschlüsse auf die generellen Mechanismen thalamokortikaler Zielfindung zu (Molnar et al., 1998; Inan and Crair, 2007; Molnar et al., 2012). Aus diesem Grund wurden thalamische Projektionen in den *reeler*-Kortex in zahlreichen Arbeiten intensiv beforscht. In Tracingexperimenten wurde die korrekte Etablierung thalamokortikaler Kontakte zumeist bejaht, allerdings unter der falschen Annahme, dass die Schicht IV Zellen als natives Zielkompartiment der thalamischen Efferenzen eine weitgehend umschriebene Schicht in der unteren Hälfte des *reeler*-Kortex bilden (Caviness, 1976; Steindler and Colwell, 1976; Caviness, 1982b; Caviness and Frost, 1983). Auf Grundlage der Befunde der vorliegenden Arbeit muss aber davon ausgegangen werden, dass die Schicht IV Zellen ausgedehnt über den *reeler*-Kortex verteilt sind. Die in früheren Studien beschriebenen Projektionsmuster sprechen damit eher gegen eine korrekte Etablierung thalamokortikaler Verbindungen. Dabei ist zu bedenken, dass die überwiegend verwendete Methode der anterograden Axondegeneration (Marchi and Algeri, 1885) nicht übermäßig präzise (i.e. keine Unterscheidung zwischen hindurchziehenden und endenden Axonen möglich) und technisch veraltet ist (Vercelli et al., 2000). Es darf auch nicht unerwähnt bleiben, dass die aus den Arbeiten gezogenen Schlüsse nicht in allen Fällen mit den gezeigten Abbildungen im Einklang stehen. Die abgebildeten thalamischen Projektionen wirken in einigen Fällen diffuser als sie im Text beschrieben werden. Man muss also davon ausgehen, dass das falsche Konzept der Invertierung der kortikalen Schichten im *reeler*-Gehirn (Caviness and Sidman, 1973a; Rakic and Caviness, 1995) diese Arbeiten in der Interpretation der Ergebnisse ungünstig beeinflusst hat. Eine der frühen Arbeiten zu thalamokortikalen Verbindungen im *reeler*-Kortex ist mit unseren Befunden in weiten Teilen deckungsgleich (Cragg,

1975). Unterstützung für die Theorie eines intakten thalamischen Eingangs kommt außerdem von Studien, die sich mit der frühen Etablierung thalamokortikaler Synapsen im sich entwickelnden *reeler*-Kortex beschäftigen (Molnar et al., 1998; Higashi et al., 2005). Die Sequenz der Etablierung thalamokortikaler Verbindungen verläuft im *reeler*-Kortex in weiten Teilen analog zum Wildtyp. Noch bevor ein Großteil der kortikalen Neurone überhaupt entstanden ist, erreichen thalamische Fasern den Kortex (Rakic, 1976). Nach einer kurzen Verweildauer wachsen sie im Wildtyp in die 'Subplate' ein, im *reeler*-Kortex hingegen in das entsprechende Gegenstück- die 'Superplate' (Rakic, 1976; Molnar et al., 1998). In ihren jeweiligen Kompartimenten etablieren die beiden Genotypen transiente Synapsen. Die Synapsenbildung setzt sich in beiden Genotypen im sich entwickelnden Kortex, der sogenannten 'kortikalen Platte' fort. Diese befindet sich im Wildtyp-Kortex über der Subplate, im *reeler*-Kortex hingegen unterhalb der Superplate (Molnar et al., 1998; Higashi et al., 2005).

Die molekularen Mechanismen, welche die thalamischen Fasern aus der Preplate schließlich mit den Schicht IV Neuronen in Verbindung treten lassen, sind nur unzureichend verstanden. Allerdings scheinen ein komplexes Geflecht aus attraktiven und repulsiven Faktoren sowie verschiedene Axon-Wegleitungsmoleküle daran beteiligt zu sein (Lopez-Bendito and Molnar, 2003; Inan and Crair, 2007; Erzurumlu and Gaspar, 2012). Neben Cadherinen und verschiedenen anderen, im Kortex schichtenspezifisch verteilten Molekülen (Skaliora et al., 1998; Redies, 2000; Oeschger et al., 2012) scheinen dabei vor allem Ephrine und Eph-Rezeptoren eine Rolle zu spielen, indem sie thalamische Fasern selektiv abstoßen und anziehen können (Lopez-Bendito and Molnar, 2003; Molnar et al., 2012). Dieser Mechanismus muss umso feiner gesteuert sein, sollten die ektopen Zellen mit molekularem Schicht IV Schicksal im *reeler*-Kortex tatsächlich selektiv innerviert werden. Etwaige Gradienten müssten thalamische Axone zu der richtigen Zelle und nicht bloß in das richtige zelluläre Kompartiment locken, da die Zielzellen kein solides Kompartiment bilden und weit über den Kortex verteilt sind.

Der letztendliche Beweis, dass die thalamischen Fasern im desorganisierten *reeler*-Kortex ihre nativen Zielzellen finden, steht allerdings aus. Virale Tracingexperimente erscheinen geeignet, die Frage abschließend zu klären. Bei dieser Art von Experimenten wäre eine Identifikation von Prä- und Postsynapse, zum Beispiel durch das Einbringen fluoreszenzmarkierter prä- und postsynaptischer Proteine mittels

viraler Vektoren möglich (Grinevich et al., 2005; Meyer et al., 2010). Der definitive Nachweis der Synapsen könnte mittels korrelierter Licht- und Elektronenmikroskopie erbracht werden (da Costa and Martin, 2011), ihre Funktionsfähigkeit zum Beispiel mit optogenetischen Methoden und der slice-Elektrophysiologie (Cruikshank et al., 2010).

#### 4.2 INVERTIERUNG VERSUS CHAOS: EFFEKTE DES NEURONALEN MIGRATIONSDEFEKTES AUF DIE ZELLULÄRE ARCHITEKTONIK DES NEOKORTEX DER REELER-MAUS

Das von 1973 stammende Modell der 'outside-in' Organisation, welches von einer Invertierung der kortikalen Schichtung ausgeht (Caviness and Sidman, 1973a), ist weiterhin das gängige Konzept zur Beschreibung des kortikalen *reeler*-Defektes in der aktuellen Literatur (cf. Britto et al., 2011; Hertel and Redies, 2011; Sekine et al., 2011). Das Modell hat den Reiz, dass es den Laminierungsdefekt scheinbar einfach und eindeutig beschreiben kann und somit Rückschlüsse auf Aufgabe und Funktion des reelin-Proteins zulässt (Caviness and Sidman, 1973a; D'Arcangelo, 2005; Cooper, 2008; Hammond et al., 2010).

Die Befunde zahlreicher späterer Studien im *reeler*-Kortex sind weitgehend inkompatibel mit einer einfachen 'outside-in' Organisation, dennoch wurde eine Einpassung in das bestehende Modell versucht. So wurde etwa die über die gesamte Breite des Kortex verteilte Lage kortikospinaler Projektionsneurone mit einer zusätzlichen Aufspaltung von Schicht V und VI Neuronen begründet, von denen jeweils nur eine Teilpopulation an der Invertierung beteiligt sei (Hoffarth et al., 1995). In einem anderen Ansatz wird die weitgehend diffuse Anordnung normalerweise laminiertes Zellpopulation (z. B. BrdU-positive oder Tbr1-positive Zellen) zwar mit einer signifikanten Durchmischung von früh und spät generierten Zellen beschrieben, die jedoch nur ein Zusatzbefund zu einer prinzipiellen Invertierung des Kortex darstellen soll (Polleux et al., 1998; Hevner et al., 2003).

Die 'outside-in' Theorie hat also bis heute einen enormen Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse von Arbeiten am *reeler*-Gehirn. Sie beruht in weiten Teilen auf dem 'birth-dating' Verfahren mit BrdU oder H3-Thymidin, bei dem der Entstehungszeitpunkt einer Zelle mit ihrer laminären Position korreliert wird (Sidman et al., 1959; Duque and Rakic, 2011).

Die Neurone des murinen Kortex entstehen innerhalb von 6 Tagen in 11 Zellzyklen, die über den Kortex verteilt von rostralateral nach ventromedial zeitlich versetzt ablaufen (Takahashi et al., 1995; Miyama et al., 1997). Der jeweilige Zellzyklus beeinflusst die spätere laminäre Position eines Neurons dabei aber deutlich entscheidender als der genaue Entstehungszeitpunkt. Im Extremfall können selbst Zellen, die in der gleichen Stunde entstanden sind, ihre Migration in völlig unterschiedlichen kortikalen Schichten beenden. Beispielsweise beenden Zellen die

am Embryonaltag 14 entstanden sind ihre Migration, abhängig von ihrer rostrokaudalen und mediolateralen Position, entweder in Schicht IV oder in Schicht V oder gar VI (Takahashi et al., 1999). Auch in Doppelmarkierungen von BrdU mit verschiedenen molekularen Marker zeigt sich, dass die Schichtenzugehörigkeit einer Zelle eher von ihrem molekularen Phänotyp als vom ihrem Entstehungszeitpunkt bestimmt wird (Hevner et al., 2003). Die molekularen Schichtenschicksalsmarker, die in der vorliegenden Studie zum Einsatz kamen sind also von ihrem Ansatz her das spezifischere Werkzeug zur Untersuchung des kortikalen *reeler*-Defektes und geeignet, die mit Hilfe des birth-datings gewonnenen Befund zu überprüfen und zu hinterfragen.

Die Spezifität der verwendeten Schichtenschicksalsmarker wurde für die vorliegende Arbeit erstmals überprüft. Dazu wurde die Lage der für die verschiedenen Marker positiven Zellen innerhalb einer rekonstruierten Wildtyp-Kolumne bestimmt, bei der die Schichteneinteilung anhand zytoarchitektonischer Kriterien vorgenommen wurde. Einundsiebzig Prozent der *Rgs8*-positiven Zellen, 78 % der *RORB*-positiven- und 87 % der *Er81*-positiven Zellen befinden sich demnach in ihrem nativen Kompartiment. Diese Werte enttäuschen die in der Literatur hervorgerufenen Erwartungen einer absoluten Spezifität dieser Marker (Hevner et al., 2003; Lein et al., 2007). Bei genauerer Betrachtung von Abbildung 12C muss aber kritisch hinterfragt werden, ob sich kortikale Schichten überhaupt scharf abgrenzen lassen. Obwohl die einzelnen Maxima der Verteilungskurven deutlich voneinander abgrenzbar sind, gehen die Zellen der einzelnen Schichten an ihren Rändern auf Strecken von bis zu 300 µm fließend ineinander über. Damit kommt die für den *reeler*-Kortex beschriebene Vermischung von Zellen mit unterschiedlichen Schichtenschicksalen bereits im Wildtyp vor, allerdings im Sinne eines kontinuierlichen Überganges der Schichten ineinander. Diese Sichtweise ist eine wichtige Ergänzung zum klassischen Konzept der 6-Schichtigkeit des Neokortex (Jones and Powell, 1973; Lund, 1988; Mc Connell, 1989).

Abbildung 12C macht aber auch deutlich, dass sich mit Hilfe der molekularen Marker eine Invertierung der kortikalen Schichten im *reeler*-Hirn eindeutig nachweisen lassen müsste, und zwar im Sinne einer umgekehrten Anordnung der gefundenen Kurvenmaxima, mit *Er81*-positiven Zellen in der Nähe der Pia und *Rgs8*-positiven Zellen oberhalb der weißen Substanz. Dieser Befund liegt im *reeler*-Kortex allerdings nicht vor (Abb. 12D). Stattdessen erscheinen insbesondere die Schicht II/III

äquivalenten (*Rgs8*-positiven) Zellen vollkommen willkürlich über die gesamte Dicke des Kortex verteilt. Auch die Schicht IV äquivalenten (*RORB*-positiven) Zellen zeigen nur ein sehr grobes vertikales Verteilungsmuster, indem sie insbesondere den Bereich unterhalb der Pia und in geringerem Umfang auch oberhalb der weißen Substanz meiden, dabei aber immer noch so weit über den Kortex verteilt sind, dass der Begriff 'Schicht' unangebracht erscheint. Die Schicht V äquivalenten (*Er81*-positiven) Zellen sind ebenfalls in allen Tiefen des Kortex anzutreffen, bilden aber in gewisser Weise das Gegenstück der Verteilung der *RORB*-positiven Zellen, indem sie unterhalb der Pia und oberhalb der weißen Substanz etwas zahlreicher vorkommen.

Die dargestellten Befunde widersprechen der gängigen Sichtweise der Architektur des *reeler*-Kortex fundamental. Die gefundene Verteilung der Zellen lässt sich aber dennoch mit Befunden aus der bestehenden Literatur korrelieren. Die Population der *Er81*-positiven Zellen umfasst ganz überwiegend subkortikale Projektionsneurone (Yoneshima et al., 2006). Deren Anordnung entspricht der Anordnung subkortikaler (kortikospinaler) Projektionsneurone im *reeler*-Kortex, die mittels retrogradem Tracing visualisiert wurden (Terashima et al., 1983; Hoffarth et al., 1995; Polleux et al., 1998). Indirekt ist auch die Position der *RORB*-positiven Zellen aus der Literatur vorhersagbar. Ihre Position ist deckungsgleich mit den stark CO-aktiven Areale und den Projektionsfeldern lemniskaler thalamischer Boutons. Sowohl die breite Verteilung der CO-aktiven Areale als auch die großflächige Verteilung thalamischer Axone konnte für den *reeler*-Kortex bereits gezeigt werden (Cragg, 1975; Higashi et al., 2005; Strazielle et al., 2006). Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich also eher bezüglich ihrer Interpretation als in ihrer generellen Aussage von der bisherigen Literatur.

Die von uns erhobenen Befunde zur Organisation des Neokortex im *reeler*-Gehirn (Wagener et al., 2010) wurden durch methodisch ähnliche Studien bestätigt (Dekimoto et al., 2010; Boyle et al., 2011).

### 4.3 FUNKTIONELLE MODULE IM DESORGANISIERTEN KORTEKX

Die Frage nach dem Vorhandensein funktioneller Module im desorganisierten Kortex ist vor allem deswegen interessant, weil sie Rückschlüsse auf die generelle Notwendigkeit einer kortikalen Laminierung für die Ausbildung solcher Module zulässt. Diese kann einerseits als notwendige Grundlage für eine effektive Verschaltung der Neurone untereinander betrachtet werden (Kaas, 1997), könnte im drastischsten Fall jedoch auch ein funktionsloses Überbleibsel der Phylogenese darstellen (Purves et al., 1992). Damit gibt die Suche nach funktionellen Modulen im desorganisierten Kortex letztlich Antwort darauf, ob sich kortikale Zellen außerhalb ihrer nativen Schicht als das sie normalerweise umgebende Milieu überhaupt funktionsfähig ausbilden und zu funktionellen Netzwerken zusammenschließen können.

Die Existenz von Barrels als strukturelle und auch funktionelle Module des primären somatosensorischen Areals wird für den *reeler*-Kortex in der Literatur kontrovers diskutiert (Cragg, 1975; Caviness et al., 1976; Welt and Steindler, 1977; Strazielle et al., 2006). Auf Basis der exakten Analyse des strukturellen Defektes im *reeler*-Kortex kann erstmals auch die Morphologie grob fehlorganisierter Module schlüssig interpretiert werden. Vor diesem Hintergrund kann die Existenz funktioneller Module für den Barrel-Kortex der *reeler*-Maus bejaht werden. Der morphologische Unterschied zur Wildtyp-Struktur fällt allerdings drastisch aus. Anstelle der Barrel-assoziierten Kolumne findet sich ein kolumnär organisiertes Modul, das von mehreren Aggregaten von Zellen mit molekularem Schicht IV Schicksal durchzogen wird. Die verschiedenen Aggregate entsprechen zusammengenommen einem Barrel und können als Barrelteiläquivalente betrachtet werden. Die Zusammenlagerung der *RORB*-positiven Zellen steht vermutlich mit der Funktion von *RORB* selbst im Zusammenhang, für das nachgewiesen werden konnte, dass es auch bei ektopter transgener Expression zur Zusammenlagerung von Zellen im sich entwickelnden Kortex führt (Jabaudon et al., 2011). Außer der Zusammenlagerung der Barrelteiläquivalente hat die Kolumne keine gliedernden Elemente. Die resultierende Kolumne ist also keinesfalls 'Barrel bezogen', weshalb sie einfach als Barrelteiläquivalente-enthaltende Kolumne bezeichnet werden sollte.

Trotz der massiv gestörten laminären Organisation des *reeler*-Neokortex (im Folgenden als vertikale Organisation bezeichnet), sind die beschriebenen *reeler*-Module in somatotopen Karten topographisch korrekt zueinander positioniert (im

Folgenden als horizontale Organisation bezeichnet). Dieser Befund könnte die Wichtigkeit zentraler Karten der sensorischen Peripherie im Sinne eines guten biologischen Designs unterstreichen (Kaas, 1997). Die räumliche Nähe stark verschalteter Areale könnte ein besonders ökonomisches Verschaltungsprinzip ermöglichen (Durbin and Mitchison, 1990; VanEssen, 1997). Diese Idee ist umso interessanter, da eine solche ökonomische Verschaltung in der vertikalen Orientierung durch die Abwesenheit der Schichten im *reeler*-Kortex aufgehoben sein könnte. Das *reeler*-Barrelfield nimmt in Bezug auf die Gesamtgröße des Kortex relativ mehr Raum ein als das gleiche Areal im Wildtyp-Kortex. Dieser Größenzuwachs ist nur zu Ungunsten anderer Kortexareale möglich. Die erhaltene horizontale Organisation im *reeler*-Barrelfield könnte also gerade noch ausreichen, um eine so effektive Verschaltung zu gewährleisten, dass die Funktion des Areals nicht wesentlich eingeschränkt ist. Nicht in Karten organisierte Kortexareale könnten durch den zusätzlichen Wegfall der vertikalen Organisation hingegen so ineffektiv verschaltet werden, dass sie in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Im Zuge allgemeiner Plastizitätsmechanismen könnte es zur Schrumpfung der betroffenen Areale kommen (Fox, 2002). Überprüfen ließe sich die Theorie durch einen Größenvergleich der unterschiedlichen Kortexareale vor und nach der kritischen Periode, da eventuell betroffene Areale erst nach Fehlverschaltung mit nachfolgender Funktionseinschränkung relativ an Größe verlieren sollten (Hensch, 2005; Erzurumlu and Gaspar, 2012).

Die morphologisch identifizierten *reeler*-Module zeigen auf funktioneller Ebene eine erstaunliche Ähnlichkeit zu den Wildtyp-Modulen. Die Aktivierung neuronaler Netzwerke in Folge physiologischer sensorischer Stimulation erfolgt in der Wildtyp- und *reeler*-Kolumne in quantitativ gleicher Stärke.

Das basale Expressionsniveau von *c-fos* ist äußerst gering (Sagar et al., 1988; Staiger et al., 2000), dessen physiologische Expression setzt außerdem die Neuartigkeit und damit die physiologische Bedeutsamkeit eines Stimulus voraus (Montag-Sallaz et al., 1999). Man kann also davon ausgehen, dass es sich auch bei der Aktivierung in der *reeler*-Kolumne um bedeutsame neuronale Aktivität im Sinne eines spezifisch aktivierten Netzwerkes handelt (Staiger, 2006).

Die Analyse der an der Aktivierung der *reeler*-Kolumne beteiligte 'Schichtenkompartimente' zeigt jedoch auch Unterschiede zwischen Wildtyp- und

*reeler*-Modulen auf. Während das *RORB* Kompartiment in beiden Genotypen eine gleichartige Aktivierung erfährt, werden supra- und infragranulär in der *reeler*-Kolumne signifikant weniger Zellen aktiviert. Schicht IV Zellen können als primäres Zielkompartiment thalamischer Fasern betrachtet werden (Killackey, 1973; Killackey and Leshin, 1975; Wimmer et al., 2010). Das *RORB* Kompartiment wird demnach vermutlich direkt durch den thalamischen Eingang aktiviert, während *Rgs8*- und *Er81*-positive Zellen als Äquivalente der supra- und infragranulären Kompartimente erst durch intrakortikale Signalverarbeitung an der Aktivierung beteiligt werden könnten (Schubert et al., 2007; Feldmeyer et al., 2012). Die geringere Aktivierung könnte also auf intrakolumnäre Verschaltungsstörungen zurückzuführen sein. Diese Theorie bedarf allerdings experimenteller Überprüfung, z.B. durch elektrophysiologische Paarableitungen mit anschließender Rekonstruktion der Zellen (Feldmeyer et al., 2006).

Bei allen Überlegungen zu möglicherweise normalen physiologischen Aktivierungsvorgängen in der *reeler*-Kolumne darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die *Reln*-Mutation auch einen ausgeprägten motorischen Phänotyp bedingt (Falconer, 1951; Goffinet, 1984a). Damit ist unklar ob *reeler*-Mäuse überhaupt in der Lage sind komplexe gemischt sensomotorische Aufgaben, wie etwa 'gap-crossing' oder Oberflächendiskrimination zu leisten und ob der äußerst komplex gesteuerte Mechanismus des whisking im *reeler*-Tier überhaupt normal stattfinden kann.

Das in der vorliegenden Studie beobachtete Verhalten der Tiere in der angereicherten Umgebung deutet zumindest auf ein normales Explorations- und whisking-Verhalten hin. Allerdings bedarf der endgültige Nachweis eines nicht pathologischen whisking im *reeler*-Tier technisch aufwendigerer Methoden, wie etwa der Hochgeschwindigkeits-Videographie (Towal and Hartmann, 2006). Darüber hinaus ist die *reeler*-Maus verhaltensphysiologisch bisher noch unzureichend charakterisiert (Salinger et al., 2003).

Unabhängig von der letztlich Güte des stattfindenden whisking-Verhaltens birgt die dargestellte Aktivierung der *reeler*-Kolumne jedoch eine wichtige Erkenntnis: Die Ausbildung und Aktivierung umschriebener neuronaler Netzwerke ist im desorganisierten Kortex möglich. Damit ist die Potenz einer Zelle zur Ausbildung von- und Integration in komplexe neuronale Netzwerke nicht vom umgebenden Milieu

einer Zelle abhängig sondern eher von ihrem molekularen Phänotyp, der wiederum im engen Zusammenhang mit dem Zellzyklus zum Entstehungszeitpunkt der Zelle zu stehen scheint (Miyama et al., 1997; Takahashi et al., 1999).

Inwieweit die gezeigte Aktivierung der *reeler*-Kolumne letztlich physiologische Aktivität, im Sinne der physiologischen Verarbeitung elektrischer Impulse darstellt, sollte in Zukunft mittels *in vitro* und *in vivo* elektrophysiologischer Verfahren überprüft werden.

#### 4.4 DIE ROLLE VON REELIN IN DER KORTEXENTWICKLUNG UNTER DER ANNAHME EINER VOLLSTÄNDIGEN NICHTAUSBILDUNG KORTIKALER SCHICHTEN

Der *reeler*-Phänotyp stellt auch einen interessanten Ansatz dar, um die Prozesse der regelhaften Kortexentwicklung zu verstehen. Entsprechend intensiv wurde die Funktion des reelin-Proteins beforscht (cf. Frotscher, 1997; Cooper, 2008; Frotscher and Zhao, 2010). Die Ergebnisse zeigen, dass reelin auf komplexe Art und in teilweise divergenten Funktionen die Migration neu gebildeter Neurone beeinflusst.

Die gängigen Theorien zur Rolle von reelin bei der Kortexentwicklung waren in der Lage, den Phänotyp im *reeler*-Kortex schlüssig zu erklären. Sie gingen dabei allerdings fälschlicherweise von einer Invertierung der kortikalen Schichten im *reeler*-Gehirn aus. Vor dem Hintergrund des eindeutig anders gearteten Laminierungsdefektes müssen damit zentrale Aspekte der gängigen Modelle hinterfragt und überdacht werden.

##### 4.4.1 Das 'Ablöse und Stopp-Modell'

Eine der frühen Theorien zur reelin-Funktion besagt, dass das reelin-Protein als Ablöse- und Stoppsignal wirkt (Frotscher, 1997; Dulabon et al., 2000). Der Begriff des Ablösesignals bezieht sich dabei auf den Migrationsmodus der Lokomotion, bei der die migrierenden Neurone sich via Integrinen mit radialen Gliafortsätzen verbinden und diese als Schiene für die Migration verwenden (Nadarajah et al., 2001; Elias et al., 2007). Reelin führt zu Ablösung von der Gliafschiene (Dulabon et al., 2000; Sanada et al., 2004) und stoppt die Neurone der Theorie zufolge unterhalb der reelinreichen Marginalzone (D'Arcangelo et al., 1995). Im *reeler*-Kortex bleiben die Ablösung von der Gliafschiene und das Stoppsignal entsprechend aus. Das fehlende Stoppsignal führt zum Einwandern der migrierenden Neurone in die normalerweise (bis auf die Cajal-Retzius Zellen) zellfreie Marginalzone. Damit soll es keinen Raum mehr geben, in den nachfolgende Neurone einwandern könnten (Frotscher, 1997). Außerdem lösen sich migrierende Neurone nicht von den Gliafasern ab, was letztlich zu einem 'Stau' entlang der voll besetzten Gliafortsätze führen soll (Pinto-Lord et al., 1982). Beide Prozesse zusammen wären geeignet, die kortikale Inversion zu bedingen. Neu generierte Neuronenpopulationen haben weder einen zellarmen

Zielkorridor, in dem sie ihre Migration beenden könnten, noch sind sie in der Lage, entlang der vollbesetzten Gliafortsätze früher generierte Zellschichten zu durchwandern und stauen sich infolgedessen unter diesen auf.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte weitgehend willkürliche Verteilung von Zellen mit unterschiedlichen molekularen Schichtenzugehörigkeiten im *reeler*-Kortex lässt Teile der Theorie fraglich erscheinen. Die spät geborenen *Rgs8* Zellen mit molekularer Schicht II/III Zugehörigkeit finden sich durchaus auch direkt unterhalb der Pia, also in dem Raum, in dem es nach dem 'Ablöse und Stopp-Modell' gar keinen Platz für spät entstandene Neurone geben sollte. Außerdem finden sich in sämtlichen Tiefen des Kortex jeweils Zellen mit allen molekularen Schichtenzugehörigkeiten. Damit ist die regelhafte Migration zwar gestört, allerdings keinesfalls im Sinne einer generellen Unfähigkeit, früher generierte Zellschichten zu durchdringen. Die Migration über weite Strecken der kortikalen Ausdehnung erfordert auch im *reeler*-Kortex aller Voraussicht nach Lokomotion: So müssen die Gliafortsätze zumindest teilweise frei von älteren Vorläuferneuronen sein, die damit auch reelinunabhängig von den Glia ablösbar sein müssen.

Für das Ablöse und Stopp-Modell bedeutet das, dass reelin allenfalls eine katalytische Rolle beim Ablösen von den radialen Gliafortsätzen haben kann. Die Funktion von reelin als Stoppsignal an der Marginalzone erscheint aufgrund des großen Zellreichtums unterhalb der Pia im *reeler*-Gehirn einleuchtend. Allerdings drängt sich die Frage auf, wie es bei den vielen spät entstandenen Zellen, die sich im unteren Teil des *reeler*-Kortex befinden, reelinunabhängig zum frühen Migrationsarrest gekommen ist, beziehungsweise wie in diesem Fall das Stoppsignal vermittelt wurde.

Es gibt jedoch auch unabhängig von der vorliegenden Studie zahlreiche Befunde, die das Ablöse und Stopp-Modell zumindest als zu wenig differenziert erscheinen lassen. Grund dafür ist, dass reelin ganz offensichtlich unterschiedliche Aufgaben zu unterschiedlichen Zeiten der Kortexentwicklung zukommen. In der frühen Kortikogenese ist es dafür verantwortlich, dass neu generierte Neurone den Vorläufer des Kortex, die sogenannte 'Preplate' durchdringen können und sie dabei in Marginalzone und 'Subplate' unterteilen (Abb. 2B). Im embryonalen *reeler*-Gehirn findet dieser Prozess nicht statt, stattdessen sammeln sich die Zellen der 'Cortical Plate' unterhalb der 'Preplate' an, die damit zur 'Superplate' wird (Abb.2D; Sheppard

and Pearlman, 1997). Reelin wirkt zu dieser frühen Phase der Kortexentwicklung also ganz offensichtlich nicht als Stoppsignal, sondern permissiv. Belegt wird dieser Befund auch durch die Tatsache, dass sich der dargestellte Defekt im *reeler*-Hirn durch die ektopische transgene Expression von reelin verhindern lässt (Magdaleno et al., 2002), und dass die externe Zugabe von reelin im Zellkulturexperiment mit reelindefizienten Zellen ebenfalls den Phänotyp rettet (Jossin et al., 2004). In beiden Experimenten kommt es zwar zur regelhaften Aufspaltung der Preplate, der Laminierungsdefekt bleibt aber interessanterweise bestehen.

Die migrierenden Neurone spalten die Preplate nicht nach vorheriger Lokomotion auf, sondern wandern durch somale Translokation ein. Bei diesem Prozess senden die Zellen einen Führungsfortsatz in die Preplate, der im Anschluss den Zellkörper regelrecht hinterherzieht (Miyama et al., 1997; Nadarajah et al., 2001). In *Dab1* defizienten *Scrambler* Mäusen ist bereits die initiale Positionierung des Führungsfortsatzes gestört. Er endet unterhalb der Preplate und verändert während der Migration seine Position (Sanada et al., 2004). Reelin könnte also die frühe neuronale Migration beeinflussen, indem es den Führungsfortsatz in die Preplate leitet und ihn dort verankert (Frotscher, 2010).

#### 4.4.2 Das 'Ablöse und Start-Modell'

Der Wirkmechanismus von reelin lässt sich also nicht auf ein einfaches Stopp-Signal reduzieren. Entsprechend komplexer ist das 'Ablöse und Start-Modell' (Cooper, 2008; Frotscher and Zhao, 2010). Es trägt der Tatsache Rechnung, dass die somale Translokation reelinabhängig, die Glia abhängige Lokomotion hingegen von anderen Faktoren initiiert wird (Nadarajah et al., 2001). Beide Prozesse finden jedoch zielgerichtet in Richtung Marginalzone statt. Aufgrund seiner räumlichen und zeitlichen Expression ist reelin ein guter Kandidat, diese Direktionalität herzustellen (Frotscher and Zhao, 2010).

Die oben dargestellte Aufspaltung der Preplate in der frühen Kortikogenese lässt sich durch den stimulierenden Einfluss von reelin auf die mittels somaler Translokation migrierenden späteren Schicht VI Neurone erklären.

In späteren Phasen der Entwicklung wird der Mechanismus komplizierter. Die Neurone beginnen die Migration mittels Lokomotion, vermutlich unabhängig von reelin. Das Ablösen von den radialen Fasern verläuft dann aber, wie im 'Ablöse und

Stopp-Modell' geschildert, reelinabhängig, und zwar in dem Moment, in dem der Führungsfortsatz die Marginalzone erreicht (Dulabon et al., 2000; Sanada et al., 2004). Es folgt jedoch kein Stoppen der Migration, sondern im Gegenteil ein reelingesteuerter Migrationsstart, bei dem erneut mittels somaler Translokation der Zellkörper dem verankerten Führungsfortsatz folgt und dabei reelinabhängig die früher generierten Zellschichten durchwandert (Nadarajah et al., 2001; Borrell et al., 2006). Der Zellkörper wird erst an der Grenze zur reelinreichen Marginalzone gestoppt. Aus der Tatsache, dass eine Zerstörung der reelin produzierenden Cajal Retzius Zellen migrierende Neurone in die Marginalzone einwandern lässt, kann man schließen, dass dieser Migrationsarrest tatsächlich reelinabhängig funktioniert (Super et al., 2000).

Die Stabilisierung des Zytoskeletts scheint ein wichtiger Mechanismus zu sein, über den reelin Einfluss auf die migrierenden Neurone nimmt. Über die Phosphorylierung von n-cofilin wird der Führungsfortsatz in der Marginalzone verankert, was einerseits ein Nachfolgen des Zellkörpers ermöglicht, andererseits der Migration eine Richtung vorgibt (Chai et al., 2009).

Das dargestellte Modell könnte den 'outside-in' Phänotyp des *reeler*-Kortex erklären, wurde aber in zahlreichen Aspekten auch auf der Basis dieses fälschlicherweise angenommenen Phänotyp erhoben. Auf Grundlage der Nicht-Inversion der kortikalen Schichten bedarf es also auch bei diesem Modell einer kritischen Hinterfragung einiger postulierter Mechanismen.

Wie im Ablöse und Stopp-Modell wird die Inversion der kortikalen Schichten unter anderem mit einem Stau entlang der Gliafortsätze erklärt, allerdings mit dem Zusatz, dass die Durchdringung früher generierter Zellschichten insbesondere durch die reelinabhängige somale Translokation zustande käme (Frotscher and Zhao, 2010). Die nahezu homogene Verteilung *Rgs8*-positiver Zellen widerspricht aber auch dieser Sichtweise. Auch im *reeler*-Kortex sind spät geborene Zellen in der Lage, über weite Strecken zu migrieren und dabei ältere Zellschichten zu durchdringen, beides Tatsachen die in den bisherigen Modellen zur reelin Funktion nicht berücksichtigt werden. Damit stellt sich die Frage mit welchem Mechanismus diese Zellen migrieren (Nadarajah et al., 2001). Die Lokomotion soll schließlich aufgrund der Nicht-Ablösung älterer Zellen von den Gliafortsätzen blockiert sein (Pinto-Lord et al., 1982; Sanada et al., 2004), die somale Translokation hingegen nur reelinabhängig erfolgen (Nadarajah et al., 2001; Frotscher and Zhao, 2010). Da die Zellen aber entsprechend

der vorliegenden Befunde trotzdem zur Migration im Stande sind, kann *reelin* zumindest für einen, wenn nicht gar für beide Migrationsmechanismen keine unbedingte Notwendigkeit darstellen.

*Reelin* scheint eher eine zentrale Rolle bei der Vorgabe einer Richtung sämtlicher neuronaler Migrationsprozesse zu spielen (Chai et al., 2009; Frotscher and Zhao, 2010; Jossin, 2011). Diese Sichtweise ist geeignet, die Befunde der vorliegenden Studie zu interpretieren. Migration findet im *reeler*-Kortex generell und auch über weite Strecken statt, allerdings ohne eine vorherrschende Migrationsrichtung. Das könnte auch die gestörte Polarität der Zellen des *reeler*-Kortex erklären. Die meisten Zellen erscheinen beliebig ausgerichtet, bis hin zur vollständigen Invertierung von Pyramidenzellen (Landrieu and Goffinet, 1981). Diese gestörte Zellorientierung könnte den Endpunkt einer fehlorientierten Migration darstellen. Die Zellen könnten also in nahezu beliebige Richtung migrieren, und diese Migration dann nach zu kurzen, normal langen oder auch überlangen Migrationswegen beenden. Der Endpunkt wäre eine weitgehend homogene Verteilung von Zellen mit unterschiedlichen molekularen Schichtenzugehörigkeiten, bei der eine verhältnismäßig lange Migration durchaus auch in den unteren kortikalen Anteilen enden könnte. Klären ließe sich diese Theorie durch Zeitrafferaufnahmen (Sanada et al., 2004) migrierender *reeler*-Neurone, in denen neben den Migrationsmechanismen vor allem die Migrationsrichtung und die horizontale Abweichung während der Migration untersucht werden müsste.

Die weitgehend beliebige Lage von Zellen mit unterschiedlichen molekularen Schichtenschicksalen im *reeler*-Kortex könnte also vor allem durch den Verlust einer vorgegebenen Migrationsrichtung erklärbar sein, und weniger mit dem verpassten Ausbleiben eines Start-, Stopp- oder Ablösesignals. Dabei soll die grundsätzliche Beeinflussung von Zellen durch *reelin* anhand dieser Mechanismen keinesfalls bestritten, sondern deren Wichtigkeit allenfalls relativiert werden. Diese Sichtweise soll anregen, durch neue Hypothesen zu einem besseren Verständnis der Kortexentwicklung unter der Beteiligung von *reelin* zu kommen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Nagetiere erkunden ihre Umgebung mit Hilfe der Vibrissen auf ihrer Schnauze. Die dabei generierte sensorische Information wird im 'Whisker-to-Barrel Pathway' (WTBP) modifiziert und schließlich dem Neokortex zur bewussten Wahrnehmung zugeleitet. Der WTBP enthält multiple Karten die topographisch der sensorischen Rezeptorperipherie entsprechen, damit ist er somatotop organisiert. Die Karten bestehen aus individuellen funktionellen Modulen. Die Notwendigkeit einer intakten kortikalen Laminierung für die Ausbildung komplexer funktioneller Module war bisher ungeklärt.

Für die vorliegende Arbeit wurde der WTBP der *reeler*-Maus untersucht. Für diese homozygot *Reln*-defiziente Mausmutante ist eine ausgeprägte Desorganisation der kortikalen Schichtung bekannt, die in der Regel als Invertierung der Schichten II bis VI beschrieben wird. Mit fluoreszenten Nissl- und Cytochromoxidasefärbungen sowie immunhistochemischen Methoden und der *in situ*-Hybridisierung konnten in den verschiedenen Anteilen des WTBP umschriebene Module nachgewiesen werden. Subkortikal entsprechen diese den Wildtyp-Strukturen. Im primären somatosensorischen Kortex konnten ebenfalls äquivalente kolumnär organisierte Module identifiziert werden, diese *reeler*-Kolumnen unterscheiden sich strukturell aber massiv von den klar gegliederten sogenannten 'Barrel' bezogenen Wildtyp-Kolumnen.

Mit Hilfe eines molekularen Markers für aktivierte neuronale Netzwerke (*c-fos*) konnte für sämtliche der dargestellten strukturellen Module ihre natürliche funktionelle Aktivierbarkeit in Folge sensorischer Stimulation nachgewiesen werden. Damit können auch im desorganisierten Kortex umschriebene neuronale Netzwerke gezielt aktiviert werden. Sowohl das beschriebene Aktivierungsmuster, als auch die Analyse präsynaptischer thalamischer Boutons deuten darauf hin, dass die im *reeler*-Kortex ektopt gelegenen Schicht IV Zellen (die das native Zielkompartiment thalamischer Fasern darstellen) einen intakten thalamischen Eingang erhalten, während die intrakortikale Verschaltung bis zu einem gewissen Grad gestört zu sein scheint.

Mit Hilfe molekularer Schichtenschicksalsmarker wurde auch der kortikale Laminierungsdefekt im *reeler*-Kortex neu evaluiert. Dieser stellte sich unerwartet stark ausgeprägt dar. Der aufgezeigte Defekt muss eher als vollständige Desorganisation der kortikalen Schichtung, denn als Invertierung beschrieben werden.



## 6 GLOSSAR

Abkürzung	Bedeutung
apoER2	Apolipoprotein-E Rezeptor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BrdU	Bromdesoxyuridin
c	Kaudal
c-fos	FBJ osteosarcoma oncogene-Protein
CNPase	Cyclische Nukleotid-Phosphodiesterase
CO	Cytochromoxidase
cp	Kortikale Platte, bzw. [engl.] cortical plate
CTP	Cytidintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
Dab1	Adapterprotein Disabled 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, bzw. [engl.] deoxyribonucleic acid
<i>Er81/ Etv1</i>	Gen: Ets variant gene 1
<i>Fos</i>	Gen: FBJ osteosarcoma oncogene
g	Granuläre Zellen, bzw. [engl.] granule cells
GFAP	Saures Gliafaserprotein, bzw. [engl.] glial fibrillary acidic protein
GR	Granuläres Kompartiment (kortikale Schicht IV)
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HB	Hybridisierungspuffer
HC	Hippocampus
IEGs	Unmittelbare / frühe Gene, bzw. [engl.] immediate early genes
IG	Infragranuläres Kompartiment (kortikale Schichten V-VI)
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
iz	Intermediärzone, bzw. [engl.] intermediate zone
Kb	Kilobasen
LB	LB-Medium, bzw. [engl.] lysogeny broth
LDVL	Nucleus laterodorsalis thalami (ventrolateraler Anteil)
lp	Große Pyramidenzellen, bzw. [engl.] large pyramidal cells
LRT	Nucleus reticularis lateralis medullae oblongatae
M	Molarität
M1/ M2	Primärer/Sekundärer Motorkortex,
Mo5	Nucleus motorius nervi trigemini
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, bzw. [engl.] messenger ribonucleic acid
msp	Mittlere bis kleine Pyramidenzellen, bzw. [engl.] medium-to-small pyramidal cells
mz	Marginalzone, bzw. [engl.] marginal zone
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium

<b>Ncl</b>	Nucleus (Kern)
<b>Not I</b>	Restriktionsenzym (Typ II aus <i>Nocardia otitidis-cavarium</i> )
<b>PB</b>	Phosphatpuffer
<b>PBS</b>	Phosphatpuffer mit NaCl
<b>PBST</b>	Phosphatpuffer mit NaCl und Triton X100
<b>PCRt</b>	Nucleus reticularis parvocellularis
<b>pm</b>	Polymorphe Zellen, bzw. [engl.] polymorphic cells
<b>POm</b>	Nucleus posterior (pars medialis)
<b>ppz</b>	Vorplatte, bzw. [engl.] preplate (premordial plexiform zone)
<b>Pr5</b>	Nucleus principalis nervi trigemini
<b>Pr5DM/ Pr5VL</b>	Pr5 dorsomedialer Anteil / ventrolateraler Anteil
<b><i>Reln</i></b>	Gen: Reelin
<b><i>Rgs8</i></b>	Gen: Regulator of G-protein signaling 8
<b><i>rl-/-</i></b>	Homozygote <i>Reln</i> Mutante (= <i>reeler</i> -Maus)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure, bzw. [engl.] ribonucleic acid
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b><i>RORB</i></b>	RAR-related orphan receptor beta
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute, bzw. [engl.] revolutions per minute
<b>S1BF</b>	prim. somatosensorisches 'Barrelfield' ([dt.] Tönnchenfeld)
<b>S1Tr/ HL/ Sh</b>	Primärer somatosensorischer Kortex Rumpf ([engl.] trunk)/ Hinterbein ([engl.] hindlimb)/ Schulter ([engl.] shoulder)
<b>S2</b>	Sekundärer somatosensorischer Kortex
<b>s5</b>	Sensorische Wurzel des Nervus trigeminalis
<b>Sal I</b>	Restriktionsenzym (aus <i>Streptomyces albus</i> G)
<b>sb</b>	Unterplatte, bzw. [engl.] subplate
<b>sp</b>	Überplatte, bzw. [engl.] superplate
<b>sp5</b>	Tractus spinalis nervi trigemini
<b>SP5I</b>	Nucleus spinalis nervi trigemini (pars interpolaris)
<b>Sp6 Polymerase</b>	RNA-Polymerase aus <i>Salmonella typhimurium</i> LT2Z
<b>SR</b>	Supragranuläres Kompartiment (kortikale Schichten I-II/II)
<b>SSC</b>	Standard Saline Citratpuffer
<b>str</b>	Superiore thalamische Strahlung, bzw. [engl.] superior thalamic radiation
<b>T3 Polymerase</b>	RNA-Polymerase aus T3 Bakteriophagen
<b>T7 Polymerase</b>	RNA-Polymerase aus T7 Bakteriophagen
<b>TB</b>	Tris-Puffer oder Tris(hydroxymethyl-)aminomethan-Puffer
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Salinelösung
<b>TBST</b>	Tris-gepufferte Salinelösung mit Triton X100
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>vGluT2</b>	vesikulärer Glutamattransporter 2
<b>VLDLR</b>	Rezeptor für Lipoproteine sehr geringer Dichte, bzw. [engl.] very-low-density lipoprotein receptor
<b>vm</b>	Ventromedial
<b>VPM</b>	Nucleus ventralis posteromedialis thalami
<b>vz</b>	Ventrikulärzone, bzw. [engl.] ventricular zone
<b>wm</b>	Weißer Substanz, bzw. [engl.] white matter
<b>WTBP</b>	Whisker-to-Barrel Pathway [engl.]

**Anmerkungen:**

Bezüglich Klein-, Groß- und Kursivschreibung von Genen und Mausmutanten, sowie der Auswahl der Kurzformen von Gennamen, hält sich die vorliegende Arbeit an die Vorschlägen des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* (Stand September 2011).

Die Schreibweise und Auswahl von Proteinnamen entspricht der *NCBI Protein Database* (Stand Januar 2013).

Die Abkürzungen für anatomische Strukturen entstammen in der Regel dem Paxinos-Atlas für das Mäusehirn (Paxinos and Franklin, 2001).



## 7 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, Sosnik R, Bagdasarian K, Haidarliu S (2001) Temporal frequency of whisker movement. II. Laminar organization of cortical representations. *Journal of Neurophysiology* 86:354-367.
- Alcántara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci* 18:7779-7799.
- Angevine JB, Jr., Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768.
- Armstrong-James M, Fox K (1987) Spatiotemporal Convergence and Divergence in the Rat S1 Barrel Cortex. *J Comp Neurol* 263:265-281.
- Belford GR, Killackey HP (1979) Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 183:305-321.
- Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K, Staiger JF (2002) Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat* 23:187-198.
- Bock HH, Herz J (2003) Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Current biology* : CB 13:18-26.
- Borrell V, Kaspar BK, Gage FH, Callaway EM (2006) In vivo evidence for radial migration of neurons by long-distance somal translocation in the developing ferret visual cortex. *Cerebral Cortex* 16:1571-1583.
- Boyle MP, Bernard A, Thompson CL, Ng L, Boe A, Mortrud M, Hawrylycz MJ, Jones AR, Hevner RF, Lein ES (2011) Cell-type-specific consequences of Reelin deficiency in the mouse neocortex, hippocampus, and amygdala. *The Journal of Comparative Neurology* 519:2061-2089.
- Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM (1997) Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res* 84:81-97.
- Britto JM, Tait KJ, Johnston LA, Hammond VE, Kalloniatis M, Tan SS (2011) Altered speeds and trajectories of neurons migrating in the ventricular and subventricular zones of the reeler neocortex. *Cerebral Cortex* 21:1018-1027.
- Carvell GE, Simons DJ (1990) Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10:2638-2648.
- Catalano SM, Shatz CJ (1998) Activity-dependent cortical target selection by thalamic axons. *Science* 281:559-562.
- Caviness VS (1976) Patterns of cell and fiber distribution in the neocortex of the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 170:435-447.
- Caviness VS (1982a) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice- a developmental-study based upon [H-3] thymidin autoradiography. *Dev Brain Res* 4:293-302.
- Caviness VS (1988) The Reeler malformation. Implication for neocortical histogenesis. *Cerebral Cortex* (Plenum Press):60-89.
- Caviness VS, Sidman RL (1973a) Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 148:141-151.
- Caviness VS, Frost DO (1983) Thalamocortical projections in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 219:182-202.
- Caviness VS, Frost DO, Hayes NL (1976) Barrels in somatosensory cortex of normal and reeler mutant mice. *Neurosci Lett* 3:7-14.

- Caviness VS, Jr. (1982b) Development of neocortical afferent systems: studies in the reeler mouse. *Neurosci Res Program Bull* 20:560-569.
- Caviness VS, Jr., Sidman RL (1972) Olfactory structures of the forebrain in the reeler mutant mouse. *The Journal of comparative neurology* 145:85-104.
- Caviness VS, Jr., Sidman RL (1973b) Retrohippocampal, hippocampal and related structures of the forebrain in the reeler mutant mouse. *The Journal of comparative neurology* 147:235-254.
- Chai XJ, Forster E, Zhao ST, Bock HH, Frotscher M (2009) Reelin Stabilizes the Actin Cytoskeleton of Neuronal Processes by Inducing n-Cofilin Phosphorylation at Serine3. *Journal of Neuroscience* 29:288-299.
- Cooper JA (2008) A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci* 31:113-119.
- Cragg BG (1975) Absence of barrels and disorganization of thalamic afferent distribution in the sensory cortex of reeler mice. *Exp Neurol* 49:858-862.
- Cruikshank SJ, Urabe H, Nurmikko AV, Connors BW (2010) Pathway-Specific Feedforward Circuits between Thalamus and Neocortex Revealed by Selective Optical Stimulation of Axons. *Neuron* 65:230-245.
- D'Arcangelo G (2005) The reeler mouse: anatomy of a mutant. *Int Rev Neurobiol* 71:383-417.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374:719-723.
- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T (1997) Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:23-31.
- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24:471-479.
- da Costa NM, Martin KAC (2011) How Thalamus Connects to Spiny Stellate Cells in the Cat's Visual Cortex. *Journal of Neuroscience* 31:2925-2937.
- Dekimoto H, Terashima T, Katsuyama Y (2010) Dispersion of the neurons expressing layer specific markers in the reeler brain. *Development, Growth & Differentiation* 52:181-193.
- Deschenes M, Moore J, Kleinfeld D (2012) Sniffing and whisking in rodents. *Current Opinion in Neurobiology* 22:243-250.
- Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E (2008) 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 9:601-612.
- Dorfl J (1985) The Innervation of the Mystacial Region of the White-Mouse - a Topographical Study. *Journal of Anatomy* 142:173-184.
- Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Meth* 29:261-265.
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES (2000) Reelin binds alpha 3 beta 1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27:33-44.
- Duque A, Rakic P (2011) Different effects of bromodeoxyuridine and [3H]thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:15205-15217.
- Durbin R, Mitchison G (1990) A Dimension Reduction Framework for Understanding Cortical Maps. *Nature* 343:644-647.
- Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-U903.
- Erzurumlu RS, Gaspar P (2012) Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *European Journal of Neuroscience* 35:1540-1553.

- Falconer D (1951) 2 new mutants, trembler and reeler, with neurological actions in the house mouse (*mus-musculus*). In: *J Genet*, pp 192-200.
- Feldman DE, Brecht M (2005) Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310:810-815.
- Feldmeyer D, Lubke J, Sakmann B (2006) Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats. *J Physiol-London* 575:583-602.
- Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CC, Poulet JF, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C (2012) Barrel Cortex Function. *Progress in neurobiology* (in press).
- Ferrere A, Vitalis T, Gingras H, Gaspar P, Cases O (2006) Expression of *Cux-1* and *Cux-2* in the developing somatosensory cortex of normal and barrel-defective mice. *Anat Rec Part A* 288A:158-165.
- Filipkowski R, Rydz M, Berdel B, Morys J, Kaczmarek L (2000) Tactile experience induces *c-fos* expression in rat barrel cortex. *Learn Memory* 7:116-122.
- Folsom TD, Fatemi SH (2012) The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* (in press).
- Förster E, Bock HH, Herz J, Chai X, Frotscher M, Zhao S (2010) Emerging topics in Reelin function. *Eur J Neurosci* 31:1511-1518.
- Fowler T, Sen R, Roy AL (2011) Regulation of Primary Response Genes. *Mol Cell* 44:348-360.
- Fox K (2002) Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* 111:799-814.
- Frotscher M (1997) Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res* 290:315-322.
- Frotscher M (2010) Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci* 33:407-414.
- Frotscher M, Zhao ST (2010) Go or Stop? Divergent Roles of Reelin in Radial Neuronal Migration. *Neuroscientist* 16:421-434.
- Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Förster E, Zhao S (2009) Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *J Neural Transm* 116:1451-1455.
- Goffinet AM (1984a) Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice. *Brain Res* 319:261-296.
- Goffinet AM (1984b) Abnormal development of the facial nerve nucleus in reeler mutant mice. *J Anat* 138 ( Pt 2):207-215.
- Goffinet AM (1990) Cerebellar phenotype of two alleles of the 'reeler' mutation on similar backgrounds. *Brain Res* 519:355-357.
- Goffinet AM (1995) Developmental Neurobiology - a Real Gene for Reeler. *Nature* 374:675-676.
- Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ (1997) Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* 17:8024-8037.
- Graziano A, Liu X-B, Murray KD, Jones EG (2008) Vesicular glutamate transporters define two sets of glutamatergic afferents to the somatosensory thalamus and two thalamocortical projections in the mouse. *J Comp Neurol* 507:1258-1276.
- Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234:80-83.
- Grinevich V, Brecht M, Osten P (2005) Monosynaptic pathway from rat vibrissa motor cortex to facial motor neurons revealed by lentivirus-based axonal tracing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:8250-8258.
- Grove E, Fukuchi-Shimogori T (2003) Generating the cerebral cortical area map. *Annu Rev Neurosci* 26:355-380.

- Guic-Robles E, Valdivieso C, Guajardo G (1989) Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system. *Behav Brain Res* 31:285-289.
- Haidarliu S, Ahissar E (2001) Size gradients of barreloids in the rat thalamus. *J Comp Neurol* 429:372-387.
- Hamburgh M (1963) Analysis of the postnatal developmental effects of "Reeler", a neurological mutation in mice. a study in developmental genetics. *Dev Biol* 19:165-185.
- Hammond VE, So E, Cate HS, Britto JM, Gunnensen JM, Tan SS (2010) Cortical layer development and orientation is modulated by relative contributions of Reelin-negative and -positive neurons in mouse Chimeras. *Cereb Cortex* 20:2017-2026.
- Harris JA, Petersen RS, Diamond ME (1999) Distribution of tactile learning and its neural basis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7587-7591.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 6:877-888.
- Herschman HR (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60:281-319.
- Hertel N, Redies C (2011) Absence of layer-specific cadherin expression profiles in the neocortex of the reeler mutant mouse. *Cerebral Cortex* 21:1105-1117.
- Hevner R, Daza RA, Rubenstein JL, Stunnenberg H, Olavarria J, Englund C (2003) Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons. *Dev Neurosci* 25:139-151.
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24:481-489.
- Higashi S, Hioki K, Kurotani T, Kasim N, Molnar Z (2005) Functional thalamocortical synapse reorganization from subplate to layer IV during postnatal development in the reeler-like mutant rat (Shaking rat Kawasaki). *Journal of Neuroscience* 25:1395-1406.
- Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S, Nakao K, Katsuki M, Hayashizaki Y (1995) The Reeler Gene Encodes a Protein with an Egf-Like Motif Expressed by Pioneer Neurons. *Nat Genet* 10:77-83.
- Hoffarth RM, Johnston JG, Krushel LA, van der Kooy D (1995) The mouse mutation reeler causes increased adhesion within a subpopulation of early postmitotic cortical neurons. *J Neurosci* 15:4838-4850.
- Howell BW, Herrick TM, Cooper JA (1999) Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev* 13:643-648.
- Huntley GW, Benson DL (1999) Neural (N)-cadherin at developing thalamocortical synapses provides an adhesion mechanism for the formation of somatopically organized connections. *J Comp Neurol* 407:453-471.
- Inan M, Crair MC (2007) Development of cortical maps: perspectives from the barrel cortex. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13:49-61.
- Ito M (1985) Processing of Vibrissa Sensory Information within the Rat Neocortex. *Journal of Neurophysiology* 54:479-490.
- Jabaudon D, S JS, D JT, M JG, Macklis JD (2011) ROR $\beta$  Induces Barrel-like Neuronal Clusters in the Developing Neocortex. *Cerebral Cortex* 22:996-1006.
- Jones E, Powell T (1973) Anatomical organization of the somatosensory cortex. In: *Handbook of sensory physiology, vol. 2: Somatosensory system*. New York: Springer-Verlag vol. 2:pp 579-620.

- Jossin Y (2011) Polarization of migrating cortical neurons by Rap1 and N-cadherin: Revisiting the model for the Reelin signaling pathway. *Small GTPases* 2:322-328.
- Jossin Y, Ignatova N, Hiesberger T, Herz J, de Rouvroit CL, Goffinet AM (2004) The central fragment of reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *Journal of Neuroscience* 24:514–521.
- Kaas JH (1997) Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res Bull* 44:107–112.
- Keshvara L, Benhayon D, Magdaleno S, Curran T (2001) Identification of reelin-induced sites of tyrosyl phosphorylation on disabled 1. *J Biol Chem* 276:16008-16014.
- Killackey HP (1973) Anatomical evidence for cortical subdivisions based on vertically discrete thalamic projections from the ventral posterior nucleus to cortical barrels in the rat. *Brain Res* 51:326-331.
- Killackey HP, Leshin S (1975) The organization of specific thalamocortical projections to the posteromedial barrel subfield of the rat somatic sensory cortex. *Brain Res* 86:469-472.
- Kleinfeld D, Deschenes M (2011) Neuronal Basis for Object Location in the Vibrissa Scanning Sensorimotor System. *Neuron* 72:455-468.
- Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP (1988) Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. *Brain Res* 463:346-351.
- Kwan KY, Sestan N, Anton ES (2012) Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139:1535-1546.
- Landrieu P, Goffinet A (1981) Inverted Pyramidal Neurons and Their Axons in the Neocortex of Reeler Mutant Mice. *Cell and Tissue Research* 218:293-301.
- Lein ES et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168-176.
- Liu JS (2011) Molecular Genetics of Neuronal Migration Disorders. *Curr Neurol Neurosci* 11:171-178.
- Lopez-Bendito G, Molnar Z (2003) Thalamocortical development: How are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 4:276-289.
- Lund JS (1988) Anatomical organization of macaque monkey striate visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 11:253-288.
- Ma PM (1991) The barrelettes--architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol* 309:161-199.
- Ma PM (1993) Barrelettes--architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. II. Normal post-natal development. *J Comp Neurol* 327:376-397.
- Magdaleno S, Keshvara L, Curran T (2002) Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of reelin in reeler mice. *Neuron* 33:573-586.
- Marchi V, Algeri G (1885) Sulle degenerazioni discendenti consecutive a lesione sperimentale in diverse zone della corteccia cerebrale. *Rivista Sperimentale di Freniatria* 11:492-494.
- Marin-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* 152:109-126.
- Martin MR (1981) Morphology of the cochlear nucleus of the normal and reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 197:141-152.
- Mc Connell SK (1989) The Determination of Neuronal Fate in the Cerebral-Cortex. *Trends Neurosci* 12:342-349.
- Meier H, Hoag WG (1962) Neuropathology of Reeler, a neuro-muscular mutation in mice. *J Neuropath Exp Neur* 21:649-654.

- Meyer HS, Wimmer VC, Hemberger M, Bruno RM, de Kock CP, Frick A, Sakmann B, Helmstaedter M (2010) Cell type-specific thalamic innervation in a column of rat vibrissal cortex. *Cerebral cortex* 20:2287-2303.
- Miyama S, Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1997) A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. *Cerebral cortex* 7:678-689.
- Molnar Z, Blakemore C (1995) How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends Neurosci* 18:389-397.
- Molnar Z, Higashi S, Lopez-Bendito G (2003) Choreography of early thalamocortical development. *Cerebral Cortex* 13:661-669.
- Molnar Z, Adams R, Goffinet AM, Blakemore C (1998) The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *Journal of Neuroscience* 18:5746-5765.
- Molnar Z, Garel S, Lopez-Bendito G, Maness P, Price DJ (2012) Mechanisms controlling the guidance of thalamocortical axons through the embryonic forebrain. *Eur J Neurosci* 35:1573-1585.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8:427-437.
- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M (1999) Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. In: *J Neurobiol*, pp 234-246.
- Morgan JI, Curran T (1986) Role of Ion Flux in the Control of C-Fos Expression. *Nature* 322:552-555.
- Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12:459-462.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong ROL, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143-150.
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18:311-318.
- O'Leary D, Nakagawa Y (2002) Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 12:14-25.
- O'Brien TF, Steindler DA, Cooper NGF (1987) Abnormal Glial and Glycoconjugate Dispositions in the Somatosensory Cortical Barrel Field of the Early Postnatal Reeler Mutant Mouse. *Developmental Brain Research* 32:309-317.
- Oeschger FM, Wang WZ, Lee S, Garcia-Moreno F, Goffinet AM, Arbones ML, Rakic S, Molnar Z (2012) Gene Expression Analysis of the Embryonic Subplate. *Cerebral Cortex* 22:1343-1359.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Ed2. New York: Academic Press.
- Petersen CCH (2007) The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* 56:339-355.
- Pierret T, Lavallee P, Deschenes M (2000) Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *Journal of Neuroscience* 20:7455-7462.
- Pinto-Lord MC, Evrard P, Caviness VS (1982) Obstructed neuronal migration along radial glial fibers in the neocortex of the reeler mouse: a Golgi-EM analysis. *Brain Res* 256:379-393.
- Polleux F, Dehay C, Kennedy H (1998) Neurogenesis and commitment of corticospinal neurons in reeler. *J Neurosci* 18:9910-9923.
- Purves D, Riddle DR, Lamantia AS (1992) Iterated Patterns of Brain Circuitry (or How the Cortex Gets Its Spots). *Trends Neurosci* 15:362-368.

- Rakic P (1976) Prenatal Genesis of Connections Subservicing Ocular Dominance in Rhesus-Monkey. *Nature* 261:467-471.
- Rakic P, Caviness VS (1995) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14:1101-1104.
- Redies C (2000) Cadherins in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 61:611-648.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-Fos protein in brain-metabolic mapping at the cellular-level. *Science* 240:1328-1341.
- Salinger WL, Ladrow P, Wheeler C (2003) Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation. *Behav Neurosci* 117:1257-1275.
- Sanada K, Gupta A, Tsai L-H (2004) Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* 42:197-211.
- Schaeren-Wiemers N, André E, Kapfhammer JP, Becker-André M (1997) The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur J Neurosci* 9:2687-2701.
- Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM (1997) Reelin mRNA expression during mouse brain development. *Eur J Neurosci* 9:1055-1071.
- Schubert D, Kotter R, Staiger JF (2007) Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Structure & Function* 212:107-119.
- Sekine K, Honda T, Kawauchi T, Kubo K, Nakajima K (2011) The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:9426-9439.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Sheppard AM, Pearlman AL (1997) Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: An early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse. *J Comp Neurol* 378:173-179.
- Sidman RL, Miale IL, Feder N (1959) Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Experimental neurology* 1:322-333.
- Simons DJ (1978) Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J Neurophysiol* 41:798-820.
- Skalióra I, Singer W, Betz H, Puschel AW (1998) Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *European Journal of Neuroscience* 10:1215-1229.
- Staiger JF (2006) Immediate-early gene expression in the barrel cortex. *Somatosensory & Motor Research* 23:135-146.
- Staiger JF, Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K (2000) Exploration of a novel environment leads to the expression of inducible transcription factors in barrel-related columns. *Neuroscience* 99:7-16.
- Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K (2002) Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience* 109:687-699.
- Steindler DA, Colwell SA (1976) Reeler mutant mouse: maintenance of appropriate and reciprocal connections in the cerebral cortex and thalamus. *Brain Res* 113:386-393.
- Strazielle C, Hayzoun K, Derer M, Mariani J, Lalonde R (2006) Regional brain variations of cytochrome oxidase activity in Relnrl-ork mutant mice. *JNeurosciRes* 83:821-831.

- Super H, Del Rio JA, Martinez A, Perez-Sust P, Soriano E (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cerebral Cortex* 10:602-613.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS (1995) The Cell-Cycle of the Pseudostratified Ventricular Epithelium of the Embryonic Murine Cerebral Wall. *Journal of Neuroscience* 15:6046-6057.
- Takahashi T, Goto T, Miyama S, Nowakowski RS, Caviness VS (1999) Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: Relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *Journal of Neuroscience* 19:10357-10371.
- Terashima T (1996) Distribution of mesencephalic trigeminal nucleus neurons in the reeler mutant mouse. *Anat Rec* 244:563-571.
- Terashima T, Kishimoto Y, Ochiishi T (1994) Musculotopic organization in the motor trigeminal nucleus of the reeler mutant mouse. *Brain Res* 666:31-42.
- Terashima T, Inoue K, Inoue Y, Mikoshiba K, Tsukada Y (1983) Distribution and morphology of corticospinal tract neurons in reeler mouse cortex by the retrograd HRP method. *J Comp Neurol* 218:190-205.
- Towal RB, Hartmann MJ (2006) Right-left asymmetries in the whisking behavior of rats anticipate head movements. *Journal of Neuroscience* 26:8838-8846.
- Uziel D, Muehlfriedel S, Bolz J (2008) Ephrin-A5 promotes the formation of terminal thalamocortical arbors. *Neuroreport* 19:877-881.
- Van Beveren C, van Straaten F, Curran T, Muller R, Verma IM (1983) Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell* 32:1241-1255.
- Van der Loos H (1976) Barreloids in mouse somatosensory thalamus. In: *Neurosci Lett*, pp 1-6.
- VanEssen DC (1997) A tension-based theory of morphogenesis and compact wiring in the central nervous system. *Nature* 385:313-318.
- Vercelli A, Repici M, Garbossa D, Grimaldi A (2000) Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Research Bulletin* 51:11-28.
- Vincent SB (1912) The function of the vibrissae in the behaviour of the white rat. *Behav Monograph*.
- Wagener RJ, David C, Zhao ST, Haas CA, Staiger JF (2010) The Somatosensory Cortex of reeler Mutant Mice Shows Absent Layering But Intact Formation and Behavioral Activation of Columnar Somatotopic Maps. *Journal of Neuroscience* 30:15700-15709.
- Waite P (2004) Trigeminal sensory system. In: Paxinos, G (editor) *The rat nervous system* Ed3 San Diego: Academic Press.:817-851.
- Watakabe A, Ichinohe N, Ohsawa S, Hashikawa T, Komatsu Y, Rockland KS, Yamamori T (2007) Comparative analysis of layer-specific genes in Mammalian neocortex. *Cereb Cortex* 17:1918-1933.
- Welker C (1971) Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (SmI) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res* 26:259-275.
- Welker C (1976) Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. *The Journal of comparative neurology* 166:173-189.
- Welker C, Woolsey TA (1974) Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol* 158:437-453.
- Welt C, Steindler DA (1977) Somatosensory cortical barrels and thalamic barreloids in reeler mutant mice. *Neuroscience* 2:755-766.
- Wimmer VC, Bruno RM, de Kock CP, Kuner T, Sakmann B (2010) Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POM axons in rat vibrissal cortex. *Cerebral Cortex* 20:2265-2276.

- Wong-Riley MT, Welt C (1980) Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2333-2337.
- Woolsey TA, Van der Loos H (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17:205-242.
- Woolsey TA, Anderson JR, Wann JR, Stanfield BB (1979) Effects of early vibrissae damage on neurons in the ventrobasal (VB) thalamus of the mouse. *J Comp Neurol* 184:363-380.
- Yamada A, Uesaka N, Hayano Y, Tabata T, Kano M, Yamamoto N (2010) Role of pre- and postsynaptic activity in thalamocortical axon branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7562-7567.
- Yamamoto KR, Alberts BM (1976) Steroid Receptors - Elements for Modulation of Eukaryotic Transcription. *Annu Rev Biochem* 45:721-746.
- Yamamoto T, Sakakibara S, Mikoshiba K, Terashima T (2003) Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of yotari and reeler mice. *J Comp Neurol* 461:61-75.
- Yassin L, Benedetti BL, Jouhanneau JS, Wen JA, Poulet JF, Barth AL (2010) An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. *Neuron* 68:1043-1050.
- Yoneshima H, Yamasaki S, Voelker C, Molnar Z, Christophe E, Audinat E, Takemoto M, Nishiwaki M, Tsuji S, Fujita I, Yamamoto N (2006) ER81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience* 137:401-412.
- Yu C, Derdikman D, Haidarliu S, Ahissar E (2006) Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat. *PLoS Biol* 4:e124.



## 8 PUBLIKATION

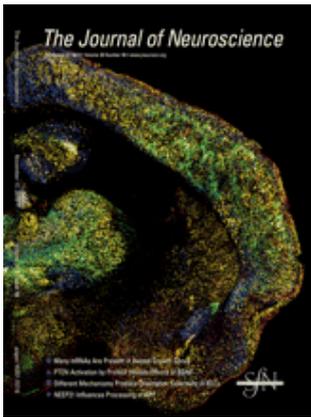
Die vorliegende Arbeit wurde in Auszügen im *Journal of Neuroscience* veröffentlicht:

Wagener RJ, David C, Zhao ST, Haas CA, Staiger JF (2010)

The Somatosensory Cortex of *reeler* Mutant Mice Shows Absent Layering But Intact Formation and Behavioral Activation of Columnar Somatotopic Maps.

Journal of Neuroscience 30:15700-15709.

Abstract: Sensory information acquired via the large facial whiskers is processed and relayed in the whisker-to-barrel pathway, which shows multiple somatotopic maps of the receptor periphery. These maps consist of individual structural modules, the development of which may require intact cortical lamination. In the present study we examined the whisker-to-barrel pathway in the *reeler* mouse and thus used a model with disturbed cortical organization. A combination of histological (fluorescent Nissl and cytochrome oxidase staining) as well as molecular methods (c-Fos and laminar markers *Rgs8*, *RORB*, and *ER81* expression) revealed wild type-equivalent modules in *reeler*. At the neocortical level, however, we found extensive alterations in the layout of the individual modules of the map. Nevertheless, they showed a columnar organization that included compartments equivalent to those of their wild-type counterparts. Moreover, all examined modules showed distinct activation as a consequence of behavioral whisker stimulation. Analysis of the magnitude of the cortical lamination defect surprisingly revealed an extensive disorganization, rather than an inversion, as assumed previously. Striking developmental plasticity of thalamic innervation, as suggested by vGluT2 immunohistochemistry, seems to ensure the proper formation of columnar modules and topological maps even under highly disorganized conditions.



Cover legend: Coronal view of one hemisphere of a *reeler* mutant mouse brain produced by merging four pseudocolored micrographs taken at the level of the primary somatosensory “barrel” cortex. Cells are labeled with markers that in wild-type mice identify distinct cortical layers: yellow, layer II/III; green layer IV; blue, layer V. *In situ* hybridization for these markers in the *reeler* brain reveals a more-or-less random expression pattern, rather than distinct layers. This challenges the hypothesis that *reeler* cortex develops in an “outside-in” pattern, according to which the cortical layers should be present, but inverted. The immediate early gene c-Fos (red) identifies cells activated after exploration of a novel environment. For more information, see the article by Wagener et al. in this issue (pages 15700–15709).

*Die Seiten 99 - 100 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.*

*Die Seiten 99 - 100 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.*

## 10 DANKSAGUNG

Für wertvolle Hilfe im Prozess der Erstellung meiner Doktorarbeit bin ich vielen Menschen zu großem Dank verpflichtet. An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Jochen Staiger, der maßgeblichen Anteil an dem Projekt hatte. Er hat mich auf großartige Weise in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken eingeführt und war immer unterstützend zur Stelle. Unsere spannenden wissenschaftlichen Diskussionen habe ich als große Bereicherung empfunden. Die genannten positiven Erfahrungen haben mich auch motiviert, mich über meine Doktorarbeit hinaus in der Wissenschaft zu engagieren. Für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bin ich sehr dankbar. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, ohne die Studium und Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären. Sie waren mir (wie immer) eine unabdingbare Hilfe. Gleiches gilt für meine Freundin und zukünftige Frau, Dr. Annika Gold, die mir eine wichtige Stütze war und in zahlreichen Situationen große Rücksicht auf mein wissenschaftliches Engagement genommen hat.

Bei Prof. Carola Haas möchte ich mich für die freimütige Weitergabe ihres umfangreichen Wissens insbesondere zur Technik der *in situ*-Hybridisierung bedanken, außerdem für die spontane Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit. Mein lieber Kollege Dr. Csaba Dávid hat mit dazu beigetragen, mich in die Wissenschaft einzuführen, war immer eine Anlaufstelle bei Fragen und Problemen im Labor und hat mich mit großer Sachkenntnis in der statistischen Auswertung der Ergebnisse unterstützt. Dafür danke ich ihm. Bei Dr. Shanting Zhao bedanke ich mich herzlich für das Überlassen von *reeler*-Tieren und die Unterstützung beim Aufbau unserer eigenen Zucht. Bei Dr. Martin Möck bedanke ich mich für spannende wissenschaftliche Diskussionen, das Einbringen seiner Erfahrung und seine allzeitige Hilfsbereitschaft. Bei meiner Schwester bedanke ich mich für die liebe und geduldige Unterstützung beim Umgang mit Bildbearbeitungs- und Layoutsoftware.

Die Unterstützung durch erfahrene technische Assistentinnen und Assistenten habe ich besonders zu schätzen gelernt. Ich danke Monika Paetzold für die liebe und hilfreiche Unterstützung bei der täglichen Arbeit in unserem Labor. Susanne Huber war eine wertvolle und geduldige Hilfe beim Erlernen und der Ausführung der *in situ*-Hybridisierungsexperimente. Auch dafür möchte ich herzlich Danken.

Beim ehemaligen Direktor unseres Freiburger Institutes, Prof. Michael Frotscher, bedanke ich mich für die wohlwollende Unterstützung unseres Projekts und die von ihm eingebrachten Ideen und Ratschläge.

Ich blicke dankbar und mit Freude auf die gemeinsame Arbeit zurück.

Göttingen im Januar 2013

Robin Wagener