

Inhibitorische Netzwerke im somatosensorischen Kortex
der Ratte: Nachweis der synaptischen Innervation von
erregenden und hemmenden Zielzellen durch VIP-
immunreaktive Interneurone

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Carmen Masanneck

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2002

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2002

Referent: Univ.-Prof. Dr. Karl Zilles

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Großhirnrinde der Säugetiere	1
1.2 Das somatosensorische System der Ratte: Der Barrel Kortex	3
1.2.1 Zytoarchitektur und kolumnärer Aufbau des Barrel Kortex	4
1.2.2 Topografie und kolumnäre Organisationsstruktur im somatosensorischen System	6
1.2.3 Funktionelle Hinweise auf kolumnäre Informationsverarbeitung	7
1.2.4 Zelluläre Komponenten im Barrel Kortex	8
1.2.5 Klassifizierung inhibitorischer, GABAerger Neurone	10
1.2.6 Inhibitorische Interneurone in kortikalen Schaltkreisen	12
1.3 VIP-positive Neurone im Barrel Kortex als vertikale Komponente interlaminärer Signalverarbeitung einer Kolumne	13
1.3.1 Konnektivität	14
1.3.2 Physiologische Eigenschaften des VIP	17
1.3.3 VIP als Neurotransmitter?	18
1.4. Calbindin-positive Interneurone- eine heterogene Population	20
1.4.1 Zelltypen	20
1.4.2 Konnektivität	21
1.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der synaptischen Konnektivität	22
2. Ziel der Untersuchung	25
3. Material, Versuchstiere und Methoden	26
3.1 Material	26
3.1.1 Herstellung der Gebrauchslösungen	27
3.1.2 Geräte	28
3.2 Versuchstiere	28
3.3 Methoden	29
3.3.1 Perfusion	29
3.3.2 Doppelimmunperoxidaseanfärbung von VIP und Calbindin für lichtmikroskopische Auswertung und für korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie	30
3.3.3 Doppelimmunfluoreszenz der Antigene VIP und CB	34
3.3.4 Intrazelluläre Farbstoffinjektionen in fixierten Gewebeschnitten	35
3.4 Methodik der Auswertung	37
3.4.1 Lichtmikroskopische Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-positiven Interneuronen	37
3.4.2 Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Auswertung	39
3.4.3 Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz von VIP und CB	40
3.4.4 Auswertung der intrazellulären Farbstoffinjektion in fixierten Gewebeschnitten	40

4. Ergebnisse	42
4.1 Korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie	42
4.1.1 Morphologie und Klassifizierung der Calbindin-positiven Neurone	42
4.1.2 Lichtmikroskopische Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-positiven Interneuronen	50
4.1.3 Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Auswertung	55
4.2 Doppelimmunfluoreszenz der Antigene VIP und CB	62
4.3 Intrazelluläre Farbstoffinjektionen in fixierten Gewebeschnitten	63
4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von VIP nach intrazellulärer Injektion von Lucifer Yellow	65
4.3.2 Intrazelluläre Injektion von MicroRuby (MR) und immunhistochemische Visualisierung von MR und VIP für die korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie	68
5 Diskussion	70
5.1 Diskussion methodischer Aspekte	71
5.1.1 Gewebefixierung und –behandlung	71
5.1.2 Lichtmikroskopische Quantifizierung der VIP-IR Boutons an CB-Interneuronen	71
5.1.3 Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Auswertung	73
5.1.4 Konfokale Mikroskopie	74
5.1.5 Intrazelluläre Farbstofffüllung	74
5.2 Diskussion der Ergebnisse	75
5.2.1 Morphologie der CB-positiven Interneurone	75
5.2.2 Zielstrukturen VIP-positiver Axonterminalien: Innervation von CB-IR-Interneuronen	81
5.2.3 Korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie	86
5.2.4 Zielstrukturen VIP-positiver Axonterminalien: Innervation von Pyramidenzelle	88
5.3 Informationsverarbeitung im Barrel Kortex	89
6. Zusammenfassung	93
7. Literaturverzeichnis	94
8. Anhang	110
9. Lebenslauf	113
10. Danksagung	116
11. Erklärung	117

1. Einleitung

1.1 Die Großhirnrinde der Säugetiere

Die Großhirnrinde (Kortex cerebri) des Menschen ist die am höchsten differenzierte zentralnervöse Struktur bei Säugetieren, wobei hier unter Differenzierung der Grad der Gyrifizierung und die Unterteilung des Kortex in zahlreiche histologisch definierbare Unterareale verstanden wird. Zu den allgemeinen strukturellen Merkmalen des Kortex wird die areale Parzellierung sowie laminäre Differenzierung gezählt (Zilles und Wree, 1995). Studien der laminären Organisation des Neokortex begannen am Anfang des 20. Jahrhunderts und sind heute unter dem Begriff der Zytoarchitektonik bekannt. Durch diese von Campell in England und Vogt und Brodmann in Deutschland erstmals durchgeführten Studien konnte der Neokortex in mindestens 150 Areale untergliedert werden. Seitdem wurden viele weitere Areale bzw. Unterareale identifiziert, jedoch wird hier nur die Unterscheidung des Koniokortex bzw. des granulären Kortex der sensorischen Areale, des agranulären Kortex der motorischen und prämotorischen Areale, sowie des homotypischen Kortex, der viele der Assoziationsareale enthält, angeführt (Douglas, 1998). Vor allem die primären Rindenareale eignen sich aufgrund ihrer vergleichbaren Organisation für Untersuchungen zur prinzipiellen Struktur und Funktion kortikaler Areale. Mit Ausnahme des primären motorischen Kortex (Fr1 und Fr3¹; Zilles, 1985), der keine Schicht IV (Lamina granularis) besitzt, weisen alle primären Rindenareale eine laminäre Gliederung in 6 Schichten parallel zur Pia mater auf. Ein weiteres Kennzeichen der primären Areale ist die topografisch organisierte Repräsentation von peripheren rezeptiven Feldern. Beispiele dafür sind tonotope Karten im primären auditorischen Kortex (Te1; Zilles, 1985)², retinotope Karten im primären visuellen Kortex (Oc1; Zilles, 1985)³ und somatotope Karten im primären somatosensorischen Kortex (Par 1; Zilles, 1985)⁴. Ein Merkmal der Somatotopie ist, dass die somatosensorischen

¹ M1 (Paxinos und Watson, 1998); MOp (Swanson, 1998)

² Au1 (Paxinos und Watson, 1998); AUDp (Swanson, 1998)

³ V1 (Paxinos und Watson, 1998), VISp (Swanson, 1998)

⁴ S1 (Paxinos und Watson, 1998), SSp (Swanson, 1998)

Fasern in einer geometrischen Reihenfolge angeordnet sind, die die Lagebeziehungen an der Körperoberfläche widerspiegelt. Ein weiteres Kennzeichen der Topografie ist, dass die Rezeptordichte in der Peripherie die Größe des kortikalen Repräsentationsbereiches bestimmt (Kaas, 1997). Dies lässt sich anschaulich am Beispiel der Somatotopie beim "Homunculus"⁵ (**Abb.1**) als auch beim "Rattunculus" strukturell und funktionell zeigen (Riddle und Purves, 1995). Die speziell im Bereich des Gesichts, der Lippen und der Hände überdimensionale Repräsentation ist Ausdruck des besonders feinen räumlichen Auflösungsvermögens in diesen Oberflächenregionen. Diese Transformation in der Topografie ist auch unter dem Begriff "Vergrößerungsfaktor" der Projektion vom Rezeptor zum Kortex bekannt. Bei Ratten lassen sich alle prinzipiellen Organisationsmerkmale der Großhirnrinde der Säugetiere im Allgemeinen, aber auch des Menschen im Besonderen nachweisen, so dass sich diese Spezies zur Untersuchung der kortikalen Informationsverarbeitung eignet. Welker (1971) und Welker und Woolsey (1974) konnten überzeugend die Repräsentation der Körperperipherie im somatosensorischen System der Ratten zeigen.

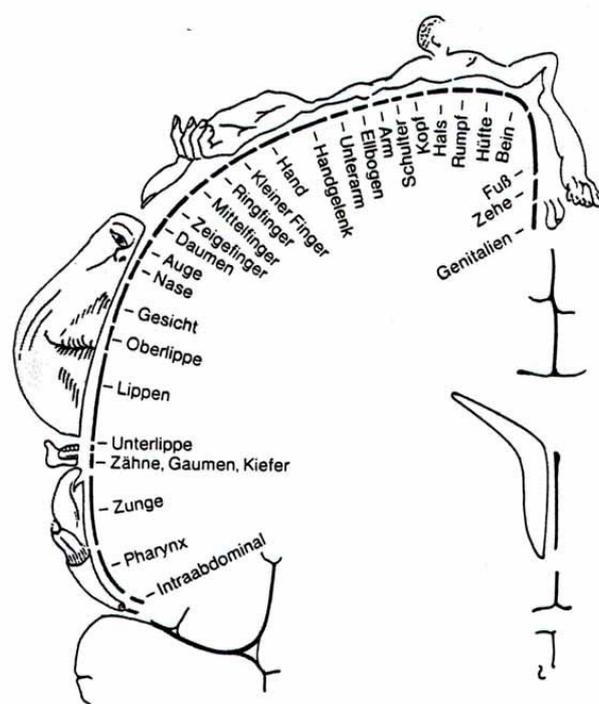


Abb.1: Der somatosensorische "Homunculus" mit der Darstellung der Projektionen der Körperoberfläche auf die postzentrale Windung (Gyrus postcentralis) des menschlichen Kortex. Aus Shepherd, (1993).

⁵ Aufzeichnung der Repräsentationsareale des Cortex mit den charakteristischen Verzerrungen

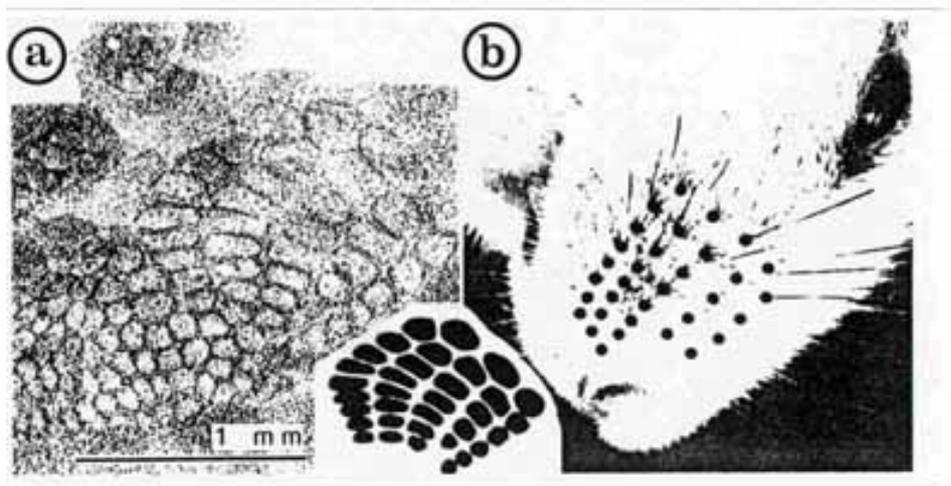


Abb. 2: **a)** Im histologischen Tangentialschnitt durch den Bereich des somatosensorischen Kortex fallen die glomerusartigen Gruppen ringförmig angeordneter Zellen auf, die sog. Tönnchen (engl. barrels), von denen jedes eine Vibrisse repräsentiert. **b)** Die Schnauze einer Maus mit den Vibrissen. Schematische Zeichnung zeigt die Gesamtverteilung der Barrels in dieser Kortexregion. Aus Woolsey und Van der Loos, (1970).

1.2 Das somatosensorische System der Ratte: Der Barrel Kortex

Ein großer Anteil des somatosensorischen Systems der Nagetiere repräsentiert die Vibrissen bzw. Schnurrhaare und verarbeitet als primärsensorisches Areal auf kortikaler Ebene die Informationen bei der taktilen Diskrimination der Umwelt dieser nachtaktiven Spezies. Die Vibrissen und die damit assoziierten Haarfollikelrezeptoren bilden zusammen ca. 25-30 flexible taktile Organe (**Abb. 2**), die als das wichtigste Sinnessystem dieser Tiere bezeichnet werden können. (Welker, 1964; Glassman, 1994). Woolsey und Van der Loos (1970) beschrieben als erste detailliert das Barrelareal (Vibrissenfeld) für die Maus und Welker (1971) für die Ratte.

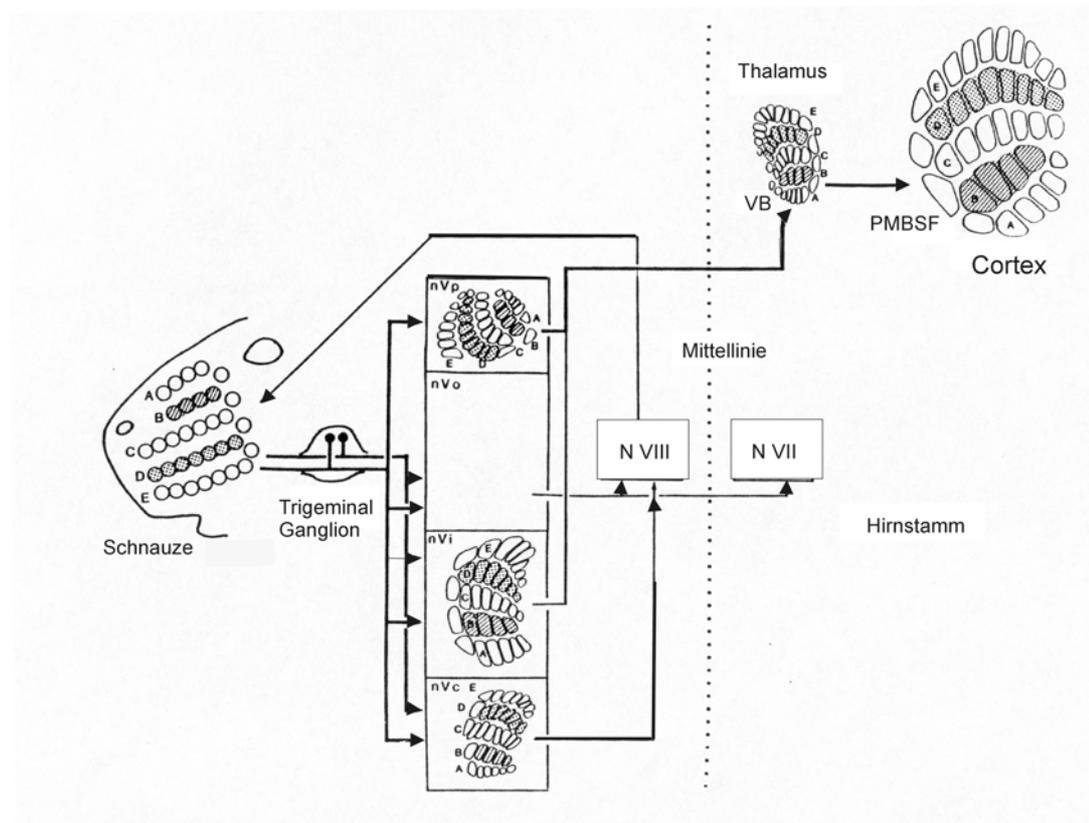


Abb. 3: Schematisches Diagramm, das die Projektionswege des Trigeminalsystems der Nagetiere zusammenfasst. Die somatotopen Projektionen können im Trigeminalkomplex des Hirnstammes (Subnucleus caudalis-nVc und interpolaris-nVi des spinalen Trigeminalkerns und im prinzipalen sensorischen Kern von V-nVp), im Thalamus (VB-Nucleus ventrobasalis thalami) und im posteromedialen Vibrissenfeld (PMBSF) nachgewiesen werden. Aus Woolsey, (1987).

1.2.1 Zytoarchitektonik und kolumnärer Aufbau des Barrel

Kortex

Als Barrelkortex bzw. Vibrissenfeld wird der Bereich des somatosensorischen Kortex definiert, der die leicht zu identifizierenden Aggregate der Barrels in der Schicht IV enthält (**Abb. 2**). Dies entspricht bei Mäusen dem architektonischen Areal III (Caviness, 1975) und bei Ratten dem parietalen Areal 1 (Par 1; Zilles und Wree, 1995). In beiden Spezies befinden sich die Barrels im primär somatosensorischen Areal (SI; Simons und Woolsey, 1979). Der posteromediale Bereich des Vibrissenfeldes (posteromedial barrel subfield – PMBSF nach Woolsey und Van der Loos, 1970) umfasst circa 40 bis 50% des gesamten Barrelkortex und unterscheidet sich von der anterolateralen Region durch größere und ellipsenförmige Barrelstrukturen. Während ein Teil des somatosensorischen Systems den Unterkieferbereich, die Vorder- und

Hinterpfote und den Rumpf repräsentiert (Welker, 1971; Welker und Woolsey, 1974; Riddle und Purves, 1995), konnten Woolsey und Van der Loos (1970) in der Schicht IV des Barrelareals eine regelmäßige Serie von fünf Reihen mit jeweils kranzförmig angeordneten Zellgruppen identifizieren, die eine der in fünf Reihen angeordneten Vibrissen repräsentieren (**Abb. 2 und 3**). Diese Zellgruppen wurden von den Autoren als "Tönnchen" (engl. Barrels) bezeichnet. Die einzelnen Barrels der Schicht IV sind durch Bereiche getrennt, in der die Schicht IV kaum identifizierbar ist, die dysgranuläre Zone, die bei Ratten ausgeprägter ist als bei Mäusen (Chapin et al., 1987). Die charakteristische Struktur (**Abb. 4**) der Barrels von Mäusen ist das Resultat unterschiedlicher Zelldichten: das Barrelzentrum ist von einem Ring dichtgepackter Zellen (engl. side) und von dem zellarmen Septum umgeben, das einzelne Barrels voneinander trennt (Keller, 1995). Wie in anderen kortikalen Arealen erhält diese Schicht die Hauptafferenzen aus dem Thalamus (Lu und Lin, 1993; Staiger et al., 1996a). Jeder der ca. 25-30 Schnurrhaarfollikel wird durch ca. 100-150 myelinisierte Fasern innerviert, deren Zellkörper im Trigeminalganglion liegen (Simons, 1997). Nach synaptischen Verschaltungen im Hirnstamm und Thalamus wird die Information in die Eingangsschicht (Lamina IV/ granularis) des somatosensorischen Kortex weitergeleitet (**Abb. 3**). Die aufsteigenden Fasern der Vibrissen enden im thalamischen Nucleus ventralis posterior medialis (VPM) und von dort erfolgt die Projektion in den somatosensorischen Kortex. Auf allen Ebenen der Informationsverarbeitung sind Nervenzellgruppen in Form einer topografischen Karte angeordnet, die funktionell der Repräsentation der Vibrissen entspricht. Das Vibrissenareal hat sich als ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Prinzipien synaptischer Informationsverarbeitung in kortikalen Arealen erwiesen, da individuelle Barrels in der Lamina granularis (IV) als Bestandteil diskreter funktioneller Kolumnen, die sich über alle kortikalen Schichten erstrecken, leicht identifiziert werden können.

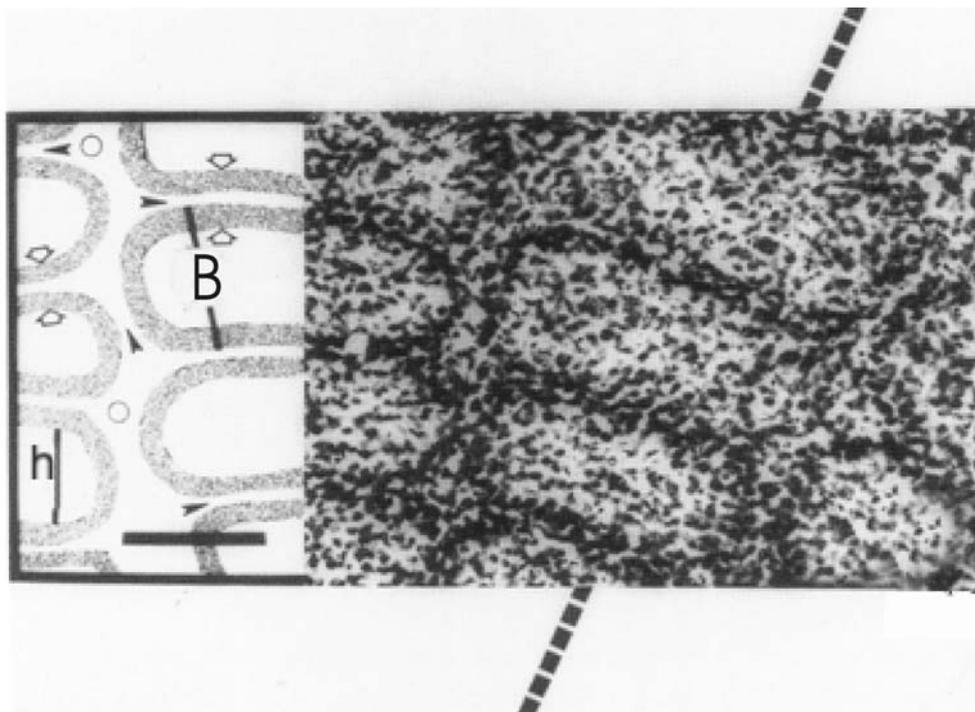


Abb. 4.: Nissl-Färbung eines tangentialen Schnittes aus dem PMBSF der Maus. B: Barrel; h: Barrelzentrum (engl. hollow); Pfeilspitzen: Septa; gestrichelte Linien: Seiten. Die ovalen PMBSF-Barrel sind entlang der gestrichelten Achse in Reihen angeordnet. Maßstab = 100 µm. Aus Rice, (1995).

1.2.2 Topografie und kolumnäre Organisationsstruktur im somatosensorischen System

Die zellulären Elemente der Barrels antworten aufgrund der topografischen Projektionen präferenziell auf Eingänge von einzelnen korrespondierenden Schnurrhaaren, die in der kortikalen Kolumne repräsentiert werden (Simons, 1978). Diese topografische Projektion wird im gesamten Trigeminalsystem von der Peripherie bis zum somatosensorischen Kortex, auf Hirnstammebene in den Barrelettes des Nucleus principalis nervi trigemini und des Nucleus tractus spinalis, im Thalamus in den Barreloids des Nucleus ventrobasalis, aufrechterhalten. Zellen innerhalb einer Barrelkolumne integrieren zusätzlich räumliche und zeitliche Eingänge von benachbarten Schnurrhaaren (Simons, 1978; Ito, 1985; Armstrong-James und Fox, 1987; Mirabella et al., 2001).

So konnte gezeigt werden, dass bei Stimulation nur einzelner Schnurrhaare auch Zellen außerhalb der korrespondierenden Kolumne aktiviert werden. Mit Ausnahme der einzigartigen Ausprägung der Barrels in Schicht IV entspricht der Barrel Kortex der zytoarchitektonischen Struktur anderer sensorischer

Areale: Er weist sechs Schichten auf und enthält leicht nachzuweisende funktionelle Kolumnen, die die basale Organisationseinheit aller kortikalen Areale bilden (Mountcastle, 1979). Der Nachweis kortikaler Kolumnen ist bisher ebenso anschaulich wie im somatosensorischen Kortex der Nager (250-500 μm Ausdehnung) auch im visuellen Kortex durch den Nachweis okulärer Dominanzsäulen beim Affen (ca. 500 μm) gelungen (Mountcastle, 1957; Hubel und Wiesel, 1969; Welker und Woolsey, 1974). In beiden Systemen wurde gezeigt, dass Neurone innerhalb dieser Kolumne bevorzugt auf adäquate Sinnesreize der gleichen Modalität reagieren. Die kortikale Kolumne stellt damit eine funktionelle Einheit dar, innerhalb derer eine multisensorische Integration erfolgt (Shepherd, 1993) und die in weit reichende Schaltkreise eingebunden ist (Simons, 1997).

Obwohl das Konzept der kortikalen Kolumnen von mehreren Seiten kritisiert worden ist (Purves et al., 1992; Swindale, 1998), bietet es sich dennoch als Modell für Fragestellungen der prinzipiellen Informationsverarbeitung in lokalen kortikalen Schaltkreisen an.

1.2.3 Funktionelle Hinweise auf kolumnäre Informationsverarbeitung

Durch verschiedene experimentelle Strategien kann die Korrelation der kortikalen Zytoarchitektur mit der peripheren Sensorik demonstriert werden (McCasland et al., 1997).

Elektrophysiologische Ableitungen zeigen, dass die meisten Zellen in einem Barrel durch das entsprechende kontralaterale Schnurrhaar aktiviert werden (Armstrong-James et al., 1992). Durch den Nachweis experimentell induzierbarer Transkriptionsfaktoren wie c-Fos kann die Repräsentation der Schnurrhaare im somatosensorischen Kortex morphologisch gezeigt werden (Staiger et al., 2000 und 2002). Ebenso zeigen metabolische Marker, wie z.B. 2-Deoxyglucose als Indikator eines gesteigerten Energiestoffwechsels, dass bei Manipulation einzelner Schnurrhaare Aktivitätsänderungen in dem jeweils korrespondierenden Barrel hervorgerufen werden (Kossut, 1992). Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass eine Vibrisse nicht nur in der Schicht IV, sondern in allen kortikalen Schichten der entsprechenden Kolumne repräsentiert wird (Armstrong-James et al., 1992; Welker et al., 1993). Aufgrund

seiner leicht identifizierbaren Zytoarchitektur hat sich der Barrel Kortex zudem als geeignetes Modell für verschiedene neurobiologische Fragestellungen, wie Entwicklung kortikaler Schaltkreise, Prinzipien kortikaler Informationsverarbeitung und Plastizität kortikaler Funktionen erwiesen (Durham und Woolsey, 1977; Keller, 1995). So führen postnatale Manipulationen der Schnurrhaare zur Induktion synaptischer Plastizität und zur veränderten Repräsentation der Peripherie im Kortex (Fox, 1994; Kossut und Siucinska, 1996; Hajos et al., 1998). Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Barrels in Schicht IV die Manifestation einer funktionellen kortikalen Kolumne darstellen, die vertikal durch alle Schichten des Kortex in dieser Region angeordnet ist.

1.2.4 Zelluläre Komponenten im Barrel Kortex

Der Barrel Kortex ist auch in Bezug auf die dort zu identifizierenden Zelltypen anderen sensorischen Arealen prinzipiell ähnlich (Keller, 1995).

Dabei lassen sich die zellulären Elemente kortikaler Kolumnen aufgrund ihrer morphologischen, neurochemischen und physiologischen Merkmale näher charakterisieren. Bisher hat sich keine einheitliche Klassifizierung der Zelltypen mit allgemeiner Akzeptanz durchgesetzt. Weithin akzeptiert ist jedoch die Einteilung in Pyramidal- und Nichtpyramidal- (NP)Zellen (Peters und Jones, 1984). Aufgrund der Heterogenität der NP-Zellen werden diese oft mittels einer Negativdefinition von den Pyramidalzellen abgegrenzt. Aufgrund der morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften sowie dem Gehalt und der Kolokalisation von Transmittern und Neuropeptiden werden beide Zellgruppen in spezifische Subpopulationen eingeteilt (Cauli et al., 1997).

Pyramidalzellen des Kortex

Als Pyramidalzellen werden ca. 2/3 aller kortikalen Zellen im Kortex klassifiziert (Ren et al., 1992; Beaulieu, 1993). Da sie zwischen kortikalen Arealen und zu subkortikalen Strukturen wie dem Thalamus Verbindungen herstellen, werden sie auch als Projektionsneurone bezeichnet (Douglas, 1998). Zu ihren definierenden Merkmalen zählen ein konikales Soma und mehrere Basaldendriten, ein apikaler Dendrit und Dornfortsätzen an den Dendriten. Des Weiteren ist ein Axon, das der Basis des Somas entspringt und zur weißen

Substanz zieht, charakteristisch für diese Zellklasse (Peters und Jones, 1984). Zu diesem Zelltyp zählen auch die sog. modifizierten Pyramidalzellen der Schicht II (Lamina granularis externa), deren apikale Dendriten kurz ausgeprägt oder gar nicht vorhanden sind und Pyramidalzellen der Schicht VI (Lamina multiformis), deren apikale Dendriten aus einer Seite des Zellkörpers oder aus den basalen Dendriten entspringen kann.

Neben diesen gemeinsamen Eigenschaften besitzen Pyramidalzellen Merkmale, aufgrund derer sie in spezifische Subklassen unterteilt werden (Keller, 1995). Pyramidalzellen, die zum gleichen kortikalen Areal projizieren, können aufgrund der laminären Verteilung ihrer Somata, dendritischen und axonalen Verzweigungsmuster (Katz, 1987), sowie spezifischen afferenten und intrinsischen synaptischen Verbindungen von anderen Pyramidalzellen unterschieden werden (Zusammenfassung in White, 1989). Außerdem können Pyramidalzellen in verschiedenen kortikalen Arealen aufgrund ihrer intrinsischen Membraneigenschaften in Subpopulationen eingeteilt werden (Keller, 1995). Aufgrund des spezifischen Musters von Aktionspotentialen nach einem depolarisierenden Reiz lassen sich regelmäßig feuernde (engl. regular-spiking) Pyramidalzellen von in kurzen Salven feuernenden (intrinsically-bursting), Pyramidalzellen unterscheiden (McCormick et al., 1993; Amitai und Connors, 1995). Die Korrelation der Formen von Dendritenbäume mit elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen hat zu der Annahme geführt, dass die Form des Dendritenbaumes ein Faktor sein könnte, der das Muster des Feuerverhaltens bedingt (Mainen und Sejnowski, 1996). Ein weiteres Kriterium nach dem Pyramidalzellen in Subpopulationen eingeteilt werden, sind ihre neurochemischen Eigenschaften. Einige Subpopulationen (ca. 30 %) der Pyramidalzellen exprimieren die kalziumbindenden Proteine Calbindin D-28k oder selten Parvalbumin (DeFelipe, 1993; DeFelipe, 1997). Im somatosensorischen Kortex der Ratte befindet sich Calbindin fast ausschließlich in Pyramidalzellen der Schichten II/III. Bisher ist unbekannt, warum nur bestimmte Pyramidalzellen diese Proteine besitzen (Keller, 1995).

Nichtpyramidalzellen des Kortex

Im Barrel Kortex der Ratte können prinzipiell zwei Typen der NP-Zellen unterschieden werden (Simons und Woolsey, 1984): Zellen des *Typ I* haben

kleine Somata und Dendriten mit Dornfortsätzen. Dies sind vor allem bedornte Sternzellen, die wie die Pyramidenzellen exzitatorisch sind. Zellen vom *Typ II* haben größere Somata und glatte Dendriten mit nur wenigen bzw. keinen Dornfortsätzen oder perlenförmigen Verdickungen. Dazu zählen Multipolar- und Bipolarzellen (Keller, 1995).

Dies entspricht der Einteilung nach DeFelipe (1997) in exzitatorische Sternzellen mit Dornfortsätzen (in den mittleren Schichten bzw. Schicht IV des Kortex) und in inhibitorische NP-Zellen ohne Dornfortsätze. Während *Typ I* Zellen L-Glutamat oder Aspartat als Neurotransmitter synthetisieren, enthalten die meisten, wahrscheinlich sogar alle der *Typ II* Zellen gamma-Aminobuttersäure (GABA) und sind damit inhibitorisch (Lin et al., 1985; Keller und White, 1986; Keller und White, 1987). Aufgrund der heterogenen Ausprägung vieler Merkmale der NP-Zellen lassen sich diese schwieriger in Subpopulationen einordnen. Hinsichtlich ihrer Morphologie ist eine größere Diversität an Merkmalen zu beobachten (Fairén et al., 1984; DeFelipe, 1993). Sie können aber vor allem aufgrund des Fehlens apikaler Dendriten und den nur selten vorhandenen dendritischen Dornen von Pyramidalzellen unterschieden werden (Peters und Jones, 1984).

Von den 54.900 Nervenzellen pro mm³ im somatosensorischen Kortex der Ratte (Ren et al., 1992) sind ca. 14.5 % der Zellen GABAerg (Beaulieu, 1993). Nach Peters und Jones (1984); Fairén et al. (1984) und Cobas und Fairén (1988) können diese Zellen in weitere Subtypen eingeteilt werden.

1.2.5 Klassifizierung inhibitorischer, GABAerger Neurone

Zahlreiche immunhistochemische Untersuchungen in verschiedenen Spezies zeigen, dass kortikale inhibitorische Interneurone in spezifische Subpopulationen hinsichtlich ihrer axonalen und dendritischen Morphologie, ihrer neurochemischen Eigenschaften (Demeulemeester et al., 1988; van Brederode et al., 1991; Demeulemeester et al., 1991) und aufgrund ihrer synaptischen Konnektivität klassifiziert werden können (DeFelipe, 1997).

Neurochemische Klassifizierung

Neurone, die kalziumbindende Proteine und/oder Neuropeptide enthalten, finden sich in allen Schichten (außer in Schicht I, der Lamina molecularis) aller

kortikale Areale und Spezies, wobei sich jedoch Proportion und Anzahl der Nervenzellen, die positiv für eine bestimmte Kombination an Markerproteinen sind, in den Schichten und Arealen innerhalb einer Spezies unterscheiden (van Brederode et al., 1990; DeFelipe, 1993; DeFelipe, 1997). Wie bereits bei den Pyramidalzellen angedeutet, können auch NP-Zellen aufgrund ihres Gehaltes an kalziumbindenden Proteinen, Parvalbumin, Calbindin-28K (CB) und Calretinin (CR) in Subpopulationen eingeteilt werden (Hendry und Jones, 1991; Demeulemeester et al., 1991; van Brederode et al., 1991; DeFelipe, 1993; Gonchar und Burkhalter, 1997).

Bisher ist ungeklärt, ob kalziumbindende Proteine als intrazelluläre Kalziumspeicher fungieren, ob sie neuronale Aktivität passiv modulieren oder eine aktive Rolle in der kalziumvermittelten Signaltransduktion spielen (Rogers und Resibois, 1992).

Im somatosensorischen Kortex der Ratte ergibt sich eine nahezu komplementäre laminäre und morphologische Parzellierung der NP-Zellen basierend auf dem Gehalt an diesen kalziumbindenden Proteinen, da CB und PV fast nie kolokalisiert sind (van Brederode et al., 1990; van Brederode et al., 1991).

Elektrophysiologische Klassifizierung

In letzter Zeit konnte gezeigt werden, dass im frontalen Kortex der Ratte Parvalbumin (PV), Calbindin (CB), Calretinin (CR) sowie Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) und Somatostatin (SOM) in Interneuronpopulationen exprimiert werden, die bestimmte morphologische und neurochemische Charakteristika aufweisen (DeFelipe, 1997) und sich auch elektrophysiologisch unterscheiden lassen (Kawaguchi und Kubota, 1993; Kawaguchi, 1995; Kawaguchi und Kubota, 1996; Kawaguchi, 1997; Cauli et al., 1997, 2000). Die Arbeiten von Kawaguchi und Kubota (1993, 1996) zeigen, dass im Frontalkortex der Ratte lokale Interneurone der Schichten II/III und V hinsichtlich ihrer Aktionspotentialentladungsmuster in schnell feuernde ("fast-spiking", FS), spät feuernde, ("late-spiking", LS), niedrighschwellig feuernde ("low-threshold spiking", LTS), regelmäßig feuernde ("regular-spiking", RS) und in kurzen Salven feuernde ("burst-spiking", BS) NP-Zellen eingeteilt werden können. Da es sowohl areal- als auch speziesbedingte Unterschiede der Zellpopulationen gibt (DeFelipe, 1997), können diese Befunde erste Hinweise

für eine multimodale Klassifizierung der Zelltypen auch im somatosensorischen System der Ratte liefern.

Klassifizierung aufgrund der Konnektivität

Inhibitorische Interneurone lassen sich auch durch ihre spezifische Afferenzierung bestimmter Kompartimente der Zielstrukturen (am Soma, an Dendriten oder an Axoninitialsegmenten) unterscheiden (Freund und Buzsaki, 1996; Thomson und Deuchars, 1997; Somogyi et al., 1998). Interessant ist, dass diese unterschiedliche Zielzellinnervation mit dem spezifischen Antwortverhalten der innervierenden Zellen auf intrazelluläre Stromapplikation korreliert. Interneurone, die in ihrem Feuerverhalten unterschieden werden können, projizieren diese Signalmuster also auf distinkte Kompartimente der Zielzellen.

Von verschiedenen Interneuronpopulationen innervierte Pyramidalzellen können dementsprechend hemmende Eingänge verschiedener Zeitverzögerungen und -verläufe an ihren Dendritenbäume integrieren.

1.2.6 Inhibitorische Interneurone in kortikalen Schaltkreisen

Interneurone bilden insgesamt eine heterogene Zellpopulation, die sich hinsichtlich der oben genannten Eigenschaften in spezifische Subpopulationen einteilen lassen. Umgekehrt wurde gezeigt, dass eine morphologisch charakterisierte Zelle eine Vielfalt an chemischen Charakteristika aufweisen kann, die von der Spezies, dem kortikalen Areal und der Schicht abhängen (DeFelipe, 1993). Da lokale Interneurone in spezifischen Schaltkreisen zu der laminären und kolumnären Informationsverarbeitung beitragen (DeFelipe, 1997), gibt die Erfassung der Interkonnektivität morphologisch und neurochemisch charakterisierter Zellen Aufschluss über die kortikale Informationsverarbeitung. Inhibitorische Interneurone stellen grundlegende Elemente in neuronalen Schaltkreisen dar, da sie komplexe Interaktionen zwischen Pyramidalzellen regulieren und in der kortikalen Entwicklung, bei neuronaler Synchronisation und bei plastischen Prozessen, auch im Sinne von Lernen und Gedächtnisbildung, eine entscheidende Rolle spielen (Freund und Buzsaki, 1996).

Durch kombinierte ultrastrukturelle, neuropharmakologische und elektrophysiologische Experimente kann insbesondere die integrierte Aktivität

zwischen lokalen inhibitorischen Schaltkreisen und deren Einfluss auf die Aktivität von Pyramidalzellen untersucht werden. Da PV, CB und CR positive Zellen eine jeweils weitgehend nicht-überlappende (Interneuron-) Population darstellen (van Brederode et al., 1991; DeFelipe, 1997; Frotscher, 1992; Gonchar und Burkhalter, 1997), kann der Nachweis dieser kalziumbindenden Proteine hervorragend für die Untersuchung spezifischer Schaltkreise genutzt werden (Freund, 1989; Blümcke et al., 1990; Kiss et al., 1990; Freund et al., 1990; Baimbridge, et al. 1992). Obwohl eine gewisse Überlappung der Subpopulationen, die kalziumbindende Proteine und/oder Peptide exprimieren, in verschiedenen Arealen und Spezies zu beobachten ist (DeFelipe, 1997), sind Dichte und laminäre Verteilung der immunreaktiven Zellen, deren Fortsätze und axonalen Boutons in verschiedenen Arealen charakteristisch für eine bestimmte Subpopulation an Interneuronen, was darauf hinweist, dass diese Zellpopulationen in verschiedenen neuronalen Systemen vorhanden sind (van Brederode et al., 1991; DeFelipe, 1997).

Im Folgenden soll auf zwei neurochemisch unterscheidbare Zelltypen der GABAergen Interneurone näher eingegangen werden, da ihre Interkonnektivität bisher noch nicht im Barrel Kortex untersucht wurde und diese Analyse einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt.

1.3 VIP-positive Neurone im Barrel Kortex als vertikale Komponenten interlaminärer Signalverarbeitung einer Kolumne

In einer bestimmten Subpopulation GABAerger Zellen im zerebralen Kortex wurde das Neuropeptid VIP mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen (Said und Rosenberg, 1976). Ungefähr 3 % aller Nervenzellen des Neokortex sind VIP-positiv (Fuxe et al., 1977; Rogers, 1992).

VIP ist hauptsächlich in Bipolarzellen der supragranulären Schichten lokalisiert, deren Fortsätze überwiegend radial orientiert sind (Connor und Peters, 1984; Morrison et al., 1984; Hajos, et al., 1988a; Staiger et al., 1996b). VIP kann darum als Marker für überwiegend bipolare Interneurone angesehen werden, deren Axonterminalien wahrscheinlich immer GABA ausschütten und über GABA_A und GABA_B Rezeptoren Einfluss auf die postsynaptische Zielzelle

ausüben. Diese Bipolarzellen und Double-Bouquet-Zellen, die allerdings bisher nicht in Nagetieren nachgewiesen wurden, zeigen lange, meist absteigende Hauptaxone und Kollateralen (Peters, 1984; Somogyi und Cowey, 1984; Kawaguchi und Kubota, 1996). Ein weiterer charakteristischer Zelltyp sind die Arkadezellen, die mit ihrem im dendritischen Bereich aufsteigenden Axonen überlappende Kollateralen bilden (Jones, 1975; Kawaguchi und Kubota, 1996). Viele dendritischen Verzweigungen der VIP-Neurone reichen bis in die Schichten I und V (Lamina pyramidalis interna), während die axonalen Boutons sich in den Schichten I, II, und IV häufen, was für eine nicht zufällige Verteilung der Axonterminalien spricht (Hajos et al., 1988b). Die radiale Orientierung der Dendriten, die zum Teil alle Schichten des Kortex durchlaufen und die vertikale Orientierung der Axone (Connor und Peters, 1984), könnten strukturelle Korrelate der funktionellen kortikalen Kolumne sein (Morrison et al., 1984; Zilles et al., 1993). Es kann daher angenommen werden, dass diese Zellen in der Lage sind, neuronale Aktivität zwischen verschiedenen Schichten innerhalb einer vertikalen Kolumne zu vermitteln und darüber deren Synchronisation zu fördern. Bayraktar et al. (2000) konnten zudem eine schichtenspezifische und arealdefinierte Verteilung der Dendriten und Axonkollateralen zeigen. Demnach verzweigen sich die Axone der Zellen in den Schichten II-Va innerhalb ihres Barrels, während die Axone der Zellen, die in den Schichten Vb und VI lokalisiert sind, auch in benachbarte Barrelkolumnen ziehen können. Dies bestätigt die Annahme, dass interlaminäre, intrinsische Signalwege präferentiell innerhalb einer Barrelkolumne bestehen (White, 1989). Es zeigt aber auch, dass VIP-Zellen zwischen benachbarten Barrels inhibitorische Effekte vermitteln können.

1.3.1 Konnektivität

Schon aus früheren Golgi-Studien ist bekannt, dass bipolare Zellen, die eine Subpopulation aller GABAergen Zellen repräsentieren und zu denen wahrscheinlich auch eine Subpopulation VIP-positiver Zellen gerechnet werden muss, meist lokale intrakortikale Verbindungen eingehen (Loren et al., 1979; Feldman und Peters, 1978).

Synaptische Eingänge an VIP-positiven Interneuronen

Bisher liegen für VIP-Interneurone quantitative Daten nur über deren Afferenzierung vor. Es wurde nachgewiesen, dass die Population VIP-immunreaktiver Zellen in supragranulären Schichten zu 22.4%, in der granulären Schicht zu 73.7% und in infragranulären Schichten zu 17.4% direkte synaptische thalamokortikale Eingänge erhalten (Staiger et al., 1996b). Da VIP-Zellen hauptsächlich eine bipolare Morphologie ausprägen und eine Subpopulation der Bipolarzellen bilden, entspricht dies Ergebnissen vorheriger Golgi-Studien der Bipolarzellen (Peters und Kimerer, 1981). Die Innervation der VIP-Zellen erfolgt insbesondere in der Schicht III (Lamina pyramidalis interna) in Form von multiplen synaptischen Verknüpfungen zwischen den präsynaptischen thalamischen Boutons und den postsynaptischen VIP-positiven Zellen. Bisher ist bezüglich der Afferenzierung der VIP-Interneuronpopulation im somatosensorischen Kortex der Ratte auch bekannt, dass sie regelmäßig durch PV-positive Axonterminalien, oft in Form charakteristischer Körbe um das Soma und an proximalen Dendriten innerviert werden, wobei bis zu 20 perisomatische Kontakte an einer VIP-Zelle beobachtet werden können. Diese Studien konnten sowohl exzitatorische Eingänge aus dem Thalamus als auch inhibitorische Eingänge von lokal verschalteten Interneuronpopulationen auf den gleichen Zielzellen, nämlich VIP-positiven Interneuronen, belegen. (Staiger et al., 1997). Im visuellen Kortex der Ratte ließen sich ausschließlich asymmetrische Synapsen auf VIP-positiven Dendriten nachweisen (Hajos et al., 1988b), während die Somata viele symmetrische Eingänge integrieren. Glutamaterge Eingänge von Pyramidalzellen konnten elektrophysiologisch durch gepaarte Zellableitungen nachgewiesen werden (Porter et al., 1998; Rozov et al., 2001).

Da diese Interneuronpopulation, wie auch Parvalbumin-positive Zellen (Staiger et al., 1996b), im somatosensorischen Kortex direkt in den Schichten IV, III und II durch den VPM innerviert werden, könnten sie an den frühen Stadien der sensorisch/taktilen Informationsverarbeitung im Barrel Kortex beteiligt sein (Staiger et al., 1997). Aufgrund ihrer Morphologie und Orientierung, d.h. dendritische und axonale Verzweigungen innerhalb und zwischen kortikalen Kolumnen, könnten sie zudem Informationen mehrerer kortikalen Schichten integrieren und die Formung rezeptiver Felder zwischen Kolumnen

beeinflussen. Für das Verständnis der Informationsverarbeitung innerhalb einer Kolumne ist es nicht nur wichtig, die Zielzellen thalamischer Afferenzen zu identifizieren, sondern auch die Grundlagen der nachfolgenden, intrakortikalen Informationsverarbeitung zu entschlüsseln.

Efferenzen VIP-positiver Zellen

Eine bereits identifizierte Zielstruktur VIP-positiver Zellen sind andere VIP-positive Zellen, so dass aufgrund der elektronenmikroskopisch nachgewiesenen symmetrischen Synapsen auf eine hemmende Interkonnektivität dieser Population geschlossen werden kann (Connor und Peters, 1984; Staiger, 2000). Des Weiteren findet sich eine eher spärliche Projektion VIP-positiver Neuronen auf eine Interneuronpopulation, die durch die Expression von PV gekennzeichnet ist, so dass VIP- und PV-positive Neurone zwar reziprok aber nicht gleichwertig miteinander verschaltet zu sein scheinen (Staiger, 2000). Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist weiter bekannt, dass VIP-positive Axone symmetrische Synapsen mit dünnen oder mitteldicken Dendriten und Somata bisher nicht näher charakterisierter Zellen, vermutlich aber Interneuronen formen (Connor und Peters, 1984; Hajos et al., 1988b).

Ebenso gibt es Hinweise, dass sie symmetrische Synapsen an Dornfortsätzen ausbilden (Peters et al., 1987; Hajos et al., 1988b). Elektronenmikroskopisch wurde ebenso die Innervation vom Pyramidalzellkörper gezeigt (Connor und Peters, 1984; Hajos und Zilles, 1988). Andere Autoren (Connor und Peters, 1984) dagegen konnten keine VIP-positiven Axonterminalien an Dornfortsätzen von Pyramidalzellen nachweisen. Eine einzige Studie beschrieb dagegen asymmetrische axo-dendritische Kontakte VIP-positiver Terminalien im Kortex (Pelletier et al., 1981). Diese Untersuchungen geben zwar allgemeine Hinweise auf mögliche Zielstrukturen, jedoch wurden die Zielzellen bisher nicht näher morphologisch oder neurochemisch charakterisiert und sie widersprechen sich hinsichtlich der Charakterisierung der synaptischen Strukturen (asymmetrisch oder symmetrisch).

1.3.2 Physiologische Eigenschaften des VIP

Neben der anatomischen Identifizierung der synaptischen Eingänge ist es insbesondere für die Efferenzen der VIP-positiven Interneurone entscheidend zu verstehen, welche neurochemischen Effekte VIP hat, um die Informationsverarbeitung innerhalb einer kortikalen Kolumne aufschlüsseln zu können.

VIP gehört zur Familie der Sekretine (Kandel et al., 1996) und besteht aus 28 Aminosäuren, deren Sequenz der von Sekretin und Glukagon ähnelt (Mutt und Said, 1974; Ishihara et al., 1992).

VIP ist im somatosensorischen Kortex immer mit GABA kolokalisiert und markiert folglich eine Subpopulation inhibitorischer Interneurone mit vorwiegend bipolarer Morphologie (Bayraktar et al., 1997; Motor Kortex: Kubota et al., 1994 und Cauli et al., 2000). Bezogen auf die laminäre Kolokalisation sind 24% aller GABAergen Neurone in den Schichten II/III, 16% in Schicht V sowie 24 % in Schicht VI auch VIP-positiv (Kubota et al., 1994). Des Weiteren enthalten VIP-positive, meist bipolare Neurone zu 34% das Acetylcholin-synthetisierende Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) (Bayraktar et al., 1997). Demnach gehört eine Subpopulation VIP-positiver Interneurone zu einer Population, in der mindestens zwei klassische Neurotransmitter, in diesem Fall GABA und Acetylcholin, kolokalisieren. Elektrophysiologisch lassen sich VIP-Zellen durch ihr unregelmäßiges Antwortverhalten charakterisieren (Porter et al., 1998).

Bisher wurden für VIP sehr vielfältige Einflüsse sowohl auf Nervenzellen als auch auf Gliazellen beschrieben (Chneiweiss et al., 1985). VIP hat Einfluss auf den kortikalen Metabolismus, indem es die Glykogenolyse (Magistretti et al., 1981; Tsacopoulos und Magistretti, 1996) und die cAMP-Produktion in mehreren Hirnregionen stimuliert (Quik et al., 1978). Ishihara et al. (1992) konnten zeigen, dass VIP nach Bindung an den Rezeptor die Adenylat-Zyklase stimuliert. Die blutflussregulierenden Effekte (Said und Mutt, 1970; Chedotal et al., 1994) wurden aufgrund der interlaminären Organisation der VIP-positiven Zellen als ein anatomisches Korrelat für die Kopplung des Metabolismus an die kortikale Aktivität innerhalb der Kolumnen interpretiert (Emson und Marley, 1985). Auf synaptischer Ebene wurde nachgewiesen, dass VIP aktivitäts- und kalziumabhängig freigesetzt wird (Giachetti et al., 1977; Emson et al., 1978; Wang et al., 1985), und verschiedene Parameter der synaptischen

Reizübertragung beeinflusst (Ferron et al., 1985; Sessler et al., 1991; Murphy et al., 1993).

Der VIP-Rezeptor besteht aus 459 Aminosäuren (Mr 52.054) und enthält sieben Transmembranbereiche. Er ist strukturell den Rezeptoren für Sekretin, Calcitonin und dem Parathyroid-Hormon verwandt und gehört folglich zu der Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Ishihara et al., 1992). Ferner zeigen VIP und PACAP eine hohe Sequenzhomologie und einige gemeinsame Rezeptoren, nämlich PACAP II VIP1 (Ishihara et al., 1992) und PACAP II VIP2 (Lutz et al., 1993).

Neben diesen Einflüssen reguliert VIP den Zelltod und die Differenzierung von retinalen Ganglienzellen (Kaiser und Lipton, 1990). Es beeinflusst die neokortikale Astrozytogenese vermutlich durch Interaktion mit dem PACAP II VIP 2 Rezeptor (Zupan et al., 1998). In Astrozytenkulturen stimulieren VIP und PACAP in subnanomolarer Konzentration die Akkumulation von intrazellulärem Kalzium und erhöhen den Gehalt an Inositolphosphaten (Fatatis et al., 1994). Auch eine neuroprotektive Wirkung gegen exzitotoxischen Zelltod wird diskutiert (Gressens et al., 1997). Weitere Wirkungen von VIP sind die trophischen Effekte während der Embryogenese (Pincus et al., 1994) und die Induktion von Transkriptionsfaktoren (Martin et al., 1995).

1.3.3 VIP als Neurotransmitter?

Da es sogar für allgemein als Neurotransmitter akzeptierte Substanzen oft schwierig ist, ihre Transmitterfunktion zu zeigen, stuft man eine Substanz nach Kandel et al. (1996) nur dann als Neurotransmitter ein, wenn sie die folgenden vier Kriterien erfüllt:

- Synthese in Neuronen.
- Lokalisation in der präsynaptischen Endigung und Freisetzung in genügend großer Menge, um eine bestimmte Wirkung am postsynaptischen Neuron oder Effektororgan hervorzurufen.
- die Stimulation des präsynaptischen Weges und die Applikation des exogenen Peptids sollten die gleichen Charakteristika und die gleiche Pharmakologie zeigen (d.h. es werden in der postsynaptischen Zelle die gleichen Ionenkanäle oder Botenstoffe aktiviert).

- Die Wirkung des Transmitters wird über spezifische Rezeptoren vermittelt
- Es gibt einen spezifischen Mechanismus, um die Substanz vom Wirkungsort (dem synaptischen Spalt) zu entfernen.

Zur Signalübertragung an Synapsen werden hauptsächlich niedermolekulare Transmitter und neuroaktive Peptide, kurze Aminosäureketten, benutzt. Im Gegensatz zu den klassischen Transmittern, die direkt in den Axonterminalien synthetisiert werden können, stammen neuroaktive Peptide von Vorläuferproteinen ab, die im Zellkörper gebildet werden und dann, in Vesikeln verpackt, zum Axonende transportiert werden. Zusätzlich zu ihrer Wirkung als Hormon fungieren diese Peptide auch als Transmitter, wenn sie dicht neben ihrem Bestimmungsort freigesetzt werden, so dass sie drei der genannten Kriterien erfüllen (Kandel et al., 1996).

Auch wenn VIP als Neuropeptid nicht alle Kriterien eines klassischen Transmitters erfüllt, gibt es Hinweise, dass VIP eine wichtige Rolle als neuromodulatorische Substanz einnimmt (Quik et al., 1979; Fahrenkrug, 1993). VIP ist in Neuronen lokalisiert (Giachetti et al., 1977; Loren et al., 1979) und zeigt eine selektive Verteilung in bestimmten Gehirnarealen (Said und Rosenberg, 1976). Für VIP wurden spezifische Bindungsstellen im zerebralen Kortex nachgewiesen (Taylor und Pert, 1979); zudem gibt es eine räumliche Assoziation zwischen der VIP-Immunreaktivität (IR) und VIP-Rezeptorlokalisierung (Csillag et al., 1993). Im Gegensatz zu klassischen Transmittern werden Neuropeptide jedoch im Zellkörper synthetisiert und oft in "large dense core" Vesikeln gespeichert. Während die Ausschüttung der niedermolekularen Transmitter rasch und anhaltend erfolgen kann, da die Vesikel sehr schnell wieder mit Transmitter aufgefüllt werden können, müssen Peptide erst vom Zellkörper nachgeliefert werden. Für VIP konnten erregende Effekte auf ZNS-Neurone nach iontophoretischer Applikation gezeigt werden (Phillis et al., 1978). Haas und Gähwiler (1992) beschrieben, dass die Erregbarkeit kortikaler Zellen durch VIP verstärkt, während sie in anderen Studien (in Pyramidalzellen) erniedrigt wurde (Pawelzik et al., 1992; Murphy et al., 1993).

Da VIP erregende und hemmende Antworten kortikaler Neurone bei Applikation von GABA und Acetylcholin (ACTH) im somatosensorischen Kortex erhöht

(Sessler et al., 1991), kann der Effekt von VIP als modulatorisch bezeichnet werden. Diese Modulation bestehender Nervenzellsignalübertragungen wurde im visuellen Kortex im Zusammenhang einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und der Richtungsselektivität diskutiert (Murphy et al., 1993). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass VIP im zentralen Nervensystem diverse Effekte auf verschiedene Zielstrukturen ausübt. Neben einer regulierenden Rolle im Neuroendokrinen-System und einer Funktion als Modulator des Blutflusses und der metabolischen Aktivität, bleibt aber die physiologische Funktion des intraneuronalen VIPs immer noch unklar (Abrams et al., 1985).

1.4. Calbindin-positive Interneurone - eine heterogene Population

Kalziumbindende Proteine gehören zu einer Gruppe homologer Proteine, die eine charakteristische Struktur für die Bindung von Kalzium besitzen. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Calmodulin, Calbindin D-28K, Calretinin und Parvalbumin (Cheung, 1980; Andressen et al., 1993). Kalziumbindende Proteine können durch immunhistochemische Methoden in den Neuronen, die sie exprimieren, in einer Golgi-artigen Weise dargestellt werden (van Brederode et al., 1991; Rogers und Resibois, 1992; Rogers, 1992) und visualisieren so teilweise ganze funktionelle Systeme (Celio, 1990).

1.4.1 Zelltypen

Die vorwiegend vertikal orientierten CB-positiven Zellen stellen ungefähr 5% der Gesamtpopulation der neuronalen Zellen dar (Celio, 1990). Die supragranulären Pyramidalzellen werden durch immunhistochemischen Nachweis von CB nur leicht, während Interneurone regelmäßig stark angefärbt werden (van Brederode et al., 1990). Zu den CB-exprimierenden Zellen gehören u.a. Double-Bouquet-Zellen beim Menschen und Affen, Martinottizellen, neurogliaforme Zellen und eine Subpopulation der Pyramidalzellen der Schichten II und III (DeFelipe, 1997). CB-positive Pyramidalzellen wurden in allen Spezies beschrieben (DeFelipe, 1997). Im

Neokortex der Ratte konnte die typische Morphologie der Double-Bouquet-Zellen durch Markierung der kalziumbindenden Proteine bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund der Expression in Pyramidalzellen kolokalisieren CB-positive Zellen nur zu ca. 12-30% GABA (DeFelipe, 1997), während PV-positive Zellen fast immer auch als GABAerge Interneurone klassifiziert werden können und 70% der GABAergen Interneuronpopulation bilden. Die große Variabilität der Kolokalisation von GABA und CB kann also auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die heterogene Population CB-positiver Zellen aus Interneuronen und Pyramidalzellen besteht und es Unterschiede zwischen den Spezies bezüglich der Kolokalisation verschiedener kalziumbindender Proteine gibt.

1.4.2 Konnektivität

Bisher ist noch relativ wenig über die Afferenzierung der Zellen, die kalziumbindende Proteine exprimieren, bekannt (DeFelipe, 1997).

Afferenzen CB-positiver Neurone

Hornung und Celio (1992) konnten im Neokortex von Primaten die Innervation CB-positiver Neurone durch Serotonin (5-HT) -immunreaktive axonale Strukturen nachweisen. Im Neokortex von Ratten identifizierten Freund und Meskenaite (1992) GABAerge Projektionen des basalen Vorderhirns auf Somata und proximale Dendriten CB-positiver Interneurone.

Neben diesen subkortikalen Afferenzen konnte die Innervation CB-positiver Interneurone durch CR-positive NP-Zellen im medialen Präfrontalkortex von Affen, speziell an primären und sekundären Dendriten, gezeigt werden (Gabbott und Bacon, 1996).

Efferenzen CB-positiver Neurone

Beim Primaten und Menschen bilden die bisher nur in diesen Spezies nachweisbaren CB-immunreaktiven Double-Bouquet-Zellen Synapsen mit dendritischen Dornfortsätzen von Pyramidalzellen. Andere CB-positive Zelltypen kontaktieren mit ihren axonalen Terminalien auch Somata und Dendriten der Pyramidalzellen. Für Chandelier-Zellen wurde beim Menschen die für diese Zellklasse typische Afferenzierung der Axoninitialsegmente der

Pyramidalzellen belegt (Zusammenfassung in DeFelipe, 1997). In allen Fällen konnten die Synapsen als symmetrisch klassifiziert werden (s.u.).

1.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der synaptischen Konnektivität

Im zerebralen Kortex sind die meisten Synapsen keine elektrischen, sondern chemische Synapsen, die durch Botenstoffe die Kommunikation zwischen den Nervenzellen vermitteln (Peters und Jones, 1984). Als Neurotransmitter spielen hauptsächlich Acetylcholin, Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat und GABA, biogene Amine wie Catecholamine, Serotonin und Histamin, und Neuropeptide eine Rolle in der Informationsübertragung. Sie vermitteln über spezifische Rezeptoren erregende oder hemmende Signale auf die postsynaptischen Strukturen. Innerhalb der postsynaptischen Zelle wiederum werden Ionenkanäle und/oder intrazelluläre Botenstoffe wie cAMP, Phosphatidylinositol und intrazelluläres Kalzium aktiviert (Andressen et al., 1993). Zielmoleküle dieser intrazellulären Signalkaskaden sind wiederum Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, G-Proteine und kalziumbindende Proteine. Die elektronenmikroskopische Untersuchung neurochemisch charakterisierter Nervenzellpopulationen liefert morphologisch den eindeutigen Nachweis der synaptischen Natur der Kontakte und kann Aufschluss über die Art der synaptischen Übertragung, nämlich exzitatorisch versus inhibitorisch, geben.

Die zwei wesentlichen Merkmale einer Synapse werden aufgrund spezifischer ultrastruktureller Charakteristika identifiziert (Peters und Palay, 1996).

- 1.) Das präsynaptische Element wird durch den Gehalt an synaptischen Vesikeln in unmittelbarer Nähe der synaptischen Verdichtung (aktive Zone) und den häufig sichtbaren Mitochondrien charakterisiert.
- 2.) Die Identifizierung des synaptischen Spaltes als ein wesentliches Kriterium zur Identifizierung einer Synapse erfolgt durch den Nachweis der prä- und postsynaptischen Verdichtungen an den zytoplasmatischen Außenseiten, welche einen 20 und 30 nm weiten interzellulären Raum zwischen einander ausbilden.

Nach DeFelipe et al. (1999) werden prinzipiell zwei Strategien verfolgt, um synaptische Strukturen eindeutig zu identifizieren: nach der "eindeutigeren"

Methode werden Strukturen als synaptischer Kontakt bestimmt, wenn sie einen identifizierbaren synaptischen Spalt mit prä- und postsynaptischer Membranspezialisierung und mit synaptischen Vesikeln in der Präsynapse aufweisen. Nach der zweiten Strategie werden Strukturen als Synapse gewertet, wenn sie synaptische Vesikel im präsynaptischen Element zeigen, unabhängig davon, ob ein synaptischer Spalt identifizierbar ist.

Im zerebralen Kortex können zwei Arten von Synapsen, nämlich *Typ I* und *Typ II* nach Gray (1959), entsprechend den asymmetrischen und symmetrischen Synapsen nach Colonnier (1968), unterschieden werden. Grays Klassifizierung basiert auf der Ausprägung des elektronendichten Materials in unmittelbarer Nähe der prä- und postsynaptischen Membran. *Typ I* Synapsen besitzen eine dickere postsynaptische als präsynaptische Dichte, die ihnen ein asymmetrisches Aussehen verleiht. *Typ II* Synapsen besitzen etwa gleich dicke prä- und postsynaptische Verdichtungen, weshalb sie auch als symmetrisch bezeichnet werden (Douglas, 1998). Ein weiterer Unterschied dieser beiden Typen ist die Größe des synaptischen Spaltes. Bei asymmetrischen Synapsen beträgt er ca. 80 nm, während bei symmetrischen Synapsen kleinere Abstände zwischen der Prä- und der Postsynapse zu finden sind (Peters und Jones, 1984).

Es wird angenommen, dass asymmetrische Synapsen die erregenden und symmetrische Synapsen die inhibitorischen Synapsen repräsentieren (**Abb. 5**) (White, 1989; DeFelipe et al., 1999). Alle Axonterminalien einer Zelle prägen dabei nur einen Typ der beiden Synapsen aus (Peters und Jones, 1984).

<u>Typ I / asymmetrisch (exzitatorisch)</u>	<u>Typ II / symmetrisch (inhibitorisch)</u>
Spaltbreite ca. 30 nm	Spaltbreite ca. 20 nm
prominente postsynaptische Verdichtung	weniger prominente Verdichtung
große sphärische Vesikel	kleinere ovale Vesikel

Abb. 5: Morphologische Kriterien, nach denen Synapsen ultrastrukturell klassifiziert werden können.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen können nicht nur eindeutig das Vorhandensein und die Art der synaptischen Kontakte, sondern auch andere Charakteristika der Interneurone identifiziert werden. An GABAergen Neuronen lassen sich symmetrische Kontakte (*Typ II*) an Zellkörpern und proximalen Dendriten nachweisen (Peters und Palay, 1996). Die Dendriten

inhibitorischer Zellen weisen selten Dornfortsätze auf und erhalten erregende und hemmende Eingänge. Das Soma inhibitorischer Zellen enthält große Mengen an rauhem endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen und der Nukleus zeigt tiefe Einfaltungen. Die Vesikel der Axonterminalien sind klein und oval und die Synapse lässt sich als symmetrisch charakterisieren. Im Gegensatz dazu erhalten Pyramidalzellen an ihrem Somata nur symmetrische, inhibitorische Kontakte, aber an ihren Dendriten symmetrische und asymmetrische Synapsen (Peters und Jones, 1984). Die Dornfortsätze bilden meist eine asymmetrische und einige (7% der Dornfortsätze; Douglas, 1998) zusätzlich eine symmetrische Synapsen mit präsynaptischen Elementen aus. Die Axonterminalien der Pyramidalzellen lassen sich als asymmetrisch klassifizieren und die Vesikel sind im Vergleich zu den symmetrischen Synapsen groß und sphärisch. Im Durchschnitt beträgt die Länge der synaptischen Verbindungen im Neokortex verschiedener Spezies 0,2 bis 0,35 μm (DeFelipe et al., 1999). Durch lichtmikroskopische Untersuchungen können spezifische Zellpopulationen neurochemisch und morphologisch charakterisiert werden. Jedoch liefert bisher nur die Elektronenmikroskopie die notwendigen ultrastrukturellen Details, um eine funktionelle synaptische Konnektivität zwischen Zellen eindeutig nachzuweisen und Synapsen als symmetrisch oder asymmetrisch zu charakterisieren.

2. Ziel der Untersuchungen

Um Wege der Informationsverarbeitung in neuronalen Schaltkreisen mittels detaillierter Struktur-Funktionsbeziehungen hinreichend zu beschreiben, müssen neben den elektrophysiologischen Eigenschaften auch deren morphologische Korrelate untersucht werden. Eine wichtige Fragestellung ist die quantitative Erfassung der strukturellen Grundlagen der Konnektivität, speziell der synaptischen Verschaltung spezifischer Zellpopulationen. Während die Position bestimmter Nervenzellen in neuronalen Schaltkreisen auf lichtmikroskopischer Ebene untersucht werden kann, erfordert der Nachweis synaptischer Interaktionen individueller Zellen die Untersuchung des Gewebes auf ultrastruktureller Ebene mit dem Elektronenmikroskop (Bolam, 1992).

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in welche inhibitorische und exzitatorische Schaltkreise VIP-positive Zellen eingebunden sind, müssen deren potentiellen Zielstrukturen identifiziert werden. Für diese Fragestellung eignet sich die Darstellung immunhistochemisch charakterisierter Zellpopulationen und die Untersuchung der synaptischen Konnektivität mittels der korrelierten Licht- und Elektronenmikroskopie. Ein weiteres Ziel der Arbeit war zu überprüfen, ob sich die widersprüchlichen Ergebnisse bzgl. der Innervation von Pyramidalzellen, speziell an Dornfortsätzen (Hajos et al., 1988b) mittels hierfür weiterentwickelter Methoden aufklären lassen. Für diese Fragestellung wurde die intrazelluläre Farbstoffinjektion in fixiertes Gewebe etabliert und für die Untersuchung im Elektronenmikroskop optimiert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich damit, spezifische Zielpopulationen darzustellen und zu ermitteln, ob VIP-positive Axonendigungen bestimmte morphologische und/oder neurochemisch identifizierbare Zellpopulationen präferenziell kontaktieren und ob sich diese Afferenzierung in Beziehung zur interlaminären Signalverarbeitung setzen lässt.

3. Material, Versuchstiere und Methoden

3.1 Material

Reagenzien für die Immunhistochemie:

Primärantikörper: polyklonaler anti-VIP aus Kaninchen (r- α -VIP), hergestellt von Dr. Göröcs; (Gulyas et al., 1990); monoklonaler anti-Calbindin-D-28K (m- α -CB) aus Maus, von der Fa. Sigma (C8666, St.Louis, MO; USA).

Sekundärantikörper und Fluorochrome: Streptavidin-konjugiertes Alexa 488 und 594 von d

er Fa. Molecular Probes (Eugene, Niederlande); Cy3- und Cy2-(Carbocyanine) gekoppelte anti-Kaninchen- und anti-Maus-Antikörper (AK) aus Ziege von der Fa. Dianova (Hamburg).

Normales Ziegen Serum (Normal Goat Serum, NGS); Normales Pferde Serum (Normal Horse Serum, NHS); biotinylierter anti-Kaninchen-AK aus Esel und biotinylierter anti-Maus-AK aus Esel; Vectastain ABC Kit, von der Fa. Vector Laboratories (Burlingame, USA).

Triton X-100 und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) von der Fa. Sigma (St.Louis, MO; USA).

Sonstige Chemikalien/ Materialien:

Einmalspritzen von der Fa. Dahlhausen (Köln).

Sterile Kanülen von der Fa. Becton und Dickinson (Dublin, Irland).

DPX-Eindeckmedium für Histologie; Ammonium-nickelsulfat Hexahydrat; Durcupan ACM, von der FA. Fluka (Buchs, Schweiz).

Objektträger und Deckgläser von der Fa. Menzel-Gläser (Braunschweig).

Glaselektroden GB 150F-8P von der Fa. Science products (Hofheim).

Natriumchlorid (NaCl); Chrom-(III)-Kaliumsulfat; Saccharose; Xylol; Pikrinsäure; Wasserstoffperoxid; Gelatine; Natriumdihydrogensulfat; Polyethylenglycol 200; Pentobarbital; Chloroform; Uranylacetat-Dihydrat; Glycerol (ca. 87%); Acrolein (ca. 95%); 1,2-Propylenoxid; di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und Natriumhydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) von der Fa. Merck (Darmstadt).

Pioloform F Pulver; Kupfergrids (G2500C), 2mmx1mm Slot, Copper 3.05 mm; Osmiumtetroxid, von der Fa. Plano (Wezlar).

Liquemin N5000 von der Fa. Hoffmann-LaRoche (Grenzach-Wyhlen).

Lucifer Yellow-Di-Lithium Salz (LY); Micro-ruby (MR) von der Fa. Molecular Probes (Eugene, Niederlande).

Formvar (F-6146); β -D(+) Glucose; Natriumborhydrid (NaBH_4); TRIS-Puffer von der Fa. Sigma (Deisenhofen).

3.1.1 Herstellung der Gebrauchslösungen

Phosphatpuffer 0.2M PB 7.4; 1l:

42.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bzw. 28.48g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in 800ml H_2O dest. und 8.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 300 ml H_2O dest. gelöst; zu der Säure-Lösung wird soviel basische Lösung gegeben, bis ein pH-Wert von 7.4 eingestellt ist.

0.05M TRIS-Puffertabelle (TB-Puffer):

pH	Volumen	TRIZMA Hydrochlorid (g)	TRIZMA-Base (g)
7.4	1000 ml	6.6	0.97
7.6	1000 ml	5.3	1.97
8.1	500 ml	2	1.485

Für TBS wurde der Pufferlösung 0.9 % (w/v) NaCl beigefügt.

Narkoselösung: 1 g Pentobital werden in 1 ml Polyethylenglycol 200 (20%) und 9 ml sterilem H_2O aufgelöst.

Heparin-NaCl: 0.9% (w/v) NaCl in Aqua dest. und 0.5 ml Liquemin /500 ml Lösung.

PFA- Zamboni-Fixativ (gepuffertes 4 %iges Paraformaldehyd mit Pikrinsäure nach Stefani et al., 1967):

0.1 M PB, pH 7.4

0.2% (v/v) gesättigte Pikrinsäure

4% (w/v) Paraformaldehyd

Chromalaungelatine:

0.5% (w/v) Gelatine und 0.1% (w/v) Chromalaun in Aqua dest. lösen, auf 60 °C erhitzen, filtern und bei 4°C aufbewahren.

Material zur Gridträgerfilmherstellung: 1% (w/v) Pioloform in Chloroform.

Osmiumtetroxid (2% Stammlösung): Eine Ampulle Osmiumtetroxid (1g) wurde in 50 ml Aqua dest. in einer Glasflasche gelöst.

3.1.2 Geräte:

NeuroLucidakomponenten: Nikon Mikroskop Eclipse E 800, Nikon (Düsseldorf) mit XYZ-motorisiertem Mikroskoptisch, Steuergerät und Joystick; 3-CCD Farbkamera, Hitachi Denshi, Ltd.; Horizontale Auflösung 700 TV Linien; GenuineIntel Computer mit Pentium III Prozessor und 384 MB RAM Arbeitsspeicher; erster Monitor: Hansol Electronics Mazellan 700P, verbunden mit Grafikkarte FlashPoint Intrigue v1.4 und zweiter Plug & Play Monitor von Sony verbunden mit Grafikkarte Diamond Viper V550 für Windows 98.

Software: NeuroLucida Version 3 von der Fa. MicroBrightField, Inc. (Colchester, VT, USA; <http://www.microbrightfield.com>).

Weitere Geräte:

Ultramikrotom UCT Leica (Wien); Mikromanipulator DC3001R, Mikroelektrodenhalter; MS314 Kontrolleinheit und Magnetstativ M10 von der Fa. Maerzhäuser (Wetzlar); Iontophoreseeinheit HVCS0210 von der Fa. npi electronic (Tamm); Axioplan Durchlicht- und Auflicht-Fluoreszenzmikroskop, Zeiss (Jena) mit der UV-Quelle HBO 100W/2 Atto ArcTM; Filtersätze von Zeiss: 05 (BP 395-440, FT 460, LP 470); 15 (BP 546, FT 580, LP 590); 10 (BP 450-490, FT 510, LP 515-565); 25 (TBP 400/495/570, FT 410/505/585, TBP 460/530/610); Mikropipettenpuller (Model P-87/PC, Sutter Instruments, Novato, CA); Leica Vibratom VT 1000S von Leica (Nussloch); Elektronenmikroskop: LEO 912 OMEGA von der Firma Zeiss (Oberkochen) und Leica (Nussloch).

Software: Metaview Version 4.5r5 für die Erstellung der Minimalprojektionen aus sequentiellen Bilderstapeln von Universal Imaging CorporationTM, (Downingtown PA, USA); Photoshop (Adobe); Office 97 (Microsoft).

3.2 Versuchstiere

Es wurden sechs (Projekt I) und 12 (übrige Projekte) männliche Wistar-Ratten in der Gewichtsklasse 250-300g aus der Tierversuchsanlage (TVA) der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verwendet, die dort in Standardkäfigen bei gleichbleibender Temperatur von 22°C +/- 2°C, 55%-iger +/- 5% Luftfeuchtigkeit und einem 12 Stunden Tag-Nachtrythmus gehalten wurden. Den Tieren wurde Futter der Fa. Altromin (Lage) und Wasser ad libitum angeboten.

3.3 Methoden

3.3.1 Perfusion

Die Tiere wurden mit Pentobarbital (ca. 50 mg/kg Körpergewicht, Injektion i.p. 0.5-1 ml), narkotisiert und nach Öffnen des Thoraxes erfolgte eine transkardiale Perfusion durch die Aorta ascendens, indem der linke Ventrikel geöffnet und die Kanüle von dort bis zur Aorta eingeführt wurde. Die absteigende Aorta wurde abgeklemmt. Nachdem mit 50 ml NaCl (0.9% und Liquemin) das Blut herausgespült wurde, erfolgte die Gewebefixierung mit 450 ml Fixativ (10 ml/min nach (Merighi, 1992)). Für die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen und intrazellulären Injektionen wurde als Fixativ die PFA-Zamboni-Lösung (gepuffertes Paraformaldehyd mit Pikrinsäure und 4% Paraformaldehyd, frisch depolymerisiert) verwendet. Bei der Doppelimmunperoxidasefärbung wurde zunächst eine Lösung aus 5 ml Acrolein und 95 ml 0.1M PB eingesetzt, danach erfolgte die weitere Nachfixierung mit 400 ml Zamboni-Lösung. Nach Präparation der Gehirne wurden diese 1 hr nachfixiert und in PB bei 4°C bis zum Schneiden aufbewahrt. Aus dem Bereich des somatosensorischen Kortex wurden am Vibratom 50 µm dicke Frontalschnitte hergestellt und in PB 0.1M, pH 7.4 aufgefangen und gelagert.

3.3.2 Doppelimmunperoxidasefärbung von VIP und Calbindin für quantitative lichtmikroskopische Auswertung und für korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie

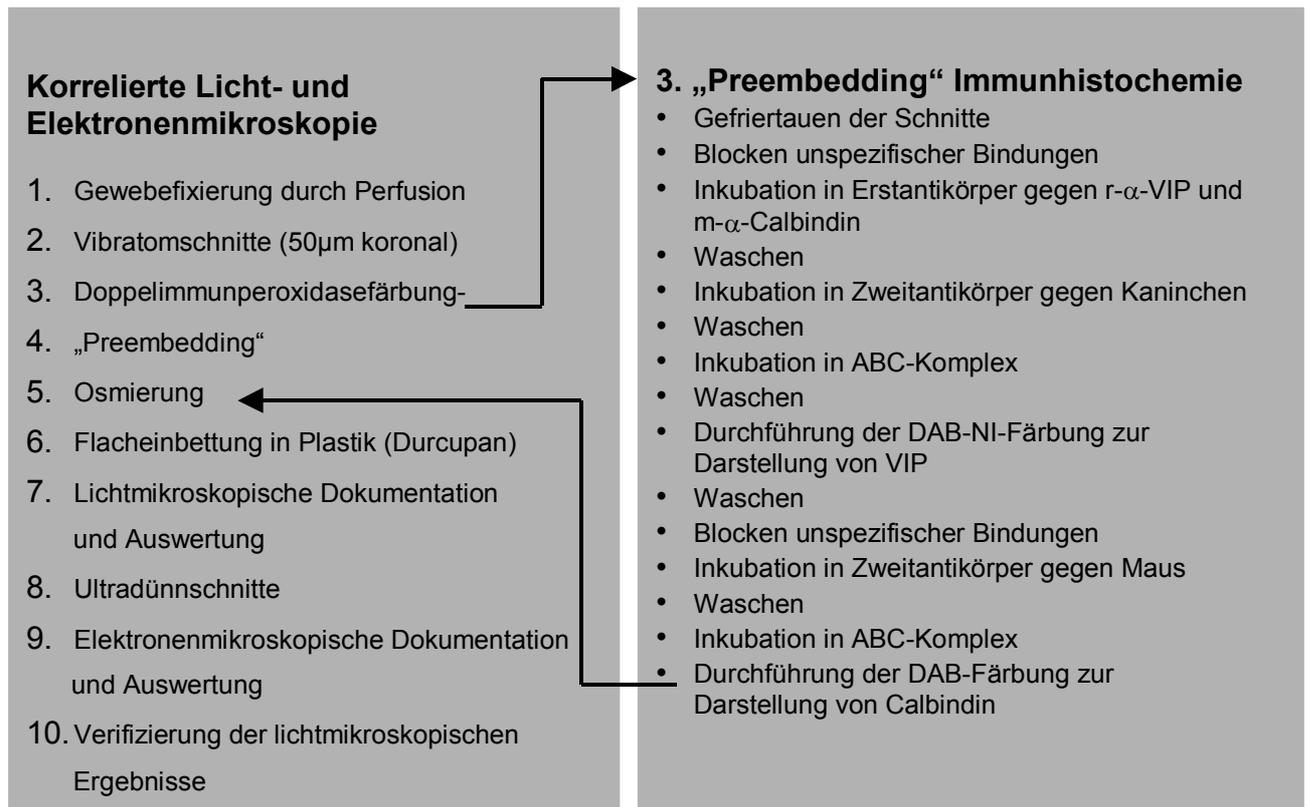


Abb. 6: Versuchsübersicht der korrelierten licht- und elektronenmikroskopischen Methode.

“Preembedding“-Immunhistochemie

Zur Verbesserung der Antikörperpenetration wurden die Schnitte gefriergetaut. Zunächst erfolgte eine 45-minütige Inkubation in 25% Saccharose und 10% Glycerol in 0.01 M PB bei RT zum Schutz des Gewebes vor Gefrierartefakten. Anschließend wurden die Schnitte auf Aluminiumfolie überführt, 3x über flüssigem Stickstoff gefriergetaut und in PB, pH 7.4, gewaschen.

Vor Beginn der Immunperoxidase-Färbung (frei-flottierend) mittels Avidin-Biotin-Technik (**Abb. 7**) wurden die Schnitte mit 1% NaBH₄ in 0.01M PB für 10 min

behandelt und anschließend sorgfältig in PB gewaschen, bis keine Luftblasen mehr erkennbar waren.

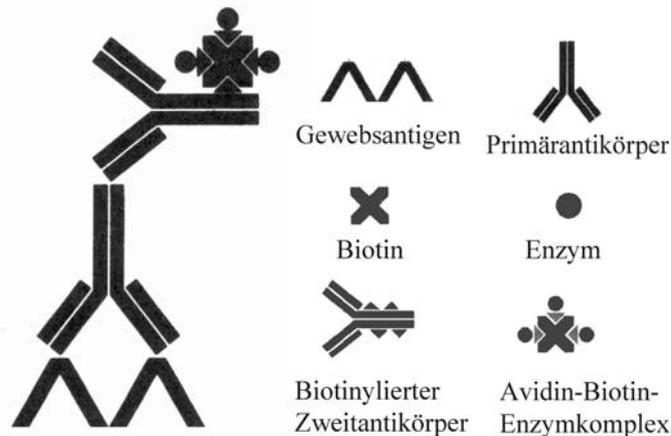


Abb. 7: Avidin-Biotin-Methode: vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (ABC) reagieren mit biotinylierten Sekundärantikörpern. Die sekundären Antikörper wurden zuvor an den Primärantikörper gebunden, der spezifisch gegen Gewebsantigene gerichtet ist. Quelle: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden. 3. Auflage, 1997. DAKO.

2 x in 0.05M TBS (pH 7.4) 15 min auf Schüttler waschen.

Blocken in 10 % NGS in TBS für 45 min.

Inkubation in r- α -VIP (Verdünnung 1:80.000 bis 1: 150.000) (Gulyas et al., 1990) und m- α -Calbindin 1: 100.000 für 36 bis 48 Stunden bei 4°C in TBS auf einem Schüttler.

4 x 15 min in TBS, pH 7.4 waschen.

2 Stunden Inkubation in biotinyliertem Ziege- α -Kaninchen-AK 1:100 in 0.05M TBS, pH 7.4 bei RT.

4 x 15 min in TBS, pH 7.4 waschen.

Ansetzen des peroxidasekonjugierten Biotin-Avidin-Komplexes: das Avidin und die biotinylierte Peroxidase wurden 30 min vor Gebrauch 1:1:100 in TBS pH 7.4 angesetzt, die Inkubation erfolgt in der Endkonzentration 1:1:200 für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler.

2 x 15 min in 0.05M TBS 7.4 waschen.

2 x 15 min in 0.05M TB pH 8.1 waschen.

Entwicklungslösung für VIP: 7.5 mg DAB und 0.2 g Ammonium-Nickelsulfat wurden in 50 ml 0.05M TB, pH 8.1 gelöst. Je 0.5 ml dieser Lösung dient zum

Vorinkubieren der Schnitte und zu 25 ml der verbleibenden DAB-Ni-Lsg wurden 10 µl 30% H₂O₂-Lösung gegeben, davon wurden 0.5 ml zum Start der Reaktion benutzt.

Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und bei optimaler Färbeintensität des Antigens in 0.05M TB, pH 8.1 gestoppt.

2 x 15 min waschen in 0.05M TBS, pH 8.1.

Blocken in 10% (v/v) NHS in TBS, pH 8.1 für 45 min bei RT.

Inkubation in biotinyliertem Pferd- α -Maus Zweitantikörper 1:200 in TBS, pH 8.1 für 2 Stunden bei RT oder 12 Stunden bei 4°C.

4 x 15 min waschen in TBS, pH 8.1.

30 min vor Gebrauch ABC-Komplex 1: 100 in TBS, pH 8.1, ansetzen (s.o.), in der Endkonzentration 1:400 für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubieren.

2 x 15 min in 0.05M TBS, pH 8.1 waschen.

2 x 15 min in 0.05M TB, pH 7.6 waschen.

Entwicklungslösung für Calbindin: 5 mg DAB wurden in 10 ml TB 7.6 gelöst. 0.5 ml dieser Lösung diente zum Vorinkubieren für 10 min bei RT, durch Zufügen von weiteren 0.5 ml DAB-Lösung und 10 µl einer 0.1%igen H₂O₂ Lösung wurde die Reaktion gestartet. Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und in 0.05M TB, pH 7.6 gestoppt.

Osmierung und EM-Flacheinbettung

Die Schnitte wurden in 0.1M PB, pH 7.4 für mindestens 10 min überführt. Danach erfolgte eine Kontrastrierung für 45 min bei 4°C in 1% Osmiumtetroxid und 7% β -D(+)-Glukose. Das Gewebe wurde nun für jeweils 10 min durch eine Pufferreihe mit absteigender Molarität geführt:

0.125/0.1/0.075/0.05/0.025/0.01 M PB, pH 7.4; Inkubation für 10 min in Aqua dest., 10 min. 50% Ethanol, 45 min Uranylacetat (1% in 70% Ethanol) bei 4°C zur Kontrasterhöhung im Elektronenmikroskop.

Danach wurden die Schnitte in Aluminiumschiffchen in 70% Ethanol überführt und für jeweils 10 min in folgender Alkoholreihe entwässert: 90%, 96%, 2 x 100%. Vor dem Überführen in Durcupan erfolgte für 2 x 5 min die Inkubation in Propylenoxid. Das Durcupan wurde zuvor in folgendem Mischverhältnis und

entsprechender Reihenfolge angerührt: 10 g Komponente A, 10 g Komponente B, 0.3 g Komponente D, 0.3 g Komponente C. Das Gewebe wurde über Nacht bei RT in diesem Gemisch infiltriert, auf Objektträger transferiert und eingedeckt. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank mit Gewichten auf den Deckgläsern zur Flacheinbettung. Nach lichtmikroskopischer Auswertung (siehe Methodik der Auswertung) und ausführlicher Dokumentation erfolgte die Wiedereinbettung selektierter Zellen in Durcupanblöckchen zum Herstellen serieller Ultradünnschnitte.

Wiedereinbettung selektierter Zellen und Herstellung serieller Ultradünnschnitte

Das Deckglas wurde an entsprechender Stelle entfernt, das Gewebe unter einem Binokular mit einem Skalpell ausgeschnitten, auf einen Objektträger überführt und angedrückt. Eine Einbettungskapsel wurde über das Gewebe gestülpt und mit Durcupan ACM (s.o.) gefüllt, die Polymerisation erfolgte wieder über Nacht bei 60°C. Nach Entfernen der Einbettungskapsel und des Objektträgers wurde eine Übersichtszeichnung des Materials unter dem Lichtmikroskop angefertigt, um das Trimmen zu erleichtern. Am Ultramikrotom wurde überflüssiges Durcupan und Gewebe mit einer Rasierklinge entfernt und der Block zu einer trapezförmigen Struktur getrimmt. Die Oberfläche des Blockes wurde mikrometergenau bis zur Zelle mit einem Glasmesser heruntergetrimmt. Anschließend wurden Serienultradünnschnitte (70 nm) mit einem Diamantmesser angefertigt und auf die zuvor mit Formvar-beschichteten Schlitzblenden überführt.

Beschichtung der Grids mit Formvar: Trägerfilmherstellung:

Ein Objektträger wurde in einen Scheidetrichter gestellt, der mit einer 1%igen (w/v) Pioloformlösung in Chloroform gefüllt wurde, und die Lösung wurde langsam abgelassen. Der am Objektträger haftende Film wurde in H₂O dest. abgelöst, die Grids (2mmx 1mm Slot; Copper 3.05mm) wurden auf dem an der Oberfläche schwimmenden Film aufgelegt und mit Parafilm bedeckt. Diese Schichten wurden nun aus dem Wasser gezogen und in ein U-Glas überführt. Nach dem Trocknen wurden sie für das Auffangen der 70 nm Schnitte verwendet (s.o.).

3.3.3 Doppelimmunfluoreszenz der Antigene VIP und CB

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Schnitte nicht gefriergetaut, sondern nach dem Schneiden wie folgt weiterbehandelt:

2 x 15 min spülen in 0.4% Triton X-100 in 0.05M TBS, pH 7.4.

Inkubation in r- α -VIP 1:20.000 und m- α -Calbindin 1:30.000 für 36 bis 48 Stunden bei 4°C in TBS und 0.4 % Triton X-100 auf einem Schüttler.

4 x 15 min waschen in TBS, pH 7.4.

Inkubation für 2 Stunden bei RT in einer Lösung aus Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen (1:200 bis 1:800) aus Esel und einem biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper aus Pferd in TBS, pH 7.4 .

4 x 15 min waschen in TBS, pH 7.4

An den biotinylierten Zweitantikörper wurde anschließend Streptavidin gekoppeltes Alexa 488 (Molecular Probes) in der Verdünnung 1:200 in 0.05M TBS, pH 7.4, durch zweistündige Inkubation bei RT gebunden.

Diese Dreischritt-Immunfärbung wurde durch einen letzten Waschvorgang 2 x 15 min in 0.05M TBS, pH 7.4 beendet.

Alternativ dazu wurde ein Gemisch aus einem Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen (1:200 bis 1: 800) und einem Cy2-gekoppeltem Anti-Maus Antikörper, beide aus Esel, eingesetzt. Die Zweischnitt-Immunfärbung war damit beendet (**Abb. 8**). Die Schnitte wurden aus 0.05M TB, pH 7.6 auf die Objektträger gezogen, nach erfolgtem Antrocknen diente Vectashield als Eindeckmedium. Die Präparate werden bei -20°C und vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Färbungen wurden durch konfokale Mikroskopie an einem Leica TCS^{4D} Laserscanmikroskop (Leica Lasertechnik, Heidelberg) am Institut für Neurobiologie, IFN Magdeburg, qualitativ dargestellt.



Abb.8: Indirekte Immunfluoreszenz. An den primären Antikörper wird ein Sekundärantikörper gebunden, der mit einem Fluorochrome gekoppelt ist.

3.3.4 Intrazelluläre Farbstoffinjektionen in fixierten Gewebeschnitten

Die intrazelluläre Füllung in fixiertem Gewebe, die ohne vorherige Messung der elektrischen Aktivität der Zellen vorgenommen wurde, erfolgte unter visueller Kontrolle mit einem Mikroskop, das im Idealfall mit einem fixierten Mikroskoptisch (Fixed-stage) ausgestattet ist.

Hier stand ein Zeiss Mikroskop zur Verfügung, das mit einem Long-Distance-Objektiv (Zeiss DU 40/0.65) ausgestattet war und einen Arbeitsabstand von 8-10 mm sowie einen Winkel der Elektrode von ca. 45° zuließ.

Die visuelle Kontrolle der Füllung erfolgte durch Epifluoreszenzbelichtung mit einer regulierbaren Zeiss HBO 100 Watt Hochdruck-Quecksilberdampf-Mercury Lampe (Attoarc), wobei Lucifer Yellow mit dem Filtersatz 05 von Zeiss (BP 395-440, FT 460, LP 470) angeregt wurde. Mikroelektroden wurden am Pipetten-Puller bis zu einem Spitzendurchmesser von 0.1 – 0.2 μm gezogen und durch Diffusion mit dem jeweiligen Farbstoff gefüllt. Ein in die Glaselektrode eingeführter chlorierter Silberdraht vermittelte den Kontakt zwischen dem Farbstoff und dem Elektrodenhalter der Stromquelle. Die Farbstoffinjektion erfolgte durch eine Stromquelle mit einem negativen Strom von -1 bis -5 nA bei Lucifer Yellow (5% in dest. H_2O) bzw. positiven Strom gleicher Stärke bei Injektion von Microruby (2.5 % in dest. H_2O). Der 50 μm dicke Koronarschnitt wurde in die Injektionskammer überführt und mit ausreichend 0.1M PB, pH 7.4 bedeckt. Die Injektionskammer wurde auf dem Mikroskoptisch fixiert und der Stromkreis durch Verbindung der Pufferlösung mit der Iontophoreseeinheit geschlossen. Durch Befestigung der Elektrode an der entsprechenden Halterung des Mikromanipulators kann diese durch die motorisierte Steuerung gezielt in das Gewebe geführt werden. Eine erfolgreiche Zellpenetration ist erkennbar, wenn sich Soma und Dendriten bei Stromapplikation mit dem Farbstoff füllen. Der Füllvorgang dauerte je nach Zellgröße 3-10 min.

Nachdem pro Schnitt ca. 1-5 Zellen gefüllt und der Farbstoff durch Inkubation der Schnitte in Zamboni-Lösung fixiert wurde, wurden die Schnitte für 2 x 10 min in 0.1M PB, pH 7.4 gewaschen. Anschließend wurde nach Protokoll a) bei Injektion von Lucifer Yellow oder nach Protokoll b) bei Injektion von Microruby vorgegangen.

Protokoll a) Immunfluoreszenzfärbung von VIP nach Injektion von Lucifer Yellow:

2 x 15 min spülen in 0.4% Triton X-100 in 0.05M TBS, pH7.4.

Inkubation in r- α -VIP 1:20.000 für 36 bis 48 Stunden bei 4°C in 0.05M TBS und 0.4 % Triton X-100 auf einem Schüttler.

4 x 15 min waschen in TBS, pH 7.4.

Inkubation für 2 Stunden bei RT in TBS, pH 7.4, mit einem Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen (1:200 bis 1:800) aus Esel.

4 x 15 min waschen in TBS, pH 7.4.

Die Schnitte wurden aus 0.05M TB, pH 7.6 auf die Objektträger gezogen, nach erfolgtem Antrocknen diente Vectashield als Eindeckmedium. Die Präparate werden bei -20° und vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Färbungen wurden durch konfokale Mikroskopie qualitativ dargestellt.

Protokoll b) Anfärbung von Microruby und immunhistochemische Darstellung von VIP für die korrelierte Licht-und Elektronenmikroskopie

Zur Verbesserung der Gewebepenetration wurden die Schnitte zunächst gefriergetaut. Nach Inkubation in 25% Sucrose, 10% Glycerol in 0.01 M PB für mind. 45 min bei RT erfolgte das Gefriertauen in flüssigem Stickstoff. Danach wurden die Schnitte bis zur Anfärbung in PB, pH 7.4 aufbewahrt.

2 x in 0.05M TBS, pH 7.4 für 15 min auf einem Schüttler waschen.

30 min vor Gebrauch ABC-Komplex 1:1:100 in 0.05M TBS pH 7.4 ansetzen, in der Endkonzentration 1:1:200 für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubieren.

2 x 15 min in 0.05M TBS, pH 7.4 waschen.

2 x 15 min in 0.05M TB, pH 7.6 waschen.

Entwicklungslösung für Microruby: 5 mg DAB wurden in 10 ml TB 7.6 gelöst. 0.5 ml dieser Lösung diente zum Vorinkubieren für 10 min bei RT, die Reaktion wurde gestartet, indem weitere 0.5 ml DAB-Lösung und 10 μ l einer 0.1 %igen H₂O₂ Lösung dazugegeben wurde. Bei ausreichender Färbeintensität wurde die Reaktion in TB pH 7.6 wie folgt gestoppt:

- 4 x 15 min in TBS 7.6 waschen.
- Blocken in 10 % NGS in 0.05M TBS, pH 7.4 für 45 min.

- Inkubation in r- α -VIP 1:40.000 - 1:80.000 für 36 bis 48 Stunden bei 4°C in 0.05M TBS, pH 7.6 auf einem Schüttler.
- 4 x 15 min in 0.05M TBS, pH 7.6 waschen.
- 2 Stunden Inkubation in biotinyliertem α -Kaninchen aus Ziege 1:100 verdünnt bei RT.
- 4 x 15 min in 0.05M TBS, pH 7.6 waschen.
- 30 min vor Gebrauch ABC-Komplex 1:1:100 in 0.05M TBS pH 7.4 ansetzen, in der Endkonzentration 1:1:200 für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubieren.
- 2 x 15 min in 0.05M TBS, pH 7.6 waschen.
- 2 x 15 min in 0.05M TB pH 8.1 waschen.

Entwicklungslösung für VIP: 7.5 mg DAB und 0.2 g Ammonium-Nickelsulfat wurden in 50 ml 0.05M TB pH 8.1 gelöst. 0.5 ml dieser Lösung diente zum Vorinkubieren der Schnitte für 10 min. Zu 25 ml der restlichen DAB-Ni-Lsg wurden 10 μ l 30 % H₂O₂ –Lösung gegeben. Davon wurden 0.5 ml zum Start der Reaktion benutzt.

Die Reaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und in 0.05M TB, pH 8.1 gestoppt. Die Schnitte wurden wie beschrieben für die Elektronenmikroskopie eingebettet. Die Auswertung erfolgte wie für die korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie beschrieben, d.h. Zellen, die von VIP-positiven Boutons kontaktiert wurden, wurden ausführlich dokumentiert und für Ultradünnschnitte wieder eingebettet.

3.4 Methodik der Auswertung

3.4.1 Lichtmikroskopische Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-positiven Interneuronen

Die für die EM eingebetteten Schnitte wurden zunächst lichtmikroskopisch mit Hilfe des computerunterstützten Neurolucidasystems folgendermaßen ausgewertet: In geringer Vergrößerung (4x Objektiv) wurde im Bereich des Barrel Kortex ein Areal von 500 μ m Breite parallel zur Pia durch alle Schichten des Kortex in dem jeweils 50 μ m dicken Schnitt abgegrenzt. Alle CB-positiven Interneurone in diesem Bereich wurden mit niedriger Vergrößerung (10x-Objektiv) eingezeichnet und nummeriert. In dieser so definierten Makrokolumne

wurden CB-positive Zellen nach den folgenden Kriterien für eine Quantifizierung der Kontakte ausgewählt:

- Gesamtdendritenlänge mindestens 100 μm .
- Verzweigung von mindestens
- 2 Primärdendriten in Dendriten 2. Ordnung.

In der Schicht IV wurden diese Kriterien nicht angewendet, sondern alle CB-positiven Interneurone in die Analyse einbezogen. Zum Einen ist die Zelldichte CB-positiver Interneurone in der Schicht IV geringer als in anderen Schichten und zum Anderen wurden unter den supra- und infragranulären Schichten mehrere Schichten zusammengefaßt, so dass auf diese Weise die Anzahl der zu analysierenden Zellen in der Schicht IV erhöht wurde. Aus bisherigen Studien (Van Brederode et al., 1991; Gabbott und Bacon, 1996b), die CB-positive Interneurone morphologisch beschrieben, geht hervor, dass alle CB-positiven Interneurone Dendriten erster Ordnung besitzen. Es ist darum anzunehmen, dass sich bei den Zellen, die hier nur eine Zellkörpermarkierung aufweisen, mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Schneideprozess keine Dendriten erkennen lassen.

Die CB-positiven Zellen wurden mit einem 100x Objektiv rekonstruiert, wobei für jeden lichtmikroskopisch identifizierten VIP-Bouton, der eine lückenlose räumliche Assoziation mit CB-positiven Somata oder Dendriten zeigte, ein Marker gesetzt wurde. Diese Marker wurden durch das hier verwendete Programm "Neurolucida" entsprechend ihrer Lokalisation an der CB-positiven Zelle als somatische oder dendritische Kontakte in Tabellen aufgelistet. Des Weiteren wurden die dendritischen Kontakte getrennt nach den jeweiligen dendritischen Ordnungen aufgeführt. Alle Zellen wurden aufgrund der Zellkörperlage den supragranulären-, granulären und infragranulären Schichten zugeordnet.

Die Daten der CB-positiven Zellen in der Kolumne wurden anschließend durch das Programm Neuroexplorer dargestellt und in das Programm Excel kopiert.

Für die statistische Analyse der Anzahl und Verteilung der Marker auf Dendriten unterschiedlicher Ordnungen wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen jeder einzelnen dendritischen Ordnung jedes Tieres ermittelt, um die Variabilität zwischen den Tieren (n=6) vergleichen zu können. Die gleichen Daten wurden dann für einzelne dendritische Ordnungen aller

Tiere ermittelt, um schließlich die Mittelwerte zwischen den einzelnen dendritischen Ordnungen durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholung auf Homogenität prüfen zu können. Bei der Analyse mit ANOVA wurden Unterschiede dann als signifikant gewertet, wenn das Signifikanzniveau eine vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0.01$ unterschritt

Morphologische Charakterisierung der CB-positiven Interneurone:

Durch die Exportoptionen im Programm Neurolucida konnte die CB-positive Zellpopulation grafisch dargestellt werden. Aufgrund dieser Rekonstruktionen wurden die Zellen morphologisch klassifiziert und in Zelltypen eingeteilt.

Grundlage der Einteilung in Laminae war dabei der prozentuale Anteil der Schichten an der Gesamtdicke des Kortex von der Pia bis zur weissen Substanz nach Schober (1986). Bei der Einteilung wurden die Schichten I, II und III als supragranuläre, die Schichten V und VI als infragranuläre Schichtenkompartimente zusammengefaßt, während als granuläre Schicht die Schicht IV bezeichnet wird.

3.4.2 Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische

Auswertung

Beim Rekonstruieren wurden für die korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Auswertung geeignete Zellen selektiert. Diese Zellen wurden nach abgeschlossener LM-Auswertung für die Herstellung von Ultradünnschnitten wieder eingebettet, um die lichtmikroskopisch vorläufig als Synapsen definierten Kontakte im EM zu verifizieren.

Ein wichtiger Schritt für die korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie ist die detaillierte Dokumentation der Zellen, deren synaptische Kontakte verifiziert werden sollen. Auch die Bestimmung der Position leicht zu identifizierender Strukturen (Landmarken) in Relation zu der Zelle erleichterten das Auffinden der Zellen im EM. Die Dokumentation der Zellen erfolgte durch Rekonstruktion mittels des Neurolucida-Systems, wobei gleichzeitig alle VIP-Boutons an den CB-IR-Interneuronen markiert und anschließend durchnummeriert wurden. Des Weiteren wurden hochauflösende Fotografien und digitale Aufnahmen mehrerer Bilderstapel in verschiedenen Fokusebenen (z) erstellt. Diese "Z-Stapel" wurden durch die Minimum-Intensitäts-Projektion des Programms "Metaview" zu einer zweidimensionalen Projektion aller Fokusebenen überführt. Nach

erfolgter Dokumentation wurden solche VIP-positiven Boutons für eine Verifizierung synaptischer Strukturen ausgewählt, die eine geeignete Orientierung hatten, d.h. seitlich zur postsynaptischen Zielstruktur und nicht oberhalb oder unterhalb lokalisiert waren.

3.4.3 Auswertung der Doppelimmunfluoreszenz von VIP und CB

Bei der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von VIP und CB erfolgte nur eine qualitative Darstellung der Ergebnisse durch konfokale Laserscanmikroskopie, da diese in Vergleich zur Doppelimmunfärbung den Vorteil der besseren Separation der eingesetzten Fluorochrome bot.

Die Fluorochrome Cy3 und Alexa 488 wurden simultan mit einem Argon/Krypton (ArKr)-Ionen Laser (Erregungswellenlängen 488 nm, 568nm, 647nm) mit dem Leica Laserscanmikroskop TCS^{4D} (Leica Lasertechnik, Heidelberg) und der Software Scanware 5.1 (Leica) in der als zusätzliches Modul 3D-MISA-Software implementiert ist, simultan aufgenommen. Das Mikroskop ist außerdem mit einem Akusto-optisch regulierbaren Filter (AOTF) für Selektions- und Intensitätsadaptation ausgestattet. Die Filterkombination für FITC und TRITC (TD 488 und 568; RSP 580 und Sperrfilter BP-535 für den ersten Kanal; LP-590, Sperrfilter BP-600 für den zweiten Kanal) erlaubte eine gute Separation der Fluorochrome. In der z-Achse wurden ca. 20-50 optische Schnitte mit einer z-Auflösung von ca. 1 µm (Focustiefe) im 512x512 oder 1024x1024 Pixelformat gescannt. Von diesen Bilderstapeln wurde eine Extended-Fokus-Projektion berechnet. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop (Version 5.0; Adobe Systems, Mountain View, CA) vorgenommen, um Kontraste und Farbintensität zu optimieren.

3.4.4 Auswertung der intrazellulären Farbstoffinjektion in fixierten Gewebeschnitten

a) Lucifer Yellow

Die Schnitte, die Lucifer Yellow gefüllte Zellen enthielten, wurden ebenfalls im Leica TCS^{4D} Laserscanmikroskop (Leica Lasertechnik, Heidelberg), das mit einem ArKr-Laser (75 mW, 488/568nm/647nm) und einem UV-Laser (Coherent Enterprise 50 mW, 351/364) ausgestattet war, simultan gescannt. Für die

Aufnahme von VIP wurde die Filterkombination für TRITC gewählt und für LY die Filterkombination mit den Erregungswellenlängen 476nm und 488nm (Detektor RSP 580, Mirror BP-TRITC). Die Auflösung betrug 512x512 Pixel. Von beiden Kanälen (rot und grün) wurden Bilderstapel (optische Schnitte) in der z-Achse erstellt, die einen Abstand von einem Mikrometer hatten. Außerdem wurde eine Extended-Fokus-Projektion für jeden der beiden Kanäle des Bilderstapels mittels der Software berechnet, so dass die Morphologie der Zelle und die evtl. angelagerten VIP-Boutons identifiziert werden konnten. Da bei dieser Softwareprojektion jedoch nicht sichergestellt war, dass die potentiellen VIP-Kontakte auch in der gleichen Fokusebene wie die Zielzellstrukturen liegen, konnte nur durch Überlagerung beider Kanäle in der jeweils gleichen z-Tiefe diese räumliche Anordnung verifiziert werden.

b) Injektion von MicroRuby

Das Verfahren entspricht im Prinzip der Methode, die bei für das EM selektierten CB-Zellen angewendet wurde. Alle injizierten Zellen wurden zunächst ausführlich mit den dort beschriebenen Methoden dokumentiert, indem sie rekonstruiert und digitale Bilderstapel erstellt wurden. Mit Farbstoff gefüllte Zellen wurden dann für die Elektronenmikroskopie aufbereitet, wenn lichtmikroskopisch VIP-positive Kontakte lückenlos an der Zelle erkennbar waren. Einzelne Kontakte wurden anhand der Prinzipien der korrelierten Licht- und Elektronenmikroskopie als Synapsen verifiziert.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Studie war die Erfassung der Konnektivität spezifischer Zellpopulationen in qualitativer und quantitativer Hinsicht. Mit Hilfe der computerunterstützten Rekonstruktion konnten CB-positive Interneurone morphologisch charakterisiert und der prozentuale Anteil bestimmter Zelltypen bestimmt werden. An den gleichen Neuronen wurde eine Quantifizierung der VIP-Boutons am Zellkörper und an den Dendriten vorgenommen. Der ultrastrukturelle Nachweis der synaptischen Konnektivität mittels der korrelierten Licht- und Elektronenmikroskopie wird an zwei repräsentativen Beispielen gezeigt. Die Innervation von Pyramidenzellen durch VIP-IR-Boutons wird durch Bilder der konfokalen Mikroskopie dargestellt. Der Nachweis synaptischer Interaktionen wird dagegen durch Präparate erbracht, die durch Umwandlung des fluoreszenten Farbstoffes in ein elektronendichtes Reaktionsprodukt der ultrastrukturellen Untersuchung zugänglich gemacht wurden.

4.1. Korrelierte Licht und Elektronenmikroskopie

In diesem Projekt wurden zwei Ziele verfolgt. Erstens erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung der CB-positiven Interneurone. Dies beinhaltete die morphologische Charakterisierung der Zellen und die Quantifizierung der VIP-Boutons, die diesen Zellen unmittelbar angelagert waren. Insbesondere wurde hier die Verteilung der VIP-Boutons auf verschiedenen dendritischen Ordnungen erfaßt, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich die Innervationsdichte mit zunehmenden Verzweigungsgrad ändert. Zweitens, erfolgte der korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Nachweis der synaptischen Innervation von CB-positiven Interneuronen durch VIP-positive Boutons anhand von insgesamt fünf repräsentativen Zellen.

4.1.1. Morphologie der Calbindin-positiven Neurone

Bei der immunhistochemischen Markierung der Zellen konnte nur die Morphologie der Dendriten und die Form des Somas zur Klassifizierung berücksichtigt werden, da sich Axone mit den verfügbaren Antiseren nicht visualisieren lassen (DeFelipe, 1997). CB-positive Pyramidalzellen, die hauptsächlich in der Schicht III in allen Spezies nachgewiesen wurden (DeFelipe, 1997), wurden bei dieser Klassifizierung nicht berücksichtigt, da ausschließlich Interneurone den

Schwerpunkt der Untersuchung bildeten.

Für die Einteilung in Subpopulationen bzw. „Archetypen“ von Interneuronen wurde hier eine Einteilung nach Bayraktar et al. (2000) und Cobas et al. (1987) herangezogen, die in den folgenden schematischen Abbildungen grafisch verdeutlicht wird.

1.) Bipolare Neurone (single- or bitufted) können in mehrere Subtypen unterteilt werden. Die Somata aller Subtypen lassen zwei gegenüberliegende Pole erkennen, von denen aus sich Dendriten verzweigen. Folgende Zelltypen können aufgrund der dendritischen Morphologie unterschieden werden:

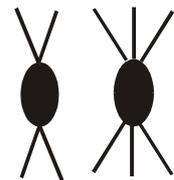
a) Einfach bipolar: Den zwei Polen des ovoiden Somas entspringt jeweils ein langer Dendrit und diese verzweigen sich entweder nicht oder erst in weiterer Entfernung vom Zellkörper in Dendriten höherer Ordnung (**Abb. 9C**).



b) Einzel-gebüschelt: Ein Dendrit entspringt einem Pol des Somas, während ein weiterer oder auch mehrere dem anderen Pol entspringen und sich in der Nähe des Somas weiter verzweigen (**Abb. 9B**).



c) Doppelt-gebüschelt: Zwei oder mehrere Dendriten entspringen den beiden Polen und verzweigen sich in der Nähe des Somas.



d) Modifizierte bipolare Zellen entsprechen den Kriterien von a) bis c), weisen aber zusätzlich seitlich einen kleineren Dendriten auf.



(2) Multipolare Zellen: Das Soma ist eher rundlich und mehrere Dendriten entspringen von verschiedenen Stellen des Somas (**Abb. 9E**).



(3) Tröpfchenförmige Zellen: Ein dicker Dendrit entspringt einem Pol des Somas, während andere, kleinere Dendriten der gegenüberliegenden Seite entspringen („bulb“ und „radish“ nach Cobas et al., 1987) (**Abb. 9A**).



(4) Trianguläre Zellen: Ein Hauptdendrit verzweigt sich von einem Pol des annähernd dreieckigen Somas, während zwei weitere den zwei gegenüberliegenden Polen entspringen (**Abb. 9D**).



(5) Nicht klassifizierbare Zellen: Seltene, aufgrund des Somas und der Dendriten nicht klassifizierbare Zellen.



Im Folgendem wird der Anteil dieser so definierten Zelltypen innerhalb einer kortikalen Kolumne von 500 μm Breite dargestellt. Diese Klassifizierung und Zählung erfolgte durchgehend wie in der **Abb. 14** dargestellten Computerrekonstruktion.

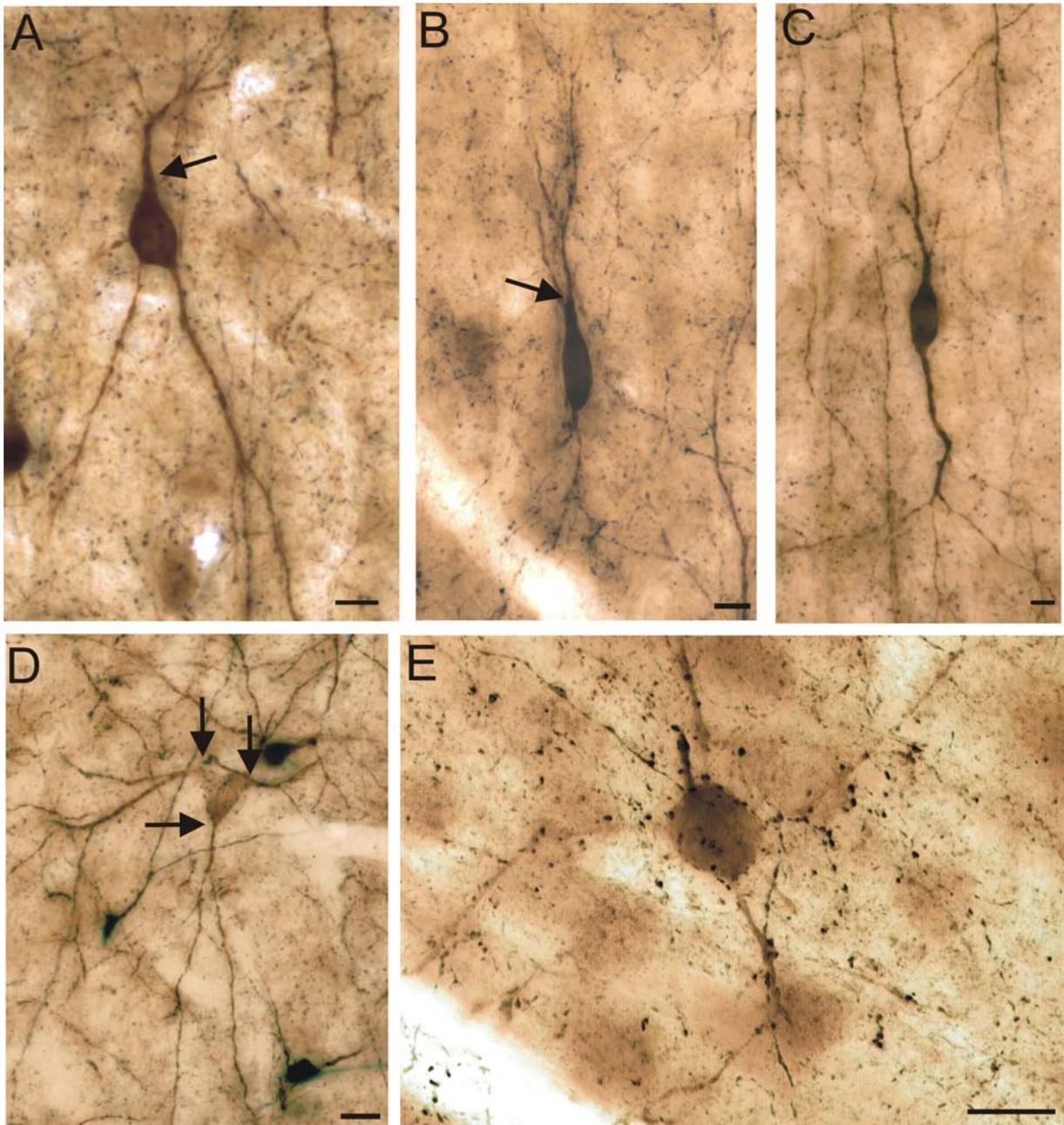


Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der häufigsten Zelltypen CB-positiver Interneurone. A: Tropfenförmige Zelle mit einem zur Pia ziehenden dicken Dendriten (Pfeil) („bulb“ und „radish“ nach Cobas et al. (1987)). Weitere, kleinere Dendriten entspringen der anderen Seite des Somas. B: Einzeln-gebüschelte, bipolare Zelle. Die Dendriten, die dem oberen Pol des Somas entspringen, verzweigen sich in der Nähe des Somas (Pfeil). C: „Einfache“ bipolare Zelle mit zwei vertikal orientierten Dendriten. D: Trianguläre Zelle. An den drei Polen (Pfeile) des Somas entspringen die Dendriten. E: Multipolare Zelle, deren Soma keine Polarisierung erkennen lässt und von dem aus viele Dendriten entspringen. Maßstab: 10 μm .

Wie aus dem Diagramm in **Abb. 10** ersichtlich wird, sind die meisten der CB-positiven Interneurone bi- oder multipolar. Da nur 4% eine trianguläre Form des Somas zeigen und nur 7% nicht klassifiziert werden können, besteht der überwiegende Anteil entweder aus bipolaren Zellen mit einem ovoiden Soma (48%) oder aus multipolaren Zellen mit einem runden Soma (31%). Den größten Anteil unter den Bipolarzellen, deren feinere Unterteilung in **Abb. 11** prozentual dargestellt ist, stellen „einfach“ bipolare Neurone (59%) dar, d.h. die primären Dendriten verzweigen sich meist nicht in unmittelbarer Nähe des Somas in Dendriten höherer Ordnungen. Zu einem sehr geringen Anteil kommen bipolare doppelt-gebüschelte Zellen vor (1%), deren Dendriten sich in unmittelbarer Nähe des Somas weiter verzweigen. Unter den bipolaren Zellen sind folglich am häufigsten Zellen zu finden, deren Primärdendriten sich erst weiter entfernt vom Soma in Dendriten höherer Ordnungen aufzweigen. Wenn die laminäre Verteilung der Zelltypen betrachtet wird (**Abb. 12**), lassen sich keine Unterschiede zwischen den Schichten erkennen. In allen Schichten dominiert der bipolare Zelltyp, gefolgt von multipolaren Zellen. Dies widerspricht der Beschreibung von Van Brederode et al. (1991), die in infragranulären Schichten überwiegend multipolare Zellen fanden.

Die absolute Zellzahl der CB-positiven Interneurone unterscheidet sich in den betrachteten Schichtenkompartimenten (**Abb. 12**): die infragranulären Schichten enthalten die meisten CB-positiven Interneurone, gefolgt von den supragranulären und den granulären Schichten. Zu beachten ist hierbei, dass die Zelltypen Schichtenkompartimenten zugeordnet sind, die eine unterschiedliche Dicke aufweisen und hier die absolute Zellzahl und nicht die relative Dichte betrachtet wird. Die Tatsache, dass die Schicht IV annähernd so viele Zellen enthält wie die zusammengefaßten Schichten I bis III ist darauf zurückzuführen, dass hier alle Zellen ohne Anwendung der Auswahlkriterien einbezogen wurden (siehe Methoden, 3.4.1). Dies erklärt auch, dass dort mehr Zellen enthalten sind, die keine Klassifizierung in Zelltypen erfahren haben, da auch Zellen mit nur unzureichender Anfärbung der Dendriten einbezogen wurden.

Bei Betrachtung der laminären Verteilung der Subklassen unter den Bipolarzellen (**Abb. 13**) ist zu erkennen, dass auch hier der Anteil bestimmter Zelltypen in allen Schichten vergleichbar ist.

Wie aus der **Abb. 14A** ersichtlich wird, sind die meisten Zellen vertikal zur Pia

orientiert und radial ausgerichtet, was Ergebnissen bisheriger Studien entspricht (Hendry und Jones, 1991; Jin et al., 2001; Porter et al., 2001). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Dendritenbäume vieler Zellen über mehrere Schichten zu verfolgen sind. Eine genaue Analyse erfordert jedoch eine detailliertere Einteilung in Schichten und Unterschichten, die hier aufgrund der angefertigten immunhistochemischen Visualisierung der Zellpopulationen nicht in klassischer Weise (Nissl-Zellkörperfärbung) erfolgen konnte.

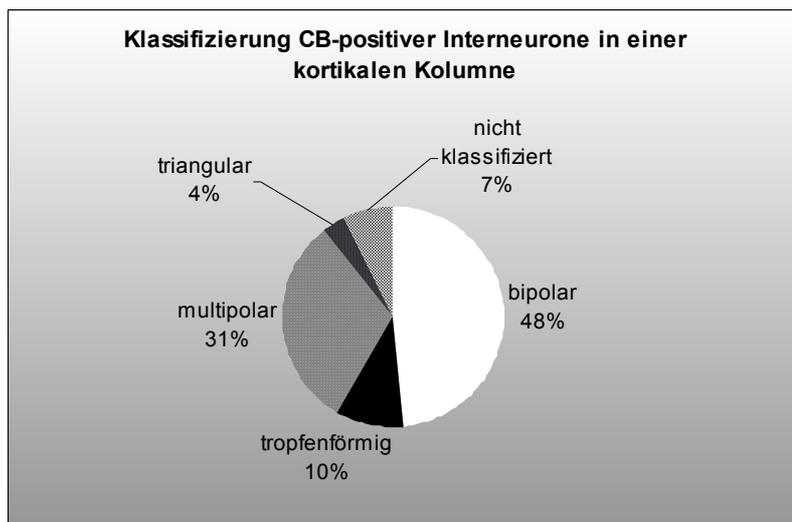


Abb. 10: Darstellung des prozentualen Anteils bestimmter Zelltypen in allen Schichten des Kortex.

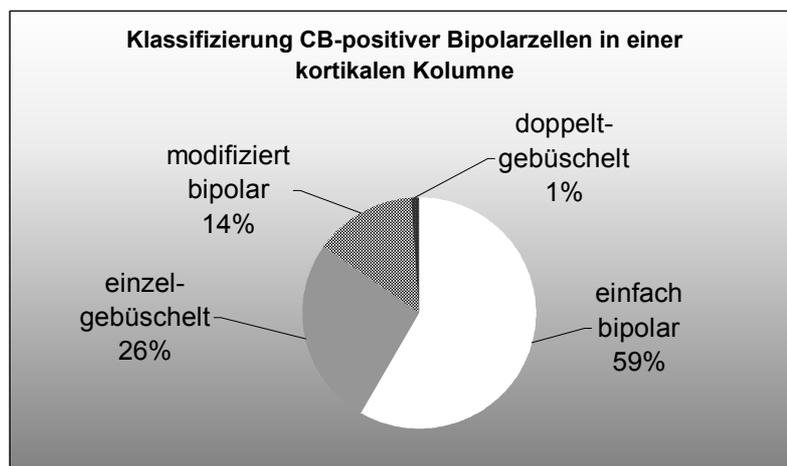


Abb. 11: Prozentualer Anteil bestimmter Unterklassen innerhalb der Bipolarzellen in allen Schichten des Kortex.

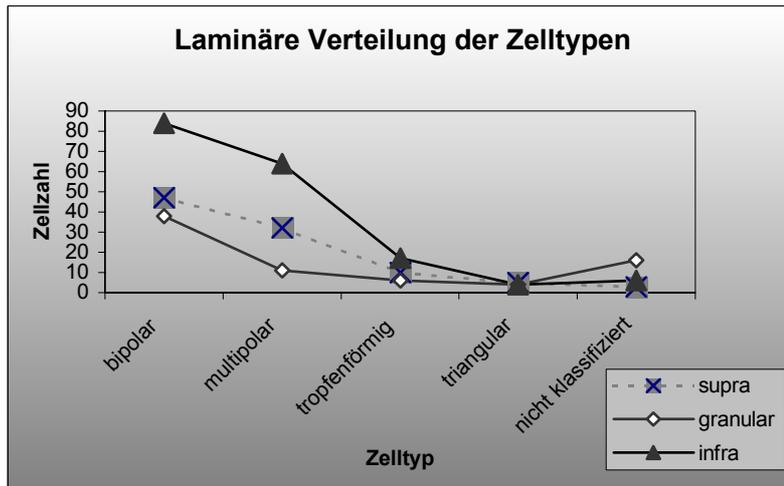


Abb. 12: Verteilung der Zelltypen in den supra-, granulären, und infragranulären Schichten einer „Makrokolumne“.

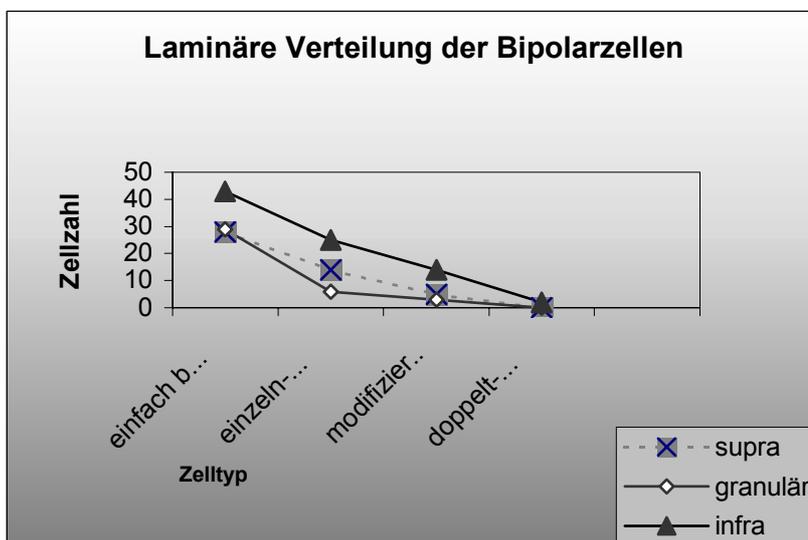


Abb. 13: Verteilung der Subzelltypen der Bipolarzellen in den supra-, granulären, und infragranulären Schichten einer „Makrokolumne“.

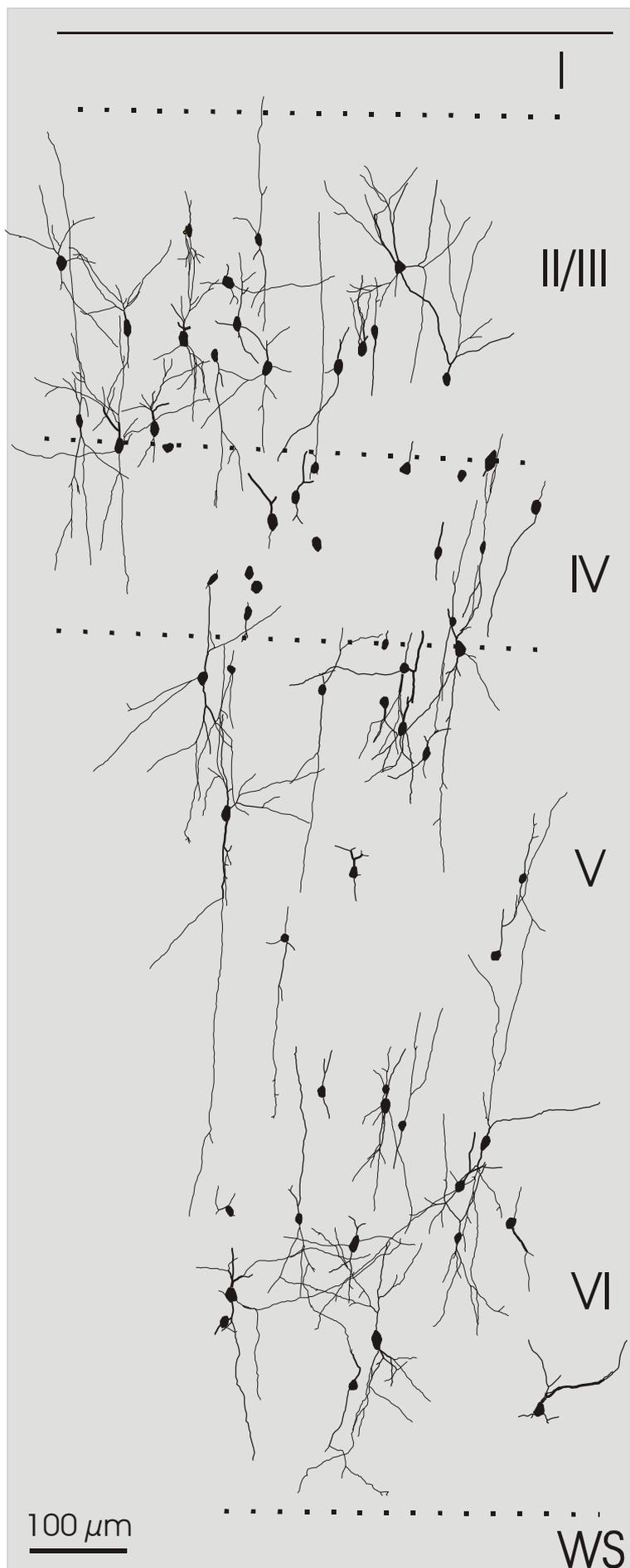


Abb. 14: Rekonstruktion der CB-positiven Interneurone innerhalb einer kortikalen Kolumne von 500 μm Breite aus dem Barreilkortex der Ratte. Die Schichteneinteilung ist hier durch die gestrichelten Linien symbolisiert und wurde durch den prozentualen Anteil der Dicke der jeweiligen Schichten zur Gesamtdicke des Kortex ermittelt. VIP-positive axonale Boutons an CB-positiven Somata und Dendriten wurden durch Marker symbolisiert (hier nicht gezeigt). In der Schicht IV wurden die Auswahlkriterien nicht angewendet, so dass Zellkörper zu sehen sind, die keine primären Dendriten zeigen, wobei es sich wahrscheinlich um einen Anschnittsartefakt handelt. I = Schicht I; II/III = Schichten II und III; IV = Schicht IV; V und VI umfassen die infragranulären Schichten bis zur weißen Substanz (WS).

4.1.2 Lichtmikroskopische Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-positiven Interneuronen

CB-positive Interneurone konnten anhand der Lokalisation der Zellkörper den definierten Schichtenkompartimenten zugeordnet werden. Bei der Quantifizierung der VIP-Boutons an Zellkörpern konnten daher supragranuläre, infragranuläre und granuläre Schichten miteinander verglichen werden. Die Mittelwerte der Anzahl VIP-positiver Boutons an den Somata der CB-Interneurone beträgt 4.1 in supragranulären und granulären und 4.5 in infragranulären Schichten (**Abb. 16**). Bei dem Vergleich der Mittelwerte zwischen den Schichten mit dem ANOVA-Testverfahren konnten keine signifikanten Unterschiede errechnet werden ($\alpha=0.5012$). Von den insgesamt 304 Zellen wiesen 93% VIP-positive Boutons am Soma auf. In den supragranulären Schichten zeigten 10 von 94 (10.6%), in granulären 3 von 75 (ca. 4%) und in den infragranulären 8 von 135 (5.9%) Zellen keine enge räumliche Assoziation zu VIP-Boutons auf. Eine Berechnung der Dichte, wie in **Abb. 18** für die dendritischen Ordnungen dargestellt (Anzahl der Marker pro Dendritenlänge in μm), wurde hier nicht durchgeführt.

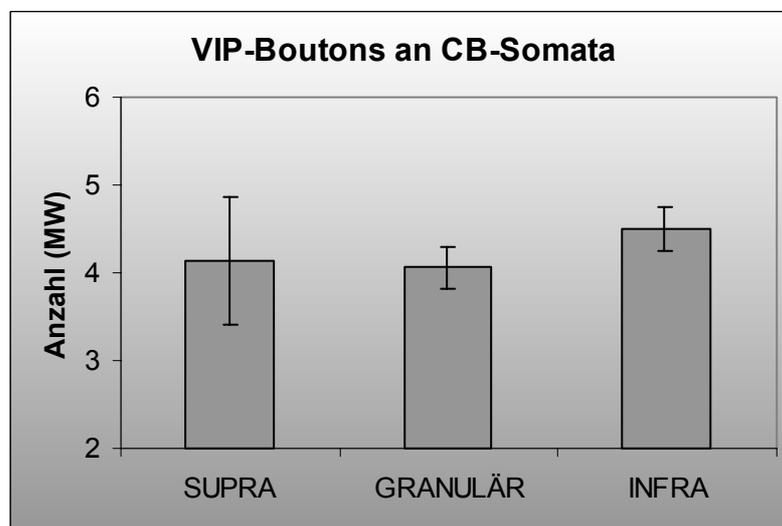


Abb. 15: Anzahl der VIP-positiven axonalen Boutons an CB-positiven Somata in verschiedenen Schichten des Barrel Kortex. Die Balken stellen die Mittelwerte und den jeweiligen Standardfehler dar ($\alpha=0.5012$).

Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-IR Interneuronsomata

Schicht	Supra	Granular	Infra
Marker	4.13	4.06	4.50
Min	0	0	0
Max	26	16	22

Abb. 16: Quantifizierung der Marker, die VIP-positive Boutons an CB-positiven Somata symbolisieren. Angegeben sind hier die Mittelwerte von insgesamt 6 Tieren in den entsprechenden Schichten.

Die statistische Analyse der Anzahl VIP-positiver Boutons an Dendriten ergab, dass die verschiedenen Ordnungen der Dendriten aller rekonstruierten Zellen nicht homogen durch VIP-positive Boutons kontaktiert werden. Im Gegensatz zu den Zellkörpern wurden zwei unterschiedliche Parameter untersucht. Einmal wurde die absolute Anzahl der Marker betrachtet (**Abb. 17**), wobei sich zeigte, dass die 2. und 3. dendritische Ordnung signifikant mehr Marker aufweisen als die 1., 4. und 5. Ordnung ($\alpha=0.0002$). Des Weiteren kontaktieren VIP-positive Boutons alle CB-positiven Interneurone auf den primären oder sekundären Dendriten. Die höheren Ordnungen einer individuellen CB-IR-Zelle werden dagegen nicht immer kontaktiert. Bei Betrachtung aller VIP-Boutons an individuellen CB-Neuronen ist die höchste Anzahl der Marker in infragranulären Schichten zu beobachten (158 Marker auf allen Dendriten einer CB-Zelle). Der Maximalwert für eine Zelle in granulären Schichten ist 81 und in supragranulären Schichten 74. Bezogen auf einzelne dendritische Ordnungen wurden Maximalwerte auf tertiären Dendriten einer Zelle verzeichnet (Marker auf Dendriten der 3. Ordnung = 60); der niedrigste Maximalwert ist auf Dendriten der 5. Ordnung (Zahl der Marker = 24) zu finden.

Bei diesen Werten wurde nur die absolute Anzahl der VIP-Boutons bzw. deren Mittelwerte verglichen. Da die absolute Anzahl der VIP-Boutons an einer individuellen Zelle von der Anzahl der Dendriten der betreffenden Zelle beeinflusst wird, können sich Zellen diesbezüglich in der Anzahl der Marker unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Gesamtsumme der Marker durch die Anzahl der Dendriten aller Zellen geteilt. Daraus ergibt sich, dass der Mittelwert bei den einzelnen dendritischen Ordnungen zwischen 1.74 (1. Ordnung) und 1.12 (5. Ordnung) liegt und der Maximalwert mit abnehmender Ordnungszahl der

Dendriten kleiner wird (**Abb. 20**).

Wird die Innervationsdichte (Anzahl der Boutons/ 100 μm Dendritenlänge, **Abb. 18**) betrachtet, so zeigt sich, dass diese an Dendriten 1. Ordnung signifikant höher, und die Innervationsdichte an Dendriten 5. Ordnung signifikant geringer ist ($\alpha=0.0001$), als die an anderen dendritischen Ordnungen. Die höchste Dichte (Marker/ 100 μm =26.75) wird bei Dendriten 1. Ordnung erreicht, die niedrigste Dichte (10.94) bei Dendriten 5. Ordnung (**Abb. 20**). Zu beachten ist, dass bei der Auswertung der Innervation der Dendriten alle kortikalen Schichten (supragranulär, granulär und infragranulär) zusammengefaßt wurden. Des Weiteren wurde die statistische Auswertung nur für die ersten fünf Ordnungen durchgeführt, da für die 6. bis 9. Ordnung eine zu geringe Stichprobe vorhanden war. Die statistische Analyse einzelner Ordnungen und der Vergleich dieser Mittelwerte zwischen einzelnen Schichten wurde ebenfalls aufgrund der zu geringen Stichprobe nicht durchgeführt (Datendiagramme im Anhang, **Abb. 28/29**). Zusammengefaßt ließ sich nachweisen, dass die Innervationsrate (Boutons/ 100 μm Dendritenlänge) mit zunehmender Ordnung abnimmt. Das Kreisdiagramm (**Abb. 19**) zeigt die Verteilung aller Marker auf den Dendriten der verschiedenen Ordnungen. Auch hier ist zu erkennen, dass vor allem die ersten drei dendritischen Ordnungen der CB-positiven Interneurone VIP-positive Boutons aufweisen und insgesamt 84% aller Marker dort lokalisiert sind.

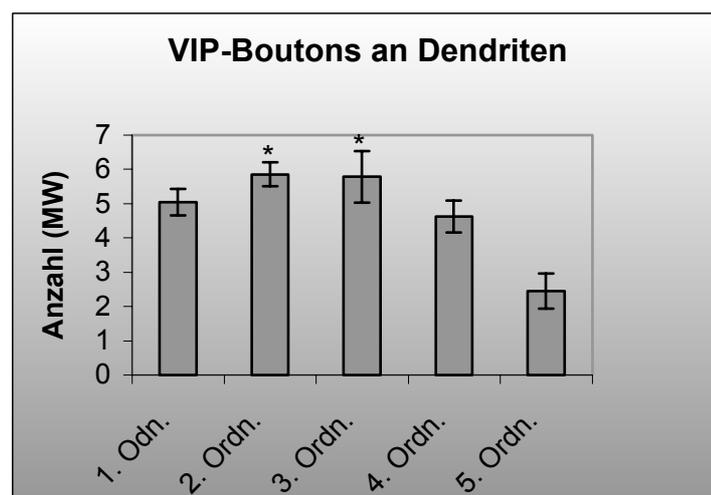


Abb. 17: Das Diagramm zeigt die Anzahl der VIP-positiven Boutons an Dendriten CB-positiver Interneurone. Auf der x-Achse sind die in die Analyse einbezogenen dendritischen Ordnungen (Ordn.) aufgetragen. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte (MW) und der jeweilige Standardfehler der einzelnen Ordnungen aufgetragen. ($\alpha=0.0002$). Signifikante Unterschiede werden durch Sterne hervorgehoben.

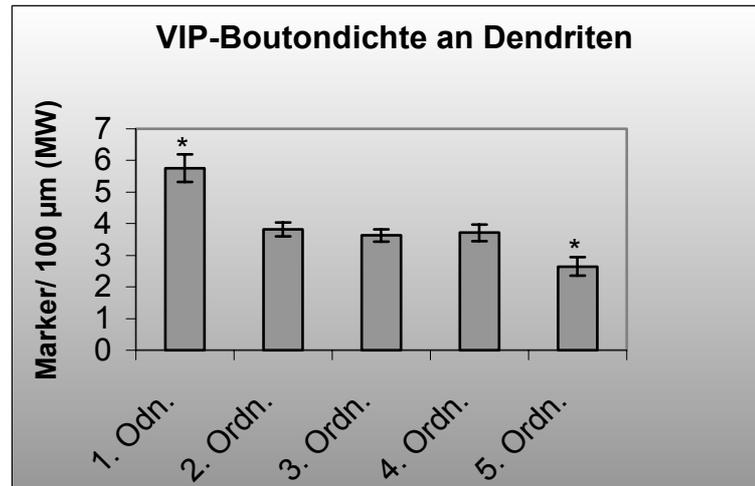


Abb. 18: Das Diagramm zeigt die Dichte der VIP-positiven Boutons an Dendriten CB-positiver Interneurone. Angegeben sind die Mittelwerte (Marker/ 100 µm Dendritenlänge) und der jeweilige Standardfehler der einzelnen dendritischen Ordnungen. ($\alpha=0.0001$). Signifikante Unterschiede werden durch Sterne hervorgehoben.

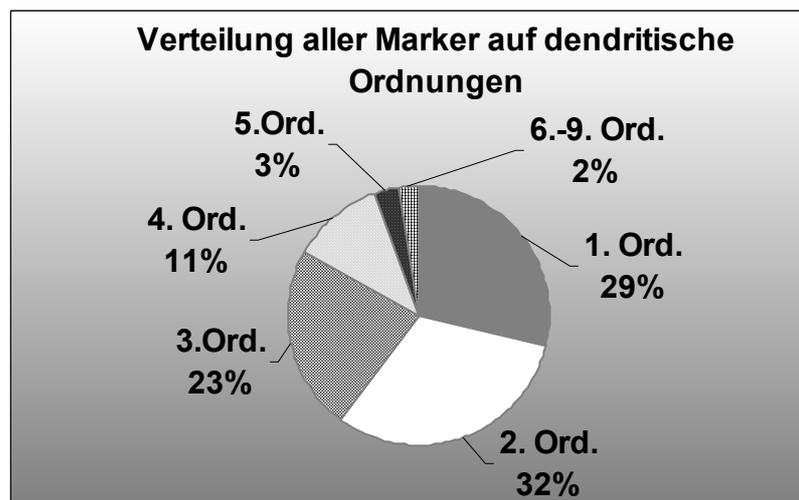


Abb. 19: Prozentuale Verteilung aller erfaßten VIP-Boutons auf Dendriten der verschiedenen Ordnungen. Die Ordnungen sechs bis neun wurden hier zusammengefaßt, da sie insgesamt nur eine geringe Anzahl von VIP-Boutons aufweisen.

Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-IR Interneurondendriten

Ordnung	1. Ord	2. Ord.	3. Ord.	4.Ord.	5. Ord.
MW	4.7	6.2	7.4	5.3	2.8
Max	37	37	60	36	24
Min	0	0	0	0	0
M/ Dendrit (MW)	1.7	1.6	1.7	1.6	1.1
M/ Dendrit; Max	13	10	9	7.5	7
M/ Dendrit; Min	0	0	0	0	0
Dichte (MW)	5.0	3.6	3.4	3.4	2.8
Dichte; Max	26.8	16.3	25.4	13.1	10.9

Abb. 20: Quantifizierung VIP-positiven Boutons an CB-positiven Dendriten. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte (MW), Maxima (Max), Minima (Min), Maxima bzw. Minima der Marker pro Dendrit (M/ Dendrit, Max. bzw. Min.) und Dichte der VIP-Boutons pro 100 μm Dendritenlänge, wobei alle Schichten des Kortex zusammengefaßt sind.

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, sind in die Analyse der quantitativen Datenerhebung nur Zellen einbezogen worden, die bestimmte Kriterien erfüllen. Da sich z.B. in dem gesamten Datensatz nur eine einzige Zelle mit Dendriten 9. Ordnung fand, wurden des Weiteren die Ordnungen, die nur eine geringe Anzahl an Dendriten aufwiesen, bei der Analyse nicht berücksichtigt.

Das Rekonstruktionsverfahren ermöglichte sowohl die Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an den rekonstruierten Zellen, als auch die morphologische Charakterisierung fast aller CB-positiven Interneurone anhand der Somaform und des dendritischen Verzweigungsmusters. Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, dass in allen Schichten des Kortex CB-positive Interneurone zu einem großen Anteil eine bipolare oder multipolare Morphologie ausprägen. Dies bestätigt frühere Studien, die in anderen Arealen und Spezies durchgeführt wurden, wo ebenso diese morphologischen Zelltypen unter CB-IR-Interneuronen beschrieben wurden (Van Brederode et al., 1990; Demeulemeester et al., 1991). Annähernd 90% der Zellkörper weisen eine enge räumliche Assoziation mit VIP-positiven Boutons auf und alle Zellen werden an Dendriten der ersten fünf Ordnungen kontaktiert.

4.1.3 Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

Die Analyse der Zellen, deren Innervation auf elektronenmikroskopischer Ebene nachgewiesen wurde, erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben, durch mehrere Verfahren. Im Folgenden wird zunächst die computerunterstützte Rekonstruktion und die lichtmikroskopische Identifikation einzelner VIP-Boutons beispielhaft an einem CB-positiven Interneuron gezeigt. Der korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Nachweis einzelner VIP-Boutons an CB-Interneuronen als funktionelle Synapsen wird exemplarisch anhand von zwei repräsentativen Zellen dargestellt. Die computerunterstützte Rekonstruktion der CB-positiven Zellen ermöglichte die Anfertigung von Übersichtsskizzen sowie die Darstellung einzelner Zellen mit hoher Auflösung. Die Übersichtsskizze in **Abb. 21A** zeigt die Lage eines CB-positiven Interneurons in den supragranulären Schichten des Barrelkortex; ebenso eingezeichnet sind Blutgefäße und weitere immunreaktive Zellen, die später zur Orientierung auf den Ultradünnschnitten am Elektronenmikroskop dienten. Die in höherer Auflösung gezeichnete Zelle mit tropfenförmiger Morphologie in **Abb. 21B** zeigt sowohl am Soma als auch an allen Dendriten VIP-positive Boutons, die hier durch schwarze Punkte (Marker) symbolisiert werden und durchnummeriert sind. Die **Abb. 21C** zeigt eine lichtmikroskopische Digitalaufnahme, die durch eine Maximumprojektion des Programms „Metaview“ aus einem Bilderstapel über mehrere Fokusebenen berechnet wurde. Durch diese Methode können alle Dendriten der Zelle und die angelagerten VIP-positiven Boutons in einer Projektionsebene visualisiert werden. Wie auf der lichtmikroskopischen Digitalaufnahme (**Abb. 21C**) zu erkennen ist, besteht eine enge räumliche Assoziation zwischen den dunkelblau-gefärbten VIP-Boutons und der braun-gefärbten CB-Zelle.

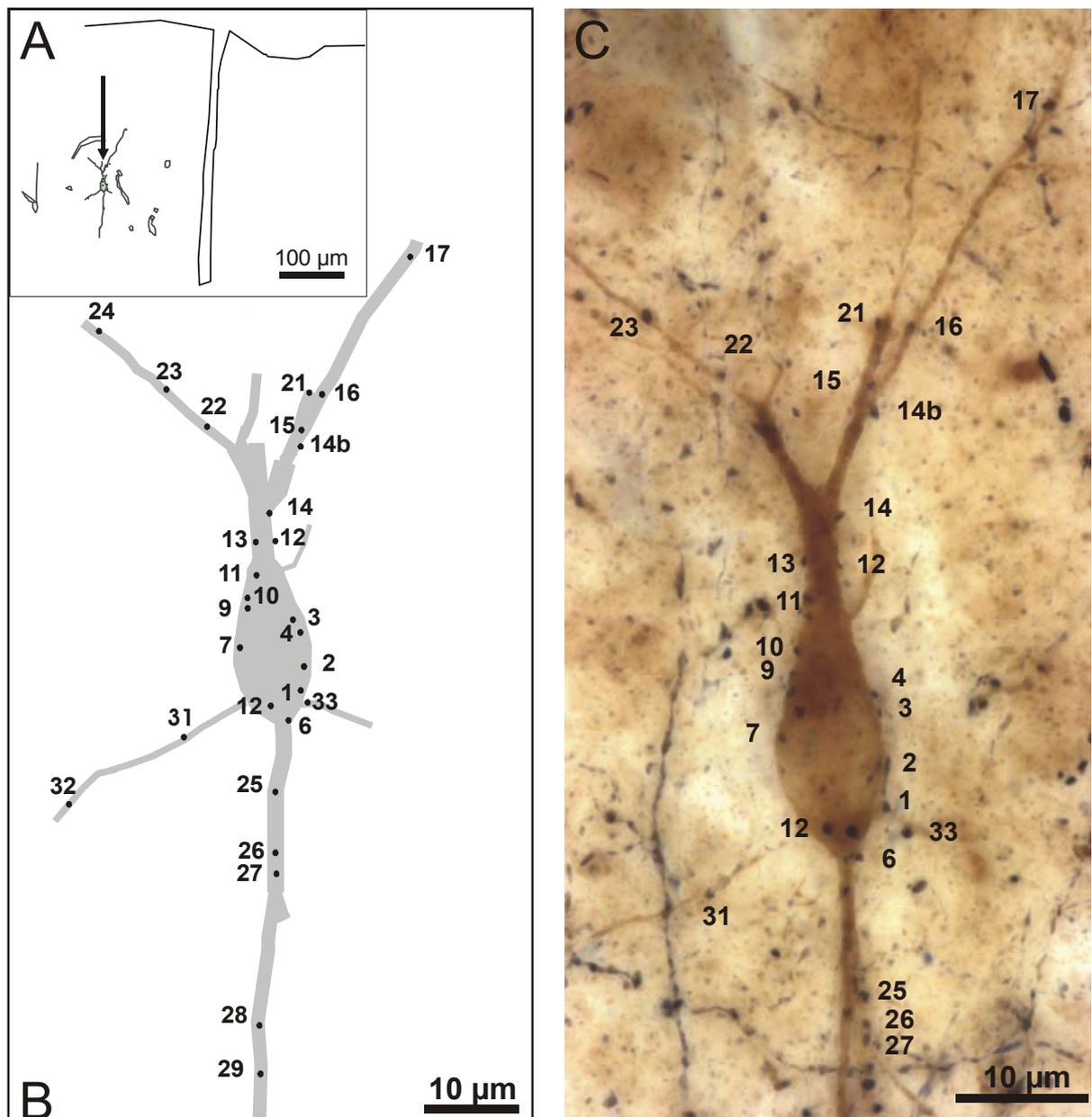


Abb. 21: Computerunterstützte Rekonstruktion einer CB-positiven Zelle und lichtmikroskopische Darstellung. A: Die Übersichtsskizze zeigt die Lage der Zelle (Pfeil) in den supragranulären Schichten und weitere immunreaktive Zellen (Kreise) sowie Blutgefäße. B: Ausschnittsvergrößerung von A zeigt Verteilung und Nummerierung der VIP-positiven Boutons an der Zelle. C: Maximumprojektion eines Bilderstapels zur Darstellung der Zelle über mehrere Fokusebenen.

Ob diese Kontaktstellen aber synaptische Strukturen darstellen, kann nur durch die korrelierte elektronenmikroskopische Untersuchung am gleichen Präparat gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde nun nicht nur untersucht, ob es synaptische Kontakte zwischen neurochemisch definierten Interneuronpopulationen gibt, vielmehr wurden durch den korrelierten Licht- und elektronenmikroskopischen Ansatz einzelne, im LM als potenzielle Kontaktstellen identifizierte Strukturen im EM aufgrund ultrastruktureller Merkmale als Synapsen verifiziert. Im Folgenden wird daher eine Darstellung der Ergebnisse gewählt, die es ermöglicht, die lichtmikroskopisch sichtbaren Boutons direkt mit einer elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahme und einer hohen Vergrößerung mit den identifizierten Boutons zu vergleichen. In der **Abb. 22A** (Nummerierung entspricht der in **Abb. 21**) sind in der lichtmikroskopischen Aufnahme die möglichen Kontaktstellen hervorgehoben, die auch auf der elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahme in **Abb. 22B** als gefärbte Strukturen (Pfeile) zu erkennen sind. Diese liegen also genau in der Ebene dieses nur 70 nm dicken Ultradünnschnittes. Auf der elektronenmikroskopischen Übersicht ist das gesamte Soma und die Dendriten des CB-positiven Interneurons mit granulärem DAB-Reaktionsprodukt gefüllt. Im Soma ist des Weiteren ein ultrastrukturelles Merkmal von Interneuronen gut erkennbar, nämlich die tiefe Einfaltung des Nukleus, der bei Interneuronen relativ groß ist. In den VIP-positiven Boutons ist das DAB-Nickel-Reaktionsprodukt stark angereichert und maskiert teilweise ultrastrukturelle Details, während die nur mit DAB gefärbten Strukturen eine weniger elektronendichte homogene Anfärbung zeigen. Die beiden Reaktionsprodukte sind gut voneinander unterscheidbar, sowohl in der Lichtmikroskopie, als auch auf ultrastruktureller Ebene. Die VIP-positiven Boutons sind in höherer Vergrößerung in den **Abb. 22C** bis **22H** dargestellt. Die präsynaptischen Axonterminalien liegen direkt der Membran der CB-positiven Zelle an. Nicht in allen Fällen ist aufgrund der ungünstigen Orientierung der mit der Übersichtsaufnahme korrespondierenden Schnitte im EM ein synaptischer Spalt erkennbar (s. **Abb.22C** und **Abb.22D**). In den **Abb. 22E** bis **22H** ist der synaptische Spalt zwischen präsynaptischem Axon und postsynaptischer DAB-gefärbter Struktur durch Pfeile markiert. Ebenso sind die für Axonterminalien typischen Vesikel und Mitochondrien (s. **Abb. 22E**, Bouton 7) erkennbar.

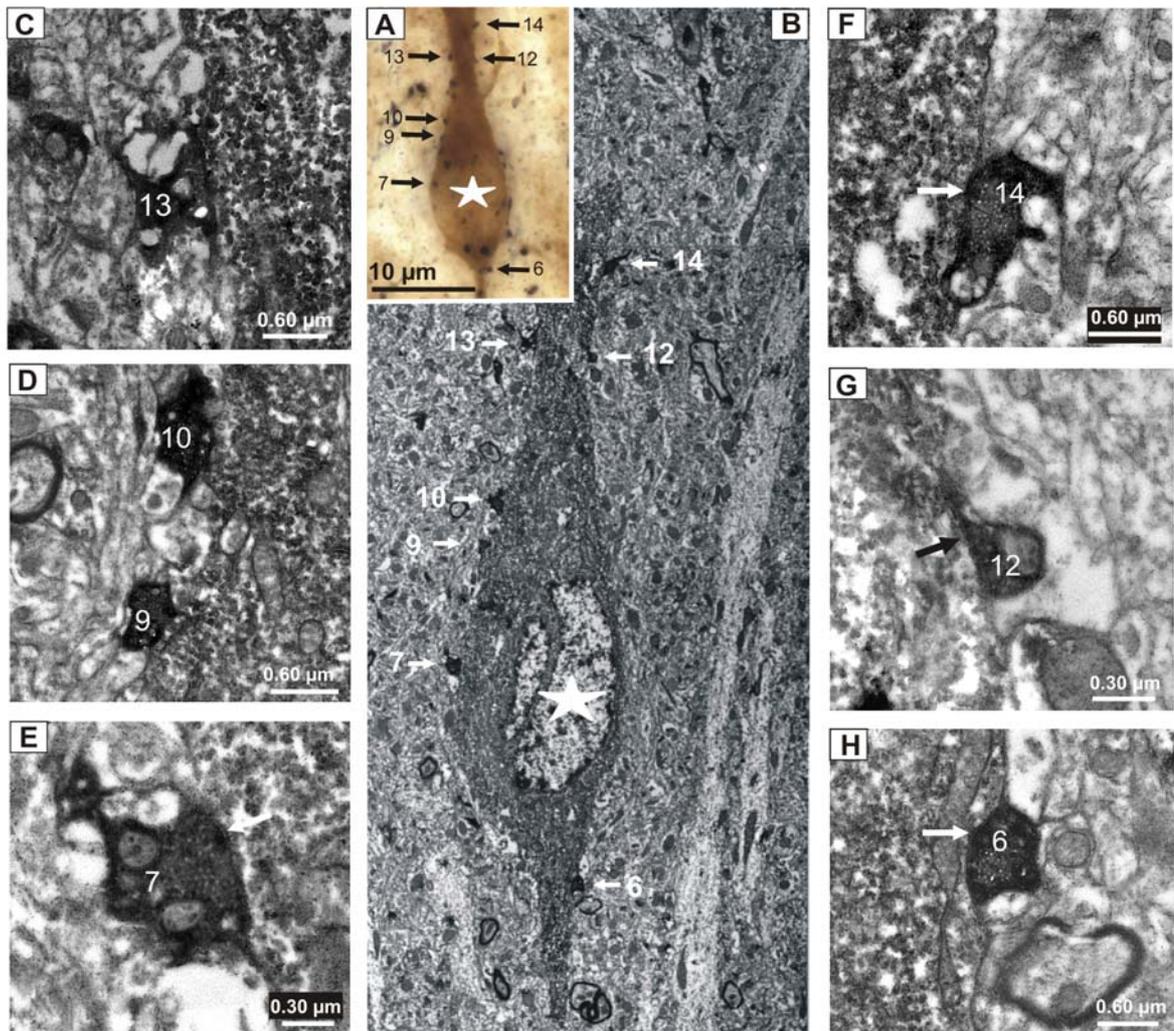


Abb. 22: Korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie. A: Lichtmikroskopische Digitalaufnahme der CB-positiven Zelle (Stern am Soma) mit multiplen Kontakten von VIP-positiven Boutons. B: Elektronenmikroskopische Übersicht. Die nummerierten Pfeile in A und B weisen auf die zu verifizierenden Boutons hin. C bis H: Hochauflösende elektronenmikroskopische Digitalaufnahmen der VIP-positiven Boutons mit Mitochondrien. Die Pfeile zeigen auf den elektronendichten synaptischen Spalt.

Die präsynaptischen Elemente, VIP-positive Axonterminalien, konnten in der vorliegenden Untersuchung leicht durch das Nickel-verstärkte DAB-Reaktionsprodukt im Neuropil lokalisiert werden. Die kontrastreiche Anfärbung erschwerte jedoch die Charakterisierung ultrastruktureller Merkmale der synaptischen Kontaktstellen. Alle Vesikel der Boutons sind hier mit dem DAB-Ni-Reaktionsprodukt gefüllt, es lassen sich keine kleinen, klaren Vesikel in diesem Material erkennen (vgl. Pelletier et al., 1981). Folgende Kriterien wurden zur Identifizierung einer Synapse herangezogen: (i) Das präsynaptische VIP-positive Bouton ist unmittelbar an die postsynaptische Zelle oder an deren Dendriten angelagert. (ii) Das Vorhandensein von synaptischen Vesikeln in unmittelbarer Nähe der synaptischen Verdichtung, der sogenannten aktiven Zone. (iii) Die Identifizierung des synaptischen Spaltes mit Verdichtungen an der

cytoplasmatischen Außenseite stellte ein wichtiges Kriterium bei der Charakterisierung synaptischer Kontaktstellen dar.

Im Folgenden wird noch eine andere CB-positive Zelle exemplarisch dargestellt, da hier weitere ultrastrukturelle Merkmale erkennbar sind, die bei der Identifizierung und Charakterisierung von Synapsen dienlich sein können. Die bipolare CB-positive Zelle in der **Abb. 23** ist in den infragranulären Schichten des Barrel Kortex lokalisiert. In der lichtmikroskopischen Digitalaufnahme sind zahlreiche blau-schwarz gefärbte VIP-positive Axonterminalien am Zellkörper und an den Dendriten der mit DAB gefärbten Zelle zu erkennen. Die Pfeile in **Abb. 23A** zeigen auf potenzielle Kontakte, die den geschwärzten Strukturen auf der elektronenmikroskopischen Übersicht in **Abb. 23B** entsprechen. Diese zeigen in den Vergrößerungen, wo Mitochondrien und Vesikel erkennbar werden, die typischen Merkmale der präsynaptischen Elemente. Ein weiteres charakteristisches Merkmal synaptischer Strukturen ist die sog. postsynaptische Verdichtung der postsynaptischen Membran (Pfeile in **Abb. 23C und 23E**). Basierend auf den ultrastrukturellen Merkmalen der Präsynapse (Vesikel) und denen der Postsynapse, können asymmetrische von symmetrischen Synapsen unterschieden werden. Da die postsynaptische Verdichtung nicht sehr prominent ausgebildet ist und die Vesikel eher oval als rund erscheinen, können die Synapsen VIP-positiver Axone als symmetrisch bzw. als Typ 2 nach Gray (1959) charakterisiert werden. Insgesamt wurden fünf CB-positive Interneurone in der korrelierten Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht. Aufgrund der elektronendichten Reaktionsprodukte, mit denen die beiden Antigene visualisiert wurden, werden ultrastrukturelle Merkmale synaptischer Elemente oft maskiert. Synapsen wurden als solche gewertet, wenn ein synaptischer Spalt und Vesikel im präsynaptischen Bouton identifiziert werden konnten. Die Tabelle in **Abb. 24** fasst die Ergebnisse der ultrastrukturellen Verifizierung lichtmikroskopisch identifizierter Kontakte zusammen. Annähernd 84% der VIP-positiven Boutons, die am Soma von den untersuchten Zellkörpern lokalisiert waren, konnten mittels der ultrastrukturellen Merkmale der Prä- und Postsynapse als synaptische Kontaktstellen charakterisiert werden. Anders verhält es sich mit VIP-positiven Boutons an CB-positiven Dendriten, die zunächst lichtmikroskopisch als potenzielle Kontaktstellen klassifiziert wurden. Hier ließ sich eine Korrelation von durchschnittlich nur ca. 52% beobachten. Die geringere Korrelation der licht- und

elektronenmikroskopischen Datenerhebung bei Dendriten lässt sich teilweise auf die Schwierigkeit zurückführen, ununterbrochene Serien an Ultradünnschnitten zu erhalten. Während die Zellkörper eine Tiefe von nur ca. 10 μm einnehmen, können sich Dendriten über die gesamten Schnittdicke von 50 μm ausdehnen. Ein weiterer Grund für die in der Tabelle angeführten nichtkorrelierenden Kontakte ist durch die begrenzte Auflösung des Lichtmikroskops bedingt. So wurden aufgrund der höheren Auflösung im Elektronenmikroskop weitere Synapsen identifiziert (in der Tabelle mit + angegeben), die bei der Auswertung im Lichtmikroskop nicht erkennbar waren. Bei der gefundenen Gesamtkorrelation von ca. 68% bedeutet dies nun, dass durch eine lichtmikroskopische Untersuchung der Innervation von Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit alle Kontakte an Zellkörpern sich auch ultrastrukturell als Synapsen verifizieren lassen. Insbesondere an Dendriten finden sich im Elektronenmikroskop aber in der Regel mehr Synapsen, als zuvor nach der lichtmikroskopischen Untersuchung angenommen wurde. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die in dieser Studie erhobene Innervationsrate von CB-positiven Dendriten eine Unterschätzung der Innervationsrate ist, die sich bei elektronenmikroskopischer Untersuchung aller Zellen ergeben würde.

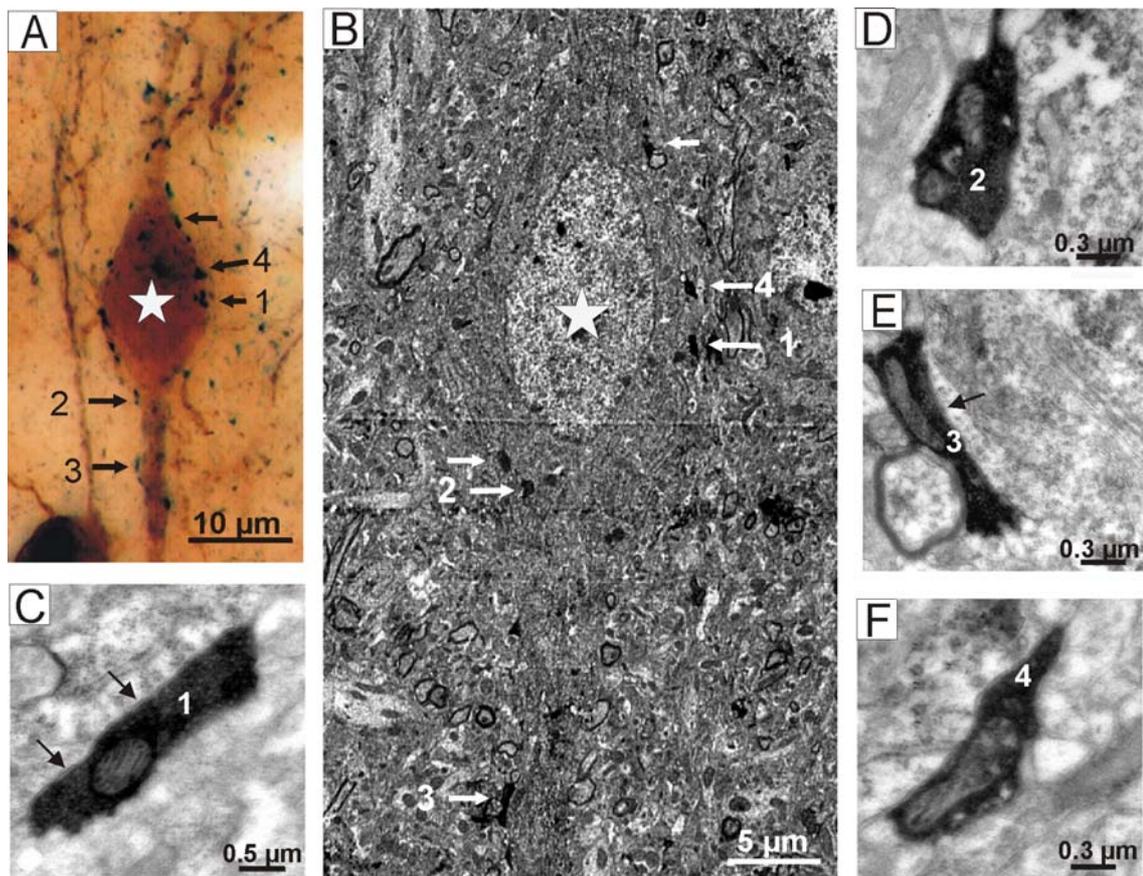


Abb. 23: Korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie. A: Lichtmikroskopische Digitalaufnahme der CB-positiven Bipolarzelle (Stern am Soma). B: Elektronenmikroskopische Übersicht. Pfeile in A und B weisen auf die VIP-positiven Boutons hin. C bis F: Hochauflösende elektronenmikroskopische Digitalaufnahmen der VIP-positiven Boutons. Die Pfeile zeigen die postsynaptischen Verdichtungen.

Korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie

EM-Block	LM	EM	Soma		LM	EM	Dendriten		Gesamt-Korrelation (%)
	Marker / Soma	Korrelierte Kontakte	Keine Korrelation	Korrelation (%)	Marker auf Dendriten	Korrelierte Kontakte	Keine Korrelation	Korrelation (%)	
12	8	8	+2	75	10	7	4(-3+1)	42.9	58.95
13	8	8	+1	87.5	8	8	+8	50	68.75
14	8	8	+2	75	12	6	-6	50	62.50
18	10	9	-1	90	18	15	-3	80.0	85.00
20	13	12	-1	91.6	23	18	11(-5+6)	38.9	65.25
Summe	47	45	7	***	71	54	32	***	***
MW	9.4	9	1.4	83.82	142	10.8	6.4	52.36	68.09

Abb. 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der korrelierten Licht- und Elektronenmikroskopie. Insgesamt wurden 5 EM-Blöcke mit je einer CB-positiven Zelle untersucht. Angegeben sind hier die Zahl der VIP-Boutons am Soma (linke Spalten) und an Dendriten (rechte Spalten). Konnten die gleichen VIP-Boutons der LM im EM als Synapsen verifiziert werden, so sind sie hier als korrelierte Kontakte aufgeführt. Konnten sie nicht als Synapsen verifiziert werden oder wurden im EM weitere Synapsen gefunden, so ist dies unter der Rubrik „keine Korrelation“ aufgeführt. Minus bedeutet, ein Bouton konnte nicht als Synapse verifiziert werden; Plus bedeutet, im EM wurden weitere Synapsen gefunden, die nicht im LM zu erkennen waren. MW= Mittelwert; *** = Summenfunktion nicht anwendbar.

4.2 Doppelimmunfluoreszenz der Antigene VIP und CB

Die Ergebnisse der fluoreszenten Darstellung der beiden Antigene entsprechen im Wesentlichen den Ergebnissen der Doppelimmunperoxidase-Markierung, ermöglichen jedoch eine bessere Unterscheidbarkeit der angefärbten Zellpopulationen. Eine Übersicht der Verteilung der immunreaktiven Elemente in allen Schichten des Neokortex bietet die **Abb. 25A**. CB-positive Neurone (grün) sind in allen Schichten lokalisiert. In supragranulären Schichten sind viele Pyramidalzellen schwach fluoreszierend, während Interneurone nur vereinzelt durch ihre intensive Immunreaktivität für CB auffallen (**Abb. 25B**). In den granulären Schichten sind nur vereinzelt CB-positive Zellen zu finden, dagegen exprimieren in infragranulären Schichten zahlreiche Interneurone, aber keine Pyramidenzellen, CB (van Brederode et al., 1991; DeFelipe, 1993). In granulären und infragranulären Schichten sind demnach ausschließlich Interneurone CB-immunreaktiv und lassen aufgrund der ausgeprägten Anfärbung der Dendriten die vertikale Ausdehnung durch mehrere Schichten erkennen. Diese Verteilung CB-positiver Elemente entspricht im Wesentlichen den Ergebnissen bisheriger Studien, die CB im Kortex verschiedener Spezies nachgewiesen haben (Demeulemeester et al., 1989; Celio, 1990; Hendry und Jones, 1991; Rogers und Resibois, 1992). Ebenso exprimieren in allen Schichten zahlreiche Interneurone VIP, deren Dendriten ebenfalls durch mehrere Schichten verlaufen und zum Teil von der Schicht V bis zur Schicht I zu verfolgen sind. Im Unterschied zu der Anfärbung von CB-Zellen (vgl. van Brederode et al., 1990), lassen sich hier im Neuropil axonale Boutons erkennen, die aber meist nicht einer Ursprungszelle zuzuordnen sind. Im Gegensatz zu bisherigen Studien, die eine nicht zufällige Verteilung der Boutons in Bezug auf einzelne Schichten beschreiben (Hajos et al., 1988), erscheinen in dieser Doppelimmunfluoreszenz-Markierung die VIP-Boutons relativ homogen verteilt. Eine Abgrenzung der einzelnen Laminae und Sublaminae ist hier mittels dieser Anfärbung nicht sicher durchführbar, so daß keine schichtenspezifische Quantifizierung angewendet werden konnte. Gut zu erkennen ist in dieser Übersicht, dass die CB- und VIP-IR Neurone in komplementären Systemen auftreten und einzelne Zellen nicht beide Antigene kolokalisieren. In **Abb. 25C** ist eine CB-positive Multipolarzelle in hoher Vergrößerung dargestellt. Die Dendriten der in Schicht VI lokalisierten Zelle sind im Gegensatz zu den meisten Zellen der Schichten II bis V horizontal ausgerichtet,

was bei Zellen nahe der weißen Substanz öfter beobachtet werden konnte (Hendry und Jones, 1991). Diese Zelle wird kletterfaserartig von multiplen VIP-positiven Boutons kontaktiert, was exemplarisch durch Pfeile hervorgehoben wurde.

4.3 Intrazelluläre Farbstoffinjektionen in fixierten Hirnschnitten

Die Methode der intrazellulären Injektion von fluoreszenten Farbstoffen in fixierten Gewebeschnitten konnte nach der Perfusion ca. eine Woche lang durchgeführt werden, ohne dass die Qualität der Füllung beeinträchtigt wurde. Neben diesem zeitlichen Parameter war ein weiterer kritischer Faktor die Fixierung des Gewebes, da sich die Zellen bei zu starker Fixierung nicht optimal füllen ließen. Eine weitere Voraussetzung für die erfolgreiche Zellfüllung ist der Strukturerthalt der Membran, was den Einsatz jeglicher Detergenzien ausschließt (Buhl und Lübke, 1989). Das Auffinden der Zellkörper erfolgte ohne vorherige Zellkörperfärbung, indem die Mikroelektrode im Gewebe vorwärtsbewegt wurde, wobei sich die Zellkörper bei erfolgreicher Penetration sofort mit Farbstoff füllten. In der Regel konnten in einem Gewebeschnitt mehrere Zellen durch Stromapplikation injiziert und der Schnitt immunhistochemisch gefärbt werden. Da die kortikale Neuronenpopulation zu ca. 85% aus Pyramidalzellen besteht, wurden diese im Vergleich zu Interneuronen relativ häufig mit der Elektrode penetriert und angefärbt. Selten wurden auf diese Weise Gliazellen gefüllt. Die Methode der intrazellulären Farbstofffüllung ohne Vormarkierung der Zielzellen hat sich demnach für die Untersuchung der Innervation von Pyramidenzellen als erfolgreich erwiesen, bei einer anderen Neuronenpopulation wäre eine Vormarkierung zur gezielten Injektion bestimmter Zelltypen geeigneter.

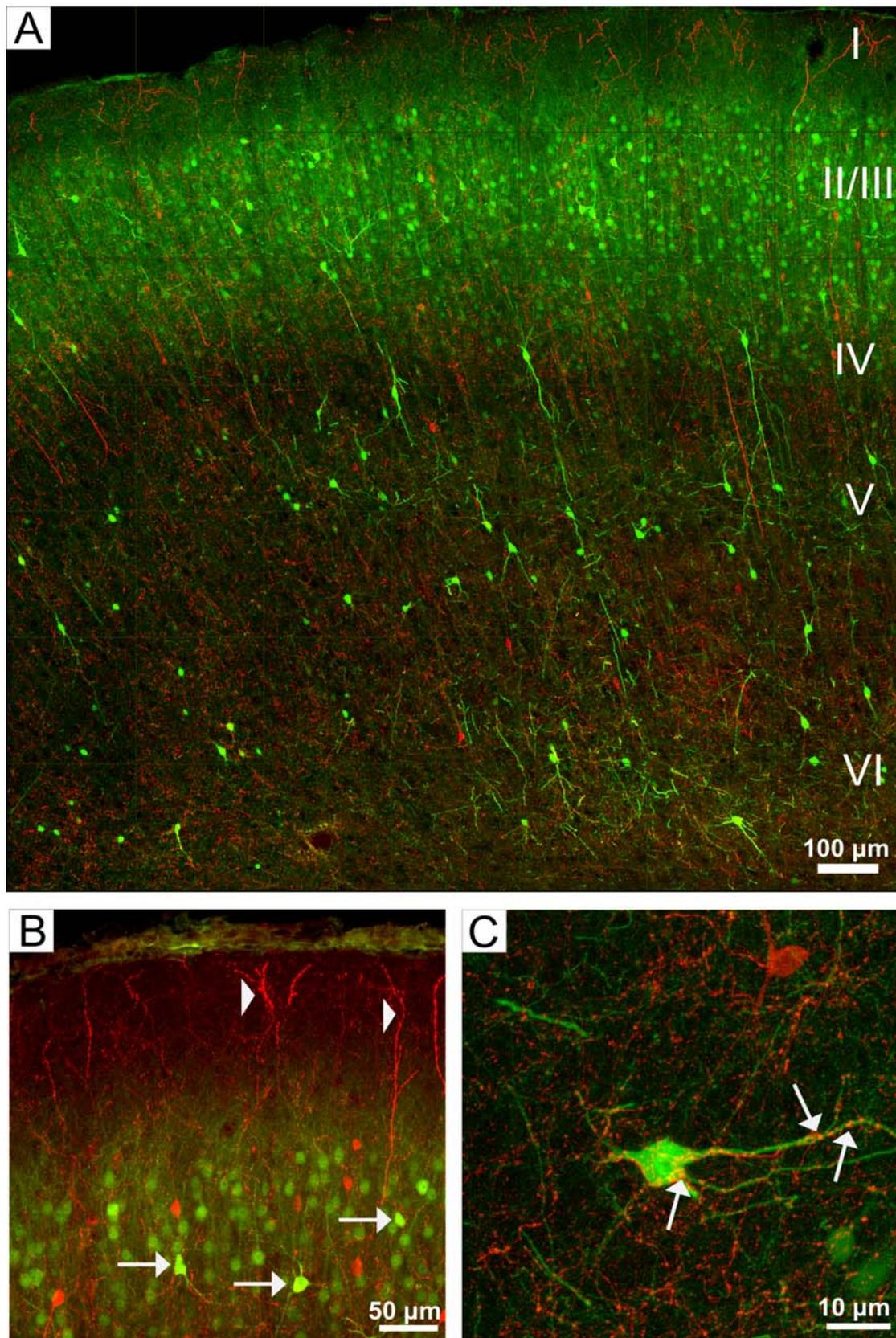


Abb. 25: Konfokale Aufnahme der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von VIP (rot) und CB (grün). **A:** Computergesteuerte Bildmontage und 3D-Rekonstruktion (3D-MISA) zeigt die Verteilung der IR der Antigene in allen Schichten des Cortex. I bis VI: Laminae des Cortex. **B:** In supragranulären Schichten sind viele Pyramidenzellen schwach und einzelne Interneurone (Pfeile) stark immunreaktiv für CB. Pfeilspitzen weisen auf intensiv angefärbte VIP-IR-Dendriten in Schicht I. **C:** Horizontal ausgerichtete CB-Zelle in Schicht VI wird kletterfaserartig von multiplen VIP-IR-Boutons (Pfeile am Soma und an Primärdendriten) kontaktiert.

4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von VIP nach intrazellulärer Injektion von Lucifer Yellow

Durch die intrazelluläre Farbstoffinjektion konnte die Morphologie von drei Stern- und 32 Pyramidenzellen des Kortex dargestellt werden. Die vollständige Füllung der weit ausladenden Dendritenbäume wurde bei dieser Methode durch die Schnittdicke von nur 50 µm limitiert. Dennoch ist davon auszugehen, dass die durch diese Methode gefüllten Dendriten in einer Qualität dargestellt wurden, die einer Golgifärbung vergleichbar ist (Buhl und Lübke, 1989). Im Vergleich zu Golgifärbungen oder intrazellulären Farbstoffinjektionen in lebenden Gewebeschnitten, ließ sich das Axon nur über wenige Mikrometer vom Soma entfernt mit dem Farbstoff füllen. Die Farbstoffinjektion in fixiertem Gewebe eignet sich dennoch hervorragend für die in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung, da es die einzige Methode ist, bei der die Dendritenbäume einschließlich ihrer Dornfortsätzen visualisiert werden können. Durch die Verwendung von fixiertem Gewebe konnten anschließend interessierende Antigene gut immunhistochemisch nachgewiesen werden. In der **Abb. 26A** wird die Füllung einer Sternzelle der Schicht IV und in **Abb. 26B** die Füllung einer Pyramidenzelle der supragranulären Schichten dargestellt. An der Sternzelle lassen sich die typischen Merkmale dieser Zellklasse erkennen (Feldman und Peters, 1978). Vom runden Soma aus verzweigen sich in alle Richtungen Dendriten. Das Axon entspringt aus der Basis des Zellkörpers und verläuft in Richtung der infragranulären Schichten. Der sich zur Pia erstreckende Dendrit ist dünner als der für Pyramidenzellen typische apikale Dendrit und verzweigt sich nur mäßig in Dendriten höherer Ordnungen. Die Zelle ist multipolar und ihre Dendriten bilden zahlreiche Dornfortsätze aus, weswegen hier eine bedornete, vermutlich exzitatorische Sternzelle vorliegen muß. Ebenso lassen sich die für Pyramidenzellen typischen Merkmale in **Abb. 26B** zeigen (Feldman und Peters, 1978). Der apikale Dendrit verzweigt sich gleichmäßig in Richtung Pia und endet mit einer Aufzweigung in Dendriten höherer Ordnung (Endbüschel). Das Soma ist nicht rund, sondern weist eine trianguläre Form auf, von denen aus sich die Hauptdendriten, der apikale und zwei basale Dendriten, verzweigen. Diese Zellklasse weist ebenfalls zahlreiche Dornfortsätze auf. In **Abb. 26** sind axonale Boutons, die sich dicht an dendritische Strukturen der gefüllten

Zellen anlagern, mit Pfeilen markiert. Auch hier kann mit großer Wahrscheinlichkeit von einer synaptischen Innervation dieser exzitatorischen Zellklassen ausgegangen werden. Sie unterscheidet sich von der Innervation der CB-Zellen dahingehend, dass die Dendriten häufig, die Somata aber nur selten durch VIP-IR Boutons kontaktiert werden. Eine multiple Innervation von Zellkörpern wurde nie beobachtet. Auf allen konfokalen Aufnahmen, die von diesen gefüllten Zellen in verschiedenen Vergrößerungen angefertigt wurden, sind VIP-Boutons nur an dendritischen Stämmen angelagert, so daß bislang keine Innervation von Dornfortsätzen nachgewiesen wurde. Bei den Pyramidenzellen wurde, neben der fluoreszenten Färbung zur Darstellung spezifischer Zellpopulationen im konfokalen Laserscanmikroskop, eine korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung vorgenommen, um potenzielle Synapsen im EM als solche zu verifizieren. Im Folgenden wird dies an einem Beispiel demonstriert.

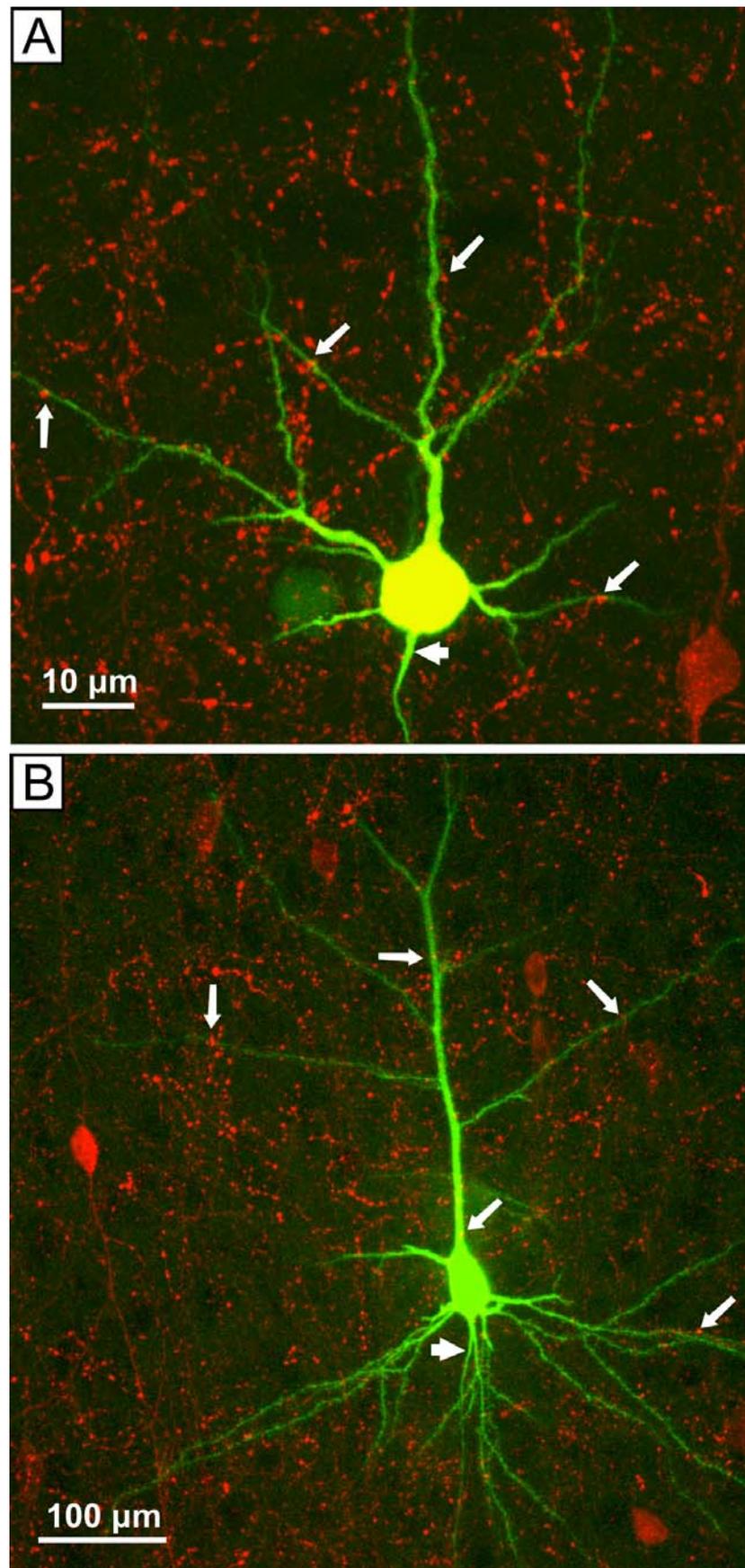


Abb. 26: Konfokale Aufnahme einer mit Lucifer Yellow gefüllten Sternzelle der Schicht IV in A und einer Pyramidenzelle der Schichten II/III in B. Durch die immunhistochemische Visualisierung von VIP können axonale VIP-IR Boutons beobachtet werden, die sich dicht an die Dendriten dieser Zellen anlagern (weiße Pfeile). Pfeilspitzen deuten auf die Axoninitialsegmente.

4.3.2 Intrazelluläre Injektion von Microruby (MR) und immunhistochemische Visualisierung von MR und VIP für die korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie

Der biotinylierte Farbstoff MR wurde in insgesamt 22 Pyramidalzellen injiziert. In allen Präparaten wurde Biotin in ein elektronendichtes DAB-Reaktionsprodukt umgewandelt, um die Zellen ultrastrukturell untersuchen zu können. Während dieses Vorgehen zu einer Anfärbung führte, die die Morphologie der Zellen einer ultrastrukturellen Untersuchung gut zugänglich macht, führte die anschließende Darstellung von VIP mittels der indirekten Immunhistochemie häufig zu einer Anfärbung, die die Unterscheidbarkeit der verwendeten Chromogene - DAB (braun) für gefüllte Zellen, DAB-Ni (blau-schwarz) für VIP-positive Strukturen - im Lichtmikroskop erschwerte. Dies führte insbesondere dazu, dass intensiv angefärbte Dornfortsätze teilweise nur schwer von dunkelblau angefärbten VIP-IR Boutons zu unterscheiden waren. Hier ist folglich die Methode der immunfluoreszenten Technik vorteilhafter, da durch diese eine exzellente Unterscheidbarkeit der interessierenden Antigene im konfokalen Mikroskop erzielt werden kann. Immunfluoreszente Nachweismethoden sind allerdings nicht unmittelbar einer ultrastrukturellen Untersuchung zugänglich, so dass in der vorliegenden Arbeit beide Nachweismethoden eingesetzt wurden. In **Abb. 27** wird die Vorgehensweise der hier durchgeführten Methode beispielhaft verdeutlicht. Der im Fluoreszenzmikroskop dunkelrot leuchtende Farbstoff wird zunächst, wie schon bei Lucifer Yellow beschrieben, iontophoretisch injiziert (**Abb. 27A**). Das Ergebnis der Konvertierung von MR in ein elektronendichtes Reaktionsprodukt ist in **Abb. 27B** zu sehen, wo eine Pyramidenzelle der supragranulären Schichten mit DAB gefärbt wurde. Die Pfeile zeigen auf VIP-positive Boutons, die in den **Abb. 27D** und **27E** als elektronenmikroskopische Detailaufnahmen zu sehen sind. Die Korrelation von Licht- und Elektronenmikroskopie wird deutlich, wenn die Strukturen der Bilder B und C verglichen werden (siehe Blutgefäß; Lage der Zelle und der Boutons). Beide Boutons, in **Abb. 27D** und **E** vergrößert dargestellt, zeigen die Merkmale typischer Präsynapsen, indem sie große Mitochondrien und Vesikel enthalten. Die Synapse zeigt einen elektronendichten synaptischen Spalt zwischen dem VIP-Bouton und der DAB-gefärbten Zelle; nahe des Spaltes ist die postsynaptische Verdichtung erkennbar. Durch die ultrastrukturellen Untersuchung

ließ sich eine Innervation von Pyramidenzellen durch VIP-IR Boutons nachweisen. Die intrazelluläre Farbstoffinjektion ermöglichte in der vorliegenden Arbeit den Nachweis der Innervation von Pyramidenzellen durch VIP-IR Boutons, wobei an Pyramidenzellen zwei Zielstrukturen identifiziert werden konnten. VIP-positive Axone kontaktieren diese Zellklasse sowohl am Soma als auch an dendritischen Stämmen.

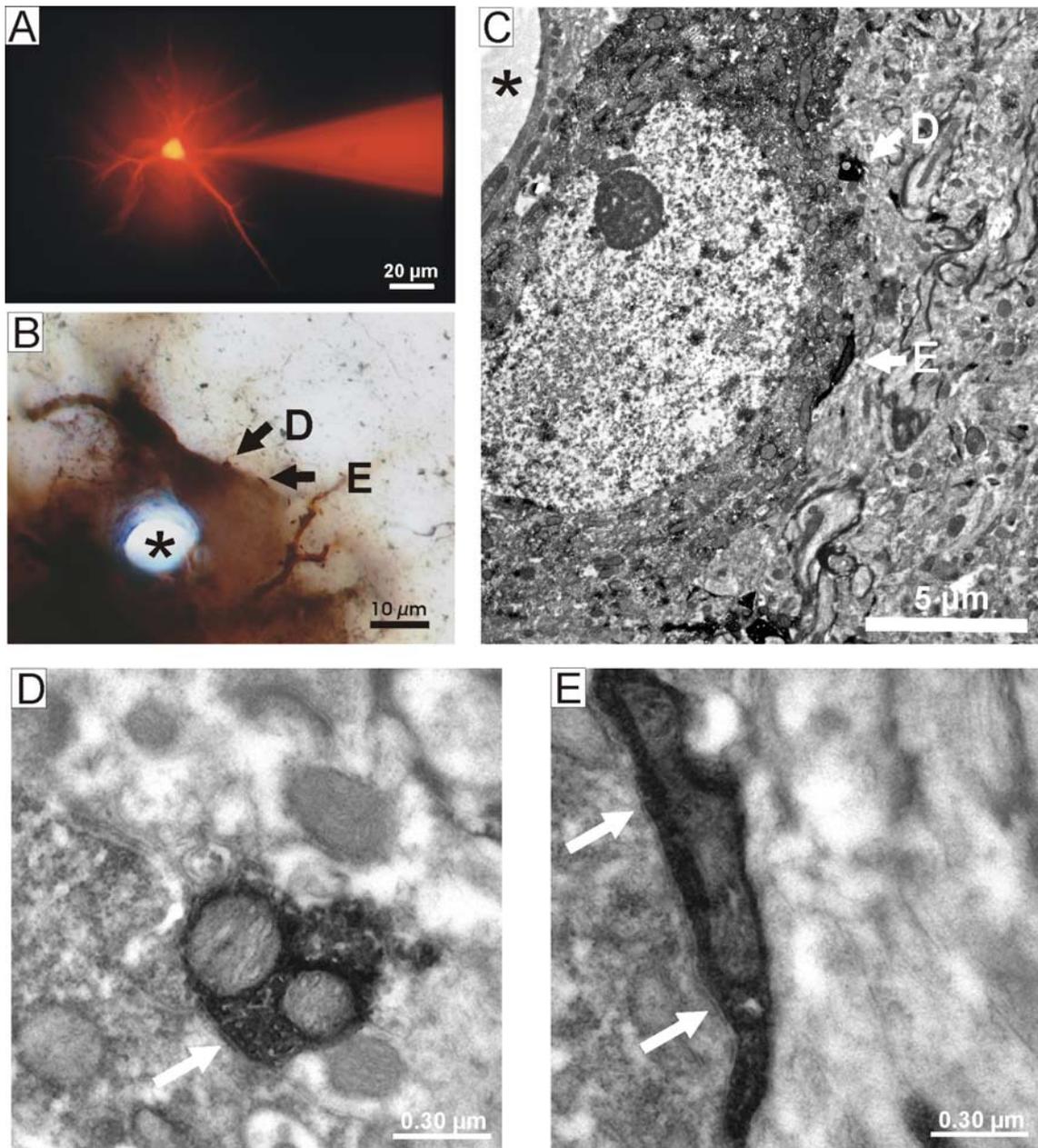


Abb. 27: Intrazelluläre Farbstoffinjektion und immunhistochemischer Nachweis VIP-positiver Strukturen in korrelierter Licht- und Elektronenmikroskopie. A: Mit einer Mikroelektrode wird MR ionotoporetisch in eine Pyramidenzelle injiziert. B: Eine andere Zelle nach Konvertierung von MR zur ultrastrukturellen Untersuchung. VIP wurde immunhistochemisch dargestellt. Pfeile zeigen auf zwei VIP-positive Boutons, die in der elektronenmikroskopischen Übersicht C ebenfalls mit Pfeilen markiert sind. In D und E sind diese Axonterminalien herausvergrößert und die Pfeile weisen hier auf die postsynaptischen Verdichtungen hin.

5. Diskussion

Traditionellerweise wurden GABAerge, inhibitorische Interneurone des Hippokampus und des Kortex vor allem als Regulatoren der Pyramidalzellaktivität angesehen. In den letzten Jahrzehnten zeigten Untersuchungen jedoch eine weitaus komplexere Rolle z.B. bei der Synchronisation von neuronalen Ensembles, der Formung rezeptiver Felder sowie Involvierung in sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Schaltkreise (Staiger et al., 1997; McBain und Fisahn, 2001). Im Vergleich zu Pyramidalzellen zeichnen sich Interneurone durch ihre Vielfalt bezüglich ihrer morphologischen, chemischen und physiologischen Merkmale aus (Van Brederode et al., 1990; Kawaguchi und Kubota, 1993; Kawaguchi und Kubota, 1996; DeFelipe, 1997; Gonchar und Burkhalter, 1997; Cauli et al., 2000; Gupta et al., 2000). Um die Prinzipien der Funktionsweise kortikaler Schaltkreise erkennen und verstehen zu können, ist es hilfreich, funktionelle Subtypen inhibitorischer Interneurone zu definieren und ihre synaptische Konnektivität zu beschreiben (Kawaguchi, 2001). VIP-positive Bipolarzellen bilden eine morphologisch und funktionell charakterisierte Zellklasse unter den GABAergen Neuronen im Neokortex (Porter et al., 1998; Rozov et al., 2001). Im Rahmen dieser Studie konnte für die Klasse der VIP-IR-Interneurone gezeigt werden, dass sie nicht nur, wie für Interneurone angenommen, direkten Einfluss auf erregende Elemente kortikaler Schaltkreise ausüben, sondern mit anderen Subtypen von Interneuronen, hier CB-exprimierenden Zellen, konnektiert sind. Die Quantifizierung der Innervation zeigt, dass VIP-Zellen alle CB-IR Interneurone synaptisch kontaktieren, und zwar bevorzugt mit multiplen Boutons am Soma und an den proximalen Dendriten. Die Innervationsdichte nimmt mit zunehmender dendritischer Ordnung der Zielzellen ab, so dass nicht nur die allgemeine Art der Zielstrukturen, wie Soma, Dendrit, Axon, sondern auch die spezifische Lokalisation der Kontaktstellen eine zelltypspezifische Signatur der Konnektivität kortikaler Schaltkreise darstellen. Im Vergleich zur spezifischen Innervation CB-positiver Interneurone sind VIP-Zellen gleichzeitig, aber nicht so prominent, in erregenden Schaltkreisen involviert. VIP-positive Boutons finden sich in enger räumlicher Assoziation mit Pyramidalzellen, und der Nachweis chemischer Synapsen wurde durch die ultrastrukturelle

Untersuchung an selektierten Zellen erbracht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Einen verschiedene Methoden kombiniert, die aus Gründen der Kompatibilität eine Anpassung bestehender Standardprotokolle erforderten, zum Anderen wurden bisher nicht etablierte Methoden und Auswertungsverfahren spezifisch für die Fragestellungen dieser Arbeit entwickelt. Im Folgenden werden daher zunächst methodische Aspekte diskutiert. Daran anschließend werden die Ergebnisse der Arbeit erörtert und im Kontext der Informationsverarbeitung neokortikaler Areale diskutiert.

5.1. Diskussion methodischer Aspekte

5.1.1 Gewebefixierung und -behandlung

Zur möglichst kompletten Darstellung von VIP-positiven axonalen Boutons wurde bei der Perfusion Acrolein verwendet, das wegen der hohen Toxizität nicht standardmäßig zum Einsatz kommt. Acrolein hat sich jedoch bei der Fixierung von Gewebe bei einigen Antigenen, speziell bei der Visualisierung von Peptiden, aufgrund einer verbesserten Detektierbarkeit, bei dennoch guter Darstellung der Ultrastruktur bewährt (Meinecke und Peters, 1987; Leranth und Pickel, 1989). Es ist reaktiver als Formaldehyd und Glutaraldehyd und penetriert das Gewebe schneller, da es sehr fettlöslich ist (Glauert und Lewis, 1998). In der vorliegenden Untersuchung konnten axonale VIP-positive Strukturen hervorragend durch diese Art der Perfusion dargestellt werden, so dass vermutlich das ganze Ausmaß der Innervation erfasst wurde. Die Ultrastruktur ließ sich ohne Nachkontrastierung mit Bleiacetat im EM darstellen, was für die korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie von Vorteil war. Auf die intrazelluläre Farbstoffinjektion wirkt sich dieses Fixanz jedoch eher nachteilig aus, da sich die Zellen weniger gut mit Farbstoff füllen ließen.

5.1.2 Lichtmikroskopische Quantifizierung der VIP-IR Boutons an CB-Interneuronen

Bei der immunhistochemischen Darstellung der zwei Antigene (VIP und CB) kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine vollständige Darstellung der CB-positiven Zellen, zumindest nicht von deren Dendriten- bzw. Axonbaum, erreicht wurde. Dies lässt sich teilweise darauf zurückführen, dass die relativ

dicken Schnitten nicht vollständig von den Antikörpern penetriert wurden. Da die lichtmikroskopische Auswertung mit einer ultrastrukturellen Untersuchung des Gewebes kombiniert wurde, ließ sich die Penetration der Antikörper nicht durch den Einsatz von TritonX-100 verbessern, da TritonX-100 die Membranen der Zellen beeinträchtigt und sich somit die Ultrastruktur verschlechtert. Aus diesen Gründen konnten CB-IR-Neurone nicht mit vollständigem Dendritenbaum visualisiert werden. Dennoch ließen sich vereinzelt Dendriten der 9. Ordnung rekonstruieren, so dass die Neurone für eine morphologische Charakterisierung hinreichend angefärbt wurden (Van Brederode et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein von mindestens zwei Primärdendriten als Auswahlkriterium für die quantitative Analyse zugrunde gelegt. Dem liegt die Überlegung zugrunde, dass mit sehr großer Wahrscheinlichkeit alle CB-positiven Interneurone zwei Primärdendriten besitzen, da unipolare Zellen bisher nicht im Kortex beschrieben wurden. Dadurch wurden Zellen von der Quantifizierung ausgeschlossen, bei denen aufgrund des Schneidens des Gewebes nur Zellkörper angefärbt werden konnten. In der Schicht IV wurden keine Ausschlusskriterien angewendet, um eine genügend große Anzahl an Zellen aus dieser Schicht in die Analyse einbeziehen zu können. Dies erklärt die höhere Prozentzahl an Zellen in der Schicht IV, die aufgrund der unvollständigen Darstellung ihrer Dendriten keiner definierten Zellklasse zugeordnet werden konnten. Des Weiteren wurden nur die dendritischen Ordnungen 1 bis 5 statistisch analysiert, da insgesamt nur wenige Dendriten höherer Ordnungen rekonstruiert werden konnten. Die Analyse einer größeren Anzahl von Dendriten der höheren Ordnungen könnte Aufschluss darüber geben, ob sich auch hier die Innervationsrate von VIP-IR Boutons ändert.

Die computerunterstützte Rekonstruktion der immunhistochemisch visualisierten Zellen hat sich als effiziente Methode zur Quantifizierung der VIP-positiven Boutons an CB-Zellen erwiesen. Auf lichtmikroskopischer Ebene konnte die Innervationsrate einer bestimmten Zellpopulation in Bezug auf einzelne dendritische Ordnungen erhoben werden, was bisher nur vereinzelt Eingang in die Literatur gefunden hat (Krimer et al., 1997; Lambe et al., 2000). Insgesamt wurde durch das Rekonstruktionsverfahren eine genaue Analyse der Boutonanzahl und -dichte an CB-Interneuronen ermöglicht (Krimer et al.,

1997). Das Analyseverfahren ließe sich weiter verfeinern, wenn eine genaue Schichtenabgrenzung erfolgen könnte und damit eine genauere Zuordnung der Zellkörper zu einzelnen Schichten und Unterschichten möglich wäre. Dies erfordert jedoch eine Färbemethode, die zusätzlich eine cytoarchitektonische Analyse der Schichten und evtl. eine Visualisierung der Barrels zulässt. Auf diese Weise könnten nicht nur die Somata den einzelnen Schichten zugeordnet werden, sondern es könnte auch schichtenspezifisch die Innervationsrate der Dendriten untersucht werden. Dies erfordert jedoch eine Weiterentwicklung des hier etablierten Rekonstruktionsverfahrens.

5.1.3 Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Auswertung

Durch die detaillierte Dokumentation der VIP-Boutons an CB-positiven Interneuronen mittels der Lichtmikroskopie konnten diese sehr gut den gefärbten ultrastrukturellen Elementen zugeordnet werden. Die Rekonstruktion selektierter Zellen mit dem Neurolucida-System erlaubt es, die Relationen der Strukturen maßstabsgetreu zu erfassen und liefert mikrometergenaue Angaben über den Dendritenbaum in drei Dimensionen. Durch den ständigen Vergleich der lichtmikroskopischen Daten mit den elektronenmikroskopischen Bildern, konnten individuelle VIP-Boutons gezielt im Elektronenmikroskop als Synapsen verifiziert werden. Nach DeFelipe (1993) werden bei einer großen Anzahl von Synapsen (40-60%) der synaptische Spalt und die Verdichtungen der prä- und postsynaptischen Membran nicht als solche erkannt, da die Schnittebene der Ultradünnschnitte nicht im rechten Winkel zu den synaptischen Verbindungen liegt. Aus diesem Grund wurden bei der lichtmikroskopischen Analyse nur dann VIP-Boutons für die Untersuchung mittels des EMs verifiziert, wenn sie eine geeignete Orientierung aufwiesen, nämlich eine seitliche Anlagerung an den Dendriten oder an das Soma. Boutons, die ober- oder unterhalb von Calbindinzellen lagen, wurden nicht für die elektronenmikroskopische Untersuchung ausgewählt, da bei tangentialer Orientierung mit großer Wahrscheinlichkeit keine ultrastrukturellen Merkmale von Synapsen nachgewiesen werden können. Nach DeFelipe et al. (1999) liefert die Anwesenheit von synaptischen Vesikeln im Axonterminal zusammen mit den charakteristischen Membranspezialisierungen - unabhängig davon, ob ein

synaptischer Spalt erkennbar ist- ausreichende Kriterien für die eindeutige Identifizierung einer Synapse. Im vorliegenden Fall jedoch wurde die Identifizierung des synaptischen Spaltes als eines der wichtigsten Kriterien gewertet, da dieser am wenigsten durch die Ablagerungen der Reaktionsprodukte maskiert wurde.

5.1.4 Konfokale Mikroskopie

Da durch die Osmierung der Kontrast zwischen DAB- und DAB/Nickel-gefärbten Antigenen vermindert wird, wurden die Antigene zusätzlich durch die Methode der Doppelimmunfluoreszenz dargestellt und mittels der konfokalen Mikroskopie ausgewertet. Die konfokale Mikroskopie bietet im Vergleich zur konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie prinzipiell den Vorteil, dass gefärbte Antigene in einem besseren Farbkontrast dargestellt werden (Wells und Johnson, 1994). Durch die Anregung der Fluorochrome mit jeweils spezifischen Laserwellenlängen eignet sich diese Methode hervorragend für Kolo-kalisierung zweier oder mehrerer Antigene (Smallcombe und Benham, 1998; Sassoe-Pognetto et al., 2000). Zudem wird die Auflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie um das 1,4 fache verbessert (Fine, 2000), was besonders bei Untersuchungen kleiner Strukturen wie Dornfortsätzen vorteilhaft ist. Durch die Verwendung des Laserscanmikroskopes konnte in der vorliegenden Arbeit die Verteilung beider Antigene mit gutem Kontrast, in Form einer Übersicht in allen Schichten des Kortex visualisiert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass VIP und CB nicht kolo-kalisiert sind. Es ließen sich außerdem VIP-positive Boutons an CB-positiven Zellen in höherer Vergrößerung mit einem starken Kontrast visualisieren. Trotz der besseren Auflösung lassen sich aber durch diese Methode keine funktionellen Synapsen nachweisen (Harris, 1994). Hier bietet die Elektronenmikroskopie den Vorteil, dass ultrastrukturelle Merkmale, die für eine Charakterisierung von Synapsen notwendig sind, sichtbar gemacht werden können (Cabirol-Pol et al., 2000).

5.1.5 Intrazelluläre Farbstofffüllung

Die Methode der intrazellulären Farbstofffüllung hat im Vergleich zu der immunhistochemischen Methode den Vorteil, dass sich Pyramidenzellen mit

hinreichenden morphologischen Details mit Farbstoff füllen lassen (Buhl und Lübke, 1989; Buhl, 1993).

Lucifer Yellow ist ein weit verbreiteter Farbstoff, der in fixiertes Gewebe iontophoretisch injiziert werden kann (Ohm und Diekmann, 1994). In Kombination mit dem immunhistochemischen Nachweis von Antigenen, hier VIP, kann die Innervation der gefüllten Zellen mittels konfokaler Mikroskopie, die die Aufnahme digitaler Bilderstapel ermöglicht, untersucht werden. Da die gefüllten Zellen nicht dreidimensional rekonstruiert werden konnten, wurde hier nur eine qualitative Auswertung vorgenommen.

Lucifer Yellow kann durch zeitaufwendige Photooxidation oder durch immunhistochemische Nachweismethoden für eine ultrastrukturelle Aufarbeitung in ein elektronendichtes DAB-Chromogen umgewandelt werden (Buhl und Lübke, 1989; Krimer et al., 1997). Für den ultrastrukturellen Nachweis der chemischen Synapsen wurde hier ein zweiter Farbstoff eingesetzt.

MicroRuby ist ein fluoreszierendes biotinyliertes Dextran (3.000 kDA), das sich ebenfalls in fixiertem Gewebe intrazellulär injizieren lässt (Liu et al., 1993; Ohm und Diekmann, 1994). Es bietet den Vorteil, dass es durch Reaktion mit dem ABC-Reagenz relativ einfach mit DAB visualisiert und mit verschiedenen immunhistochemischen Methoden kombiniert werden kann. So konnten in der vorliegenden Arbeit VIP-positive Boutons an mit Lucifer Yellow gefüllten Zellen mittels digitaler Bilderstapel nachgewiesen werden, während die mit MicroRuby gefüllten Zellen für den ultrastrukturellen Nachweis synaptischer Kontakte aufgearbeitet wurden. Einen ausführlichen Vergleich beider Farbstoffe bieten Ohm und Diekmann (1994).

Die Kombination von intrazellulärer Farbstoffinjektion mit immunhistochemischen Nachweismethoden eröffnet nun die Möglichkeit, die Konnektivität zwischen immunhistochemisch charakterisierten Zellpopulationen und morphologisch klassifizierten Zellen ultrastrukturell zu untersuchen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Morphologie der CB-positiven Interneurone

Neokortikale, nicht-pyramidale GABAerge Zellen wurden bereits vielfältig aufgrund ihrer morphologischen, elektrophysiologischen und

immunhistochemischen Kriterien klassifiziert (Kawaguchi und Kubota, 1993; Kawaguchi und Kubota, 1997; Cauli et al., 2000). Die morphologischen Zelltypen können aufgrund der Zellkörperform (Cobas et al., 1987), des Dendritenbaumes (Feldman und Peters, 1978) oder ihres axonalen Verzweigungsmusters () klassifiziert werden (Jones, 1975; Jin et al., 2001). Die hier vorgelegten Ergebnisse basieren ausschließlich auf einer Betrachtung der Zellkörperform und des Dendritenbaumes, da Axone nicht angefärbt wurden.

Klassifizierung unter Einbeziehung bisheriger Studien

CB-positive Zellen sind einer Subpopulation kortikaler Interneurone zuzuordnen, die eine ausgeprägte Heterogenität in ihrer Morphologie, elektrophysiologischen Antwortcharakteristika, neurochemischen Eigenschaften und synaptischen Konnektivität zeigen (Demeulemeester et al., 1988; DeFelipe, 1993; Cauli et al., 1997; Kawaguchi und Kubota, 1997), was eine Klassifizierung erschwert.

Ein allgemeingültiges Kriterium zur Unterscheidung ist nach Typ I und Typ II Interneuronen (siehe Einleitung). CB-positive Interneurone, die vor allem eine bipolare oder multipolare Form ausprägen (Keller, 1995), sind nach den Ergebnissen der morphologischen Untersuchung ausschließlich dem Typ II zuzuordnen. Da verschiedene Studien in verschiedenen Spezies eine unterschiedliche Einteilung dieser Zellklasse in Subpopulationen vorgenommen haben (Demeulemeester et al., 1991; Hendry und Jones, 1991; DeFelipe, 1993; Cauli et al., 2000), orientiert sich die vorliegende Untersuchung an einer morphologischen Klassifizierung von Zelltypen, die im somatosensorischen System der Nagetiere vorgenommen wurde.

Cobas, et al. (1987) untersuchten GAD-IR Neurone unter Einbeziehung von qualitativen und quantitativen Merkmalen im Barrel Kortex der Maus. Im Gegensatz zu dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen vertikal und horizontal orientierten Zelltypen unterschieden, da nur sehr wenige Zellen horizontal orientiert sind.

Da bei der Auswertung des Materials die häufig bipolare Form der CB-positiven Interneurone auffiel, wurde die Studie von Bayraktar et al. (2000) hinzugezogen, da dort eine weitere Unterteilung der Bipolarzellen in

Unterklassen vorgenommen wurde. Durch diese Vorgehensweise konnten die meisten Zellen aufgrund der Morphologie des Zellkörpers und der Dendriten einer zuvor definierten Klasse zugeordnet werden.

Des Weiteren wurde eine Einteilung der Zellen aufgrund der Lokalisation ihres Somas in supragranulären, granulären und infragranulären Schichten vorgenommen. Die prozentuale Abgrenzung der Schichten basierte auf den Ergebnissen von Schober (1986), da einzelne Schichten und Unterschichten bei der hier durchgeführten Färbung nicht sicher abgegrenzt werden konnten. Insbesondere die Grenzen zwischen den Schichten II und III sind aufgrund der ähnlichen Packungsdichte der Zellen schwer zu definieren (Van Brederode et al., 1991; Keller, 1995).

Pyramidalzellen

Pyramidalzellen sind in den Schichten II bis VI lokalisiert, bevorzugt in den Schichten II/III und V/VI (Kawaguchi und Kubota, 1996; DeFelipe, 1997). Wie in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, exprimieren viele supragranuläre, aber nicht infragranuläre Pyramidalzellen CB, was auf eine spezifische Subpopulation dieser Projektionsneurone hinweisen könnte (Andressen et al., 1993; DeFelipe, 1993). Da die Lokalisation von Projektionsneuronen in bestimmten Schichten mit ihrem spezifischen Projektionsziel korreliert, könnte dieser Befund auf eine Markierung eines funktionellen Systems hinweisen. Für das somatosensorische System ist bekannt, dass Pyramidalzellen der Schichten II/III zum ipsilateralen Motorkortex, zum sekundären somatosensorischem Areal und zur kontralateralen Hemisphäre projizieren (Chapin et al., 1987). Bisher ist ungeklärt, warum verschiedene kalziumbindene Proteine nur in bestimmten Subpopulationen von Zellen vorkommen. Es scheint jedoch eine Korrelation zwischen den funktionellen Eigenschaften kortikaler Neurone und ihrer Immunreaktivität für eine der Substanzen zu geben. Im visuellen Kortex konnte gezeigt werden, dass PV-positive Interneurone präferentiell in Zonen lokalisiert sind, die viel Zytocrom C Oxidase enthalten (Celio, 1990; Van Brederode et al., 1990), CB-positive Strukturen dagegen sind komplementär dazu verteilt. CB ist in Pyramidalzellen lokalisiert, die sich durch ein regelmäßiges und adaptierendes Feuerverhalten charakterisieren lassen (Keller, 1995), während PV vor allem in schnell feuernden und nicht

adaptierenden Interneuronen vorkommt (McCormick et al., 1985; Kawaguchi, 1995). Da auf diese Zellklasse in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht wurde, soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

Interneurone

Die prozentuale Verteilung der CB-positiven Interneurone bestätigte deutlich das häufige Vorkommen der bipolaren Zellform. Wie schon für diese morphologische Klasse beschrieben, verlaufen die Dendriten vertikal durch mehrere kortikale Schichten (White und Rock, 1981; Connor und Peters, 1984). Bipolarzellen wurde aus diesem Grunde eine Rolle in der interlaminären, kolumnären Informationsverarbeitung zugeschrieben (Morrison et al., 1984; Staiger et al., 1996, 1997; Rozov et al., 2001).

Die weitere Unterteilung der Bipolarzellen zeigte, dass die meisten Zellen als "einfach" bipolar klassifiziert werden können, da sich ihre Dendriten nicht in unmittelbarer Nähe des Somas weiter verzweigen. Zu einem Drittel sind einzeln-gebüschelte Zellen zu finden, deren Dendriten sich in der Nähe des Somas in Richtung Pia oder zur weißen Substanz in Dendriten höherer Ordnung weiter verzweigen. Nur selten waren die als bipolar klassifizierten Zellen horizontal ausgerichtet, so dass sie nicht als eine getrennte Unterklasse aufgeführt werden. Da sich die Dendriten der CB-positiven Bipolarzellen meist nicht in unmittelbarer Nähe des Somas verzweigen, ist anzunehmen, dass andere Schichten erreicht werden, bevor sich Dendriten in höhere Ordnungen aufzweigen. Bisher ist ungeklärt, ob ein hoher Verzweigungsgrad mit einer erhöhten Informationsintegration korreliert, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob CB-positive Interneurone in den Schichten, wo sich Dendriten in höhere Ordnungen verzweigen, viele synaptische Eingänge aufweisen.

Im Gegensatz zu den durch mehreren Schichten verlaufenden Dendriten der Bipolarzellen verlaufen die Dendriten der häufig vorkommenden Multipolarzellen sowohl vertikal durch mehrere Schichten, als auch horizontal. Je nachdem, ob ihre Dendriten auch in benachbarte Barrels ziehen, können sie folglich Eingänge benachbarter Barrels integrieren, wie es bereits für multipolare Zellen gezeigt wurde (White und Rock, 1981).

Die tropfenförmigen Zellen, die 10% der CB-positiven Zellpopulation im

Barrelkortex bilden, entsprechen wahrscheinlich den pyramidal-ähnlichen Zellen von Brederode et al. (1991), die von diesen Autoren ebenfalls nur selten gefunden wurden. Aufgrund der pyramidenähnlichen Form, die durch die tropfenförmige Zellkörperform und durch die Ausbildung eines dicken Dendritenstammes mit relativ vielen Verzweigungen ausgebildet wird, kann von einer Polarisierung der Zellen ausgegangen werden, die ebenfalls meist vertikal orientiert ist.

Generell lässt sich bei CB-IR-Interneuronen festhalten, dass alle Zelltypen eine vorwiegend vertikale Orientierung einnehmen. Dies trifft auf die hier klassifizierten Bipolarzellen, den triangulären und den tropfenförmigen Zellen zu. Da dies bereits in einer Untersuchung von GABAergen Zellen für den Barrel Kortex der Ratte (Cobas et al., 1987b) und Maus (Keller und White, 1987) gezeigt und *in vitro* für ca. 70% aller GAD67-positiven - auch der multipolaren - Zellen mittels einer computerunterstützten Analyse bestätigt wurde (Jin et al., 2001), scheint die vertikale Orientierung ein generelles Merkmal der Interneurone zu sein. Diese wurde auch für die apikalen Dendriten von Pyramidenzellen von Feldman und Peters (1974) im Barrel Kortex der Ratte beschrieben. Demnach verlaufen die Dendriten infragranulärer Zellen in Bündeln von 6 bis 8 Dendriten durch Schicht IV, um sich in supragranulären Schichten weiter aufzuzweigen. Da dies in mehreren kortikalen Arealen beobachtet werden konnte, wurde es als ein gemeinsamer Bauplan interpretiert. Dieser Bauplan besteht aus kortikalen Neuronen, die in Modulen um diese Cluster von Dendriten organisiert sind (Keller, 1995). Demnach sind CB-positive Interneurone und wahrscheinlich auch Pyramidalzellen prädestiniert für eine Informationsintegration zwischen den einzelnen Schichten innerhalb einer kortikalen Kolumne.

Da innerhalb einer kortikalen Kolumne die exzitatorischen Eingänge der primären sensorischen kortikalen Areale aus dem Thalamus in die Schicht IV und von dort aus in supragranuläre und in infragranuläre Schichten entlang einer seitlich begrenzten, vertikalen Säule projiziert werden, die eine Form der Topographie repräsentiert, können Interneurone, deren Dendriten vertikal orientiert durch diese Schichten verlaufen, diese Eingänge sequentiell integrieren.

Diese Organisationsprinzipien stellen sicher, dass die Afferenzen, die

spezifische Merkmale der räumlichen Umwelt repräsentieren, auf relativ enge, radiale Module verteilt und dort verarbeitet werden (Mountcastle, 1997). Es zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung, dass Zellkörper der CB-positiven Zellen vorwiegend in den supra- und infragranulären Schichten zu finden sind (Van Brederode et al., 1991), so dass sie vor allem hier Eingänge von anderen Zellpopulationen integrieren können. Da CB-IR-Interneurone nur vereinzelt in der Schicht IV vorkommen (Keller, 1995), ist es unwahrscheinlich, dass sie zu einem größten Anteil an den ersten Stadien der kortikalen Signalverarbeitung teilnehmen, wie es für andere Interneurone beschrieben wurde (Staiger et al., 1996; McCasland et al., 1997; Porter et al., 2001). Durch die nachweislich vorwiegend vertikale Orientierung der Dendriten von Pyramidalzellen und Interneuronen könnten diese potenziell Afferenzen in verschiedenen laminären Positionen, die unterschiedliche Stadien der Informationsverarbeitung repräsentieren, integrieren. Dieses Organisationsprinzipien gewährleisten, dass die Spezifität, Lokalisation, und Modalität des entsprechenden Moduls erhalten bleibt (Jin et al., 2001).

Insgesamt entsprechen die Ergebnisse dieser Studie den bereits beschriebenen, sowohl was die morphologische Typisierung als auch Lokalisation der Zellkörper betrifft (Celio et al., 1986; Demeulemeester et al., 1988; Hendry et al., 1989; Celio, 1990; Van Brederode et al., 1991). Die häufigsten Zelltypen sind bipolar oder multipolar, deren Zellkörper gehäuft in den Schichten II/III und V und VI vorkommen, aber nur selten in der Schicht IV. Für GABAerge Interneurone konnte gezeigt werden, dass die Dichte am höchsten in der Schicht IV ist (Cobas et al., 1987b). Dies scheint für die Subpopulation der CB-positiven Interneurone nicht zu gelten, denn sie sind nur selten in dieser Schicht lokalisiert.

Lokalisation in Barrels

Für einige GABAerge Zellen konnte gezeigt werden, dass sie in allen Schichten vorkommen, dass in der Schicht IV aber ihre Zellkörper präferentiell in den Seiten der Barrels liegen (Keller und White, 1986; Keller, 1995). Da hier aber die Struktur der Barrels nicht visualisiert wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Somata der CB-positiven Interneurone präferentiell im Zentrum des Barrels oder eher in den Seiten und Septen lokalisiert sind. Nach

Cohen et al. (1993) liegen die wenigen CB-positiven Zellkörper der Lamina granularis bevorzugt in den Barreelsepten. Auch hier ist zu beobachten, dass CB- und PV-positive Zellen komplementäre Populationen bilden: Die meisten Interneurone der Schicht IV, deren Somata in den Seiten und im Zentrum der Barrels liegen, sind PV-positiv.

Bisher ist die genaue Charakterisierung der kortikalen Schaltkreise, der lokalen Projektionen und die involvierten Interneurontypen nur unzureichend bekannt. Da die bisher veröffentlichten Studien in verschiedenen Arealen und Spezies durchgeführt wurden und meist nur eine Beschreibung ohne Quantifizierung der Anteile bestimmter Zellklassen beinhalten, liefert die hier durchgeführte Beschreibung der Morphologie und Quantifizierung der CB-Interneurone eine Ausgangsbasis für die Erfassung des Beitrages inhibitorischer Zellklassen zur Informationsverarbeitung im somatosensorischen Kortex der Ratte.

5.2.2 Zielstrukturen VIP-positiver Axonterminalien: Innervation von CB-IR-Interneuronen

Die meisten Synapsen, die ein kortikales Neuron mit anderen Zellen bildet, sind entweder auf dem Dendritenbaum, und zwar an Dornenfortsätzen oder am Dendritenstamm, lokalisiert. Nur ein kleiner Anteil aller exzitatorischen oder inhibitorischen synaptischen Eingänge kontaktieren die Zielstruktur am Soma oder am Axoninitialsegment (Shepherd, 1998; Keller und White, 1987). Membranpotentialänderungen, hervorgerufen durch synaptische Eingänge anderer Neurone, werden an distalen Dendritenabschnitten während der passiven Weiterleitung zum Soma entlang der "kabelartigen" Struktur abgeschwächt. Die Effizienz eines synaptischen Eingangs wird daher zu einem großen Anteil durch die räumliche Verteilung der Synapsen auf spezifischen Abschnitten des Dendritenbaumes determiniert (Keller, 1995). Eine Analyse der räumlichen Verteilung von Synapsen lässt darum eine Aussage über die Gewichtung dieser Projektionen zu und wie sie das Feuerverhalten der Zielstrukturen beeinflussen könnten. Dies gilt im Falle einer passiven Weiterleitung der Signale, jedoch konnte in letzter Zeit gezeigt werden, dass an Dendriten neben der passiven auch aktive Signalverarbeitungsprozesse (gesteuert durch Ionenkanäle) stattfinden, die die Summation und

Abschwächung postsynaptischer Potentiale beeinflussen (Larkum et al., 1999; Berger et al., 2001).

Im Vergleich zu qualitativen oder semiquantitativen Befunden (Acsady et al., 1996; DeFelipe et al., 1999) wurde hier die Innervationsrate von Interneuronen durch zwei Parameter quantifiziert. Zum Einen wurde die absolute Anzahl der VIP-positiven Boutons an den CB-positiven Interneuronen bestimmt. Dies gibt einen Hinweis auf Stärke der Inhibition, die VIP insgesamt an CB-positiven Interneuronen ausübt und welcher Einfluss auf das Ausgangssignal der Zielstrukturen ausgeübt werden kann. Hier zeigte sich, dass individuelle CB-IR-Interneurone bis zu 166 VIP-Boutons in infragranulären Schichten, 126 in supragranulären Schichten und 89 in granulären Schichten aufweisen können. Es zeigt sich also, dass VIP einen prominenten inhibitorischen Einfluss auf CB-positive Interneurone ausüben kann, indem sich über hundert Boutons an einer individuellen Zelle anlagern. Diese hohe Anzahl der symmetrischen Synapsen an individuellen Zellen ist insofern überraschend, weil das Verhältnis der erregenden zu hemmenden Synapsen ein Überwiegen der exzitatorischen Eingänge an GABAergen Zellen zeigt (Keller und White, 1987). Es ist davon auszugehen, dass VIP-Neurone wahrscheinlich zu einem erheblichen Anteil an der Gesamtinhibition der CB-IR-Population beitragen. Die niedrigste Innervationsrate, 1 Bouton, fand sich bei Zellen in supragranulären Schichten, gefolgt von Zellen in infragranulären Schichten (2 Boutons) und granulären Zellen (3 Boutons). Es zeigt sich damit insgesamt, dass es eine große Variabilität bezüglich der Anzahl der VIP-Boutons gibt, indem sich an einzelnen CB-IR-Interneuronen nur ein Bouton anlagert, während andere Zellen über einhundert Kontakte aufweisen. Ein Grund für diese Variabilität der Innervation könnte darin liegen, dass die CB-Zellpopulation aus heterogenen Zelltypen besteht (s. Klassifizierung der Zellen) und hier die Innervation nicht nach Zelltypen aufgeschlüsselt wurde (Lambe et al., 2000).

Wie Shepherd (1998) betont, dienen die Aufzweigungen der Dendriten in höhere Ordnungen nicht nur einer Vergrößerung der Oberfläche, sondern haben auch zur Folge, dass die einzelnen Ordnungen nicht gleichwertig bezüglich ihrer Leitfähigkeit sind. Die Geometrie der Verzweigungen und die Orte synaptischer Eingänge korrelieren mit den elektrotonischen Eigenschaften, so dass Teile der Dendritenbäume unabhängig voneinander die Signale

verarbeiten, was zu dem Begriff der "dendritischen Kompartimente" führte. Es ist daher wichtig, nicht nur die Gesamtanzahl der VIP-Boutons an CB-positiven Zellen zu betrachten. Um die integrative Aktivität der Dendriten erfassen zu können, müssen vier Faktoren bedacht werden: die dendritischen Verzweigungen (Ordnungen), die Lokalisation der Synapsen, sowie aktive und passive Membraneigenschaften (Shepherd, 1998).

In der vorliegenden morphologischen Untersuchung wurde daher die Lokalisation der Boutons an den Zellkörpern und an verschiedenen dendritischen Ordnungen untersucht. Ein Resultat dieser Datenerhebung ist, dass die Ordnungen zwei und drei einen höheren Mittelwert als die der in die Analyse einbezogenen anderen Ordnungen zeigen. Aufgrund dieser Datenlage lässt sich zwar kein Trend ableiten, jedoch kann angenommen werden, dass die Mehrzahl der VIP-Boutons an proximalen Dendriten und damit an niedriger dendritischen Ordnungen lokalisiert sind. Durch eine Analyse einer größeren Anzahl an Dendriten höherer Ordnungen könnte die Hypothese verifiziert werden, ob die absolute Anzahl an VIP-Boutons auf Dendriten höherer Ordnungen signifikant abnimmt. Aufgrund der hier durchgeführten Rekonstruktionen lässt sich zeigen, dass nur bei wenigen Zellen Dendriten der höheren Ordnungen visualisiert werden konnten. Ob dies ein Merkmal CB-positiver Interneurone ist, kann nur durch einen Vergleich mit Befunden ermittelt werden, die durch intrazelluläre Füllungen den gesamten Dendritenbaum darstellen.

Wenn alle dendritischen Ordnungen der Zellen zusammengefasst werden, zeigt sich, dass einzelne CB-IR-Zellen eine bemerkenswert hohe Anzahl an VIP-IR-Boutons allein auf ihrem Dendritenbaum lokalisieren können. In den infragranulären Schichten wurden bis zu 158 Kontakte pro Zelle gezählt. Solche Zellen integrieren folglich sehr viele inhibitorische Eingänge auf ihren Dendriten. In den anderen Schichten wurden als Maximalwerte nur ungefähr halb so viele Kontakte (74 in infragranulären und 81 in granulären Schichten) beobachtet. Daraus lässt sich folgern, dass VIP-Zellen insbesondere in den infragranulären Schichten einen starken Einfluss auf die Signalverarbeitung in individuellen CB-IR-Zellen ausüben können. Diese Anzahl ist allerdings im Vergleich zu der Gesamtzahl der Synapsen, die ein Neuron mit anderen Zellen ausbilden kann, eher gering. Für CB-positive Interneurone wurden insgesamt ungefähr 4.000

erregende und hemmende Eingänge gezählt (McBain und Fisahn, 2001). Da hier aber nur die VIP-positive Eingänge der CB-IR-Zellen untersucht wurden, die nur ca. 3 % der Neurone im Kortex repräsentieren (Connor und Peters, 1984), spricht dies für eine gezielte Innervation durch die VIP-Zellen.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn die Anzahl aller identifizierten Boutons durch die Anzahl der rekonstruierten Dendriten geteilt wird. Auf den dendritischen Abschnitten der Ordnungen eins bis fünf finden sich im Durchschnitt 1,12 bis 1,72 Marker pro Dendrit. Sowohl die absolute Anzahl der Marker als auch die Anzahl der Dendriten nehmen mit zunehmender Ordnung ab, so dass der Quotient bei allen dendritischen Ordnungen einen relativ konstanten Wert hat. Hierbei ist zu beachten, dass nicht alle Dendriten kontaktiert werden und die Anzahl der Kontakte eine hohe Variabilität zeigt. Während also einzelne Dendriten keine Anlagerung von VIP-Boutons zeigen, lässt sich z.B. auf einem Dendriten der 3. Ordnung ein Maximalwert von 60 Kontakten beobachten.

Bezogen auf die Informationsverarbeitung innerhalb einer kortikalen Kolumne konnte somit gezeigt werden, dass auf den CB-positiven Dendriten aller Ordnungen im Durchschnitt 1 bis 2 inhibitorische Kontakte zu finden sind, diese sich aber sehr heterogen auf einzelne Zellen und/oder dendritische Ordnungen verteilen und "clustern". Da die genaue anatomische Beschreibung der Art und Anzahl von solchen Kontakten und ihre Lage auf dem Dendritenbaum Aufschluss darüber geben kann, welchen potenziellen Einfluss VIP-Boutons auf die Signalverarbeitung in CB-positiven Dendriten ausüben kann, bietet diese Analyse einen Anhaltspunkt für die Deutung von elektrophysiologisch gemessenen Antwortverhalten.

Um die hier erhobenen Daten mit der Länge der Dendriten und mit Daten anderer Studien korrelieren zu können, wurde die Dichte der Boutons entlang der einzelnen Ordnungen quantifiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Dichte an primären Dendriten am höchsten ist, und mit zunehmender Ordnung abnimmt. Dieser Trend konnte für die ersten fünf Ordnungen gezeigt werden und entspricht Ergebnissen vorheriger Studien über die Verteilung inhibitorischer Kontakte an Zielzellen (Keller und White, 1987). Auch die prozentuale Verteilung der Marker auf den Dendritenordnungen stützt den Befund, dass ein großer Anteil der identifizierten VIP-Boutons sich auf den

proximalen dendritischen Ordnungen befindet. Da im Allgemeinen angenommen werden kann, dass mit zunehmendem Abstand vom Soma die Gewichtung der Synapsen abnimmt und sie weiter proximal lokalisierte Synapsen nicht modulieren können, sind VIP-positive Boutons somit primär an Orten der Dendriten zu beobachten, wo sie einen erheblichen Einfluss auf die Signalintegration im Zellkörper ausüben können.

Mit einer vergleichbar großen Variabilität werden die Zellkörper fast aller CB-positiven Interneurone durch VIP-Boutons kontaktiert. Die statistische Analyse ergab dabei keinen signifikanten Unterschied, wenn einzelne Schichten miteinander verglichen wurden. An einzelnen Somata fanden sich bis zu 26 Kontakte, so dass neben der starken Hemmung durch VIP-Boutons auf Dendriten, auch hier eine erhebliche Inhibition nachgewiesen wurde, die die Aktionspotentialbildung effektiv beeinflussen kann. Da alle hier visualisierten CB-positiven Interneurone durch VIP-Boutons kontaktiert werden, kann das als ein prinzipielles Organisationsmerkmal neokortikaler Schaltkreise im Barrelkortex angesehen werden. Bezüglich der Lokalisation dieser Kontakte kann festgestellt werden, dass in allen Schichten VIP-Boutons bevorzugt an Zellkörpern und an den proximalen Dendriten lokalisiert sind. Diese spezifische Verteilung inhibitorischer Kontakte am Soma und an proximalen Dendriten wurde ebenso im somatosensorischen Kortex von Mäusen durch eine ultrastrukturelle Analyse GABAerger Zellen nachgewiesen (Keller und White, 1987). Interneurone, die Zielzellen am Soma innervieren, regulieren die lokale Generierung Na^+ -abhängiger Aktionspotentiale. Im Gegensatz dazu beeinflusst eine inhibitorische Innervation an Dendritenabschnitten spannungsgesteuerte Ströme, erregende Eingänge weiter distal auf den Dendriten und reguliert dendritische Ca^+ -abhängige Aktionspotentiale (McBain und Fisahn, 2001). Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen somit frühere Befunde über eine Hauptkonzentration symmetrischer Synapsen am Soma und an proximalen Dendriten (Shepherd und Koch, 1998).

Die teilweise hohe Anzahl der VIP-Boutons an den untersuchten CB-IR-Zellen konnte auch im Hippokampus beobachtet werden (Acsady et al., 1996). Gerade die Lokalisation der VIP-Boutons an proximalen Dendriten kann dazu führen, dass weiter distal eingehende erregende Signale soweit abgeschwächt werden, dass sie am Soma nicht mehr wirksam sind.

Die anatomische Beschreibung der Anzahl und der geometrischen Lage der Boutons allein lässt keine Aussage darüber zu, ob und in welcher zeitlichen Reihenfolge diese Synapsen funktionell aktiv sind. Da ein Axon nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip feuert, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit alle Axonterminalien einer Zelle gleichzeitig depolarisiert. Da sich zum Teil eine kletterfaserartige Innervation beobachten ließ, ist zu vermuten, dass einige Boutons von einem Axon abstammen und damit gleichzeitig aktiv sind. Es kann daher angenommen werden, dass zwar nicht alle VIP-Boutons an einer CB-Zelle gleichzeitig depolarisiert sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit aber die, die von einem Axon einer VIP-IR-Zelle abstammen und multiple Kontakte an CB-IR-Interneuronen ausbilden. Eine Untersuchung der Abstammung aller VIP-Boutons an einer CB-IR-Zelle könnte diese Aussage stützen, wurde aber in der vorliegende Arbeit nicht durchgeführt.

Inhibition innerhalb eines Barrels

Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass sich die Axonkollateralen einer Zelle, mit wenigen Ausnahmen, in dem Barrel verzweigen, indem der Zellkörper lokalisiert ist. Dies trifft ebenso auf den Dendritenbaum der Zellen zu (Simons und Woolsey, 1984; Harris und Woolsey, 1983). Eine Rekonstruktion VIP-positiver Zellen im Barrel Kortex der Ratte konnte zeigen, dass die Axonkollateralen der supragranulären VIP-IR-Zellen im wesentlichen innerhalb eines Barrels verbleiben, während die der infragranulären Zellen teilweise auch in benachbarte Barrels projizieren (Bayraktar et al., 2000). Für die vorliegende Untersuchung bedeutet dies, dass mit großer Wahrscheinlichkeit CB-Interneurone von VIP-Zellen des gleichen Barrels innerviert werden und diese Innervation die intra- und interlaminäre Informationsverarbeitung innerhalb einer kortikalen Kolumne beeinflusst.

5.2.3 Korrelierte Licht- und Elektronenmikroskopie

Die in der Lichtmikroskopie identifizierten VIP-Boutons zeigten bei der ultrastrukturellen Untersuchung die typischen Merkmale einer Präsynapse, nämlich Vesikel und in den meisten Fällen Mitochondrien. Die Synapsen konnten nach folgenden Kriterien als symmetrisch klassifiziert werden: Sie

haben eine relativ dünne postsynaptische Verdichtung und eher ovale als runde Vesikel.

Für VIP-positive Boutons ist zudem bereits aus vorherigen Untersuchungen bekannt, dass sie GABAerg sind und symmetrische Synapsen ausbilden (Connor und Peters, 1984; Hajos et al., 1988; Acsady et al., 1996; Bayraktar et al., 1997). Im Vergleich zu bisherigen korrelierten licht- und elektronenmikroskopischen Studien (Gulyas et al., 1996; Staiger et al., 1997) konnte in dieser Untersuchung nur eine Korrelation von 68% beim Vergleich der lichtmikroskopisch identifizierten Boutonanzahl mit ultrastrukturell identifizierten Synapsen erhoben werden. Diese Diskrepanz kann durch ein unterschiedliches methodisches Vorgehen erklärt werden. Die zu verifizierenden Kontakte werden meist lichtmikroskopisch nach subjektiven Kriterien selektiert. Des Weiteren wurden in den zitierten Untersuchungen unterschiedliche Zellpopulationen untersucht, die bezüglich des Ortes der Innervation variieren. Während mit hoher Wahrscheinlichkeit Kontakte, die am Soma lokalisiert sind, sich ultrastrukturell als Synapsen verifiziert lassen, konnten hier nur zu ca. 50% die Kontakte an Dendriten als Synapsen verifiziert werden. Der Korrelationsfaktor kann folglich dadurch beeinflusst werden, dass unterschiedliche Zielkompartimente untersucht werden. Ein weiterer Grund, der zu dieser eher geringen Korrelation geführt haben könnte, ist, dass in dieser Untersuchung auch Synapsen als nicht korrelierend aufgeführt worden, die zusätzlich im EM gefunden wurden. Da es Diskrepanzen zwischen verschiedenen Studien bezüglich der Kriterien gibt, nach denen Synapsen als solche gewertet werden (s. Einleitung; DeFelipe et al., 1999), ist damit eine weitere mögliche Ursache für den geringen Korrelationsfaktor gegeben.

Es wird angenommen, dass asymmetrische Synapsen die erregenden und symmetrische inhibitorische Synapsen repräsentieren (DeFelipe et al., 1999) und die Axonterminalien einer Zellen nur einen Typ der beiden Synapsen ausprägen (Peters und Jones, 1984). Sowohl die Befunde aus der Ultrastruktur als auch die Koloalisation mit GABA lassen den Schluss zu, dass VIP-positive Interneurone inhibitorisch sind.

5.2.4 Zielstrukturen VIP-positiver Axonterminalien: Innervation von Pyramidenzellen

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt wurde, wurde bisher auf elektronenmikroskopischer Ebene nachgewiesen, dass VIP-positive Zellen im visuellen Kortex der Ratte Pyramidenzellen innervieren (Connor und Peters, 1984; Hajos et al., 1988). Eine detaillierte morphologische Charakterisierung der Zielneurone im Lichtmikroskop ist bisher nicht erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Methode der intrazellulären Füllung Pyramidenzellen mit ihren ausgedehnten Dendritenverzweigungen visualisiert. Die Analyse der konfokalen Bilderstapel zeigte, dass VIP-Boutons unmittelbar an Dendriten der Pyramidenzellen angelagert sind. Mit hoher Wahrscheinlichkeit reflektiert diese Konstellation synaptische Kontakte und könnte ein morphologisches Korrelat für die von Hajos et al. (1988) beschriebenen symmetrischen Synapsen an Pyramidenzellen sein. Trotz der verbesserten Auflösung im konfokalen Mikroskop konnte bei den hier vorliegenden digitalen Aufnahmen nicht eindeutig untersucht werden, ob VIP-Boutons an Dornfortsätzen Synapsen ausbilden, wie es für VIP-positive Axonterminalien im visuellen Kortex beschrieben wurde (Hajos et al., 1988, s. aber Connor und Peters, 1984). Selten konnte eine Innervation von Pyramidalzellkörpern beobachtet werden. Wie in Modellstudien simuliert wurde, kann aber auch eine geringe Anzahl an inhibitorischen Synapsen, die strategisch entlang des Dendritenbaums der Zielzelle platziert sind, einen erheblichen Einfluss auf die Integration von exzitatorischen Eingängen ausüben (Holmes et al., 1992).

Die gezielte Innervation von Interneuronen und die geringere Anzahl an Kontakten an Pyramidenzellen widerspricht bisherigen Untersuchungen, die nur selten VIP-positive Boutons an Interneuronen fanden (Connor und Peters, 1984; Hajos et al., 1988). Frühere Untersuchungen basierten allerdings auf einer Stichprobenanalyse auf ultrastruktureller Ebene. Zum einen wurden hierbei potenzielle Zielzellen nicht immunhistochemisch charakterisiert, zum anderen konnten auf der allgemeinen Grundlage der ultrastrukturellen Morphologie der postsynaptischen Zielstrukturen nur Vermutungen über die möglichen Zielzelltypen angestellt werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diese Widersprüche ist, dass VIP arealspezifisch unterschiedliche

Zielstrukturen innerviert. Die zitierten Befunde im visuellen Kortex müssen also nicht unbedingt auf die hier erhobenen Befunde im somatosensorischen Kortex übertragbar sein.

5.3. Informationsverarbeitung im Barrel Kortex

GABAergen Interneuronen wurde bislang eine elementar wichtige Rolle in der Modulation exzitatorischer Signalverarbeitung zugeschrieben, die im Zusammenhang mit der Ausbildung spezifischer, topografisch geordneter rezeptiver Felder und der dabei zu beobachtenden Plastizität diskutiert wurde (Dykes, 1997). Gerade in den letzten Jahren wurde jedoch auch die Hypothese weiterentwickelt, dass die beschriebene Interkonnektivität spezifischer Interneuronpopulationen die morphologische Basis für Phänomene der Synchronisation neuronaler Aktivität bildet (McBain und Fisahn, 2001). Für einige Interneuronpopulationen wurde nachgewiesen, dass sie spezifisch andere Interneurone (Kisvarday et al., 1993; Acsady et al., 1996, DeFelipe et al., 1999) und spezifische Kompartimente von Pyramidalzellen (z.B. Axoninitialsegment, Soma (und Dendriten), (DeFelipe et al., 1989; Buhl et al., 1994; Somogyi et al., 1998; Papp et al., 2001) innervieren. Da im somatosensorischen Kortex Zellen und ihre Ausläufer meist innerhalb des Barrels verbleiben, in dem das Soma liegt, integrieren diese konnektierten Zellen vor allem Signale innerhalb eines Barrels und spielen eine Rolle in der intralaminären Informationsverarbeitung.

Für VIP-positive Zellen konnte gezeigt werden, dass sie direkte erregende synaptische Eingänge aus dem Thalamus erhalten und somit an den ersten Stadien der Informationsverarbeitung innerhalb eines Barrels teilnehmen (Staiger et al., 1996), wie es auch schon für andere Interneurone gezeigt wurde (Porter et al., 2001). Als Subpopulation der GABAergen Zellen und aufgrund ihrer Morphologie, Orientierung und Interkonnektivität könnten sie somit inhibitorisch die lokalen, intralaminären Signalverarbeitungsprozesse innerhalb einer Kolumne beeinflussen.

Bisher ist bezüglich der Konnektivität der VIP-Interneuronpopulation auch bekannt, dass sie im somatosensorischen Kortex der Ratte regelmäßig durch PV-positive Axonterminalien, oft in Form von charakteristischen Körbe innerviert werden, wobei bis zu 20 Kontakte an individuellen VIP-Zellen beobachtet

wurden (Staiger et al., 1997). In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass diese Zellpopulation selbst spezifisch eine weitere Interneuronpopulation, CB-positive Interneurone, innerviert. Dies wurde bei allen Zellen in allen Schichten in Form von multiplen Kontakten beobachtet. Da VIP häufig mit Calretinin (CR) kolokalisiert ist (Rogers, 1992; Acsady et al., 1996; Gabbott und Bacon, 1997), spiegelt dies Ergebnisse wieder, die in Studien über die Interkonnektivität von VIP- und CR-IR-Zellen erzielt wurden (DeFelipe et al., 1999). Die zu beobachtende Interkonnektivität der inhibitorischen Zellen könnte ein morphologisches Korrelat für die im somatosensorischen Kortex auftretende Inhibition nach Stimulation einer Vibrisse sein (Simons, 1995; Porter et al., 2001). GABAerge Zellen, die postsynaptisch zu anderen GABAergen Axonterminalien sind, stellen ein mögliches Korrelat für Disinhibition dar.

Im Hippokampus konnten Acsady et al. (1996) zeigen, dass verschiedene Populationen VIP-positiver Zellen spezifisch andere Interneurone innervieren. Die Innervation CB-positiver Interneurone erfolgt im Hippokampus in Form von multiplen Kontakten, während CB-positive Pyramidalzellen nicht kontaktiert werden. Eine diskutierte Schlussfolgerung ist, dass VIP-Neurone in den Dendriten von Pyramidenzellen eine Disinhibition auslösen, da CB-positive Interneurone bevorzugt die Dendriten von Pyramidalzellen kontaktieren (Gulyas und Freund, 1996).

In der vorliegenden Untersuchung konnte sowohl eine spezifische CB-Innervation als auch die direkte Innervation von Pyramidalzellen im somatosensorischen Kortex, auch auf ultrastruktureller Ebene, nachgewiesen werden. Eine Disinhibition der Pyramidalzellen über die Innervation der CB-Interneurone, die wiederum Pyramidalzeldendriten innervieren, könnte ein morphologisches Korrelat für die *in vitro* gezeigten, erregenden Effekte von VIP auf Pyramidenzellen sein (Haas und Gähwiler, 1992). Im Gegensatz dazu, könnte die direkte Innervation von Pyramidalzellen zu einer Inhibition führen, die effizient erregende Eingänge moduliert (Papp et al., 2001). Für VIP konnte auch an Pyramidalzellen der CA1- Region des Hippokampus eine proximale Innervation am apikalen Dendriten beobachtet werden (Papp et al., 2001). Die funktionelle Konsequenz ist, dass VIP erregende Eingänge an Pyramidalzeldendriten direkt inhibieren bzw. modulieren könnte, während es mit zeitlicher Verzögerung über den disynaptischen Weg eine Disinhibition an

Pyramidalzellendendriten ausübt. Insgesamt könnte dies zu einer Feinregulierung von exzitatorischen Signalverarbeitungsprozesse beitragen. In letzter Zeit konnte sogar nicht nur eine Innervation der Pyramidalzellen durch VIP-Boutons elektrophysiologisch und morphologisch nachgewiesen werden, sondern durch die gepaarte Ableitung und intrazelluläre Füllung der Zellen wurde eine reziproke Verbindung entdeckt. Dabei wurden an Dendriten einer individuellen Pyramidenzelle drei Kontakte von der Bipolarzelle und vier Kontakte von der Pyramidenzelle auf die Bipolarzelle gezählt. Diese Feedback-Inhibition könnte die Erregbarkeit der Pyramidalzellen, vermittelt über GABA_A-Rezeptoren, in Zusammenhang mit den direkten thalamokortikalen Afferenzen (Staiger et al., 1996) reduzieren (Rozov et al., 2001).

Funktion von VIP als Botenstoff

Neuroaktive Substanzen werden oft entweder als Neurotransmitter oder Neuromodulator entsprechend der Dauer und funktionellen Wirkung bezeichnet. Als typisch für Neurotransmitter werden postsynaptische Antworten angesehen, die schnell einsetzen (<1 msec) und relativ kurz andauern (< 10 msec). Aufgrund der langen Latenzzeit der Erregung und der langandauernden Wirkung unterscheidet sich VIP von der Wirkung klassischer Transmitter (Phillis et al., 1978). Es wurde gezeigt, dass VIP synergistisch mit Acetylcholin wirkt, so dass auch aus diesem Grund eine Rolle als Neuromodulator diskutiert wurde (Phillis, et al. 1978). Ebenso resultiert eine Aktivierung von VIP-Rezeptoren in einer Modulation der Erregung (Martin et al., 1992).

Die ultrastrukturellen Befunde dieser Arbeit unterstützen eine Rolle als Neurotransmitter an synaptischen Strukturen im Gegensatz zu einer parakrinen Wirkungsweise. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Kolokalisation mit Acetylcholin. Bei einer plurichemischen Transmission wird ein konventioneller Neurotransmitter zusammen mit einem Peptid ausgeschüttet, beide Substanzen wirken jedoch in verschiedenen Zeitskalen. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die Ausschüttung von Peptiden stärker mit der Aktionspotentialfrequenz ansteigt als die Ausschüttung von kolokalisiertem Transmitter, so dass das Verhältnis von Peptid zu Transmitter von der Reizfrequenz abhängt (Mains und Eipper, 1999).

Neben den spezifischen Rezeptoren, über die Botenstoffe ihre Signale

vermitteln, werden die physiologischen Effekte einer Synapse auch durch verschiedene, modulatoxische Second-Messenger-Systeme bestimmt. Nach Shepherd und Koch (1998) ist daher die Einteilung der Synapsen aufgrund ultrastruktureller Merkmale und Transmitter zwar eine sinnvolle Arbeitshypothese, sollte aber nur als ein erster Schritt für die Klassifizierung synaptischer Struktur und Funktion angesehen werden. Sowohl die Interkonnektivität der Interneuronpopulationen als auch ihre konvergierenden Projektionen auf Pyramidalzellen sind bisher nicht in allen Details bekannt. Ebenso ist die Wirkung von VIP bislang nur unzureichend erforscht, so dass die hier angestellten Überlegungen durch elektrophysiologische Untersuchungen verifiziert werden müssen.

6. Zusammenfassung

Der Barrelkortex der Ratte hat sich aufgrund seiner cytoarchitektonischen Struktur, insbesondere durch die leicht identifizierbaren Barrels in der Eingangsschicht IV, die ein morphologisches Korrelat für die kolumnäre Organisation kortikaler Areale darstellen, als Modell für viele neurobiologischen Fragestellungen bewährt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konnektivität spezifischer Zellpopulationen untersucht, die eine Grundlage für das Verständnis der Signalverarbeitungsprozesse in kortikalen Schaltkreisen darstellt. Schwerpunkt war, die Zielstrukturen VIP-positiver Axonterminalien durch immunhistochemische Darstellung der Zielzellen und intrazellulärer Farbstofffüllung zu identifizieren. Durch die Doppelimmunperoxidasefärbung konnten Calbindin-positive Interneurone als eine Population identifiziert werden, die regelmäßig von VIP-IR-Zellen kontaktiert werden. Die morphologische Analyse dieser Zellen ergab, dass diese Zielzellen hauptsächlich eine bipolare oder multipolare Morphologie ausbilden. Die quantitative Analyse ergab, dass alle CB-IR-Zellen in allen Schichten des Kortex kontaktiert werden, wobei einzelne Zellen über 100 VIP-Boutons anlagern. Der überwiegende Anteil der VIP-Boutons ist auf den proximalen Dendriten und an Somata der CB-IR-Zellen lokalisiert, und die Innervationsrate nimmt mit zunehmender dendritischer Ordnung ab. Des Weiteren werden Pyramidalzellen, also exzitatorische Projektionsneurone kontaktiert, die aber im Vergleich zu den Interneuronen wesentlich seltener VIP-Boutons anlagern. Die funktionelle Bedeutung dieser Konstellation könnte in einer direkten Inhibition der Pyramidalzellen liegen, während die Innervation einer weiteren Interneuronpopulation insgesamt zu einer Disinhibition führt. Grundlage für diese Interpretation ist die ultrastrukturelle Untersuchung der synaptischen Kontaktstellen, die sich in allen Fällen als symmetrisch und damit inhibitorisch klassifizieren lassen. Die Identifizierung dieser zwei Typen von Zielneuronen kann als mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkung des Botenstoffes, nämlich teilweise inhibitorisch und teilweise exzitatorisch, herangezogen werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abrams,G.M., Nilaver,G., und Zimmermann,E.A. (1985) VIP-containing Neurons. In A.Björklund und T.Hökfelt (Hg.): GABA and Neuropeptides in the CNS, Band 2. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 335-354.
- Acsady,L., Arabadzisz,D., und Freund,T.F. (1996) Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide- immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*. 73:299-315.
- Acsady,L., Gorcs,T.J., und Freund,T.F. (1996) Different populations of vasoactive intestinal polypeptide- immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73:317-334.
- Amitai,Y. und Connors,B.W. (1995) Intrinsic physiology and morphology of single neurons in the Neocortex. In E.G.Jones und I.T.Diamond (Hg.): *Cerebral Cortex*. New York; London: Plenum Press, 299-299.
- Andressen,C., Blümcke,I., und Celio,M.R. (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res*. 271:181-208.
- Armstrong-James,M. und Fox,K. (1987) Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex. *J. Comp. Neurol*. 263:265-281.
- Armstrong-James,M., Fox,K., und Das-Gupta,A. (1992) Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J. Neurophysiol*. 68:1345-1358.
- Baimbridge,K.G., Celio,M.R., and Rogers,J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*. 15:303-308.
- Bayraktar,T., Staiger,J.F., Acsady,L., Cozzari,C., Freund,T.F., und Zilles,K. (1997) Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide, gamma- aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Res*. 757:209-217.
- Bayraktar,T., Welker,E., Freund,T.F., Zilles,K., und Staiger,J.F. (2000a) Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J. Comp. Neurol*. 420:291-304.
- Beaulieu,C. (1993) Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res*. 609:284-292.
- Berger,T., Larkum,M.E., und Luscher,H.R. (2001) High I(h) channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J. Neurophysiol*. 85:855-868.

- Blümcke,I., Hof,P.R., Morrison,J.H., und Celio,M.R. (1990) Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the visual cortex of Old World monkeys and humans. *J. Comp. Neurol.* **301**:417-432.
- Bolam, J. P. (1992) Preparation of central nervous system tissue for light and electron microscopy. In Bolam, J.P. (Hg.): *Experimental Neuroanatomy*Oxford. New York; Tokyo, IRL Press at Oxford University Press. The Practical Approach Series. Rickwood, D. and Hames, B.D. 1-30.
- Buhl,E.H. (1993) Intracellular injections in fixed slices in combination with neuroanatomical tracing techniques and electron microscopy to determine multisynaptic pathways in the brain. *Micros. Res. Tech.* **24**:15-30.
- Buhl,E.H., Halasy,K., und Somogyi,P. (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* **368**:823-828.
- Buhl,E.H. und Lübke,J. (1989) Intracellular lucifer yellow injection in fixed brain slices combined with retrograde tracing, light and electron microscopy. *Neuroscience* **28**:3-16.
- Cabirol-Pol,M.J., Mizrahi,A., Simmers,J., und Meyrand,P. (2000) Combining laser scanning confocal microscopy and electron microscopy to determine sites of synaptic contact between two identified neurons. *J. Neurosci. Methods* **97**:175-181.
- Cauli,B., Audinat,E., Lambolez,B., Angulo,M.C., Ropert,N., Tsuzuki,K., Hestrin,S., und Rossier,J. (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* **17**:3894-3906.
- Cauli,B., Porter,J.T., Tsuzuki,K., Lambolez,B., Rossier,J., Quenet,B., und Audinat,E. (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **97**:6144-6149.
- Caviness,V.S. (1975) Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J. Comp. Neurol.* **164**:247-263.
- Celio,M.R., Scharer,L., Morrison,J.H., Norman,A.W., und Bloom,F.E. (1986) Calbindin immunoreactivity alternates with cytochrome c-oxidase-rich zones in some layers of the primate visual cortex. *Nature* **323**:715-717.
- Celio,M.R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**:375-475.

- Chapin,J.K., Sadeq,M., und Guise,J.L. (1987) Corticocortical connections within the primary somatosensory cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 263:326-346.
- Chedotal,A., Umbriaco,D., Descarries,L., Hartman,B.K., und Hamel,E. (1994) Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the neurovascular relationships of choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide nerve terminals in the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 343:57-71.
- Cheung,W.Y. (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19-27.
- Chneiweiss,H., Glowinski,J., und Premont,J. (1985) Vasoactive intestinal polypeptide receptors linked to adenylate cyclase, and their relationship with biogenic amine- and somatostatin-sensitive adenylate cyclases on neuronal and glial cells in primary cultures. *J. Neurochem.* 44:779-786.
- Cobas,A. und Fairen,A. (1988) GABAergic neurons of different morphological classes are cogenerated in the mouse barrel cortex. *J. Neurocytol.* 17:511-519.
- Cobas,A., Welker,E., Fairen,A., Kraftsik,R., und Van der Loos,H. (1987) GABAergic neurons in the barrel cortex of the mouse - an analysis using neuronal archetypes. *J. Neurocytol.* 16:843-871.
- Cohen,M.H., Zatezalo,R., und Land,P.W. (1993) Parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the somatosensory barrel cortex and the effect of tactile experience. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19:1568.
- Colonnier,M. (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res.* 9:268-287.
- Connor,J.R. und Peters,A. (1984) Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in rat visual cortex. *Neuroscience* 12:1027-1044.
- Csillag,A., Hajos,F., Zilles,K., Schleicher,A., und Schröder,H. (1993) Matching localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and VIP-receptor at pre- and postsynaptic sites in the mouse visual cortex. *J. Neurocytol.* 22:491-497.
- DeFelipe,J. (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb. Cortex.* 3:273-289.
- DeFelipe,J. (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Chem. Neuroanat.* 14:1-19.

- DeFelipe,J., Gonzalez-Albo,M.C., Del,R.M., und Elston,G.N. (1999) Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 412:515-526.
- DeFelipe,J., Hendry,S.H., und Jones,E.G. (1989) Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. *Brain Res.* 503:49-54.
- DeFelipe,J., Marco,P., Busturia,I., und Merchan-Perez,A. (1999) Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. *Cereb. Cortex* 9:722-732.
- Demeulemeester,H., Arckens,L., Vandesande,F., Orban,G.A., Heizmann,C.W., und Pochet,R. (1991) Calcium binding proteins and neuropeptides as molecular markers of GABAergic interneurons in the cat visual cortex. *Exp. Brain Res.* 84:538-544.
- Demeulemeester,H., Vandesande,F., Orban,G.A., Brandon,C., und Vanderhaeghen,J.J. (1988) Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 8:988-1000.
- Demeulemeester,H., Vandesande,F., Orban,G.A., Heizmann,C.W., und Pochet,R. (1989) Calbindin D-28K and Parvalbumin immunoreactivity is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus. *Neuroscience Letters* 99:6-11.
- Douglas,R. (1998) Neocortex. In G.M.Shepherd (Hg.): *The Synaptic Organization of the Brain*. London; New York: Oxford University Press, 459-509.
- Durham,D. und Woolsey,T.A. (1977) Barrels and columnar cortical organization: evidence from 2-deoxyglucose (2-DG) experiments. *Brain Res.* 137:168-174.
- Emson,P.C., Fahrenkrug,J., Schaffalitzky de Muckadell,O.B., Jessell,T.M., und Iversen,L.L. (1978) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): vesicular localization and potassium evoked release from rat hypothalamus. *Brain Res.* 143:174-178.
- Emson,P.C. und Marley,P.D. (1985) Cholecystokinin and vasoactive intestinal polypeptide. In L.S.Iversen, S.D.Iversen, und S.H.Snyder (Hg.): *Neuropeptides*. New York ; London: Plenum Press, 255-296.
- Fahrenkrug,J. (1993) Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol. Toxicol.* 72:354-363.
- Fairen,A., DeFelipe,J., und Regidor,J. (1984) Nonpyramidal neurons. In A.Peters und E.G.Jones (Hg.): *Cellular components of the cerebral cortex*. New York: Plenum Press, 201-253.

- Fatatis,A., Holtzclaw,L.A., Avidor,R., Brenneman,D.E., und Russell,J.T. (1994) Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: synergism with alpha-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2036-2040.
- Feldman,M.L. und Peters,A. (1974) A study of barrels and pyramidal dendritic clusters in the cerebral cortex. *Brain Res.* 77:55-76.
- Feldman,M.L. und Peters,A. (1978) The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 179:761-793.
- Ferron,A., Siggins,G.R., und Bloom,F.E. (1985) Vasoactive intestinal polypeptide acts synergistically with norepinephrine to depress spontaneous discharge rate in cerebral cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:8810-8812.
- Fine,A. (2000) Confocal Microscopy: Principles and Practice. In R.Yuste, F.Lanni, und A.Konnerth (Hg.): *Imaging Neuons. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11.1-12.1.
- Fox,K. (1994) The cortical component of experience-dependent synaptic plasticity in the rat barrel cortex. *J. Neurosci.* 14:7665-7679.
- Freund,T.F. (1989) GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res.* 478:375-381.
- Freund,T.F. und Buzsaki,G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Freund,T.F., Gulyas,A.I., Acsady,L., Gorcs,T., und Toth,K. (1990) Serotonergic control of the Hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:8501-8505.
- Freund,T.F. und Meskenaite,V. (1992) Gamma-Aminobutyric acid-containing basal forebrain neurons innervate inhibitory interneurons in the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:738-742.
- Frotscher,M. (1992) Specificity of interneuronal connections. *Anat. Anz.* 174:377-382.
- Fuxe,K., Hökfelt,T., Said,S.I., und Mutt,V. (1977) Vasoactive intestinal Polypeptide and the nervous system: immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 5:241-246.
- Gabbott,P.L. und Bacon,S.J. (1996) Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a, b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J. Comp. Neurol.* 364:609-636.
- Gabbott,P.L. und Bacon,S.J. (1997) Vasoactive intestinal polypeptide containing neurones in monkey medial prefrontal cortex (mPFC): colocalisation with calretinin. *Brain Res.* 744:179-184.
- Giachetti,A., Said,S.I., Reynolds,R.C., und Koniges,F.C. (1977) Vasoactive intestinal

polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:3424-3428.

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

Glauert,A.M. und Lewis,P.R. (1998) Fixatives. In A.M.Glauert (Hg.): *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy*. London: Portland Press, 21-55.

Gonchar,Y. und Burkhalter,A. (1997) Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb. Cortex* 7:347-358.

Gray,E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopic study. *J. Anat.* 93:420-433.

Gressens,P., Marret,S., Hill,J.M., Brenneman,D.E., Gozes,I., Fridkin,M., und Evrard,P. (1997) Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J Clin. Invest* 100:390-397.

Gulyas,A.I. und Freund,T.F. (1996) Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. *Hippocampus* 6:525-534.

Gulyas,A.I., Görcs,T.J., und Freund,T.F. (1990) Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* 37:31-44.

Gulyas,A.I., Hajos,N., und Freund,T.F. (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16:3397-3411.

Gupta,A., Wang,Y., und Markram,H. (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287:273-278.

Haas,H.L. und Gähwiler,B.H. (1992) Vasoactive intestinal polypeptide modulates neuronal excitability in hippocampal slices of the rat. *Neuroscience* 47:273-277.

Hajos,F. und Zilles,K. (1988) Quantitative immunohistochemical analysis of VIP-neurons in the rat visual cortex. *Histochemistry* 90:139-144.

Hajos,F., Zilles,K., Gallatz,K., Schleicher,A., Kaplan,I., und Werner,L. (1988a) Ramification patterns of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- cells in the rat primary visual cortex. An immunohistochemical study. *Anat. Embryol. (Berl)* 178:197-206.

Hajos,F., Zilles,K., Schleicher,A., und Kalman,M. (1988b) Types and spatial distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing synapses in the rat visual cortex. *Anat. Embryol. (Berl)* 178:207-217.

Hajos,F., Zilles,K., Zsarnovszky,A., Sotonyi,P., Gallatz,K., und Schleicher,A. (1998) Modular

distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat barrel cortex: changes induced by neonatal removal of vibrissae. *Neuroscience* 85:45-52.

Hajos,N. und Mody,I. (1997) Synaptic communication among hippocampal interneurons: properties of spontaneous IPSCs in morphologically identified cells. *J. Neurosci.* 17:8427-8442.

Harris,K.M. (1994) Serial electron microscopy as an alternative or complement to confocal microscopy for the study of synapses and dendritic spines in the central nervous system. In J.K.Stevens, L.R.Mills, und J.E.Trogadis (Hg.): 3-Dimensional confocal microscopy. Volume investigation of biological systems. San Diego: Academic Press, 421-443.

Harris,R.M. und Woolsey,T.A. (1983) Computer-assisted analyses of barrel neuron axons and their putative synaptic contacts. *J. Comp. Neurol.* 220:63-79.

Hendry,S.H., Jones,E.G., Emson,P.C., Lawson,D.E., Heizmann,C.W., und Streit,P. (1989) Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp. Brain Res.* 76:467-472.

Hendry,S.H. und Jones,E.G. (1991) GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: co- localization with calcium binding proteins. *Brain Res.* 543:45-55.

Holmes,W.R., Segev,L., und Rall,W. (1992) Interpretation of time constant and electrotonic length estimates in multicylinder or branched neuronal structures. *J. Neurophysiol.* 68:1401-1420.

Hornung,J.P. und Celio,M.R. (1992) The selective innervation by serotonergic axons of calbindin- containing interneurons in the neocortex and hippocampus of the marmoset. *J. Comp. Neurol.* 320:457-467.

Hubel,D.H. und Wiesel,T.N. (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 160:106-154.

Hubel,D.H. und Wiesel,T.N. (1969) Anatomical demonstration of columns in the monkey striate cortex. *Nature* 221:747-750.

Ishihara,T., Shigemoto,R., Mori,K., Takahashi,K., und Nagata,S. (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8:811-819.

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

- Jin,X., Mathers,P.H., Szabo,G., Katarova,Z., und Agmon,A. (2001) Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro. *Cereb. Cortex* 11:666-678.
- Jones,E.G. (1975) Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 160:205-267.
- Kaas,J.H. (1997) Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res. Bull.* 44:107-112.
- Kaiser,P.K. und Lipton,S.A. (1990) VIP-mediated increase in cAMP prevents tetrodotoxin-induced retinal ganglion cell death in vitro. *Neuron* 5:373-381.
- Kandel,E.R., Schwartz,J.H., und Jessell,T.M. (1996) Neurotransmitter. In E.R.Kandel, J.H.Schwartz, und T.M.Jessell (Hg.): *Neurowissenschaften. Eine Einführung.* Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 299-312.
- Katz,L.C. (1987) Local circuitry of identified projection neurons in cat visual cortex brain slices. *J. Neurosci.* 7:1223-1249.
- Kawaguchi,Y. (1995) Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci.* 15:2638-2655.
- Kawaguchi,Y. (1997) Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J. Neurophysiol.* 78:1743-1747.
- Kawaguchi,Y. und Kubota,Y. (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* 70:387-396.
- Kawaguchi,Y. und Kubota,Y. (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J. Neurosci.* 16:2701-2715.
- Kawaguchi,Y. und Kubota,Y. (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex.* 7:476-486.
- Keller,A. (1995) Synaptic organization of the Barrel Cortex. In E.G.Jones und I.T.Diamond (Hg.): *Cerebral Cortex.* New York; London: Plenum Press, 221-262.
- Keller,A. und White,E.L. (1986) Distribution of glutamic acid decarboxylase-immunoreactive structures in the barrel region of mouse somatosensory cortex. *Neurosci. Lett.* 66:245-250.

- Keller,A. und White,E.L. (1987) Synaptic organization of GABAergic neurons in the mouse Sml cortex. *J. Comp. Neurol.* 262:1-12.
- Kiss,J., Patel,A.J., und Freund,T.F. (1990) Distribution of septohippocampal neurons containing parvalbumin or choline acetyltransferase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 298:362-372.
- Kisvarday,Z.F., Beaulieu,C., und Eysel,U.T. (1993) Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18) - implication for lateral disinhibition. *J. Comp. Neurol.* 327:398-415.
- Kossut,M. (1992) Plasticity of the barrel cortex neurons. *Prog. Neurobiol.* 39:389-422.
- Kossut,M. und Siucinska,E. (1996) Overlap of sensory representations in rat barrel cortex after neonatal vibrissotomy. *Acta Neurobiol. Exp.(Warsz).* 56:499-505.
- Krimer,L.S., Jakab,R.L., und Goldman-Rakic,P.S. (1997) Quantitative three-dimensional analysis of the catecholaminergic innervation of identified neurons in the macaque prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 17:7450-7461.
- Kroger,R.H. und Wagner,H.J. (1998) A fluorescent double stain for visualization of neural tissue by confocal laser scanning microscopy. *J. Neurosci. Methods* 84:87-92.
- Kubota,Y., Hattori,R., und Yui,Y. (1994) Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res.* 649:159-173.
- Lambe,E.K., Krimer,L.S., und Goldman-Rakic,P.S. (2000) Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. *J. Neurosci.* 20:8780-8787.
- Larkum,M.E., Zhu,J.J., und Sakmann,B. (1999) A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 398:338-341.
- Leranth,C. und Pickel,V.M. (1989) Electron microscopic preembedding double immunostaining methods. In L.Heimer und L.Zaborsky (Hg.): *Neuroanatomical tract-tracing methods.* Vol. 2. New York: Plenum Press, 129-172.
- Lin,C.S., Lu,S.M., und Schmechel,D.E. (1985) Glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in layer IV of barrel cortex of rat and mouse. *J. Neurosci.* 5:1934-1939.
- Liu,W.L., Behbehani,M.M., und Shipley,M.T. (1993) Intracellular filling in fixed brain slices using Miniruby, a fluorescent biocytin compound. *Brain Res.* 608:78-86.
- Loren,I., Emson,P.C., Fahrenkrug,J., Bjorklund,A., Alumets,J., Hakanson,R., und Sundler,F. (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4:1953-1976.

- Lu,S.M. und Lin,R.C.S. (1993) Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens. Motor Res.* 10:1-16.
- Lutz,E.M., Sheward,W.J., West,K.M., Morrow,J.A., Fink,G., und Harmar,A.J. (1993) The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* 334:3-8.
- Magistretti,P.J., Morrison,J.H., Shoemaker,W.J., und Bloom,F.E. (1981) Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:6535-6539.
- Mainen,Z.F. und Sejnowski,T.J. (1996) Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382:363-366.
- Mains,R.E. und Eipper,B.A. (1999) Peptides. In G.J.Siegel, B.W.Agranoff, R.W.Albers, S.K.Fisher, und M.D.Uhler (Hg.): *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects.* Philadelphia, New York: Lippincott-Raven, 364-382.
- Martin,J.L., Feinstein,D.L., Yu,N., Sorg,O., Rossier,C., und Magistretti,P.J. (1992) VIP receptor subtypes in mouse cerebral cortex: evidence for a differential localization in astrocytes, microvessels and synaptosomal membranes. *Brain Res.* 587:1-12.
- Martin,J.L., Gasser,D., und Magistretti,P.J. (1995) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide potentiate c-fos expression induced by glutamate in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 65:1-9.
- McBain,C.J. und Fisahn,A. (2001) Interneurons unbound. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:11-23.
- McCasland,J.S., Hibbard,L.S., Rhoades,R.W., und Woolsey,T.A. (1997) Activation of a widespread network of inhibitory neurons in barrel cortex. *Somatosens. Mot. Res.* 14:138-147.
- McCormick,D.A., Connors,B.W., Lighthall,J.W., und Prince,D.A. (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* 54:782-806.
- McCormick,D.A., Wang,Z., und Huguenard,J. (1993) Neurotransmitter control of neocortical neuronal activity and excitability. *Cereb. Cortex.* 3:387-398.
- Meinecke,D.L. und Peters,A. (1987) GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 261:388-404.
- Merighi,A. (1992) Methods. In J.M.Polak und J.V.Priestley (Hg.): *Electron microscopic Immunocytochemistry. Principles and Practice.* Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 56.

- Mirabella,G., Battiston,S., und Diamond,M.E. (2001) Integration of Multiple-whisker Inputs in Rat Somatosensory Cortex. *Cereb. Cortex* 11:164-170.
- Morrison,J.H., Magistretti,P.J., Benoit,R., und Bloom,F.E. (1984) The distribution and morphological characteristics of the intracortical VIP-positive cell: an immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 292 :269-282.
- Mountcastle,V.B. (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* 20:408-434.
- Mountcastle,V.B. (1979) An organizing principle for cerebral function: the unit module and the distributed system. In F.O.Schmitt und F.G.Worden (Hg.): *The neurosciences. 4th study program.* MIT Press, 21-42.
- Mountcastle,V.B. (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120:701-722.
- Murphy,P.C., Grieve,K.L., und Sillito,A.M. (1993) Effects of vasoactive intestinal polypeptide on the response properties of cells in area 17 of the cat visual cortex. *J. Neurophysiol.* 69:1465-1474.
- Mutt,V. und Said,S.I. (1974) Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur. J. Biochem.* 42:581-589.
- Ohm,T.G. und Diekmann,S. (1994) The use of Lucifer Yellow and Mini-Ruby for intracellular staining in fixed brain tissue: methodological considerations evaluated in rat and human autopsy brains. *J. Neurosci. Methods* 55:105-110.
- Papp,E., Leinekugel,X., Henze,D.A., Lee,J., und Buzsaki,G. (2001) The apical shaft of CA1 pyramidal cells is under GABAergic interneuronal control. *Neuroscience* 102:715-721.
- Pawelzik,H., Dodt,H.U., und Zieglgansberger,W. (1992) Actions of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on neocortical neurons of the rat in vitro. *Neurosci. Lett.* 147:167-170.
- Paxinos,G. und Watson,C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press.
- Pelletier,G., Leclerc,R., Puviani,R., und Polak,J.M. (1981) Electron immunocytochemistry of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat brain. *Brain Res.* 210:356-360.
- Peters, A. (1984) Bipolar cells. In A.Peters and E.G.Jones (Hg.): *Cellular components of the cerebral cortex. Cerebral Cortex (1)* New York: Plenum Press, Plenum Press, 381-407
- Peters,A. und Jones,E.G. (1984) Classification of cortical neurons. In A.Peters and E.G.Jones (Hg.): *Cellular components of the cerebral cortex. Cerebral Cortex (1).* New York: Plenum Press, 107-121.

- Peters,A. und Kimerer,L.M. (1981) Bipolar neurons in rat visual cortex: a combined Golgi-electron microscope study. *J. Neurocytol.* 10:921-946.
- Peters,A., Meinecke,D.L., und Karamalidis,A.N. (1987) Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive neurons in the primary visual cortex of the cat. *J. Neurocytol.* 16:1623-1638.
- Peters,A. und Palay,S.L. (1996) The morphology of synapses. *J. Neurocytol.* 25:687-700.
- Phillis,J.W., Kirkpatrick,J.R., und Said,S.I. (1978) Vasoactive intestinal polypeptide excitation of central neurons. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 56:337-340.
- Pincus,D.W., DiCicco-Bloom,E., und Black,I.B. (1994) Trophic mechanisms regulate mitotic neuronal precursors: role of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Brain Res.* 663:51-60.
- Porter,J.T., Cauli,B., Staiger,J.F., Lambolez,B., Rossier,J., und Audinat,E. (1998) Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur. J. Neurosci.* 10:3617-3628.
- Porter,J.T., Johnson,C.K., und Agmon,A. (2001) Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 21:2699-2710.
- Purves,D., Riddle,D.R., und LaMantia,A.S. (1992) Iterated patterns of brain circuitry (or how the cortex gets its spots). *Trends Neurosci.* 15:362-368.
- Quik,M., Emson,P.C., Fahrenkrug,J., und Iversen,L.L. (1979) Effect of kainic acid injections and other brain lesions on vasoactive intestinal peptide (VIP)-stimulated formation of cAMP in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 306:281-286.
- Quik,M., Iversen,L.L., und Bloom,S.R. (1978) Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 27:2209-2213.
- Ren,J.Q., Aika,Y., Heizmann,C.W., und Kosaka,T. (1992) Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp. Brain Res.* 92:1-14.
- Rice,F.L. (1995) Comparative aspects of barrel structure and development. In E.G.Jones and I.T.Diamond (Hg.): *The Barrel Cortex of Rodents*. New York; London: Plenum Press, 1-75.
- Riddle,D.R. and Purves,D. (1995) Individual variation and lateral asymmetry of the rat primary somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 15:4184-4195.
- Rogers,J.H. (1992) Immunohistochemical markers in rat brain: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with tyrosine hydroxylase Immunohistochemical markers in rat cortex: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and. *Brain Res.* 587:147-157.

- Rogers, J.H. und Resibois, A. (1992) Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 51:843-865.
- Rozov, A., Jerecic, J., Sakmann, B., and Burnashev, N. (2001) AMPA receptor channels with long-lasting desensitization in bipolar interneurons contribute to synaptic depression in a novel feedback circuit in layer 2/3 of rat neocortex. *J Neurosci.* 21:8062-8071.
- Said, S.I. und Mutt, V. (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225:863-864.
- Said, S.I. und Rosenberg, R.N. (1976) Vasoactive intestinal polypeptide: Abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science* 192:907-908.
- Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Sieghart, W., und Fritschy, J.M. (2000) Colocalization of multiple GABA(A) receptor subtypes with gephyrin at postsynaptic sites. *J. Comp. Neurol.* 420:481-498.
- Schober, W. (1986) The rat cortex in stereotaxic coordinates. *J. Hirnforsch.* 27:121-143.
- Sessler, F.M., Grady, S.M., Waterhouse, B.D., und Moises, H.C. (1991) Electrophysiological actions of VIP in rat somatosensory cortex. *Peptides* 12:715-721.
- Shepherd, G.M. (1993) Die Hautsinne (Somatosensorik). In G.M. Shepherd (ed): *Neurobiologie*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer-Verlag, 221-241.
- Shepherd, G.M. und Koch, C. (1998) Introduction to synaptic circuits. In G.M. Shepherd (ed): *The Synaptic Organization of the Brain*. London, New York: Oxford University Press. 1-36.
- Simons, D.J. (1978) Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J. Neurophysiol.* 41:798-820.
- Simons, D.J. (1995) Neuronal integration in the somatosensory Whisker/ Barrel Cortex. In E.G. Jones und I.T. Diamond (Hg.): *Cerebral Cortex*. New York; London: Plenum Press, 263-298.
- Simons, D.J. (1997) Rodent Whisker Barrels: Window into cerebral cortical function. *News Physiol. Sci.* 12:268-273.
- Simons, D.J. und Woolsey, T.A. (1979) Functional organization in mouse barrel cortex. *Brain Res.* 165:327-332.
- Simons, D.J. und Woolsey, T.A. (1984) Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat Sml cortex. *J. Comp. Neurol.* 230 :119-132.
- Smallcombe, A. und Benham, G.S. (1998) Effective Laser Lines for Biological Confocal

- Microscopy. In P.C.Cheng und T.H.Lin (Hg.): Multidimensional Microscopy. New York: Springer Verlag, 267-289.
- Somogyi, P. und Cowey, A. (1984) Double bouquet cells. In Peters, A. und Jones, E. G. Cereb.Cortex (1), Cellular Components of the cerebral cortex. New York, Plenum Press, 337-360.
- Somogyi,P., Tamas,G., Lujan,R., und Buhl,E.H. (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. Brain Res. Brain Res. Rev. 26:113-135.
- Staiger, J. F. (2000) Strukturelle und funktionelle Einheiten des Großhirns: Nachweis einer modulären Organisation des somatosensorischen Kortex am Beispiel der Ratte. Dissertation am C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung; Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1-104.
- Staiger,J.F., Freund,T.F., und Zilles,K. (1997) Interneurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) are extensively innervated by parvalbumin- containing boutons in rat primary somatosensory cortex. Eur. J. Neurosci. 9:2259-2268.
- Staiger,J.F., Zilles,K., und Freund,T.F. (1996a) Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. Eur. J. Neurosci. 8:2273-2285.
- Staiger,J.F., Zilles,K., und Freund,T.F. (1996b) Innervation of VIP-immunoreactive neurons by the ventroposteromedial thalamic nucleus in the barrel cortex of the rat. J. Comp. Neurol. 367:194-204.
- Staiger,J.F., Bisler,S., Schleicher,A., Gass,P., Stehle,J.H., and 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, J.F., Masannek, C., Bisler, S., Schleicher, A., Zuschratter, W., and Zilles, K. (2002) Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. Neuroscience 109:687-699.
- Stefani,M., De Martino,C., und Zamboni,L. (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature 216:173-174.
- Swanson,L.W. (1998) Brain maps: structure of the rat brain. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Swindale,N.V. (1998) Cortical organization: Modules, polymaps and mosaics. Curr. Biol. 8:R270-R273.
- Taylor,D.P. und Pert,C.B. (1979) Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:660-664.

- Thomson,A.M. und Deuchars,J. (1997) Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro. *Cereb. Cortex* 7:510-522.
- Tsacopoulos,M. und Magistretti,P.J. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16:877-885.
- van Brederode,J.F., Mulligan,K.A., und Hendrickson,A.E. (1990) Calcium-Binding Proteins as Markers for Subpopulations of GABAergic Neurons in Monkey Striate Cortex. *J. Comp. Neurol.* 298:1-22.
- van Brederode,J.F., Helliesen,M., und Hendrickson,A.E. (1991) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat. *Neuroscience.* 44:157-171.
- van Brederode,J.F., Mulligan,K.A., und Hendrickson,A.E. (1990) Calcium-Binding Proteins as Markers for Subpopulations of GABAergic Neurons in Monkey Striate Cortex. *J. Comp. Neurol.* 298:1-22.
- Wang,J.Y., Yaksh,T.L., und Go,V.L.W. (1985) Studies on the in vivo release of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from the cerebral cortex: effects of cortical, brainstem and somatic stimuli. *Brain Res.* 326:317-334.
- Welker,C. (1971) Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (Sml) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res.* 26:259-275.
- Welker,C. und Woolsey,T.A. (1974) Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J. Comp. Neurol.* 158:437-454.
- Welker,E., Armstrong-James,M., Van der Loos,H., und Kraftsik,R. (1993) The mode of activation of a barrel column: response properties of single units in the somatosensory cortex of the mouse upon whisker deflection. *Eur. J. Neurosci.* 5:691-712.
- Welker,W.I. (1964) Analysis of sniffing of the albino rat. *Behavior* 22:223-244.
- Wells,S. und Johnson,I. (1994) Fluorecent labels for confocal microscopy. In J.K.Stevens, L.R.Mills, und J.E.Trogadis (Hg.): 3-Dimensional confocal microscopy. Volume investigation of biological systems. San Diego: Academic Press, 101-121.
- White,E.L. (1989) General Organization of the Cerebral Cortex. In E.L.White (ed): *Cortical Circuits: Synaptic Organization of the Cerebral Cortex- Structure, Function and Theory.* Boston: Birkhäuser, 19-45.
- White,E.L. und Rock,M.P. (1981) A Comparison of thalamocortical and other other synaptic inputs to dendrites of two non-spiny neurons in single barrel of mouse Sm1 cortex. *J. Comp.*

Neurol. 195:265-278.

Woolsey, T.A. (1987) Barrels, Vibrissae, and Topographic Representations. In G. Adelman (ed): Encyclopedia of Neuroscience. Boston, Basel, Stuttgart: Birkhäuser, 111-113.

Woolsey, T.A. und 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.

Zilles, K. (1985) The cortex of the rat. A stereotaxic atlas. Berlin: Springer Verlag.

Zilles, K., Hajos, F., Csillag, A., Kalman, M., Sotonyi, P., und Schleicher, A. (1993) Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive structures in the mouse barrel field. Brain Res. 618:149-154.

Zilles, K. und Wree, A. (1995) Cortex: areal and laminar structure. In G. Paxinos (ed): The rat nervous system. New York: Academic Press, 649-685.

Zupan, V., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Gozes, I., Fridkin, M., Robberecht, P., Evrard, P., und Gressens, P. (1998) Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide II vasoactive intestinal peptide 2 receptor in mouse neocortical astrocytogenesis. J. Neurochem. 70:2165-2173.

8. Anhang

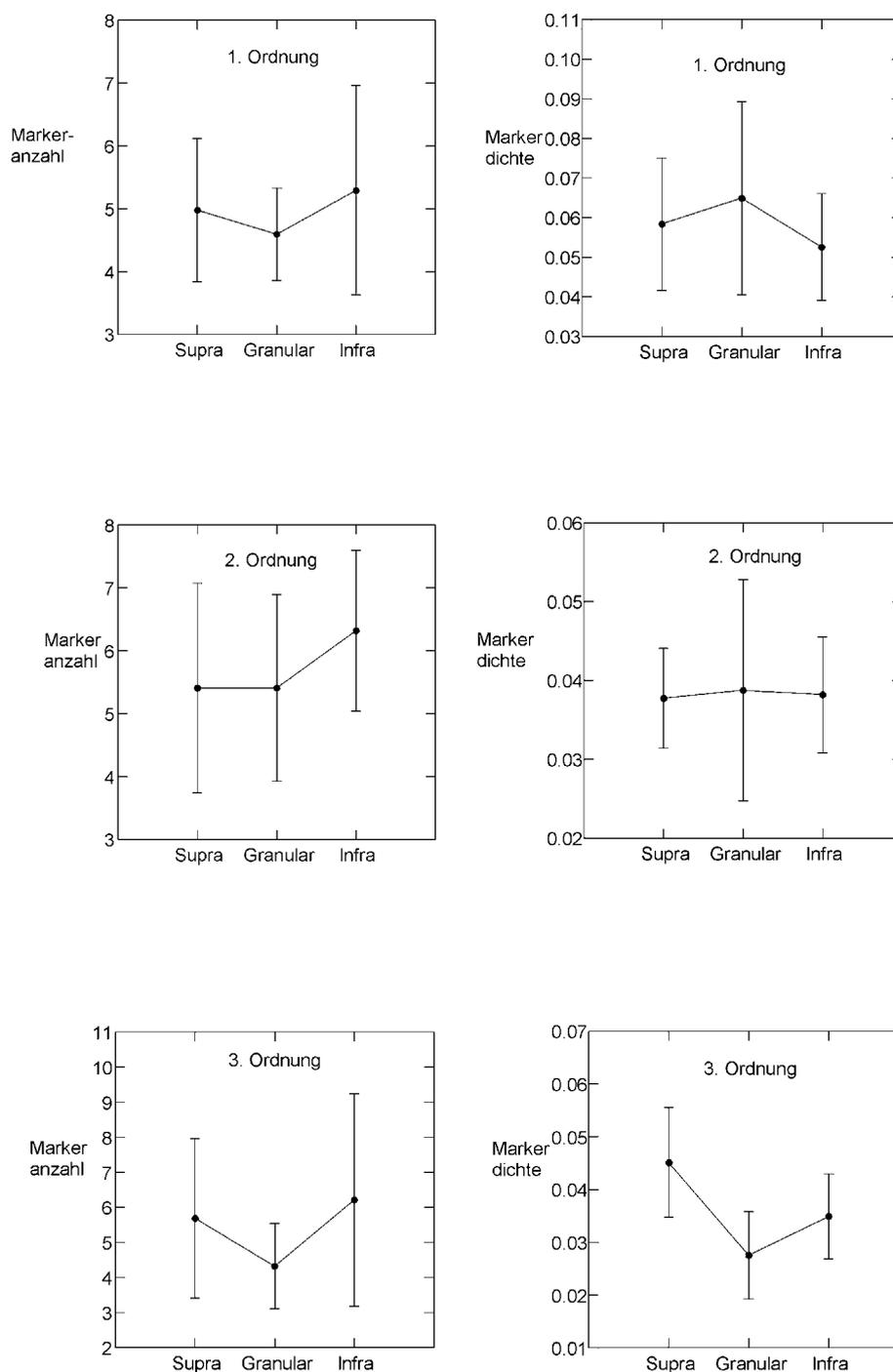


Abb. 28: Die Diagramme zeigen die Anzahl der Marker (links) und die Dichte der Marker pro μm (rechts) an CB-positiven Interneuronen. Hier sind die Daten für jede einzelne Ordnung (1 bis 5) aufgeschlüsselt nach Schichten (supra- und infragranulär, granulär) und repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler für jeweils 6 Tiere. Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, ist ein großer Standardfehler zu erkennen.

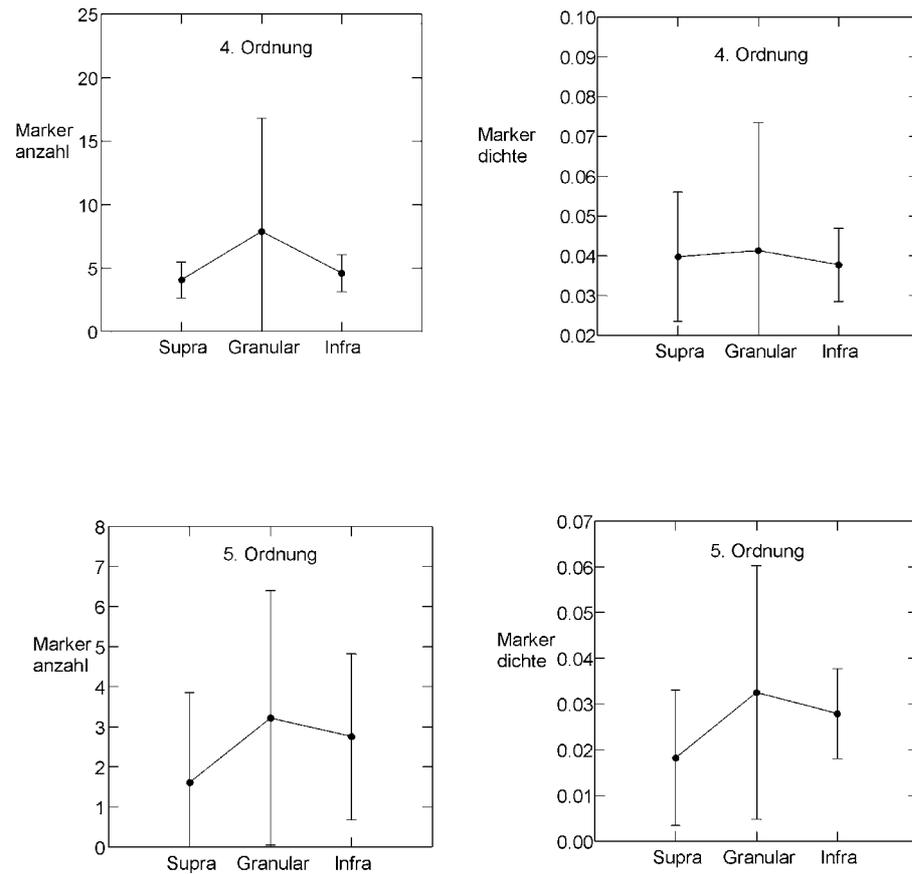


Abb. 28, Fortsetzung: Die Diagramme zeigen die Anzahl der Marker (links) und die Dichte der Marker pro μm (rechts) an CB-positiven Interneuronen. Hier sind die Daten für jede einzelne Ordnung (1 bis 5) aufgeschlüsselt nach Schichten (supra- und infragranulär, granulär) und repräsentieren die Mittelwerte und Standardfehler für jeweils 6 Tiere. Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, ist ein großer Standardfehler zu erkennen.

Abkürzungen

AK: Antikörper

Au1: Auditorisches Areal (Paxinos and Watson, 1998); AUDp (Swanson, 1998)

BS: (burst-spiking) in kurzen Salven feuernd

cAMP: zyklisches Adenosin-Monophosphat

CB: Calbindin

CR: Calretinin

Fr1 und Fr3¹: Frontales Feld (Zilles, 1985)

FS: (fast-spiking) , schnell feuernd

GABA: gamma-Aminobuttersäure

IR: Immunreaktivität

LS: (late-spiking), niedrigschwellig feuernd

LTS: (low-threshold spiking), regulär feuernd

M1: Primäres motorisches Areal (Paxinos and Watson, 1998); MOp (Swanson, 1998)

NHS: Normal Horse Serum

NGS: Normal Goat Serum

NP: nichtpyramidal

Oc1, Occipitales Feld (Zilles, 1985)

Par 1: Parietales Feld (Zilles, 1985)

PMBSF: posteromedial barrel subfield

PV: Parvalbumin

RS: (regular-spiking), regelmässig feuernd

RT: Raumtemperatur

S1: primär somatosensorisches Areal

SOM: Somatostatin

Te1: Temporales Feld (Zilles, 1985)

V1: Visuelles Areal (Paxinos and Watson, 1998), VISp (Swanson, 1998)

VB: Nukleus ventrobasalis thalami

VIP: Vasoaktives intestinales Polypeptid

VPM: thalamischer medialer Nukleus ventralis posterior

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Masanneck
Vorname	Carmen
Geburtsdatum	07.12.1969
Geburtsort	Lage (Lippe)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1976 - 1980	Grundschule Kachtenhausen (Lage)
1980 - 1981	Hauptschule in Lage
1981 - 1990	Gymnasium in Lage
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

1990 - 1995	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld.
1995/1996	Diplomarbeit zum Thema: S-100 und GAP-43 als Marker für plastische Prozesse in der ontogenetischen Entwicklung des Zebrafinkengehirns (<i>Taeniopygia guttata</i>). Angefertigt am Lehrstuhl für Verhaltensforschung.
Abschluss:	Diplombiologin

Berufliche Tätigkeiten:

02/1997 - 09/1997	Gastwissenschaftlerin an der ETH Zürich, Abteilung Molekulare Neurobiologie, Stipendiatin der American Paralysis Association.
10/1997 – 09/2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am C.& O. Vogt Institut für Hirnforschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof.Dr.K.Zilles.

Fortsetzung Berufliche Tätigkeiten:

- 10/2001-11/2001** Wissenschaftliche Angestellte der Neurologischen
Klinik der H.H. Universität Düsseldorf, Labor für
molekulare Neurobiologie unter Leitung von Prof. Dr.
Müller
- seit 11/2001** Laborleiterin der Neuraxo Biotec GmbH

Berufliche Weiterbildung:

- 1998** Versuchstierkundliche Einführung zum Erwerb des Fachkunde-
nachweises gem. § 9, Tierschutzgesetz, TVA Düsseldorf.
- 1998** Teilnahme am Methodenkurs der Neurowissenschaftlichen
Gesellschaft "Moderne Methoden der Zytochemie" in Leipzig.
- 1999** Unixkurs; Hochschulrechenzentrum der H.H. Universität
Düsseldorf.

Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen:

- 1996** Teilnahme an der 24. Göttinger Neurobiologentagung
- 1997** Teilnahme am 23. Kongress Frauen in Naturwissenschaft und Technik ,
Hannover 1997
- 1998** Referentin auf dem 24. Kongress Frauen in Naturwissenschaft und Technik ,
Mainz
- 1998** Versuchstierkundliche Einführung zum Erwerb des Fachkundenachweises gem.
§ 9, Tierschutzgesetz, TVA Düsseldorf
- 1998** Teilnahme an der ENA-Tagung Berlin
- 1998** Teilnahme am Methodenkurs der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft
„Moderne Methoden der Zytochemie“ in Leipzig
- 1999** Referentin auf dem 25. Kongress Frauen in Naturwissenschaft und Technik ,
Darmstadt
- 1999** Teilnahme am 1. Vogt-Brodmann Symposium, Düsseldorf und Jülich, 1999
- 2000** Teilnahme an der Sommerschule Informatica feminale 2000 in Bremen. Vortrag:
„Gender Studies im Internet?“
- 2001** Referentin auf dem 27. Kongress Frauen in Naturwissenschaft und Technik ,
Wien, Österreich
- 2001** Teilnahme an der 28. Göttinger Neurobiologentagung mit Posterpräsentation
- 2002** Teilnahme am 4th International Symposium on Experimental Spinal Cord Repair
and Regeneration, Brescia, Italien

Publikationen

Bisler, S.; Masanneck, C.; Stehle, J.; Zilles, K.; Staiger, J.F. (1998): Single-vibrissae stimulation leads to column-specific expression of c-Fos and ICER in the Rat Barrel Field. *Somatosensory & Motor Research* 15 (3):237-237

Staiger, J.F.; Bisler, S.; Masanneck, C.; Zilles, K. (1999): Umgebung: kolumnäre Expression von c-FOS und ICER im Barrel-Kortex der adulten Ratte. *Verhandlungen der anatomischen Gesellschaft* 181. Band:233-233

Mitarbeit am BMBF-geförderten Forschungsbericht (2000): "Gender und Informationstechnologien im Kontext der virtuellen ifu". Ed: Pasero, Ursula; Landschulze, Maren. ZIF der Christian-Albrechtsuniversität zu Kiel.

Masanneck, C., Zuschratter, W., Zilles, K., and Staiger, J. F. Target structures of Vasoactive-intestinal-polypeptide (VIP)-positive Interneurons in the Barrel Cortex of the Rat. Elsner, Norbert and Kreuzberg, Georg W. II, 700-700. 2001. Stuttgart; New York, Georg Thieme Verlag. Göttingen Neurobiology Report 2001. Proceedings of the 4th Meeting of the German Neuroscience Society 2001.

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Zilles dafür danken, dass ich am C.&O. Vogt-Institut für Hirnforschung meine Promotion unter seiner Leitung durchführen konnte.

Auch Herrn Prof. Dr. Mehlhorn möchte ich danken, dass er die Betreuung meiner Doktorarbeit übernahm.

Bei Herrn Dr. med. Staiger möchte ich mich für die Einarbeitung in das Thema, die praktische Betreuung und für das geduldige Korrekturlesen bedanken.

Für die jederzeit zur Verfügung stehende Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Ing. Schleicher bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Oermann möchte ich ganz herzlich für ihre vielfältige Hilfestellung in allen Fragen und für die Unterstützung in allen Lebenslagen danken, die in zahlreichen Diskussionen dazu beitrugen, optimale Lösungen zu finden.

Herrn Opfermann danke ich für unkomplizierte und optimale Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Insbesondere möchte ich mich für die unerschöpfliche Geduld, Aufmerksamkeit und hilfreiche Unterstützung bei meinen Kolleginnen, Frau Dr. rer. nat. Hermanns, Frau Dipl. Biologin Reiprich und Frau Dr. rer. nat. Knoche bedanken.

Für die intensive Einarbeitung in die Welt der Laserscanmikroskopie und für die Bereitstellung der Geräte zu jeder Tageszeit möchte Herrn Dr. rer. nat. Zuschratter danken. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Novotny für die technische Unterstützung am Elektronenmikroskop danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter und den mir nahestehenden Personen bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht und mir das Leben persönlich durch ihre vielfältige Unterstützung erleichtert haben.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorlegten oder in ähnlicher Form bei noch keiner anderen Institution eingereicht habe.