

Aus dem
Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Charakterisierung neuraler Vorläuferzellen im pränatalen Neokortex des Nördlichen
Spitzhörnchens (*Tupaia belangeri*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Sebastian Römer
aus Berlin

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Simone Fietz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Simone Fietz, Veterinär- Anatomisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig
Prof. Dr. Dr. Markus Morawski, Paul- Flechsig Institut für Hirnforschung,
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig

Tag der Verteidigung: 05.04.2022

Für Mattis, Christin, Emma, Mutti und Vati

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Der Neokortex.....	3
2.2 Pränatale Entwicklung des Neokortex.....	4
2.3 Entwicklungsbedingte Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex.....	7
2.3.1 Entwicklungsbedingte, nicht-infektiöse Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex.....	7
2.3.2 Entwicklungsbedingte, infektiöse Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex.....	10
2.4 Tiermodelle für kongenitale Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex.....	12
2.5 Das <i>Tupaia</i>	12
2.5.1 Allgemeines.....	12
2.5.2 Abstammung und Systematik.....	13
2.5.3 Anatomische Grundlagen und Leistung der Organe.....	13
2.5.4 Reproduktion, Konzeption und Schwangerschaft.....	14
2.5.5 Verwendung des <i>Tupaia belangeri</i> in der translationalen Medizin und Forschung.....	15
3 Publikation.....	16
3.1 Eigenanteilangabe zur Publikation:.....	16
3.2 Publikation mit dem Titel „Neural Progenitors in the Developing Neocortex of the Northern Tree Shrew (<i>Tupaia belangeri</i>) Show a Closer Relationship to Gyrencephalic Primates Than to Lissencephalic Rodents“.....	16
INTRODUCTION.....	18
MATERIALS AND METHODS.....	19
RESULTS.....	20
DISCUSSION.....	27
CONCLUSION.....	29

Inhaltsverzeichnis

AUTHOR CONTRIBUTIONS	29
FUNDING	29
ACKNOWLEDGMENTS	29
SUPPLEMENTARY MATERIAL	29
REFERENCES	29
4 Diskussion	33
5 Zusammenfassung	36
6 Summary	38
7 Literaturverzeichnis.....	40
8 Danksagung	55

Abkürzungsverzeichnis

aIP	apical intermediate progenitor
AP	apikale Progenitorzelle
aRG	apikale radiale Gliazelle
ASBH	Arbeitsgemeinschaft Spina bifida und Hydrocephalus e.V.
bIP	basal intermediate progenitor
BP	basale Progenitorzelle
bRG	basale radiale Gliazelle
Brn2	synonym: POU domain-containing transcription factor
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CP	cortical plate
CRL	crown-rump-length
CRS	connatale Rötelnembryofetopathie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.
d.h.	das heißt
e.g.	exempli gratia
et al.	et alii/ et aliae
i.e.	id est
iSVZ	innere Subventrikulärzone
IZ	intermediate zone/Intermediärzone
oSVZ	outer/äußere Subventrikulärzone
NEC	neuroepitheliale Zelle
NPC	neurale Stamm- und Progenitorzelle

Abkürzungsverzeichnis

P	Process
Par 3	protease activated receptor 3
Pax6	paired box protein Pax-6
PBS	phosphat buffered saline/phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating nuclear cell antigen
PFA	Paraformaldehyd
PMG	Polymikrogyrie
RG	radiale Gliazelle
RKI	Robert Koch-Institut
SVZ	Subventrikulärzone
SP	subplate
Tbr1	T-box brain protein 1
Tbr2	T-box brain protein 2
T.T.	Tissue Tek O.C.T. Compound
VZ	Ventrikulärzone
ZO-1	Zonula occludens (protein)-1
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Säugetiere besitzen einen sechsschichtigen Neokortex. Dieser ist verantwortlich für die Ausprägung einer Vielzahl von Fähigkeiten: Bewusstsein, Verstand, Emotionalität, Abstraktion, Kognition, Sensorik und Assoziation (DE LAHUNTA et al. 2015). Die Mehrzahl der Nagetiere, bspw. Maus und Ratte, besitzen einen sogenannten lissenzephalen Neocortex, der sich durch eine glatte Oberfläche auszeichnet. Durch die Gyrifizierung, d.h. die Einfaltung der Oberfläche des Neokortex und damit verbundener Ausprägung von Wölbungen und Furchen, ist es möglich eine deutlich höhere Anzahl von Neuronen in einem limitierten knöchernen Schädel unterzubringen. Tiere mit einem gyrenzephalen Gehirn, bspw. Primaten, weisen in aller Regel bei gleicher Hirnmasse im Vergleich zu Tieren mit einem lissenzephalen Gehirn deutlich mehr Neurone auf (HERCULANO-HOUZEL 2009, HERCULANO-HOUZEL et al. 2006, HERCULANO-HOUZEL et al. 2007).

Die überwältigende Mehrheit der neokortikalen Neurone wird während der Embryonal- und Fetalphase gebildet. Sie entstammen neuralen Stamm- und Progenitorzellen (NPCs), die sich in zwei unterschiedlichen Keimzonen ausdifferenzieren: der Ventrikulärzone (VZ) und der Subventrikulärzone (SVZ) (GÖTZ und HUTTNER 2005, FIETZ und HUTTNER 2011, LAMONICA et al. 2012, FLORIO und HUTTNER 2014, DE JUAN ROMERO und BORELL 2015, MONTIEL et al. 2016, NAMBA und HUTTNER 2017). Mit dem Beginn der Neurogenese entstehen aus primären NPCs, deren Zellkörper sich in der VZ befindet, die sekundären NPCs, die als basale Progenitorzellen (BPs) bezeichnet werden und in der SVZ akkumulieren (HAUBENSAK et al. 2004, MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, STANCIK et al. 2010). Die BPs bestehen aus zwei Hauptsubtypen: der basalen radialen Gliazelle (bRG) und der basalen Zwischenprogenitorzelle (basal intermediate progenitor, bIP) (HANSEN et al. 2010, WANG et al. 2011).

Die SVZ der Primaten ist in der Hochphase der Neurogenese deutlich dicker als bei Nicht-Primaten (SMART et al. 2002, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012). Neben der Zunahme der Dicke ist die SVZ bei einigen Tierarten, bspw. Frettchen und Primaten, in 2 morphologisch unterschiedliche Keimzonen gliederbar: eine innere SVZ (iSVZ), die sehr der Maus-SVZ ähnelt und eine äußere SVZ (outer SVZ, oSVZ), die bei der Maus fehlt bzw. bei der Ratte sehr dünn ausgebildet ist (SMART et al. 2002, FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, GARCIA-MORENO et al. 2012, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012). Die Zunahme und Umgestaltung der SVZ ist begleitet von signifikanten Änderungen in der BP-Subtyp-Zusammensetzung. Die bRGs kommen in unterschiedlichen Säugetierspezies im sich entwickelnden Neokortex vor, jedoch variiert ihre relative Häufigkeit in Abhängigkeit von der neokortikalen Expansion (FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, WANG

et al. 2011, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012, MARTINEZ-CERDENO et al. 2017, SAUERLAND et al. 2018).

Der überwiegende Teil der BPs in lissenzephalen Nagetieren durchläuft symmetrisch-neurogene Zellteilungen und zeigt somit nur begrenztes proliferatives Potential. Der Großteil der BPs in gyrenzephalen Primaten, insbesondere die bRG, ist in der Lage sich repetierend zu teilen und besitzt somit ein höheres proliferatives Potential (HAUBENSAK et al. 2004, MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, ATTARDO et al. 2008, HANSEN et al. 2010, BETIZEAU et al. 2013). Diese Zunahme an proliferierenden BPs hat eine radiale Erweiterung der SVZ zur Folge, insbesondere der oSVZ, das wiederum zu einem höheren neuronalen Output in gyrenzephalen Primaten führt (FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, BETIZEAU et al. 2013, GERTZ et al. 2014).

In der translationalen Forschung werden Tiermodelle benötigt, die eine dem Menschen ähnliche Phylogenese, Morphologie und Physiologie aufweisen. In der neuronalen Stammzellforschung werden bislang häufig Nagetiere als Tiermodelle genutzt, die jedoch nicht die gleiche bzw. ähnliche neokortikale Stammzellausstattung wie die Primaten besitzen (FIETZ et al. 2010, FIETZ et al. 2011, FLORIO et al. 2014). Die Übertragung tierexperimenteller Daten auf den Menschen ist somit limitiert und die Etablierung alternativer Versuchstiermodelle, deren NPCs wesentliche Gemeinsamkeiten mit den humanen NPCs aufweisen, von essentieller Bedeutung. Das *Tupaia* findet in der Forschung bereits etablierte Verwendung in einer Vielzahl von Wissenschaftsbereichen (XIAO 2017). Zudem weist es eine relativ enge phylogenetische Verwandtschaft zu den Primaten auf (CAMPBELL et al. 2003, FAN et al. 2013, LIN et al. 2014). Bislang liegen keine detaillierten Daten zur Präsenz, Abundanz und Verteilung der bRG und anderen NPCs im sich entwickelnden Neokortex des *Tupaia* vor. Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, die Keimzonen und die darin enthaltenen NPCs im sich entwickelnden Neokortex des *Tupaia belangeri* zu charakterisieren und zu quantifizieren. Die gewonnenen Daten wurden anschließend mit bereits erhobenen Daten zur kortikalen Entwicklung von gyrenzephalen Primaten und lissenzephalen Nagetieren verglichen, um zu ermitteln, ob das *Tupaia belangeri* als alternatives Modelltier für die humane neuronale Stammzellforschung geeignet erscheint.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Neokortex

Der Neokortex ist Teil des Zentralnervensystems (ZNS). Er stellt den phylogenetisch jüngsten Abschnitt des Endhirns (Telencephalon) dar und hat während der Evolution eine enorme Expansion durchlaufen (MEREDITH et al. 2011, O`LEARY et al. 2013). Er enthält ca. 70% der Nervenzellen des gesamten ZNS (STOFFEL 2011). Seine Funktionen sind äußerst vielfältig. Dazu gehören Prozesse der Kognition, Emotionalität, Sensorik, Assoziation und Steuerung von somatischer und viszeraler Motorik (DE LAHUNTA et al. 2015, STOFFEL 2011).

Der Neokortex besteht aus der grauen und der weißen Substanz. Die graue Substanz beinhaltet die Großhirnrinde, die die Somata der Nervenzellen und deren Dendriten enthält. Sie weist einen gut differenzierten sechsschichtigen Aufbau auf. Die weiße Substanz besteht überwiegend aus Leitungsstrukturen, d.h. aus den myelinisierten Axonen der Nervenzellkörper der grauen Substanz und wird auch Marklager genannt. Die Gesamtheit der Großhirnrinde und des Marklagers wird als Großhirnmantel (Pallium cerebri) bezeichnet (SALOMON et al. 2005, DE LAHUNTA et al. 2015, KÖNIG und LIEBIG 2014).

Die Nervenzellen des Neokortex können in Projektions- und Interneurone unterteilt werden. Projektionsneurone besitzen lange Axone, die der Erregungsleitung in andere Regionen des ZNS dienen. Im Gegenzug dazu besitzen Interneurone oftmals deutlich kürzere Axone, mit denen sie Kontakt zu anderen Nervenzellen, die sich in der Regel in unmittelbarer Nähe des eigenen Zellkörpers befinden, bilden. Sie verschalten zwei andere Nervenzellen hemmend oder erregend miteinander und werden auch als „intrinsische Neurone“ bezeichnet (HAN und SESTAN 2013, RÜSSE und SINOWATZ 2010, KÖNIG und LIEBIG 2014). Projektionsneurone des Neokortex werden überwiegend im dorsalen Telencephalon gebildet. Sie werden aufgrund ihres dreieckigen Perikaryons auch Pyramidenzellen genannt und stellen im adulten Neokortex ca. 80 % der Nervenzellen. Interneurone des Neokortex entstammen vor allem dem ventralen Telencephalon. Sie werden auch als Körner- oder Sternzellen bezeichnet und stellen die restlichen ca. 20 % der Nervenzellen im adulten Neokortex (WONDERS und ANDERSON 2006, RÜSSE und SINOWATZ 2010, HAN und SESTAN 2013, HANSEN et al. 2013).

Die Anzahl der Nervenzellen im gesamten Gehirn variiert zwischen den einzelnen Spezies stark. Das Gehirn der Maus enthält ca. 70 - 100 Millionen Nervenzellen, das der Ratte ca. 200 Millionen, das des *Tupaia* ca. 260 Millionen, das des Makaken ca. 6,4 Milliarden und das des Menschen ca. 86 Milliarden Nervenzellen (DENK 2016, HERCULANO-HOUZEL 2009,

HERCULANO-HOUZEL et al. 2006, HERCULANO-HOUZEL et al. 2007). Somit hat im Verlauf der Evolution die Anzahl der Nervenzellen speziesabhängig unterschiedlich stark zugenommen. Da die Nervenzellen in der Rinde vor allem nebeneinander und nicht übereinander ergänzt wurden, hat sich im Verlauf der Evolution die Oberfläche des Neokortex unterschiedlich stark vergrößert (KRIEGSTEIN et al. 2006). Um diese Größenzunahme im knöchernen Schädel zu „verpacken“, falteten die Spezies mit einem größeren Neokortex die Oberfläche des Neokortex ein. Je größer die Oberfläche des Neokortex, desto stärker ist die mechanische Kompression und somit auch die Ausprägung der Gyri und Sulci (TALLINEN et al. 2016). Dadurch ist das gyrenzephalo Gehirn entstanden, das unter anderem repräsentativ für Primaten ist (KRIEGSTEIN et al. 2006). Der überwiegende Anteil der Nagetiere besitzt ein lissenzephalo Gehirn, d.h. ein Gehirn ohne Einfaltungen (VINK 2018, KRIEGSTEIN et al. 2006).

2.2 Pränatale Entwicklung des Neokortex

Das ZNS entwickelt sich aus dem Neuralrohr, das im Prozess der Neurulation durch Einsenkung und Abfaltung des Neuroektoderms aus dem Ektoderm hervorgeht. Der Prozess beginnt in der Halsgegend des Embryos und schreitet nach rostral und kaudal fort. Nach Verschluss des rostralen und kaudalen Neuroporus entwickelt sich der rostrale Abschnitt zur Hirnanlage und der kaudale Abschnitt zur Anlage des Rückenmarks. Das Lumen des Neuralrohrs entwickelt sich zum liquorgefüllten Ventrikelsystem des Gehirns bzw. zum Zentralkanal des Rückenmarks. Aus der Wand des rostralen Neuralrohrs entstehen durch Zellvermehrung und -verlagerung zunächst drei Bläschen (Prosencephalon, Rhombencephalon und Mesencephalon). Dieses Entwicklungsstadium wird auch als Dreiblasenstadium bezeichnet. Daraufhin differenziert sich das Prosencephalon in das Telencephalon und das Diencephalon. Das Rhombencephalon differenziert sich in das Metencephalon und Myelencephalon. Durch diesen Prozess ist das Fünfblasenstadium entstanden. Im sich entwickelnden Telencephalon entstehen die mit Flüssigkeit gefüllten Seitenventrikel (SCHNORR und KRESSIN 2011).

Das Telencephalon wird in einen dorsalen und einen ventralen Anteil unterteilt. Das dorsale Telencephalon entwickelt sich zum Hippokampus, Bulbus olfactorius und Neokortex (RÜSSE und SINOWATZ 2010, WONDERS und ANDERSON 2006). Vor Beginn der Neurogenese besteht die Wand des Neuralrohrs aus einem einschichtigen pseudostratifiziertem Epithel. Dieses Epithel enthält die sogenannte Ventrikulärzone (VZ) als primäre Keimzone, die an der apikalen bzw. ventrikulären Oberfläche an den sich entwickelnden Seitenventrikel und basal an die Basalmembran, die sich unterhalb der Pia mater befindet, grenzt. Durch Zellteilungen und Migration entsteht eine weitere Schicht, die sogenannte „Preplate“, basal der VZ. Die „Preplate“ enthält die ersten Neurone, die sich zum überwiegenden Teil zu Cajal-Retzius-

Zellen differenzieren (KRIEGSTEIN et al. 2006). Im Anschluss daran bildet sich mit der Subventrikulärzone (SVZ) eine weitere Keimzellschicht zwischen der „Preplate“ und der VZ aus. Hier liegen die Zellen lose und ohne Orientierung zusammen. Neu entstehende Zellen wandern in die „Preplate“ aus und teilen diese in die oberflächlich gelegene Marginalzone, die folglich die Cajal-Retzius-Zellen enthält, und in die tiefer gelegene „Subplate“. Die neu einwandernden Zellen bilden die sogenannte Kortikalplatte. Die Kortikalplatte wächst nach radial aus, indem neu gebildete Neurone sich den bereits früher gebildeten Neuronen außen (basal) anlagern. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Inside-out-layering“. Durch diesen Prozess entsteht der sechsschichtige Neokortex. Final entstehen aus der Marginalzone die Schicht eins und aus der Kortikalplatte die Schichten 2-6 des Neokortex. Die Intermediärzone, die zwischenzeitlich zwischen „Subplate“ und SVZ entstanden ist, wird zur weißen Substanz. Bis auf umschriebene Bereiche der Seitenwände, in denen bis ins Erwachsenenalter olfaktorische Neurone gebildet werden, verschwindet die SVZ nahezu vollständig. Aus der VZ entsteht das Ependym als einschichtige Auskleidung der Hirnventrikel (KRIEGSTEIN et. al 2006, STOFFEL 2011).

Die überwältigende Mehrheit der neokortikalen Neurone wird während der embryonalen und fetalen Entwicklung gebildet. Sie stammen von neuronalen Stamm- und Progenitorzellen (NPCs) ab. Diese sind durch unterschiedliche zellbiologische Eigenschaften charakterisiert und befinden sich in 2 unterschiedlichen Keimschichten: der VZ und der SVZ. Die VZ liegt am weitesten apikal und grenzt an den Seitenventrikel. Sie beinhaltet Zellkörper der primären NPCs, der sogenannten apikalen Progenitorzellen (APs) (GÖTZ und HUTTNER 2005, FIETZ und HUTTNER 2011, LA MONICA et al. 2012, FLORIO und HUTTNER 2014, DE JUAN ROMERO und BORELL 2015, MONTIEL et al. 2016, NAMBA und HUTTNER 2017).

Die APs bestehen vor Beginn der Neurogenese aus neuroepithelialen Zellen (NECs). Mit Beginn der Neurogenese wandeln sich diese in apikale radiale Gliazellen (aRGs) (KRIEGSTEIN und GÖTZ 2003, GÖTZ und HUTTNER 2005) und in apikale Zwischenprogenitorzellen (apical intermediate progenitors, aIPs), die auch als kurze neurale Vorläufer (short neural precursors) bekannt sind, um (GAL et al. 2006, STANCIK et al. 2010).

Alle drei Subtypen (NECs, aRGs, aIPs) besitzen eine sogenannte apikale Domäne, die aus einer apikalen Zellmembran, einem apikalen Zellkortex und apikalen Adherens junctions besteht. Des Weiteren weisen sie einen radial orientierten Fortsatz auf. Dieser durchzieht die kortikale Wand während des gesamten Zellzyklus in NECs und aRGs und verkürzt sich vor Beginn der Mitose in aIPs. (RAKIC 1972, AAKU-SARASTE et al. 1997, CHENN et al. 1998, GÖTZ und HUTTNER 2005, GAL et al. 2006, MARTHIENS und FFRENCH-CONSTANT 2009). Vor Beginn der Neurogenese teilen sich die NECs überwiegend symmetrisch-proliferativ. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Größenzunahme der VZ in lateraler Richtung

(RAKIC 1995). Mit dem Beginn der Neurogenese beginnen sich die aIPs symmetrisch-neurogen zu teilen, wodurch zwei Neurone entstehen. Die aRGs teilen sich asymmetrisch und bilden sekundäre NPCs, die basalen Progenitorzellen (BPs). Diese wandern nach basal aus und akkumulieren in der sogenannten SVZ (HAUBENSAK et al. 2004, MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, STANCIK et al. 2010).

Die BPs bestehen aus zwei Hauptsubtypen: der basalen Zwischenprogenitorzelle (basal intermediate progenitor, bIP) und der basalen radialen Gliazelle (bRG) (HANSEN et al. 2010, WANG et al. 2011, REILLO et al. 2011, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012). Beiden Zelltypen fehlt eine apikale Domäne. Die bIPs retrahieren den radial orientierten Fortsatz vor Beginn der Mitose. Die bRGs behalten mindestens einen ihrer radial orientierten Fortsätze über den gesamten Zellzyklus (ATTARDO et al. 2008, FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, NOWAKOWSKI et al. 2016).

Anhand der Anzahl und Lage der Zellfortsätze lassen sich 3 bRG-Subtypen unterscheiden (BETIZEAU et al. 2013):

- bRG mit basalem Fortsatz (bRG- basal- process(-p))
- bRG mit apikalem Fortsatz (bRG-apical-p)
- bRG mit apikalem und basalem Fortsatz (bRG- both-p)

Die SVZ gilt als Entwicklungsmeilenstein für den Neokortex. Die Dicke der SVZ variiert zwischen den einzelnen Säugetierspezies beträchtlich und zeigt unterschiedliche Grade der Differenzierung auf (SMART et al. 2002, CHEUNG et al. 2010, FIETZ et al. 2010, REILLO et al. 2011, GARCIA-MORENO et al. 2012, KELAVA et al. 2012, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012, MARTINEZ-CERDENO et al. 2017, SAUERLAND et al. 2018).

Insbesondere die SVZ der Primaten ist in der Hochphase der Neurogenese deutlich dicker als die der Nicht-Primaten (SMART et al. 2002, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012). Neben der Dickenzunahme ist die SVZ bei einigen Tierarten, bspw. Frettchen und Primaten, in zwei morphologisch unterschiedliche Keimzonen gegliedert: eine innere SVZ (iSVZ), die sehr der Maus-SVZ ähnelt und eine äußere SVZ (oSVZ), die bei der Maus fehlt bzw. bei der Ratte sehr dünn ausgebildet ist (SMART et al. 2002, FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, GARCIA-MORENO et al. 2012, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012). Die Zunahme und Umgestaltung der SVZ geht mit einer signifikanten Änderung der BP-Subtyp-Zusammensetzung einher. Die bRGs sind zwar im sich entwickelnden Neokortex unterschiedlicher Säugetierspezies vorhanden (FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, WANG et al. 2011, MARTINEZ-CERDENO et al. 2012, MARTINEZ-CERDENO et al. 2017, SAUERLAND et al. 2018), jedoch ändert sich ihre relative Anzahl in Abhängigkeit von der kortikalen Expansion. Die SVZ der Maus beinhaltet überwiegend bIPs und einen

relativ geringen Anteil bRGs (ca. 10%). Der Anteil an bRGs in der SVZ von Schaf, Frettchen, Weißbüschelaffe und Wallaby beträgt ca. 30%. Den höchsten Anteil an bRGs (>50%) enthält die SVZ der gyrenzephalen Primaten. Die bRGs stellen dort den vorherrschenden BP-Subtyp (FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, REILLO et al. 2011, KELAVA et al. 2012, BETIZEAU et al. 2013, PILZ et al. 2013, FLORIO und HUTTNER 2014, SAUERLAND et al. 2018).

Der überwiegende Teil an BPs in lissenzephalen Nagetieren, d.h. die bIPs, durchläuft eine symmetrisch-neurogene Zellteilung und zeigt somit nur begrenztes proliferatives Potential. Der Großteil der BPs in gyrenzephalen Primaten, insbesondere die bRGs, ist in der Lage sich wiederholend zu teilen und besitzt somit ein höheres Maß an proliferativem Potential (HAUBENSAK et al. 2004, MIYATA et al. 2004, NOCTOR et al. 2004, ATTARDO et al. 2008, HANSEN et al. 2010, BETIZEAU et al. 2013). Diese Zunahme an proliferierenden BPs hat eine radiale Erweiterung der SVZ zur Folge, insbesondere der oSVZ, was zu einem höheren neuronalen Output in gyrenzephalen Primaten führt (FIETZ et al. 2010, HANSEN et al. 2010, BETIZEAU et al. 2013, GERTZ et al. 2014).

Detaillierte Daten zur Präsenz, Abundanz und Verteilung von bRGs und anderen NPCs im sich entwickelnden Gehirn des *Tupaia* sind bisher nicht verfügbar. Es war somit das Ziel dieser Untersuchung, die Keimzonen des *Tupaia belangeri* und die darin enthaltenen NPCs zu charakterisieren und zu quantifizieren und mit bereits erhobenen Daten zur kortikalen Entwicklung von gyrenzephalen Primaten und lissenzephalen Nagetieren zu vergleichen.

2.3 Entwicklungsbedingte Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex

2.3.1 Entwicklungsbedingte, nicht-infektiöse Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex

Fehlbildungen und Erkrankungen, die während der Entwicklung des Neokortex, d.h. in der pränatalen und frühen postnatalen Phase auftreten, können zu schweren und nicht reversiblen Schädigungen führen und gehen mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einher (KAINDL et al. 2020). Die Fehlbildungen der kortikalen Hirnentwicklung können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden (BARKOVICH et al. 1996 und 2005, REISS-ZIMMERMANN et al. 2010): Fehlbildungen als Folge einer abnormalen Neurogenese (A), Fehlbildungen als Folge einer abnormalen neuronalen Migration (B) und Fehlbildungen als Folge einer abnormalen kortikalen Organisation (C). Im Jahr 2012 wurde aufgrund neuer Erkenntnisse (weitere Syndrome und Genmutationen) eine neue Bezeichnung für die Gruppe „C“ eingeführt: Fehlbildungen als Folge einer abnormalen postmigrationsbedingten Entwicklung (BARKOVICH et

al. 2012).

Zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen des ZNS beim Menschen zählt die sogenannte Spina bifida (MOLDENHAUER et al. 2019). Eine bedeutende Ursache für die Entstehung einer Spina bifida ist die Mangelversorgung des ungeborenen Babys mit Folsäure (MÜHL-BENNINGHAUS 2018). Die Fehlbildung tritt zudem familiär gehäuft auf, sodass vermutlich genetische Faktoren in der Krankheitsentstehung zusätzlich eine Rolle spielen (CREMER 2009, ALRUWAILI und M DAS 2021). Darüberhinaus können auch Umwelteinflüsse wie bspw. Strahlung, Pestizide und Teratogene mitverantwortlich für die Entstehung der Spina bifida sein (ALRUWAILI und M DAS 2021).

Die Fehlbildung entsteht durch einen unvollständigen Verschluss des Neuralrohrs aus der Neuralplatte (primäre Neurulation). Sie besitzt beim Menschen eine geschätzte weltweite Prävalenz von etwa 18,6 zu 10.000 Lebendgeburten (BLENCOWE et al. 2018). Die Auswirkungen der Erkrankung hängen vom Schweregrad der Läsionen ab. Es können keinerlei Beeinträchtigungen bis hin zu schweren körperlichen Beeinträchtigungen auftreten. Am häufigsten ist der Lumbal- und Sakralbereich mit bis zu über 80 % betroffen. Es können 2 Formen der Spina bifida unterschieden werden (MÜHL-BENNINGHAUS 2018, ALRUWAILI und M DAS 2021):

1. Spina bifida occulta (geschlossene Form).

Bei der geschlossenen Form ist der Wirbelbogen gespalten. Die Rückenmarkshäute und das Rückenmark sind intakt und liegen an ihrer anatomischen Position. Diese Form ist relativ häufig und ist oftmals ein Zufallsbefund.

2. Spina bifida aperta (offene Form).

Bei der offenen Form treten Teile der Rückenmarkshäute (Meningen) isoliert (Meningozele) oder gemeinsam mit dem Rückenmark (Myelomeningozele) aus dem gespaltenen Wirbelbogen nach außen aus.

Beim Menschen geht die Myelomeningozele oftmals mit starken körperlichen Einschränkungen einher. Es treten fast immer neurologische Beeinträchtigungen auf. Querschnittslähmungen ab Höhe des „offenen Rückens“ mit Muskelschwund und Empfindungsstörungen in den Beinen, Hüftdysplasien, Fußdeformitäten als auch neurogene Störungen von Blase und Darm mit Harn- und Kotverhaltung und Inkontinenz können die Folgen sein. Störungen des Liquorkreislaufes mit einer Ausbildung eines Hydrocephalus occlusus können ebenfalls auftreten (CREMER 2009, MÜHL-BENNINGHAUS 2018).

Des Weiteren können bei der offenen Form auch Anomalien des Neokortex auftreten. Veränderungen des Volumens, der Oberfläche und der Dicke des Neokortex sind möglich (FLETCHER et al. 2005, TREBLE et al. 2013, JURANEK et al. 2008, JURANEK et al. 2010). Durch neuere Untersuchungen wurde gezeigt, dass diesen Veränderungen unter anderem eine Störung der pränatalen neokortikalen Neurogenese zugrunde liegt (FIETZ et al. 2020).

Zur Gruppe A der Malformationen der kortikalen Hirnentwicklung gehören zudem die Mikro- und Megalenzephalie. Die pränatal erworbene Mikrozephalie wird, wenn sie isoliert, d.h. nicht mit anderen strukturellen Veränderungen zusammen auftritt, in der Regel autosomal-rezessiv vererbt. Sie wird auch als autosomal-rezessive primäre Mikrozephalie bezeichnet (PIROZZI et al. 2018). Es handelt sich dabei um eine sehr seltene, genetisch heterogene Entwicklungsstörung des Gehirns, die durch einen um mindestens 2 Standardabweichungen verminderten Kopfumfang zum Zeitpunkt der Geburt bei intakter Gehirn-Architektur sowie einem unterschiedlich schwer ausgeprägten intellektuellem Defizit gekennzeichnet ist (ORPHANET(b)). Die Megalenzephalie ist eine seltene Fehlbildung des ZNS, die sich durch ein um mindestens 2 Standardabweichungen vergrößertes Gehirn bei physiologischem Hirndruck auszeichnet. Sie kann mit einer mentalen Retardierung einhergehen (PIROZZI et al. 2018, ORPHANET(a)). Für die isoliert auftretende, primäre Megalenzephalie, die pränatal erworben wird, wird ein autosomal-dominanter Erbgang angenommen. Daneben existiert eine autosomal-rezessiv vererbte Form (MCKUSICK 1986a, MCKUSICK 1986b).

Zur Gruppe B der Malformationen der kortikalen Hirnentwicklung zählt die klassische (Typ1) Lissenzephalie (BERSHTEYN et al. 2017, HEHR et al. 2007). Bei dieser Erkrankung kommt es aufgrund von unterschiedlichen Gendefekten zu einem hochgradig verdickten, drei- bis vierschichtigen Kortex und einer unterschiedlich verminderten Ausbildung der Gyri und Sulci im sich entwickelnden Neokortex aufgrund mangelnder und oder fehlgesteuerter Migration der Neurone (FRY et al. 2014, UYANIK und HEHR 2009). Die Ausprägung reicht von Agyrie bis hin zu relativ normaler Ausbildung von Gyri und Sulci (REISS-ZIMMERMANN et al. 2010).

Schwere Einschränkungen (Schluck- und Essstörungen, Krampfanfälle, Psychomotorische Einschränkungen, Muskeldystrophien- Typ 2 und unstillbare Durchfälle) mit vollständiger Pflegebedürftigkeit können beim Menschen in Folge auftreten. In Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung sind auch mildere Symptome möglich. Eine geringere mentale Retardierung und/oder therapierbare epileptiforme Anfälle können ebenfalls resultieren (DOBYNS et al. 1996, UYANIK und HEHR 2009). Die Prävalenz für alle Formen der Lissenzephalie Typ 1 wird weltweit auf 1:100.000 Geburten geschätzt (HEHR et al. 2007).

Die Lissenzephalie Typ 2 (Pflasterstein-Komplex oder Cobblestone) kann zusätzlich oder statt der Typ 1-Anomalien auch Kortexverdickungen und ödematöse oder zystische Veränderungen des Marklagers aufweisen. Der Name „Kopfsteinpflaster“ bezieht sich hier auf das

in Haufen oder Knoten auftretende Kortextgewebe, das durch eine Migration von Nervenzellen über die piaie Oberfläche des Gehirns in die Leptomeningen entsteht und sich durch eine fehlerhafte Organisation der einzelnen kortikalen Schichten auszeichnet. Nach Barkovich gehört auch der Typ 2 der Lissenzephalie in die Gruppe B der Malformationen der kortikalen Hirnentwicklung (REISS-ZIMMERMANN et al. 2010, BARKOVICH et al. 1996). Die humanen Patienten zeigen zusätzlich häufig Störungen der Augen und eine kongenitale Muskeldystrophie (Fukuyama-Muskeldystrophie, Walker-Warburg-Syndrom) (REISS-ZIMMERMANN et al. 2010, UYANIK und HEHR 2009). Eine spezifische Prävalenz für die Lissenzephalie Typ 2 existiert derzeit nicht.

Zur Gruppe C der Malformationen der kortikalen Hirnentwicklung zählt unter anderem die Polymikrogyrie (PMG) (BARKOVICH et al. 2012). Die PMG ist eine Entwicklungsstörung der Hirnrinde, bei der es zu einer exzessiven Faltung in Verbindung mit einer Fehlschichtung des Kortex kommt (POGLEDIC 2018, DI DONATO 2018). Eine Vielzahl der Patienten erleiden epileptiforme Anfälle innerhalb der ersten fünf Lebensjahre. Die Ursache für die Entstehung dieser Erkrankung kann in pränatale, ischämische, infektiöse, genetische oder teratogene Ursachen gegliedert werden (POGLEDIC 2018). Neben oftmals genetischen Ursachen wird als häufigste exogene Ursache eine Zytomegalievirusinfektion beschrieben. Darüberhinaus werden auch die Toxoplasmose und eine pränatale Zikavirusinfektion als infektiöse Ursachen diskutiert (DI DONATO 2018).

2.3.2 Entwicklungsbedingte, infektiöse Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex

Zu den häufigsten Infektionen des ZNS beim Menschen zählen die Toxoplasmose und die Röteln-Erkrankung (MATTLE und MUMENTHALER 2012). Die Toxoplasmose ist eine parasitäre Erkrankung. Sie wird verursacht durch den intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii*. Er gehört zu den Protozoen, genauer zu den Apikomplexa, und vollzieht eine sexuelle und asexuelle Vermehrungsphase. Zwischenwirte sind alle Warmblüter, der Endwirt ist die Katze (bzw. alle Spezies der Familie Felidae). Nur im Endwirt findet die geschlechtliche Vermehrung statt.

Die Übertragung dieser Zoonose verläuft über 2 Hauptwege:

1. Aufnahme von rohen, erregerhaltigen Fleischwaren,
2. Aufnahme von sporulierten Oozysten aus Katzenkot.

Der Erreger ist weltweit verbreitet und die Infektionsrate nimmt mit zunehmendem Lebensalter zu (RKI 2018). Er besitzt einen Tropismus zum ZNS. Symptome einer akuten Infektion sind Glieder- und Kopfschmerzen sowie gelegentlich auch Fieber. Eine immunkompetente Person überwindet die Infektion oftmals symptomlos und bildet zeitlebens Antikörper aus.

Werdende Mütter, die sich in der Schwangerschaft erstmalig infizieren und somit keine Antikörper ausgebildet haben, können den Parasiten auf das ungeborene Kind übertragen. Schwere neurologische Schäden, als auch Beeinträchtigungen des Sehvermögens (Chorio-retinitiden) und ein Hydrocephalus können die Folge sein (RKI 2018). Bei Infektionen im ersten Schwangerschaftstrimester besteht beim Menschen eine deutlich erhöhte Abortgefahr. Die Prävalenz einer kongenitalen Infektion beträgt beim Menschen 0,1 bis 0,3 pro 1000 Geburten (KIEFFER und WALLON 2013). Das Robert Koch Institut schätzt, dass jährlich ca. 350 kongenitale Infektionen mit daraus resultierenden klinischen Symptomen bei Neugeborenen in Deutschland auftreten (WILKING et al. 2016, RKI 2016, KIEFFER und WALLON 2013).

Nach postnataler Infektion infiziert *T. gondii* während der akuten Phase vor allem teilungsfähige Gliazellen im Neokortex von Mensch und Tier. Die *T. gondii*-Infektion führt zu Beeinträchtigungen der Morphologie und Funktion, u.a. der Proliferationsaktivität, der infizierten Zellen (PARLOG et al. 2015, BRUNET et al. 2008, WANG und GAO 2016, KIM et al. 2016). Der Zelltropismus von *T. gondii* im pränatalen Gehirn ist derzeit unbekannt.

Die Röteln-Erkrankung kann bei einer Schwangeren mit Erstinfektion eine konnatale Röteln-embryofetopathie (CRS) auslösen. Unterschiedlichste Symptomatik, wie beispielweise Katarakt, Innenohrtaubheit und/oder eine Mikrozephalie des ungeborenen Babys sind die möglichen Folgen. Die Prävalenz ist beim Menschen sehr gering. Im Jahr 2015 wurden in der gesamten europäischen WHO-Region nur sieben Kinder mit CRS geboren, der letzte gemeldete Fall in Deutschland stammt aus dem Jahr 2013 (RKI 2020).

Seit 2015 steht zudem die Zika-Virus-Infektion vermehrt im Fokus der medizinischen Forschung. Das Virus wird hauptsächlich von Mücken (*Aedes*) übertragen und stellt somit eine ernstzunehmende Zoonose dar. Weitere Übertragungswege sind sexuell, intrauterin, perinatal, durch Speichel und Bluttransfusion. Diese Virusinfektion kommt in über 80 Ländern der Welt, vorrangig in den Tropen und Subtropen vor (RKI 2019). Derzeit werden schätzungsweise nur ca. 18- 35% der Erkrankten auch symptomatisch (BARBI et al. 2018). Dieser durchläuft dann über mehrere Tage eine Virämie mit grippeähnlichen Symptomen. Zudem wird derzeit geschätzt, dass in etwa bei 1,2% aller adulten Zikavirusinfektionen beim Menschen das Guillain-Barré-Syndrom ausgelöst wird (BARBI et al. 2018). Bei einer schwangeren Frau können schwere Missbildungen des Fetus in allen Trimestern der Schwangerschaft in Folge der Infektion entstehen. Dabei kommt es zu einer massiven Störung der Neurogenese und dadurch zu einer deutlich verzögerten Gyrierung als auch zu einer Mikrozephalie mit schweren Beeinträchtigungen des Kindes. Eine repräsentative Prävalenz in Bezug auf eine kongenitale Infektion existiert derzeit nicht (GARCEZ et al. 2016, RASMUSSEN et al. 2016, PETERSEN et al. 2016). Jedoch veröffentlichte das Robert Koch-Institut gemeldete Fallzahlen:

2016 wurden 222 und 2017 noch 44 Infektionen in Deutschland gemeldet (DGGG 2018). Eine Impfung existiert derzeit noch nicht (RKI 2019).

2.4 Tiermodelle für kongenitale Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex

In der translationalen Forschung sind Tiermodelle essentiell, die in Bezug auf Phylogenese, Morphologie und Physiologie viele Gemeinsamkeiten mit dem Menschen aufweisen. Speziell in der neuronalen Stammzellforschung werden bislang häufig Nagetiere als Versuchsmodelle genutzt. Diese besitzen jedoch nicht die gleiche bzw. ähnliche Stammzellausstattung im Neokortex wie die Primaten (FIETZ et al. 2010, FIETZ et al. 2011, FLORIO et al. 2014). Primaten selbst stellen zwar einen nahen Verwandten des Menschen dar und sind daher prinzipiell als Versuchstier für den Menschen gut geeignet, jedoch wird ihr Einsatz in der Forschung aufgrund von ethischen Bedenken, hohen Unterhaltungskosten und einer verhältnismäßig niedrigen Reproduktivität kritisch betrachtet (XIAO et al. 2017). Im Bereich der Neurogeneseforschung wird ein alternatives Modelltier, das eine ähnliche oder gleiche qualitative und quantitative Ausstattung an neokortikalen NPCs besitzt, dringend benötigt. Enge Verwandte der Affen sind einerseits die Dermoptera (Riesengleiter) und andererseits die Scandentia (Spitzhörnchen).

2.5 Das *Tupaia*

2.5.1 Allgemeines

Spitzhörnchen sehen ihrem äußeren Erscheinungsbild zufolge aus wie gewöhnliche Hörnchen und sind ca. so groß wie Ratten. Der Körper ist schlank und besitzt einen langen, buschigen Schwanz und eine lange Schnauze mit kurzen Tasthaaren (KIRKWOOD et al. 2010, WESTHEIDE und RIEGER 2010). Das Wort „Tupaia“ steht im malaiischen für Baum-, Spitz-, oder Eichhörnchen (GRZIMEK et al. 1988). Sie sind Waldbewohner mit hervorragenden Klettereigenschaften und gelangen somit mit Leichtigkeit auf Bäume. Sie überwinden größere Distanzen durch Sprünge und ruhen sich sowohl in Baumhöhlen als auch am Boden aus (LANGER 2017, WESTHEIDE und RIEGER 2010). Zur Nahrungssuche halten sie sich überwiegend am Boden auf. Spitzhörnchen sind omnivor und ernähren sich aus einer Mischung von Insekten und Früchten (WESTHEIDE und RIEGER 2010, WILSON und MITTERMEIER 2018).

Der Lebensraum des *Tupaia belangeri* (Nördliches Spitzhörnchen) ist der Regenwald Südostasiens. Das Habitat erstreckt sich von Westindien bis zu den Philippinen und von Südchina

bis Sumatra (XIAO et al. 2017, WESTHEIDE und RIEGER 2010). Die Tiere haben ein Gewicht von 120 bis 150 g. Männchen sind in der Regel schwerer als Weibchen (XIAO et al. 2017). Die Lebenserwartung in freier Wildbahn ist unbekannt. In Gefangenschaft kann das *Tupaia belangeri* ein Alter von ca. 6-10 Jahren erreichen (KIRKWOOD et al. 2010, GRZIMEK et al. 1988).

2.5.2 Abstammung und Systematik

Das *Tupaia belangeri* gehört zu der Ordnung Scandentia (Tupaiiformes). Aktuell werden sie als eigene Ordnung geführt. Es gibt vier rezente Gattungen, die sich auf zwei Familien aufteilen. Die Familie Tupaiidae besteht aus drei Gattungen und die Familie Ptilocercidae aus einer Gattung (HAN et al. 2000). Die Gattungen der Tupaiidae sind die *Anathana* mit einem Vertreter, die Gattung *Dendrogale* mit zwei Vertretern und die Gattung Eigentliche Spitzhörnchen (*Tupaja*; *Tupaia*) mit 19 Vertretern, hierzu zählt auch das *Tupaia everetti*, das bis vor einigen Jahren noch als eigene Gattung geführt wurde (HAN et al. 2000).

Durch genetische Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Spitzhörnchen eine engere genetische Verwandtschaft zu den Affen als zu den Nagetieren besitzen (CAMPBELL et al. 2003, FAN et al. 2013, LIN et al. 2014). Zudem wurde postuliert, dass eine Klade (systematische biologische Einheit, die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeht und alle seine Nachfahren enthält) aus den Euarchonta gebildet werden kann, die die Ordnungen der Spitzhörnchen (Scandentia), der Riesengleiter (Dermoptera) und der Primaten umfasst (CAMPBELL et al. 2003). Die Euarchonta entstanden vor ca. 88 Millionen Jahren. Bereits vor ca. 86,2 Millionen Jahren trennten sich die Scandentia von den Primatomorpha (bestehend aus Dermoptera und Primaten) (JANECKA et al. 2007). Zur Vollständigkeit wird hier auch noch das Taxon der Sundatheria erwähnt, das aus den Ordnungen Dermoptera und Scandentia besteht. Dieses existiert aufgrund von morphologischen Gemeinsamkeiten zwischen beiden Ordnungen, sodass ein sogenanntes Schwesterngruppenverhältnis entsteht und dieses Taxon begründet (WESTHEIDE und RIEGER 2010).

2.5.3 Anatomische Grundlagen und Leistung der Organe

Der Rumpf des *Tupaia belangeri* besteht aus 7 Halswirbeln, 12-13 rippentragenden Wirbeln, 6-7 rippenfreien Lendenwirbeln, drei Sakralwirbeln und ca. 24-25 Kaudalwirbeln (HOFER et al. 1956, WESTHEIDE und RIEGER 2010). An der Vorder- und Hinterextremität gibt es jeweils 5 Zehen pro Hand bzw. pro Fuß. Der Daumen ist abspreizbar und hilft somit beim Klettern und Greifen (GRZIMEK et al. 1988, WESTHEIDE und RIEGER 2010).

Das Fell des *Tupaia belangeri* ist graugrün bis rostbraun und besteht aus kurzen Deckhaaren und kurzen weichen Wollhaaren. Das Fell an der Bauchseite ist meist heller als am Rücken.

Zudem besitzen die Tiere einen hellen Schulterstreifen. Die Ohren sind klein und meist mit Haaren bedeckt. Charakteristisch sind Drüsenfelder, die unabhängig vom Geschlecht ausgebildet sind. Das überwiegend fettige Sekret hat vielfältige Aufgaben. Dazu zählen bspw. die Fellpflege, die Kommunikation der Tiere untereinander als auch die Abgrenzung des Reviers. Die Drüsen liegen sternal und abdominal und werden durch Reiben des Körpers an Gegenständen und der Umgebung entleert (WESTHEIDE und RIEGER 2010, WILSON et al. 2005, KIRKWOOD et al. 2010).

Die charakteristische lange Schnauze wird durch das Os nasale gebildet. Die Tiere sind Makrosmatiker und besitzen zudem ein gut ausgebildetes Hör- als auch Sehvermögen. Die Retina besteht überwiegend aus Zapfen. Die Tiere können deutlich Farben unterscheiden (WESTHEIDE und RIEGER 2010).

Die Zahnformel lautet: I2/3, C1/1, P3/3, M3/3 mit insgesamt 38 Zähnen (GRZIMEK et al. 1988, HOFER et al. 1956). Die Tiere besitzen einen sogenannten Zahnkamm, der durch die schmalen, stiftartigen verlängerten Incisivi im Unterkiefer gebildet wird. Dieser dient als Werkzeug zum Abkratzen von Harz und Pflanzensaft. In der Maulhöhle liegt unter der eigentlichen Zunge noch eine weitere, sehr dünne unbemuskelte Unterzunge (Sublingua) mit gezackter Spitze, die der Reinigung des Zahnkamms dient (WESTHEIDE und RIEGER 2010). Alle Spitzhörnchen besitzen einen Blinddarm, welcher der bakteriellen Zersetzung von pflanzlicher Nahrung dient (LANGER 2017) dient. Der Uterus der weiblichen Tiere ist zweihörnig.

Das Gehirn des *Tupaia* ist lissenzephal (WESTHEIDE und RIEGER 2010). Spitzhörnchen besitzen ein hohes Hirn- zu Körpermasseverhältnis als auch neuroanatomische Charakteristika, die denen von Primaten sehr ähnlich sind. Insbesondere weisen die Zytoarchitektur und Organisation der somatosensorischen Hirnregion als auch der Seh- und Motorkortex eine größere Ähnlichkeit zu den Primaten als zu den Nagetieren auf. Die Amygdala und der Hippokampus sind deutlich größer und ermöglichen somit eine bessere Gedächtnisleistung im Vergleich zu den Nagetieren (SUR et al. 1980, ELSTON et al. 2005, REMPLE et al. 2006, REMPLE et al. 2007, WONG and KAAS 2009, VEIT et al. 2011, XIAO et al. 2017). Zudem ist der visuelle Thalamus relativ gut entwickelt und die Verzweigung des primären visuellen Kortex ähnelt mehr den Primaten als den Nagetieren (XIAO et al. 2017).

2.5.4 Reproduktion, Konzeption und Schwangerschaft

Das *Tupaia* lebt meist monogam, seltener auch einzeln in Revieren, die durch die Männchen gegen andere Artgenossen verteidigt werden. Die Tiere pflanzen sich ganzjährig fort und haben einen Östrus postpartum mit der Dauer von 8-12 Tagen (WILSON und MITTERMEIER 2018). Unmittelbar nach der Geburt der Jungtiere findet zeitnah eine erneute, durch Kopula-

tion induzierte, Ovulation statt. Sie gebären 1-3 Jungtiere, besitzen einen Fortpflanzungszyklus von 6 Wochen und sind bereits im Alter von 4-6 Monaten fruchtbar (XIAO et al. 2017, WESTHEIDE und RIEGER 2010).

Nach einer Tragezeit von - im Mittel - 43,7 Tagen (KUHN und SCHWAIGER 1973) werden die Jungen an einem separaten Nist- und Wurfplatz geboren. Die Jungtiere sind Nesthocker. Zum Zeitpunkt der Geburt sind sie nackt, besitzen geschlossene Augenlider und Gehörgänge. Das Muttertier säugt die Jungen ca. alle 2 Tage und betreibt keine aktive Brutpflege. Die Männchen haben während der Entwicklungszeit keinen Kontakt zu den Jungtieren. Mit ca. 3 bis 6 Monaten sind die Jungtiere ausgewachsen und geschlechtsreif und werden aus dem Revier vertrieben (WESTHEIDE und RIEGER 2010).

2.5.5 Verwendung des *Tupaia belangeri* in der translationalen Medizin und Forschung

In der Forschung werden *Tupaia*s für Stressuntersuchungen und deren Wirkung auf das Gehirn verwendet (FUCHS et al. 2001, LUCASSEN et al. 2001). Außerdem werden Tiere dieser Gattung für Akustikversuche und zur Lautanalyse verwendet (KONERDING et al. 2011, SCHEHKA et al. 2012). Untersuchungen zur viralen (Hepatitis-C Virus) und bakteriellen (*Staphylococcus aureus*) Infektionen, Krebs (Leber-, Lungen- und Brustkrebs), metabolischen Erkrankungen (Diabetes mellitus, hepatische Lipidose), immunassoziierten Erkrankungen, Alzheimer, Demenz und Depression werden am *Tupaia* durchgeführt (BINZ et al. 1990, FUCHS und FLÜGGE 2002, CAO et al. 2003, FUCHS et al. 2004, SCHEHKA et al. 2007, SCHEHKA und ZIMMERMANN 2009, KONERDING et al. 2011, YAMASHITA et al. 2012, XIAO et al. 2017, YAO 2017). Die kürzlich erfolgte erfolgreiche Generierung von transgenen *Tupaia*s unterstreicht die Eignung als Versuchstier für bestimmte humanassoziierte Krankungsbilder (XIAO et al. 2017).

Die etablierte Verwendung von Spitzhörnchen in der Forschung als auch die enge phylogenetische Verwandtschaft zu Primaten erklärt die Auswahl dieser Tierspezies für diese Studie. Die verhältnismäßig einfachen Haltungsbedingungen (Platzbedarf, Fütterung, Luftfeuchte, Tag/Nachtzyklus) dieser Tierart in Verbindung mit einer relativ hohen Reproduktivität mit 1 bis 3 Jungtieren pro Wurf, einem Fortpflanzungszyklus von ca. sechs Wochen und einer mittleren Lebenserwartung von 6 bis 10 Jahren unterstreicht die Eignung des Tieres als alternatives Versuchstier für die biomedizinische Forschung von Humanerkrankungen (XIAO et al. 2017, KIRKWOOD et al. 2010).

3 Publikation

3.1 Eigenanteilangabe zur Publikation:

Das Projekt wurde am Veterinär-Anatomischen Institut unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Dr. Simone Fietz durchgeführt.

Ich plante und konzipierte mit Hilfe von Frau Prof. Dr. Dr. Fietz die Experimente zu dieser Untersuchung und führte diese selbständig durch. Das Material dazu gewann ich allein.

Die Aufbereitung des Gewebes und die Herstellung der immunhistochemischen Färbungen machte ich überwiegend selbständig, zusätzlich wurde ich unterstützt durch Frau Gabriele Lindner, Kevin Richter und Hannah Bender. Die Immunfluoreszenzbilder wurden am Leica SP8 Konfokalmikroskop von Hannah Bender und Christine Sauerland erhoben.

Das Sammeln der Daten mithilfe von PC-Software (siehe Materials and Methods in der Publikation) machte ich ausschließlich selbst (Teildaten erhielt ich von Herrn Prof. Dr. Knabe zu einer Scheitel- Steißlängen-Wachstumskurve) nach Rücksprache mit Frau Prof. Dr. Dr. Fietz.

Die erhobenen Daten analysierte ich selbstständig und diskutierte das Ergebnis mit Frau Prof. Dr. Dr. Fietz (und Herrn Prof. Dr. Knabe).

Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Werte und deren Berechnung erhielt ich durch Holger Kirsten (IMISE, Universität Leipzig) und Frau Prof. Dr. Dr. Fietz.

Die Literatur habe ich eigenständig recherchiert. Das Manuskript für die Publikation schrieb ich selbstständig unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Dr. Fietz. Es wurde in Zusammenarbeit mit den Koautoren fertig gestellt.

3.2 Publikation mit dem Titel „**Neural Progenitors in the Developing Neocortex of the Northern Tree Shrew (*Tupaia belangeri*) Show a Closer Relationship to Gyrencephalic Primates Than to Lisencephalic Rodents**“

Siehe nachfolgende Seiten.



Neural Progenitors in the Developing Neocortex of the Northern Tree Shrew (*Tupaia belangeri*) Show a Closer Relationship to Gyrencephalic Primates Than to Lissencephalic Rodents

Sebastian Römer¹, Hannah Bender¹, Wolfgang Knabe², Elke Zimmermann³, Rudolf Rübsamen⁴, Johannes Seeger¹ and Simone A. Fietz^{1*}

¹ Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, University of Leipzig, Leipzig, Germany, ² Prosektur Anatomie, Medizinische Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany, ³ Institute of Zoology, University of Veterinary Medicine Hannover, Hanover, Germany, ⁴ Institute of Biology, Faculty of Biosciences, Pharmacy and Psychology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

James A. Bourne,
Australian Regenerative Medicine
Institute, Australia

Reviewed by:

Gavin John Clowry,
Newcastle University, United Kingdom
Marta Florio,
Harvard Medical School,
United States

*Correspondence:

Simone A. Fietz
simone.fietz@vetmed.uni-leipzig.de

Received: 08 December 2017

Accepted: 03 April 2018

Published: 19 April 2018

Citation:

Römer S, Bender H, Knabe W, Zimmermann E, Rübsamen R, Seeger J and Fietz SA (2018) Neural Progenitors in the Developing Neocortex of the Northern Tree Shrew (*Tupaia belangeri*) Show a Closer Relationship to Gyrencephalic Primates Than to Lissencephalic Rodents. *Front. Neuroanat.* 12:29. doi: 10.3389/fnana.2018.00029

The neocortex is the most complex part of the mammalian brain and as such it has undergone tremendous expansion during evolution, especially in primates. The majority of neocortical neurons originate from distinct neural stem and progenitor cells (NPCs) located in the ventricular and subventricular zone (SVZ). Previous studies revealed that the SVZ thickness as well as the abundance and distribution of NPCs, especially that of basal radial glia (bRG), differ markedly between the lissencephalic rodent and gyrencephalic primate neocortex. The northern tree shrew (*Tupaia belangeri*) is a rat-sized mammal with a high brain to body mass ratio, which stands phylogenetically mid-way between rodents and primates. Our study provides – for the first time – detailed data on the presence, abundance and distribution of bRG and other distinct NPCs in the developing neocortex of the northern tree shrew (*Tupaia belangeri*). We show that the developing tree shrew neocortex is characterized by an expanded SVZ, a high abundance of Pax6+ NPCs in the SVZ, and a relatively high percentage of bRG at peak of upper-layer neurogenesis. We further demonstrate that key features of tree shrew neocortex development, e.g., the presence, abundance and distribution of distinct NPCs, are closer related to those of gyrencephalic primates than to those of ferret and lissencephalic rodents. Together, our study provides novel insight into the evolution of bRG and other distinct NPCs in the neocortex development of Euarchontoglires and introduces the tree shrew as a potential novel model organism in the area of human brain development and developmental disorders.

Keywords: neocortex development, neural progenitor, basal radial glia, tree shrew, *Tupaia belangeri*

INTRODUCTION

The neocortex is the most complex part of the mammalian brain and has undergone tremendous expansion during evolution, especially in the primate lineage. The overwhelming majority of neocortical neurons are generated during embryonic and fetal development. They mostly originate from neural stem and progenitor cells (NPCs), which are characterized by distinct cell biological features and located in the two germinal zones: ventricular (VZ) and subventricular zone (SVZ) (Götz and Huttner, 2005; Fietz and Huttner, 2011; LaMonica et al., 2012; Florio and Huttner, 2014; De Juan Romero and Borrell, 2015; Montiel et al., 2016; Namba and Huttner, 2017). The VZ, the most apical layer of the cortical wall, contains the cell bodies of the primary NPCs, the apical progenitors (APs). APs consist of neuroepithelial cells (NECs) that transform into apical radial glia (aRG) at the onset of neurogenesis (Kriegstein and Götz, 2003; Götz and Huttner, 2005) and the apical intermediate progenitors (aIPs), also known as short neural precursors (Gal et al., 2006; Stancik et al., 2010). All three subtypes have an apical domain, which consists of an apical plasma membrane, an apical cell cortex and apical adherens junctions and predominantly maintain a radially oriented process, which spans the entire neocortical wall throughout the cell cycle in NECs and aRG, and retracts from the basal lamina for mitosis in aIPs (Rakic, 1972; Aaku-Saraste et al., 1997; Chenn et al., 1998; Götz and Huttner, 2005; Gal et al., 2006; Marthiens and Ffrench-Constant, 2009). Before the onset of neurogenesis, NECs mainly undergo symmetric proliferative divisions, resulting in the lateral expansion of the VZ (Rakic, 1995). With the onset of neurogenesis, aIPs mostly undergo symmetric neurogenic divisions, while aRG start dividing asymmetrically, thereby giving rise to the secondary NPCs, the basal progenitors (BPs) that accumulate in the SVZ, basal to the VZ (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004; Stancik et al., 2010). BPs comprise of two major subtypes, the basal intermediate progenitors (bIPs) and basal radial glia (bRG), the latter also referred to as outer RG cells (Hansen et al., 2010; Wang et al., 2011), intermediate RG cells (Reillo et al., 2011) or translocating RG cells (Martinez-Cerdeno et al., 2012). Both BP subtypes lack an apical domain; however, whereas bIPs retract their processes prior to M-phase, bRG maintain at least one radially oriented process throughout the cell cycle with a subset of them reaching up to the basal lamina (Attardo et al., 2008; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Nowakowski et al., 2016). Depending on the number and orientation of processes, three different bRG morphotypes have been identified (Betizeau et al., 2013): (1) bRG with a basal process, referred to as bRG-basal-process (-P), (2) bRG with an apical process, referred to as bRG-apical-P and (3) bRG with a basal and an apical process, referred to as bRG-both-P.

Although the SVZ is regarded as the developmental milestone of a six-layered neocortex, its thickness varies considerably between species showing different degrees of neocortex expansion (Smart et al., 2002; Cheung et al., 2010; Fietz et al., 2010; Reillo et al., 2011; Garcia-Moreno et al., 2012; Kelava et al., 2012; Martinez-Cerdeno et al., 2012, 2017;

Sauerland et al., 2018). In particular, the SVZ of primates, that possess an extremely high degree of neocortex expansion, is substantially thicker at peak stages of neurogenesis when compared to non-primate species (Smart et al., 2002; Martinez-Cerdeno et al., 2012). Besides its increase in thickness, the SVZ of primates and other mammals possessing a relatively expanded neocortex such as ferret, cat, sheep and agouti is clearly subdivided into two morphologically distinct germinal zones: an inner SVZ (iSVZ), which largely resembles mouse SVZ, and an outer SVZ (oSVZ) which is absent in mouse or relatively thin in rat (Smart et al., 2002; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Garcia-Moreno et al., 2012; Martinez-Cerdeno et al., 2012). The increase and remodeling of the SVZ is accompanied by significant changes in its BP subtype composition, mainly affecting their abundance rather than their occurrence. As such, bRG have been shown to occur in the developing neocortex of species from various mammalian orders and infraorders (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Wang et al., 2011; Martinez-Cerdeno et al., 2012, 2017; Sauerland et al., 2018). However, its relative abundance varies substantially between species showing different degrees of neocortex expansion. In mice, the SVZ mostly contains bIPs and only a minor fraction of bRG (~10%), whereas its abundance increases in the SVZ of sheep, ferret, marmoset and tammar wallaby (~30%) and peak in the SVZ, especially the oSVZ, of gyrencephalic primates, in which bRG become the most abundant BP type (>50%) (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Kelava et al., 2012; Betizeau et al., 2013; Pilz et al., 2013; Florio and Huttner, 2014; Sauerland et al., 2018). Importantly, the overwhelming majority of BPs, i.e., bIPs, in lissencephalic rodents undergoes symmetric proliferative divisions and thus shows limited proliferative potential, whereas a major fraction of BPs, i.e., bRG, in gyrencephalic primates is able to undergo repeated cell division, thereby displaying high proliferative potential (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004; Attardo et al., 2008; Hansen et al., 2010; Betizeau et al., 2013). This increased abundance in proliferative BPs results in the radial expansion of the SVZ, notably the oSVZ, which ultimately promotes a higher neuronal output in gyrencephalic primates, particularly in human (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Betizeau et al., 2013; Gertz et al., 2014).

The northern tree shrew (*Tupaia belangeri*) is a rat-sized mammal with an average gestation period of 43.7 days (Kuhn and Schwaier, 1973) and a close phylogenetic relationship to primates and rodents (Supplementary Figure 1). It belongs to the separate order Scandentia which is currently grouped with primates and culogos (flying lemurs) within the grandorder Euarchonta, a sister group of Glires consisting of rodents and lagomorphs (Janecka et al., 2007; Song et al., 2012; Kumar et al., 2013). Recent genome studies suggested that the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) possesses a closer genetic relationship to primates than to rodents (Supplementary Figure 1A) (Fan et al., 2013; Lin et al., 2014). Although the tree shrew exhibits – comparable to most rodents – a lissencephalic neocortex; it has, however, a high brain to body mass ratio and shows neuroanatomical characteristics that are highly similar to those of primates including the cytoarchitecture and organization

of the somatosensory, visual and motor cortex (Supplementary Figure 1B) (Sur et al., 1980; Elston et al., 2005; Remple et al., 2006, 2007; Wong and Kaas, 2009b; Veit et al., 2011). Until now, precise data on the presence, abundance and distribution of bRG and other distinct NPCs in the developing tree shrew neocortex are lacking. It was therefore the aim of this study to characterize and quantify the germinal zones and containing NPCs in the developing neocortex of the northern tree shrew (*Tupaia belangeri*). Moreover, by comparing our results with published data from phylogenetically closely related species, this study aims to answer the question whether key features of tree shrew neocortex development, e.g., the presence, abundance and distribution of the distinct NPCs, show a closer relationship to gyrencephalic primates or to lissencephalic rodents.

MATERIALS AND METHODS

Brain Samples

Tupaia belangeri brain tissue was received from the animal facilities, Institute of Biology, Faculty of Biosciences, Pharmacy, and Psychology, University of Leipzig and Institute of Zoology, University for Veterinary Medicine Hannover. Animals were housed in 125 cm × 100 cm × 80 cm wire mesh cages. Temperature averaged 22°C, humidity was kept at approximately 55% and light/dark cycle was set to 12:12. Water and standard diet pellets (Altromin Spezialfutter GmbH and Co. KG, Lage, Germany) was given *ad libitum* supplemented by fresh fruits, mealworms and locusts. Breeding pairs were not closely related to each other and pair partners were permanently housed together. Successful mating was indicated by a change in the female receptive behavior toward the male. Successful pregnancy was determined based on body weight gain. Animals were anesthetized by an intraperitoneal overdose of pentobarbital (200 mg/kg). The age of the animals ranged from embryonic/fetal day (E) 32 ($n = 2$), 37 ($n = 2$), 45 ($n = 2$) to postnatal day (P) 1 ($n = 2$) and was determined with the help of the crown-rump-length (CRL) growth curve described below (Figure 1). All experiments were performed in accordance with German animal welfare legislation and were approved by the Landesdirektion Leipzig. Embryos/fetuses and neonates were carefully dissected, brains were fixed immediately in 4% paraformaldehyde (PFA) for at least 2 days and stored in PBS at 4°C until processing.

Determination of the *Tupaia belangeri* Growth Curve

Crown-rump-lengths were provided for 57 embryos/fetuses of *Tupaia belangeri*, all belonging to the tree shrew collection of H.-J. Kuhn (Senckenberg Museum, Frankfurt/Main, Germany; present location: Department of Prosektor Anatomie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany). Detailed descriptions of the collection including preparation procedures have been published previously (Knabe and Kuhn, 1998; Washausen et al., 2005; Knabe et al., 2007, 2008; Knabe and Washausen, 2015). In brief, pregnant females were obtained from the Battelle Institute (Frankfurt/Main, Germany) and from the German Primate Center (Göttingen,

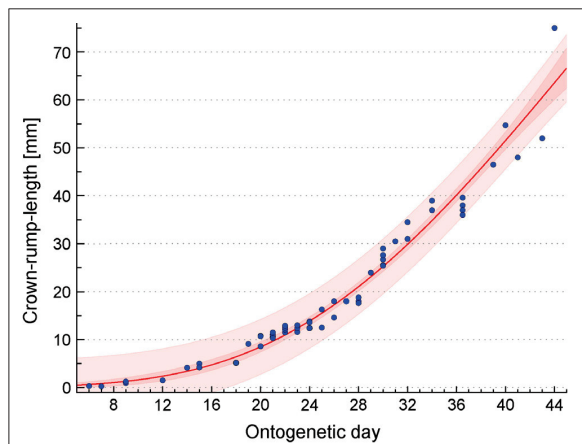


FIGURE 1 | Developmental growth curve of *Tupaia belangeri*. Plot of the relationship between ontogenetic day and crown-rump length (CRL) which has been determined in 67 *Tupaia belangeri* embryos. The CRL growth curve was estimated by the following Gompertz function: ontogenetic day = $197.918 \cdot \exp[-\exp(1.997 - 0.043 \cdot \text{CRL})]$. Dark red and light red areas represent the 95% confidence band and the 95% prediction band, respectively. For details, see Section "Materials and Methods."

Germany) (former Sonderforschungsbereich 89, Cardiology, 1976–1982). Given that in *Tupaia belangeri* ovulation is induced by copulation, the day of fertilization was considered as ontogenetic day 1. For the construction of the growth curve (Figure 1), 10 additional CRL measurements were included (Kuhn and Schwaier, 1973). Using CurveExpert Professional (Hyams Development, Chattanooga, TN, United States), the CRL growth curve was estimated by the following Gompertz function: ontogenetic day = $197.918 \cdot \exp[-\exp(1.997 - 0.043 \cdot \text{CRL})]$.

Immunocytochemistry

Brain samples were processed and subjected to an immunohistochemistry protocol as described previously (Sauerland et al., 2018). In brief, brains were incubated in 30% sucrose in PBS at room temperature, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek) and stored at -20°C . Cryosections were cut at $30 \mu\text{m}$ and kept at -20°C . Complete telencephalon was cut coronally and sections at a medium position with regard to the rostro-caudal axis were used for immunohistochemistry and heated for 1 h at $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$ in 0.01 M citrate buffer (pH 6), permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS and quenched with 0.1 M glycine. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C . The following primary antibodies were used: Tbr1 (1:200, rabbit, Millipore, AB 10554), Pax6 (1:100, rabbit, Biozol, BLD 901301), Tbr2 (1:100, sheep, R&D Systems, AF61669), PCNA (1:100, mouse, Novus Biologicals, NB500-106), phosphorylated vimentin (pVim, 1:100, mouse, Abcam, ab22651), Par3 (1:200, rabbit, Millipore, 07-330), ZO-1 (1:200, mouse, Invitrogen, 33-9100), Tau1 (1:100, mouse, Millipore, MAB3420), Brn2 (1:100, mouse, Santa Cruz, sc-393324). Donkey secondary antibodies coupled to Alexa 488, 555, and 647 (1:500, Life Technologies)

were incubated for 1 h at room temperature. All sections were counterstained with DAPI (1:500, Sigma), mounted in Mowiol (Merck Biosciences) and kept at 4°C.

Image Acquisition and Analysis

Fluorescence images were acquired with a Leica SP8 confocal laser-scanning microscope, using a 20× or 40× objective. Images were taken as 3.121 μm (20×) or 1.271 μm (40×) single optical sections and processed using Fiji and Photoshop (Adobe) software. Panels of **Figures 1–4, 6** represent single optical sections. Panels of **Figure 5** represent stacks of 3–5 optical sections. The VZ, SVZ, intermediate zone (IZ)/subplate (SP) and cortical plate (CP) were identified based on their cytoarchitecture as described previously (Sauerland et al., 2018). In brief, the VZ appeared as a densely packed cell layer that lines the lateral ventricle and whose nuclei exhibit radial morphology. The SVZ was identified as a cell layer adjacent to the VZ that exhibits a looser and sparser cell arrangement than the VZ. The IZ/SP was identified as a cell layer that exhibits a very low cell density between the SVZ and the CP. The CP was identified as densely packed cell layer adjacent to the IZ/SP. To compare data across species, iSVZ and oSVZ were identified based on previously established criteria (Smart et al., 2002; Martinez-Cerdeno et al., 2012). Specifically, the iSVZ was identified as the inner SVZ cell layer that exhibits a higher cell density and a more random cell organization than the oSVZ. The iSVZ corresponded to the dense inner band of Tbr2+ cells, which was localized to the Tau1-free zone surrounding the lateral ventricle (Supplementary Figure 2). The oSVZ was identified as the outer SVZ cell layer that exhibits a relatively loose and sparse cell arrangement and whose nuclei mostly exhibit radial morphology. The oSVZ corresponded to the diffuse outer band of Tbr2+ cells, which was localized to the Tau1-striated zone (Supplementary Figure 2).

Quantification of cells was performed with Fiji software using a Multiclass Cell Counter plug in Schindelin et al. (2012) and applying a default threshold of 100/255 on dark background. All quantifications were performed on images from the dorsolateral telencephalon. The radial thickness of the germinal zones and CP as well as the length of the ventricular surface were determined using Fiji software. Data were further processed using Prism software.

Statistical Analysis of the Relationship Between Tree Shrew, Macaque, Ferret, and Rat/Mouse Neocortex Development

Statistical analysis of the relationship between tree shrew, macaque, ferret and rat/mouse neocortex development was conducted in R. Parameters of macaque, ferret and rat/mouse neocortex development at peak of deep-layer and upper-layer neurogenesis were obtained from the literature (**Table 1**). Due to the fact that not all parameters were available from a single rodent species, data of rat and mouse neocortex development were used, i.e., neurodevelopmental parameters 1–12 were obtained from rat (Sprague Dawley rat) and neurodevelopmental parameters 13–15 were obtained from mouse (Swiss Webster mouse). Parameters

of *Tupaia belangeri* neocortex development at peak of deep-layer and upper-layer neurogenesis were analyzed in this study. Neurodevelopmental parameters 1, 2, 4–12 were obtained from a similar cortical area, predominantly representing somatosensory cortex. In case of neurodevelopmental parameters 3, 13–15, tree shrew and ferret data were obtained from a cortical area, predominantly representing somatosensory cortex, and macaque data were obtained from the visual cortex. The thicknesses of the germinal zones (neurodevelopmental parameters 3, 4) were measured using the images obtained from the literature (**Table 1**). Taken into account that different protocols were used for the quantification of cells in the developing tree shrew, macaque, ferret and rat neocortex and thus to ensure data comparability, relative values (ratios) of absolute Pax6+ NPC, Tbr2+ NPC and mitotic NPC counts between SVZ and VZ (neurodevelopmental parameters 6–12) were calculated from the absolute values and used in the analysis (**Table 2**).

For rank comparison, untransformed values of distinct parameters of cortex development (**Table 2**) were used. A rank (1–4) was assigned within each parameter to each species and the average rank over all parameters for each species was calculated. Statistical differences between the average ranks of the different species were tested with the Kruskal–Wallis-test followed by Conover's *post hoc* test using Holm correction (Pohlert, 2014). *P*-values below 0.05 were considered significant. For hierarchical clustering, principal component analysis (PCA) and Euclidean distance computation, untransformed values of distinct parameters of cortex development (**Table 2**) were transformed into *z*-scores (standard scores). Hierarchical clustering of species was performed based on Euclidean distance.

RESULTS

SVZ Is Markedly Increased at Peak of Upper-Layer Neurogenesis in the Tree Shrew Neocortex

We first examined the development of the germinal zones in the tree shrew neocortex, and analyzed E32–P1 cortical sections by immunohistochemistry for PCNA, a specific marker for proliferating cells (**Figures 2A–D** and Supplementary Figure 3). At the earliest developmental stage analyzed, the VZ appeared as a prominent and tightly packed cell layer in which PCNA+ nuclei show radial morphology (**Figure 2A**). The SVZ, in which PCNA+ nuclei are more loosely arranged, was already present at that stage but appeared relatively thin (**Figure 2A**). Quantification of the thickness of the germinal zones revealed the VZ to be the predominant germinal zone at E32 (**Figures 2E–G**). After E32, the thickness of the VZ progressively declined (**Figures 2B–E**), whereas that of the SVZ rapidly increased, especially until E37, revealing the SVZ to become the major germinal zone at later stages of tree shrew neocortex development (**Figures 2B–D,F,G**). These findings are similar to the development of the germinal zones in the neocortex of gyrencephalic primates including human and other species exhibiting an expanded neocortex such as ferret, but are

TABLE 1 | List of references of neurodevelopmental parameters used for statistical analysis.

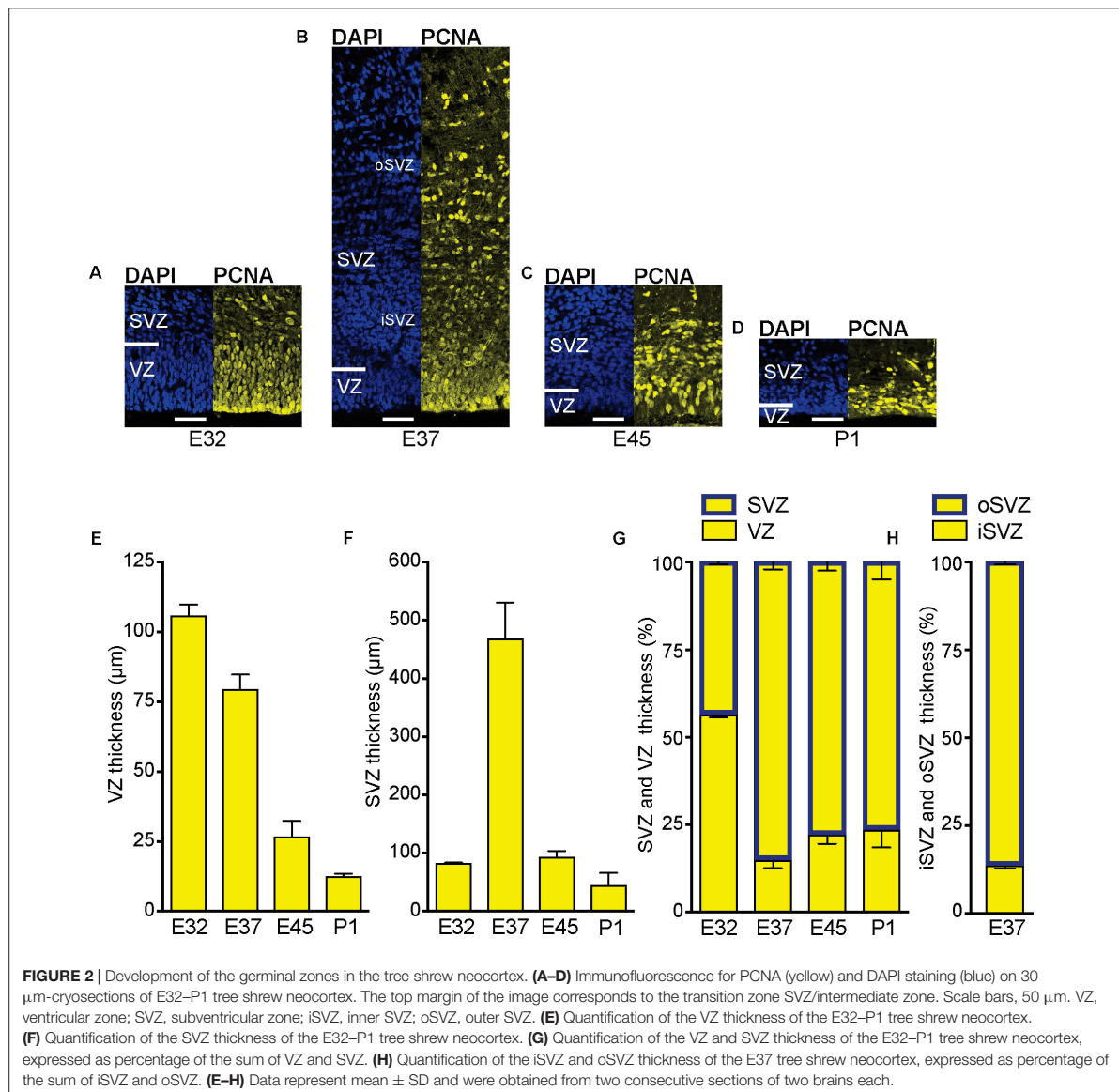
Neurodevelopmental parameter		Rat/Mouse	Ferret	Macaque
1	SVZ thickness at DL neurogenesis (μm)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
2	SVZ thickness at UL neurogenesis (μm)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
3	Ratio of SVZ/VZ thickness at DL neurogenesis	Figure 1A (Iida et al., 2006)	Figure 1O (Fietz et al., 2010)	Figure 1A (Betizeau et al., 2013)
4	Ratio of SVZ/VZ thickness at UL neurogenesis	Figure 2B (Martinez-Cerdeno et al., 2006)	Figure 1Q (Fietz et al., 2010)	Figure 2A (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
5	Ratio of oSVZ/iSVZ thickness at UL neurogenesis	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 5 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
6	Ratio of Tbr2+ NPCs in SVZ/VZ at DL neurogenesis	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
7	Ratio of Tbr2+ NPCs in SVZ/VZ at UL neurogenesis	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
8	Ratio of Tbr2+ NPCs in oSVZ/iSVZ at UL neurogenesis	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 4 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
9	Ratio of Pax6+ NPCs in SVZ/VZ at DL neurogenesis	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
10	Ratio of Pax6+ NPCs in SVZ/VZ at UL neurogenesis	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
11	Ratio of Pax6+ NPCs in oSVZ/iSVZ at UL neurogenesis	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 7 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
12	Ratio of mitoses in SVZ/VZ	Table 8 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 8 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)	Table 8 (Martinez-Cerdeno et al., 2012)
13	Relative abundance of bRG at UL neurogenesis (%)	(Wang et al., 2011)	Figure 3L (Fietz et al., 2010)	Figure 4E (Betizeau et al., 2013)
14	Relative abundance of Pax6+ bRG at UL neurogenesis (%)	(Wang et al., 2011)	Figure 3O (Fietz et al., 2010)	Figure 3J (Betizeau et al., 2013)
15	Relative abundance of Tbr2+ bRG at UL neurogenesis (%)	Figure S8H (Florio et al., 2015)	Figure 3O (Fietz et al., 2010)	Figure 3J (Betizeau et al., 2013)

Parameters of macaque, rat/mouse and ferret neocortex development were obtained from the literature as listed. VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; iSVZ, inner SVZ; oSVZ, outer SVZ; DL, deep-layer; UL, upper-layer. For details, see Section "Materials and Methods."

TABLE 2 | Untransformed values of neurodevelopmental parameters of tree shrew, macaque, rat/mouse and ferret used for statistical analysis.

Neurodevelopmental parameter		Rat/Mouse	Ferret	Tree shrew	Macaque
1	SVZ thickness at DL neurogenesis (μm)	27	97	82.1	440
2	SVZ thickness at UL neurogenesis (μm)	237	545	467.034	2590
3	Ratio of SVZ/VZ thickness at DL neurogenesis	0.333	0.8	0.778	0.667
4	Ratio of SVZ/VZ thickness at UL neurogenesis	0.875	2.333	5.901	37.5
5	Ratio of oSVZ/iSVZ thickness at UL neurogenesis	0.975	1.148	6.436	4.18
6	Ratio of Tbr2+ NPCs in SVZ/VZ at DL neurogenesis	1.563	2.464	1.772	28.667
7	Ratio of Tbr2+ NPCs in SVZ/VZ at UL neurogenesis	1.196	4.581	16.813	39.4
8	Ratio of Tbr2+ NPCs in oSVZ/iSVZ at UL neurogenesis	0.134	0.331	2.337	1.736
9	Ratio of Pax6+ NPCs in SVZ/VZ at DL neurogenesis	0.104	0.056	0.219	0.125
10	Ratio of Pax6+ NPCs in SVZ/VZ at UL neurogenesis	0.138	0.697	4.131	3.85
11	Ratio of Pax6+ NPCs in oSVZ/iSVZ at UL neurogenesis	0.026	0.817	2.955	1.982
12	Ratio of mitoses in SVZ/VZ	0.678	1.529	2.276	1.788
13	Relative abundance of bRG at UL neurogenesis (%)	8.89	42	24.664	62
14	Relative abundance of Pax6+ bRG at UL neurogenesis (%)	100	100	86	91
15	Relative abundance of Tbr2+ bRG at UL neurogenesis (%)	75	0	23	44

Neurodevelopmental parameters of tree shrew were analyzed in this study. All other parameters were obtained from the literature (Table 1). VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; iSVZ, inner SVZ; oSVZ, outer SVZ; DL, deep-layer; UL, upper-layer. For details, see section "Materials and Methods."



in contrast to that of lissencephalic rodents in which the VZ constitutes the major NPC pool throughout development (Smart et al., 2002; Kriegstein et al., 2006; Bayatti et al., 2008; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Martinez-Cerdeno et al., 2012). Interestingly, when a clear distinction between the iSVZ and oSVZ was detectable at E37, its thickness ratio was similar to that of macaque and clearly different when compared to that of rat and ferret (Figure 2H) (Martinez-Cerdeno et al., 2012).

To investigate whether the development of the germinal zones, especially the SVZ, and of the CP, show a similar time course,

we next analyzed cortical sections by immunohistochemistry for Tbr1, that is characteristically expressed by early-born deep-layer – but not by late-born upper-layer – neurons (Figures 3A–D and Supplementary Figures 4A–D) (Hevner et al., 2001; Englund et al., 2005; Molyneaux et al., 2007; Toma and Hanashima, 2015). Quantification of the CP thickness revealed that corticogenesis in the tree shrew starts before E32 and is largely completed at the time of birth, with E32 representing the stage at which mainly Tbr1+ deep-layers are being produced and E37 the stage at which largely Tbr2+ upper-layers are being produced (Figure 3E). Double-immunofluorescence for Brn2, characteristically expressed by

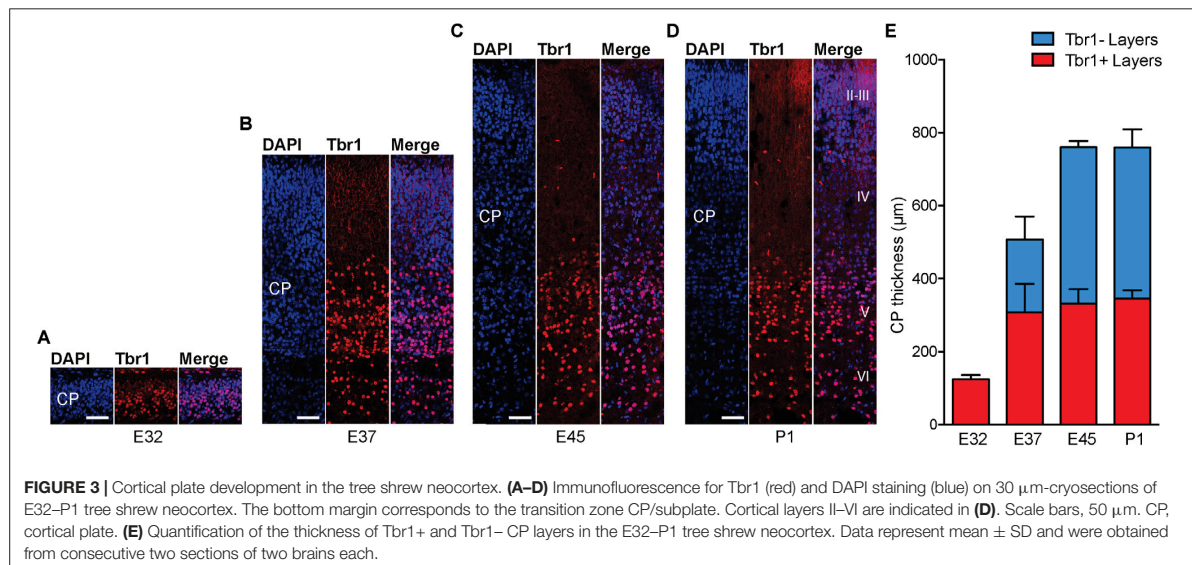


FIGURE 3 | Cortical plate development in the tree shrew neocortex. **(A–D)** Immunofluorescence for Tbr1 (red) and DAPI staining (blue) on 30 μm -cryosections of E32–P1 tree shrew neocortex. The bottom margin corresponds to the transition zone CP/subplate. Cortical layers II–VI are indicated in **(D)**. Scale bars, 50 μm . CP, cortical plate. **(E)** Quantification of the thickness of Tbr1+ and Tbr1– CP layers in the E32–P1 tree shrew neocortex. Data represent mean \pm SD and were obtained from consecutive two sections of two brains each.

upper-layer neurons, and Tbr1 revealed that a major fraction of Tbr1– cells in the E37–P1 CP belong to the population of upper-layer neurons, thus corroborating E32 to represent the peak of deep-layer and E37 the peak of upper-layer production (Supplementary Figures 4E–H) (McEvilly et al., 2002; Sugitani et al., 2002; Britanova et al., 2008; Glatzle et al., 2017). Together, this indicates that – similar to other mammalian species – the SVZ of the developing tree shrew neocortex is an important site of neurogenesis, being largest at developmental stages when upper layers of the CP are being produced (Kriegstein et al., 2006; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

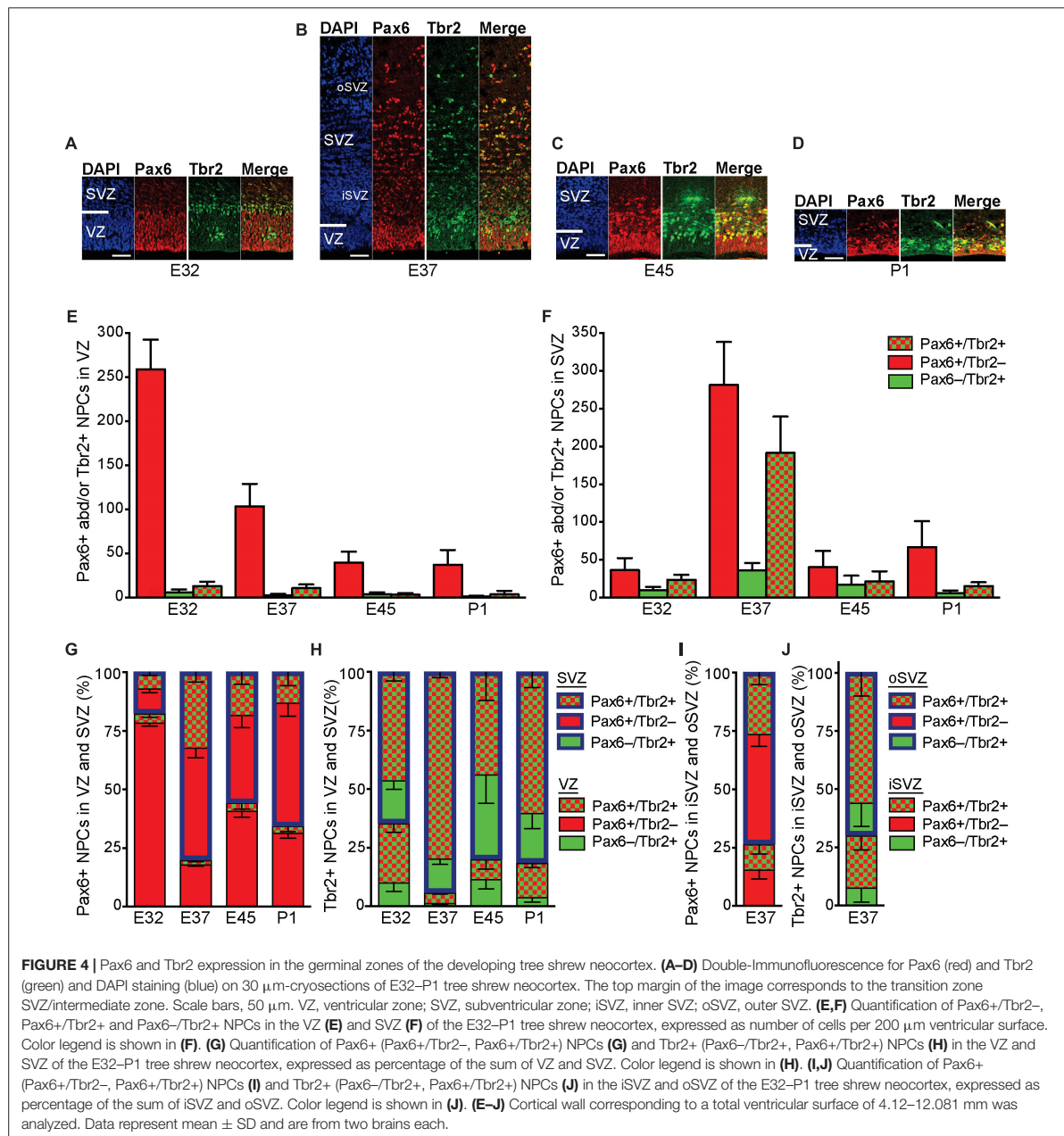
Pax6+ NPCs Are Markedly Increased at Peak of Upper-Layer Neurogenesis in the Tree Shrew Neocortex

We next focused our analysis on the characterization of the distinct NPCs in the tree shrew neocortex, and analyzed E32–P1 cortical sections by double-immunofluorescence for the expression of the NPC markers Pax6, a transcription factor characteristically expressed by APs and bRG, and Tbr2, a transcription factor characteristically expressed by bIPs (Figures 4A–D) (Englund et al., 2005; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011). At all stages analyzed, the overwhelming majority of Tbr2+ (Pax6–/Tbr2+, Pax6+/Tbr2+) NPCs is present in the tree shrew SVZ, as observed in most mammalian species (Figures 4A–F,H). At peak of upper-layer neurogenesis, i.e., E37, when iSVZ and oSVZ were clearly distinguishable from each other, a large proportion of Tbr2+ NPCs resides in the iSVZ. However, the majority of Tbr2+ NPCs is distributed in the tree shrew oSVZ, which is similar to the developing macaque neocortex but different to that of ferret and rat, in which the majority of Tbr2+ NPCs remained in the iSVZ (Figures 4B,J) (Martinez-Cerdeno et al., 2012).

In line with observations in other mammalian species (Götz et al., 1998; Englund et al., 2005; Osumi et al., 2008), NPCs of the tree shrew VZ were Pax6+ and largely Tbr2– with the number of Pax6+/Tbr2– NPCs progressively declining during development (Figures 4A–E). At E32 the number of Pax6+ (Pax6+/Tbr2–, Pax6+/Tbr2+) NPCs was relatively small in the tree shrew SVZ (Figures 4A,F), thus revealing Pax6+ NPCs to be predominantly distributed in the tree shrew VZ at early stages of neocortex development (Figure 4G). However, at later developmental stages, especially at peak of upper-layer neurogenesis, i.e., E37, the number of Pax6+ (Pax6+/Tbr2–, Pax6+/Tbr2+) NPCs markedly increases in the tree shrew SVZ (Figures 4B–D,F) shifting the distribution of Pax6+ (Pax6+/Tbr2–, Pax6+/Tbr2+) NPCs to the SVZ, especially the oSVZ (Figures 4G,I). This is in line with findings in the developing neocortex of macaque and human, but in contrast to those reported for ferret and rat, in which the majority of Pax6+ NPCs remained in the VZ until the end of neurogenesis (Bayatti et al., 2008; Fish et al., 2008; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Martinez-Cerdeno et al., 2012; Betizeau et al., 2013). Unlike the majority of Tbr2+ NPCs, which also expressed Pax6+ (Figures 4F,H), the vast majority of Pax6+ NPCs in the tree shrew SVZ were Tbr2– with the highest abundance of NPCs exclusively expressing Pax6 being present at E37 (Figures 4E,G). This raises the possibility that – similar to the developing neocortex of primates and other species exhibiting an expanded neocortex such as ferret – the tree shrew SVZ contains bRG at high abundance at peak of upper layer neurogenesis.

High Relative Abundance of bRG at Peak of Upper-Layer Neurogenesis in the Tree Shrew Neocortex

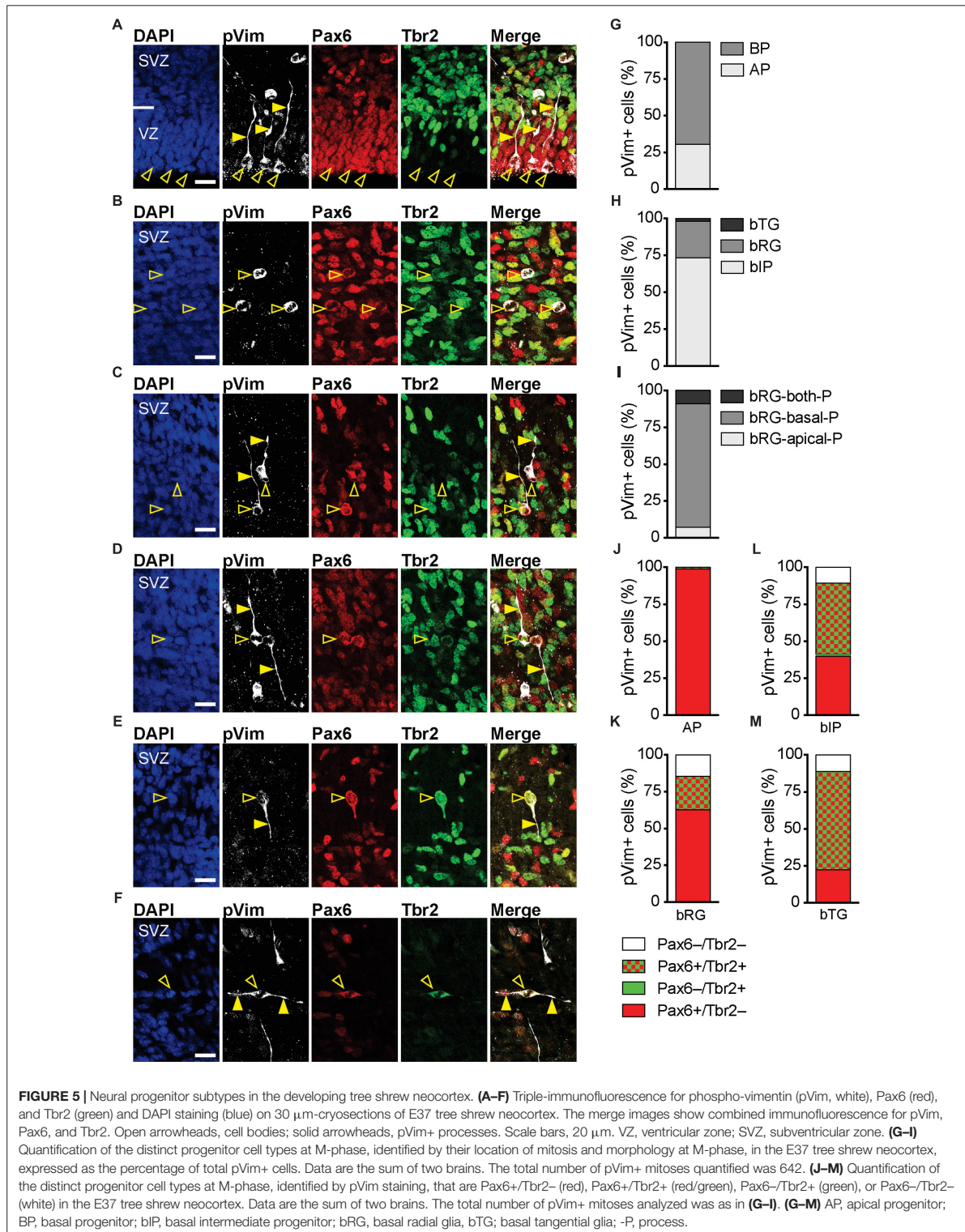
To examine whether Pax6+/Tbr2– NPCs in the tree shrew SVZ extend radially oriented processes at M-phase,



and thus represent bRG, we analyzed E37 cortical sections by immunohistochemistry for triple immunofluorescence for Pax6, Tbr2 and phosphorylated vimentin (pVim), which visualizes cellular processes of mitotic NPCs (**Figures 5A–F**). This revealed that apically dividing Pax6+ NPCs in the tree shrew VZ, i.e., APs, exhibit a radially oriented process (**Figure 5A**). Moreover, the tree shrew SVZ not only comprises mitoses that lack processes of any substantial

length, i.e., bIPs, with a large number of them being Tbr2+ (**Figures 5B, L**), but also mitoses that exhibit at least one well-developed radially oriented process, i.e., bRG, with the majority of them expressing Pax6 but not Tbr2 (**Figures 5C–E, K**).

Intriguingly, also the majority of dividing bIPs in the developing tree shrew SVZ were found to be Pax6+ (**Figure 5L**). A relatively high abundance of Pax6+ bIPs has been described



for the developing macaque SVZ, but not for that of mouse or rat (Betizeau et al., 2013).

None of the apical processes extending from the dividing bRG reached the ventricular surface (Figures 5D,E). Moreover, Par3, a protein associated with the apical cell cortex (Manabe et al., 2002; Costa et al., 2008) and ZO-1, a protein associated with apical adherens junctions (Aaku-Saraste et al., 1996), were highly concentrated at the tree shrew ventricular surface, but not in the tree shrew SVZ (Figure 6) indicating that tree shrew bRG lack an apical domain. Importantly, the relative bRG abundance in the tree shrew SVZ was much higher than that obtained in the developing SVZ of lissencephalic rodents; however, slightly smaller than that obtained in the developing SVZ of gyrencephalic primates including human and other species exhibiting an expanded neocortex including ferret (Figure 5H) (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Wang et al., 2011; Betizeau et al., 2013). Moreover, similar to the developing macaque neocortex, we observed three bRG morphologies in the tree shrew SVZ (Betizeau et al., 2013): bRG exhibiting a basal process, referred to as bRG-basal-process (-P), bRG exhibiting an apical process, referred to as bRG-apical-P and bRG exhibiting both, a basal and an apical process, referred to as bRG-both-P with the overwhelming majority of tree shrew bRG representing bRG-basal-P (Figure 5I). Interestingly, a small percentage of NPCs in the tree shrew E37 SVZ exhibited one or two tangentially oriented processes, i.e., processes that are oriented parallel to the ventricular surface at mitosis (Figures 5E,H), previously referred to as basal tangential glia (bTG) (Sauerland et al., 2018). This cell type has been shown to be present in the developing macaque SVZ (Betizeau et al., 2013) in a similar abundance; however, appears to be absent in the developing rodent SVZ.

Taken together, our findings reveal that the developing tree shrew SVZ consists of at least three main NPCs: the process-lacking bIP and the process-bearing bRG and bTG, all exhibiting similar cell biological features including location of mitosis, process retention and direction at mitosis, and molecular marker expression as has been described for gyrencephalic primates. Importantly, the tree shrew neocortex exhibits a relatively high relative abundance of bRG at peak of upper-layer neurogenesis. In conclusion, our data reveal that key features of tree shrew neocortex development, e.g., the development of the germinal zones and the distribution and abundance of distinct NPCs appear to show a closer relationship to gyrencephalic primates than to lissencephalic rodents.

Key Features of Tree Shrew Neocortex Development Are Closer Related to Those of Gyrencephalic Primates Than to Those of Lissencephalic Rodents

To quantify the strength of the relationship between neocortex development of the tree shrew and phylogenetically closely related species, we obtained distinct neurodevelopmental parameters of the tree shrew, a gyrencephalic primate (i.e.,

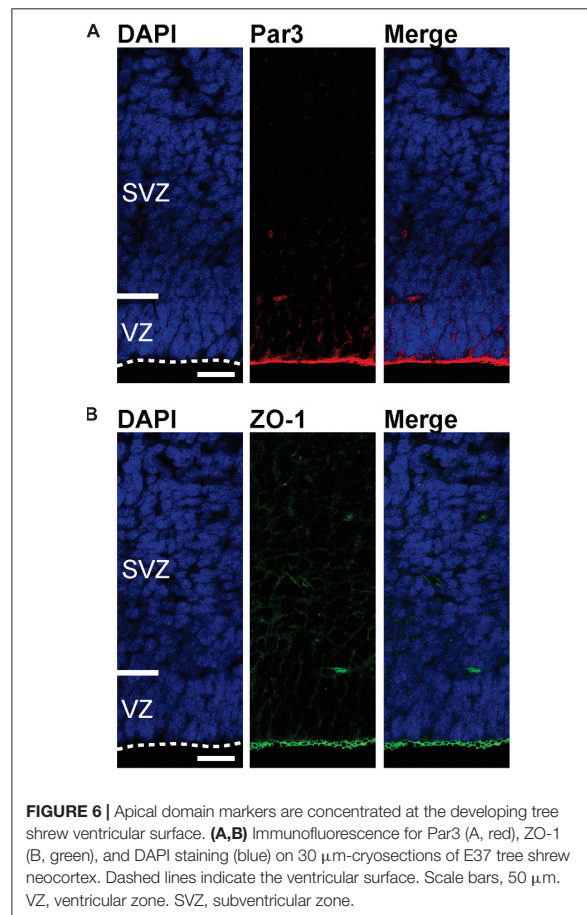
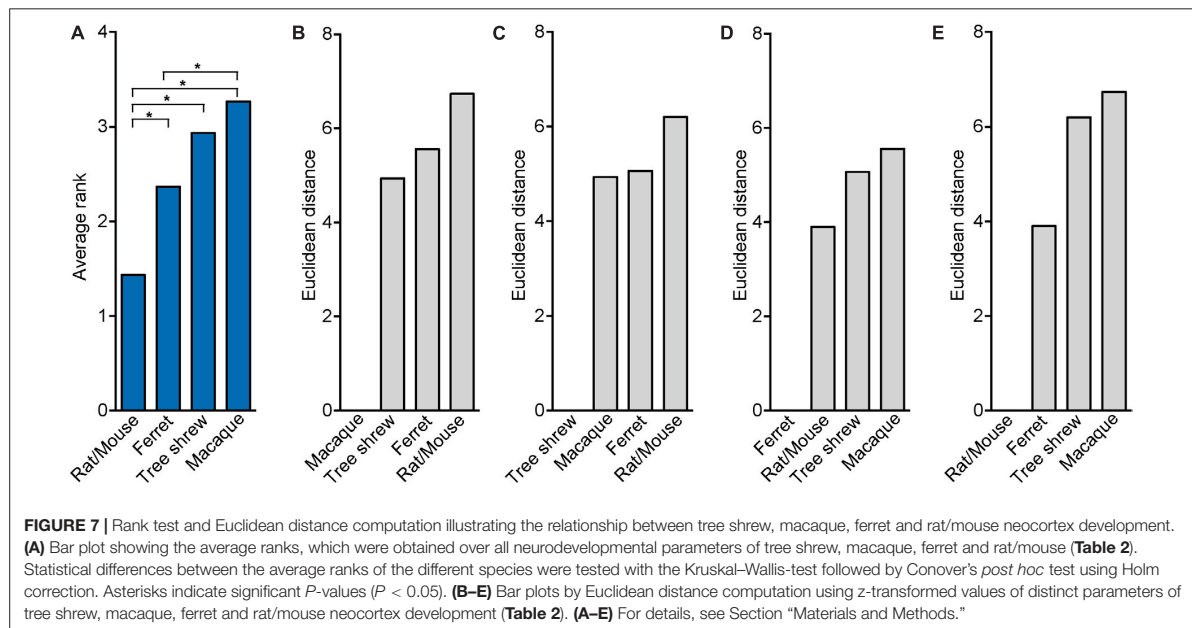


FIGURE 6 | Apical domain markers are concentrated at the developing tree shrew ventricular surface. **(A,B)** Immunofluorescence for Par3 (A, red), ZO-1 (B, green), and DAPI staining (blue) on 30 μm-cryosections of E37 tree shrew neocortex. Dashed lines indicate the ventricular surface. Scale bars, 50 μm. VZ, ventricular zone. SVZ, subventricular zone.

macaque), a lissencephalic rodent (i.e., rat, mouse) and, for comparison, a gyrencephalic carnivore (i.e., ferret) that exhibits an encephalization quotient similar to the tree shrew (Supplementary Figure 1B). We first used a rank test and compared the average ranks, which were obtained over all neurodevelopmental parameters for each species, between the four different species (Table 2 and Figure 7A). This revealed that the average rank of mouse/rat is significantly different when compared to that of all other species and most similar to that of ferret, indicating that the pattern of neurodevelopmental parameters of mouse/rat is clearly distinct from ferret, tree shrew and macaque and more similar to that of ferret than to that of tree shrew and macaque (Figure 7A). Intriguingly, the average rank of tree shrew differs significantly from that of mouse/rat, but not from that of ferret and macaque, suggesting that the pattern of tree shrew neurodevelopmental parameters is closer related to that of macaque and ferret than to that of mouse/rat (Figure 7A). As the smallest difference in the average rank has been observed between the tree shrew and the macaque, neurodevelopmental parameters of tree shrew appear to be closest related to those of macaque (Figure 7A).



In a next step, neurodevelopmental parameters of tree shrew, macaque, rat/mouse and ferret were compared by calculating pair-wise Euclidean distances between them (Figures 7B–E). This showed that the shortest Euclidean distance, and thus the highest similarity, was observed between neurodevelopmental parameters of rat/mouse and ferret (Figures 7D,E). Neurodevelopmental parameters of the tree shrew exhibited the shortest Euclidean distance, and thus the highest similarity, to those of macaque, and a shorter Euclidean distance to those of ferret than to that of rat/mouse (Figure 7C). Moreover, principal component (PC) analysis using the neurodevelopmental parameters of tree shrew, macaque, rat/mouse and ferret revealed that on the first PC, which explains about two-thirds of the total variance, the score depicting tree shrew neocortex development falls closest to that of macaque and more closer to that of ferret than to that of rat/mouse, indicating that tree shrew neocortex development is most similar to that of macaque and more similar to that of ferret than to that of rat/mouse (Figure 8A).

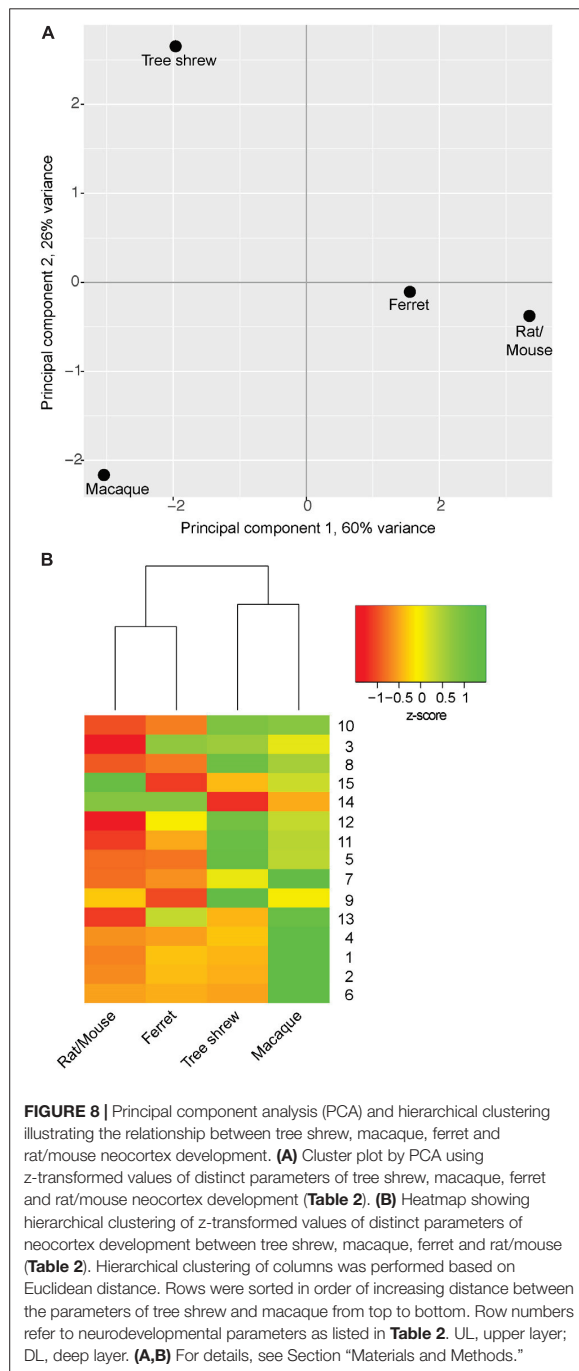
The results were corroborated when the parameters of tree shrew, macaque, rat/mouse and ferret neocortex development were clustered hierarchically with single parameters being sorted in order of increasing distance between tree shrew and macaque (Figure 8B). Again, this showed that neurodevelopmental parameters of rat/mouse and ferret are most closely related to each other and that parameters of tree shrew neocortex development are most closely related to those of macaque. Among the parameters showing the highest resemblance between tree shrew and macaque neocortex development were: the ratio of Pax6+ NPCs in SVZ/VZ and the relative abundance of Pax6+ bRG at upper-layer neurogenesis, both being clearly distinct from neocortex development of rodents (Figure 8B).

Together, the results of the statistical analysis of the relationship between the tree shrew and related species indicate that key features of tree shrew neocortex development are most closely related to those of gyrencephalic primates and more closely related to those of ferret than to those of lissencephalic rodents.

DISCUSSION

This study provides – for the first time – detailed data on the presence, abundance and distribution of the distinct NPCs in the developing neocortex of the northern tree shrew (*Tupaia belangeri*). We show that – similar to gyrencephalic primates – the developing tree shrew neocortex is characterized by an expanded SVZ, a high abundance of Pax6+ NPCs in the SVZ, and a relatively high percentage of bRG at peak of upper-layer neurogenesis. Using rank comparison, Euclidean distance computation, PCA and hierarchical clustering, this study provides first evidence that key features of tree shrew neocortex development, i.e., the development of the germinal zones and the distribution and abundance of distinct NPCs, are indeed closer related to those of gyrencephalic primates than to those of ferret and lissencephalic rodents. Hence, our results support the hypothesis that physiological, neuroanatomical and developmental characteristics of the tree shrew are very closely related to primates (Sur et al., 1980; Elston et al., 2005; Remple et al., 2007; Wong and Kaas, 2009a; Veit et al., 2011; Knabe and Washausen, 2015; Xiao et al., 2017; Yao, 2017).

Given that the tree shrew possesses a lissencephalic neocortex, our study provides further evidence for the notion that the abundant occurrence of bRG is not exclusively linked to the



development of a gyrencephalic neocortex (Garcia-Moreno et al., 2012; Kelava et al., 2012; Lewitus et al., 2013). Moreover, our statistical analysis reveals neurodevelopmental parameters of tree shrew to be closest related to gyrencephalic macaque and those

of gyrencephalic ferret to be closest related to lissencephalic rat/mouse, thus indicating that the abundance and distribution of distinct NPCs seem not to be correlated with the degree of cortical surface folding. In this regard, it would be interesting to unravel the relationship of tree shrew neocortex development to that of gyrencephalic rodents such as agouti and lissencephalic primates such as marmoset in more depth. However, as the available data of neocortex development of gyrencephalic rodents and lissencephalic primates are limited and currently not matched to neurogenic stages, we have not included them in our statistical analysis (Garcia-Moreno et al., 2012; Kelava et al., 2012). Thus, further studies including a wider range of developmental stages and neurodevelopmental parameters such as absolute values of NPC counts, cell cycle length and NPC division mode of more different mammalian species are necessary in order to gain a deeper understanding of the relationship between neocortex development of the tree shrew and phylogenetically closely related animals.

Interestingly, our data show that – although a large number of dividing bIPs in the developing tree shrew neocortex express Tbr2 – the overwhelming majority of them express Pax6. In this context it is interesting to note that the majority of bIPs in the developing macaque neocortex is able to proliferate and seems to sustain Pax6 expression whereas the majority of bIPs in the rat and mouse neocortex undergoes symmetric neurogenic division and downregulates Pax6 (Betizeau et al., 2013). It might therefore be speculated that – similar to gyrencephalic primates – the majority of bIPs in the tree shrew neocortex might belong to the proliferative subtype. Indeed, the rapid expansion of the SVZ as well as rapid increase of Pax6+ NPCs in the tree shrew SVZ between E32–37, which are accompanied by only a moderate decrease in VZ size, support the notion of self-amplifying NPCs being present in high abundance in the tree shrew SVZ. Moreover, our data indicate that the period of neurogenesis, specifically the period between peak of upper- and deep-layer neurogenesis, in the tree shrew neocortex is relatively short (approximately 5 days) being similar to that of rat (approximately 4 days) and much shorter when compared to that of ferret (approximately 12 days) (Workman et al., 2013). Hence, the high abundance of highly proliferative NPCs, i.e., proliferative bIPs and bRG, in the developing neocortex might enable the tree shrew to achieve an encephalization quotient similar to that of ferret and much higher when compared to that of rat, e.g., by producing more cells (neurons) per time unit. Further studies using long-term live cell imaging of NPCs in the developing tree shrew neocortex are needed in order to evaluate the proliferative potential and contribution of the distinct NPCs, specifically of bIPs and bRG, to tree shrew neocortex development.

The tree shrew has been receiving increasing attention as an experimental model organism for studying fundamental biological functions and disease mechanisms including viral and bacterial infections, cancer, metabolic diseases and central nervous system related functions and disorders such as psychosocial stress, learning, aging, acoustic communication, myopia and Alzheimer's disease (Binz et al., 1990; Fuchs and Flügge, 2002; Cao et al., 2003; Fuchs et al., 2004; Schehka et al., 2007; Schehka and Zimmermann, 2009;

Konerding et al., 2011; Yamashita et al., 2012; Xiao et al., 2017; Yao, 2017). Because of the close phylogenetic and genetic relationship to primates, a short life span (6–8 years) and reproductive cycle (~6 weeks), and high reproductivity with an average litter size of 2–3, the tree shrew has been proposed to replace primates in biomedical research (Norton and McBrien, 1992; Cao et al., 2003; Xiao et al., 2017; Yao, 2017). Moreover, the release of a publicly available annotated tree shrew genome sequence, the recent development of tree shrew transgenic technology and the current establishment of tree shrew inbred lines has greatly consolidated the position of the tree shrew in the field of disease animal models (Fan et al., 2013; Li et al., 2017; Yao, 2017). Until now, rodents, i.e., rat and mouse, have been most commonly used to model human brain development and to study developmental brain disorders (Florio and Huttner, 2014; Fernandez et al., 2016). However, because of the differences in neocortex development, specifically in the abundance and distribution of the distinct NPCs, between rodent and human, alternative model organisms exhibiting NPC characteristics similar to humans are urgently needed in order to better model and understand human neocortex development and developmental disorders (LaMonica et al., 2012). As the use of non-human primates in biomedical research is ethically troubling, the search for non-primate model organisms, that reflect key aspects of human neocortex development, is warranted (Barnhill et al., 2016; DeGrazia, 2016; Andersen and Winter, 2017; Neuhaus, 2017). By demonstrating that the tree shrew shows NPC characteristics very similar to gyrencephalic primates including human, this study introduced a potential novel experimental organism as an alternative to primates, which is seemingly more suitable than ferret and rodents, to model and understand specific aspects of human neocortex developmental and developmental brain disorders, i.e., where neocortex size is affected such as microcephaly.

CONCLUSION

This study reveals that the developing tree shrew neocortex is characterized by an expanded SVZ, a high abundance of Pax6+ NPCs in the SVZ, and a relatively high percentage of bRG at peak of upper-layer neurogenesis. Moreover, it

provides first evidence that key features of tree shrew neocortex development, i.e., the development of the germinal zones and the distribution and abundance of distinct NPCs, show a closer relationship to those of gyrencephalic primates than to those of ferret and lissencephalic rodents. Together, our data provides novel insight into the evolution of bRG and other distinct NPCs in the neocortex development of Euarchontoglires and introduces the tree shrew as a potential novel model organism in the area of human brain development and developmental disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SR and SF: conceived and designed the experiments. SR, HB, WK, EZ, RR, and JS: performed the experiments and/or contributed materials. SR, WK, and SF: analyzed the data. SR, WK, EZ, RR, JS, and SF: discussed the data. SR, WK, and SF: wrote the article. All authors reviewed and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Society of Laboratory Animal Science (GV-SOLAS).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gabriele Lindner, Kevin Richter, Megan Glatzle, and Christine Sauerland for their technical support, Annelies Herbert, Iris Grages, and Johanna Samtlebe for excellent animal care, and Birgit Hassfurth for tree shrew colony management. We are very grateful to Holger Kirsten (IMISE, Universität Leipzig) for his helpful recommendations on the statistical analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2018.00029/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., and Huttner, W. B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure—remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev. Biol.* 180, 664–679. doi: 10.1006/dbio.1996.0336
- Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., and Huttner, W. B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech. Dev.* 69, 71–81. doi: 10.1016/S0925-4773(97)00156-1
- Andersen, M. L., and Winter, L. M. F. (2017). Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An. Acad. Bras. Cienc.* doi: 10.1590/0001-3765201720170238 [Epub ahead of print].
- Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Brauninger, M., and Huttner, W. B. (2008). Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One* 3:e2388. doi: 10.1371/journal.pone.0002388
- Barnhill, A., Joffe, S., and Miller, F. G. (2016). The ethics of infection challenges in primates. *Hastings Cent. Rep.* 46, 20–26. doi: 10.1002/hast.580
- Bayatti, N., Moss, J. A., Sun, L., Ambrose, P., Ward, J. F., Lindsay, S., et al. (2008). A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. *Cereb. Cortex* 18, 1536–1548. doi: 10.1093/cercor/bhm184
- Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemin-Menard, A., et al. (2013). Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron* 80, 442–457. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.032
- Binz, H., Zurhorst, C., Zimmermann, E., and Rahmann, H. (1990). Neuronal substrates involved in processing of communicative acoustic signals in tree

- shrews: a 2-deoxyglucose study. *Neurosci. Lett.* 112, 25–30. doi: 10.1016/0304-3940(90)90316-2
- Britanova, O., De Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K. Y., Schwark, M., Gyorgy, A., et al. (2008). *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* 57, 378–392. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.028
- Cao, J., Yang, E. B., Su, J. J., Li, Y., and Chow, P. (2003). The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. *J. Med. Primatol.* 32, 123–130. doi: 10.1034/j.1600-0684.2003.00022.x
- Chenn, A., Zhang, Y. A., Chang, B. T., and McConnell, S. K. (1998). Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 11, 183–193. doi: 10.1006/mcne.1998.0680
- Cheung, A. F., Kondo, S., Abdel-Mannan, O., Chodroff, R. A., Sirey, T. M., Bluy, L. E., et al. (2010). The subventricular zone is the developmental milestone of a 6-layered neocortex: comparisons in metatherian and eutherian mammals. *Cereb. Cortex* 20, 1071–1081. doi: 10.1093/cercor/bhp168
- Costa, M. R., Wen, G., Lepier, A., Schroeder, T., and Götz, M. (2008). Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Development* 135, 11–22. doi: 10.1242/dev.009951
- De Juan Romero, C., and Borrell, V. (2015). Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia* 63, 1303–1319. doi: 10.1002/glia.22827
- DeGrazia, D. (2016). Nonhuman primates, human need, and ethical constraints. *Hastings Cent. Rep.* 46, 27–28. doi: 10.1002/hast.601
- Elston, G. N., Elston, A., Casagrande, V., and Kaas, J. H. (2005). Areal specialization of pyramidal cell structure in the visual cortex of the tree shrew: a new twist revealed in the evolution of cortical circuitry. *Exp. Brain Res.* 163, 13–20. doi: 10.1007/s00221-004-2131-7
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., et al. (2005). *Pax6*, *Tbr2*, and *Tbr1* are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005
- Fan, Y., Huang, Z. Y., Cao, C. C., Chen, C. S., Chen, Y. X., Fan, D. D., et al. (2013). Genome of the Chinese tree shrew. *Nat. Commun.* 4:1426. doi: 10.1038/ncomms2416
- Fernandez, V., Llinares-Benadero, C., and Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J.* 35, 1021–1044. doi: 10.15252/embj.201593701
- Fietz, S. A., and Huttner, W. B. (2011). Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 23–35. doi: 10.1016/j.conb.2010.10.002
- Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Brauninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 690–699. doi: 10.1038/nn.2553
- Fish, J. L., Dehay, C., Kennedy, H., and Huttner, W. B. (2008). Making bigger brains—the evolution of neural-progenitor-cell division. *J. Cell Sci.* 121, 2783–2793. doi: 10.1242/jcs.023465
- Florio, M., Albert, M., Taverna, E., Namba, T., Brandl, H., Lewitus, E., et al. (2015). Human-specific gene *ARHGAP11B* promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* 347, 1465–1470. doi: 10.1126/science.aaa1975
- Florio, M., and Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 141, 2182–2194. doi: 10.1242/dev.090571
- Fuchs, E., Czeh, B., and Flugge, G. (2004). Examining novel concepts of the pathophysiology of depression in the chronic psychosocial stress paradigm in tree shrews. *Behav. Pharmacol.* 15, 315–325. doi: 10.1097/00008877-200409000-00003
- Fuchs, E., and Flügge, G. (2002). Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 247–258. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00795-5
- Gal, J. S., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Chatterjee, M., Rakic, P., and Haydar, T. F. (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J. Neurosci.* 26, 1045–1056. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4499-05.2006
- García-Moreno, F., Vasistha, N. A., Trevia, N., Bourne, J. A., and Molnar, Z. (2012). Compartmentalization of cerebral cortical germinal zones in a lissencephalic primate and gyrencephalic rodent. *Cereb. Cortex* 22, 482–492. doi: 10.1093/cercor/bhr312
- Gertz, C. C., Lui, J. H., Lamonica, B. E., Wang, X., and Kriegstein, A. R. (2014). Diverse behaviors of outer radial glia in developing ferret and human cortex. *J. Neurosci.* 34, 2559–2570. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2645-13.2014
- Glatzle, M., Hoops, M., Kauffold, J., Seeger, J., and Fietz, S. A. (2017). Development of deep and upper neuronal layers in the domestic cat, sheep and pig neocortex. *Anat. Histol. Embryol.* 46, 397–404. doi: 10.1111/ahc.12282
- Götz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788. doi: 10.1038/nrm1739
- Götz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). *Pax6* controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 1031–1044. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80621-2
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R., and Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561. doi: 10.1038/nature08845
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3196–3201. doi: 10.1073/pnas.0308600100
- Hevner, R. F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y.-P., Sheng, M., Smiga, S., et al. (2001). *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29, 353–366. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00211-2
- Ida, M., Shuo, T., Hirano, K., Tokita, Y., Nakanishi, K., Matsui, F., et al. (2006). Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 281, 5982–5991. doi: 10.1074/jbc.M50713.0200
- Janecka, J. E., Miller, W., Pringle, T. H., Wiens, F., Zitzmann, A., Helgen, K. M., et al. (2007). Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science* 318, 792–794. doi: 10.1126/science.1147555
- Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A. Y., Kalinka, A. T., Stenzel, D., Tomancak, P., et al. (2012). Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb. Cortex* 22, 469–481. doi: 10.1093/cercor/bhr301
- Knabe, W., and Kuhn, H. J. (1998). Pattern of cell death during optic cup formation in the tree shrew *Tupaia belangeri*. *J. Comp. Neurol.* 401, 352–366. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981123)401:3<352::AID-CNE4>3.0.CO;2-A
- Knabe, W., and Washausen, S. (2015). Early development of the nervous system of the eutherian *Tupaia belangeri*. *Primate Biol.* 2, 25–56. doi: 10.5194/pb-2-25-2015
- Knabe, W., Washausen, S., Happel, N., and Kuhn, H. J. (2007). Development of starburst cholinergic amacrine cells in the retina of *Tupaia belangeri*. *J. Comp. Neurol.* 502, 584–597. doi: 10.1002/cne.21324
- Knabe, W., Washausen, S., Happel, N., and Kuhn, H. J. (2008). Diversity in mammalian chiasmatic architecture: ipsilateral axons are deflected at glial arches in the prechiasmatic optic nerve of the eutherian *Tupaia belangeri*. *J. Comp. Neurol.* 508, 437–457. doi: 10.1002/cne.21694
- Konerding, W. S., Brunke, J., Schehka, S., and Zimmermann, E. (2011). Is acoustic evaluation in a non-primate mammal, the tree shrew, affected by context? *Anim. Cogn.* 14, 787–795. doi: 10.1007/s10071-011-0411-8
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600
- Kriegstein, A., Noctor, S., and Martinez-Cerdeno, V. (2006). Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 883–890. doi: 10.1038/nrn2008
- Kriegstein, A. R., and Götz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43, 37–43. doi: 10.1002/glia.10250
- Kuhn, H. J., and Schwaier, A. (1973). Implantation, early placentation, and the chronology of embryogenesis in *Tupaia belangeri*. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 142, 315–340. doi: 10.1007/BF00519135
- Kumar, V., Hallstrom, B. M., and Janke, A. (2013). Coalescent-based genome analyses resolve the early branches of the euarchontoglires. *PLoS One* 8:e60019. doi: 10.1371/journal.pone.0060019
- LaMonica, B. E., Lui, J. H., Wang, X., and Kriegstein, A. R. (2012). OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on

- neurodevelopmental disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 747–753. doi: 10.1016/j.conb.2012.03.006
- Lewitus, E., Kelava, I., and Huttner, W. B. (2013). Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Front. Hum. Neurosci.* 7:424. doi: 10.3389/fnhum.2013.00424
- Li, C. H., Yan, L. Z., Ban, W. Z., Tu, Q., Wu, Y., Wang, L., et al. (2017). Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Res.* 27, 241–252. doi: 10.1038/cr.2016.156
- Lin, J., Chen, G., Gu, L., Shen, Y., Zheng, M., Zheng, W., et al. (2014). Phylogenetic affinity of tree shrews to Glires is attributed to fast evolution rate. *Mol. Phylogenet. Evol.* 71, 193–200. doi: 10.1016/j.ympev.2013.12.001
- Manabe, N., Hirai, S., Imai, F., Nakanishi, H., Takai, Y., and Ohno, S. (2002). Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. *Dev. Dyn.* 225, 61–69. doi: 10.1002/dvdy.10139
- Marthiens, V., and Ffrench-Constant, C. (2009). Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Rep.* 10, 515–520. doi: 10.1038/embor.2009.36
- Martinez-Cerdeno, V., Camacho, J., Ariza, J., Rogers, H., Horton-Sparks, K., Kreutz, A., et al. (2017). The bat as a new model of cortical development. *Cereb. Cortex* doi: 10.1093/cercor/bhx251 [Epub ahead of print].
- Martinez-Cerdeno, V., Cunningham, C. L., Camacho, J., Antczak, J. L., Prakash, A. N., Cziep, M. E., et al. (2012). Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: evidence for an outer subventricular zone in rodents. *PLoS One* 7:e30178. doi: 10.1371/journal.pone.0030178
- Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C., and Kriegstein, A. R. (2006). The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 16(Suppl. 1), i152–i161. doi: 10.1093/cercor/bhk017
- McEvilly, R. J., De Diaz, M. O., Schonemann, M. D., Hooshmand, F., and Rosenfeld, M. G. (2002). Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science* 295, 1528–1532. doi: 10.1126/science.1067132
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133–3145. doi: 10.1242/dev.01173
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., and Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437. doi: 10.1038/nrn2151
- Montiel, J. F., Vasistha, N. A., Garcia-Moreno, F., and Molnar, Z. (2016). From sauropsids to mammals and back: new approaches to comparative cortical development. *J. Comp. Neurol.* 524, 630–645. doi: 10.1002/cne.23871
- Namba, T., and Huttner, W. B. (2017). Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 6:e256. doi: 10.1002/wdev.256
- Neuhaas, C. P. (2017). Ethical issues when modelling brain disorders in non-human primates. *J. Med. Ethics* doi: 10.1136/medethics-2016-104088 [Epub ahead of print].
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144. doi: 10.1038/nn1172
- Norton, T. T., and McBrien, N. A. (1992). Normal development of refractive state and ocular component dimensions in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Vision Res.* 32, 833–842. doi: 10.1016/0042-6989(92)90026-F
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Sandoval-Espinosa, C., and Kriegstein, A. R. (2016). Transformation of the radial glia scaffold demarcates two stages of human cerebral cortex development. *Neuron* 91, 1219–1227. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.005
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 26, 1663–1672. doi: 10.1634/stemcells.2007-0884
- Pilz, G. A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., et al. (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nat. Commun.* 4:2125. doi: 10.1038/ncomms3125
- Pohlert, T. (2014). *The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)*. R Package. Available at: <https://cran.r-project.org/package=PMCMR>
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61–83. doi: 10.1002/cne.901450105
- Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* 18, 383–388. doi: 10.1016/0166-2236(95)93934-P
- Reillo, I., De Juan Romero, C., Garcia-Cabezas, M. A., and Borrell, V. (2011). A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 21, 1674–1694. doi: 10.1093/cercor/bhq238
- Remple, M. S., Reed, J. L., Stepniewska, I., and Kaas, J. H. (2006). Organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). I. Architecture, microelectrode maps, and corticospinal connections. *J. Comp. Neurol.* 497, 133–154. doi: 10.1002/cne.20975
- Remple, M. S., Reed, J. L., Stepniewska, I., Lyon, D. C., and Kaas, J. H. (2007). The organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*): II. Connectional evidence for a frontal-posterior parietal network. *J. Comp. Neurol.* 501, 121–149. doi: 10.1002/cne.21226
- Sauerland, C., Menzies, B. R., Glatzle, M., Seeger, J., Renfree, M. B., and Fietz, S. A. (2018). The basal radial glia occurs in marsupials and underlies the evolution of an expanded neocortex in therian mammals. *Cereb. Cortex* 28, 145–157. doi: 10.1093/cercor/bhw360
- Schehka, S., Esser, K. H., and Zimmermann, E. (2007). Acoustical expression of arousal in conflict situations in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 193, 845–852. doi: 10.1007/s00359-007-0236-8
- Schehka, S., and Zimmermann, E. (2009). Acoustic features to arousal and identity in disturbance calls of tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Behav. Brain Res.* 203, 223–231. doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.007
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Smart, I. H., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M., and Kennedy, H. (2002). Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb. Cortex* 12, 37–53. doi: 10.1093/cercor/12.1.37
- Song, S., Liu, L., Edwards, S. V., and Wu, S. (2012). Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14942–14947. doi: 10.1073/pnas.1211733109
- Stancik, E. K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R., and Haydar, T. F. (2010). Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J. Neurosci.* 30, 7028–7036. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6131-09.2010
- Sugitani, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., et al. (2002). Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev.* 16, 1760–1765. doi: 10.1101/gad.978002
- Sur, M., Weller, R. E., and Kaas, J. H. (1980). Representation of the body surface in somatosensory area I of tree shrews, *Tupaia glis*. *J. Comp. Neurol.* 194, 71–95. doi: 10.1002/cne.901940105
- Toma, K., and Hanashima, C. (2015). Switching modes in corticogenesis: mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. *Front. Neurosci.* 9:274. doi: 10.3389/fnins.2015.00274
- Veit, J., Bhattacharyya, A., Kretz, R., and Rainer, G. (2011). Neural response dynamics of spiking and local field potential activity depend on CRT monitor refresh rate in the tree shrew primary visual cortex. *J. Neurophysiol.* 106, 2303–2313. doi: 10.1152/jn.00388.2011
- Wang, X., Tsai, J. W., Lamonica, B., and Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 555–561. doi: 10.1038/nn.2807
- Washausen, S., Obermayer, B., Brunnett, G., Kuhn, H. J., and Knabe, W. (2005). Apoptosis and proliferation in developing, mature, and regressing epibranchial placodes. *Dev. Biol.* 278, 86–102. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.10.016
- Wong, P., and Kaas, J. H. (2009a). An architectonic study of the neocortex of the short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Brain Behav. Evol.* 73, 206–228. doi: 10.1159/000225381

- Wong, P., and Kaas, J. H. (2009b). Architectonic subdivisions of neocortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Anat. Rec.* 292, 994–1027. doi: 10.1002/ar.20916
- Workman, A. D., Charvet, C. J., Clancy, B., Darlington, R. B., and Finlay, B. L. (2013). Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J. Neurosci.* 33, 7368–7383. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013
- Xiao, J., Liu, R., and Chen, C. S. (2017). Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model. *Zool. Res.* 38, 127–137. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.033
- Yamashita, A., Fuchs, E., Taira, M., Yamamoto, T., and Hayashi, M. (2012). Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques. *J. Med. Primatol.* 41, 147–157. doi: 10.1111/j.1600-0684.2012.00540.x
- Yao, Y. G. (2017). Creating animal models, why not use the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*)? *Zool. Res.* 38, 118–126. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.032
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Römer, Bender, Knabe, Zimmermann, Rübsamen, Seeger and Fietz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4 Diskussion

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit liefert detaillierte Daten zu den zellbiologischen Charakteristika der NPCs im sich entwickelnden Neokortex des *Tupaia belangeri*. Drei grundlegende Erkenntnisse stellen sich dar:

Der sich entwickelnde Neokortex des *Tupaia belangeri* verfügt über (i) eine relativ große SVZ, (ii) eine hohe Abundanz von Pax6+ NPCs in der SVZ sowie über (iii) einen hohen Prozentsatz von bRGs zum Zeitpunkt der Bildung der oberen Kortexschichten.

Durch statistische Analysen konnte gezeigt werden, dass die NPCs des *Tupaia belangeri* größere qualitative und quantitative Ähnlichkeiten zu den kortikalen NPCs von gyrenzephalen Primaten (z.B. Rhesusaffe) als zu denen von lissenzephalen Nagetieren (z.B. Maus, Ratte) aufweisen. Somit unterstützen die Ergebnisse die Hypothese der engeren neuroanatomischen, genetischen und phylogenetischen Verwandtschaft zu den Primaten (SUR et al. 1980, ELSTON et al. 2005, REMPLE et al. 2007, WONG und KAAS 2009, VEIT et al. 2011, KNABE und WASHAUSEN 2015, XIAO et al. 2017, YAO 2017).

Da das *Tupaia* einen lissenzephalen Neokortex besitzt, zeigen die Ergebnisse zudem, dass eine hohe relative Abundanz von bRGs und die Bildung eines gyrifizierten Neokortex nicht direkt im Zusammenhang stehen (GARCIA-MORENO et al. 2012, KELAVA et al. 2012, LEWITUS et al. 2013). Darüber hinaus deuten die durchgeführten Untersuchungen darauf hin, dass die kortikalen NPCs des gyrenzephalen Frettchens größere Ähnlichkeiten zu den NPCs der lissenzephalen Maus und Ratte als zu denen von Primaten und *Tupaia* aufweisen. Das lässt den Schluss zu, dass die Häufigkeit und Verteilung der unterschiedlichen NPCs eine untergeordnete Rolle bei der Gyrierung spielt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, in welchem Ähnlichkeitsverhältnis die kortikalen NPCs des *Tupaia* zu denen gyrenzephaler Nagetiere (z.B. Aguti, Capybara) und lissenzephaler Primaten (z.B. Weißbüschelaffe) stehen. Die derzeit verfügbare Datenlage zur kortikalen Neurogenese im Aguti und Weißbüschelaffen ist gering (GARCIA-MORENO et al. 2012, KELAVA et al. 2012) und war dementsprechend nicht Bestandteil der statistischen Erfassung.

Um ein tiefes Verständnis über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der neokortikalen Entwicklung des *Tupaia* und phylogenetisch nah verwandten Spezies zu erhalten, sollten zukünftige Untersuchungen die Analyse weiterer Parameter (z.B. Zellzykluslänge und Art der Zellteilung der NPCs) in unterschiedlichen Spezies beinhalten. Die vorliegende Arbeit hat interessanterweise gezeigt, dass ein hoher Anteil an bIPs im sich entwickelnden Neokortex des *Tupaia belangeri* nicht nur *Tbr2* exprimiert sondern auch Pax6. Der Hauptteil der bIPs im sich entwickelnden Neokortex des Rhesusaffen teilt sich proliferativ und exprimiert ebenfalls

Pax6, wohingegen die Mehrzahl der bIPs im sich entwickelnden Neokortex von Maus und Ratte die Expression von Pax6 herunterregulieren und sich symmetrisch neurogen teilen (BETIZEAU et al. 2013, NOCTOR et al. 2004, FLORIO und HUTTNER 2014). Dies lässt die Annahme zu, dass ein hoher Anteil der bIPs im sich entwickelnden Neokortex des *Tupaia belangeri* - analog zu dem des Rhesusaffen - ebenfalls zum proliferativen Typ gehört. Eine hohe Anzahl proliferierender NPCs in der SVZ des *Tupaia belangeri* würde zudem die rasche Dickenzunahme der SVZ sowie die deutliche Erhöhung der NPCs in der SVZ zwischen dem Trächtigkeitstag 32 und 37 erklären.

Zwischen der Entstehung der tiefen und oberen Kortexschichten liegen im *Tupaia belangeri* 5 Tage. Damit ist dieser Zeitraum ähnlich lang wie bei Ratte und Maus, aber deutlich kürzer als beim Frettchen mit ca. 12 Tagen (WORKMAN et al. 2013). Die hohe Anzahl an proliferativen NPCs, das heißt an bIPs und bRGs, ermöglicht es dem *Tupaia belangeri* - im Vergleich zum Frettchen - womöglich innerhalb einer kürzeren Zeiteinheit mehr Neurone zu generieren und somit einen ähnlichen Enzephalisierungsgrad wie dem des Frettchens zu erreichen.

Da die bIPs des *Tupaia belangeri* als auch der untersuchten Primaten auch ohne Kontakt zur Basalmembran in der Lage sind, sich wiederholend zu teilen, scheint dieser Kontakt für die Proliferationskapazität der Zelle nicht essentiell zu sein. Vor kurzem veröffentlichte Daten haben zudem gezeigt, dass es stattdessen die Größe der Zelloberfläche bzw. die Anzahl der Fortsätze ist, die positiv mit der Proliferationskapazität der kortikalen NPCs korreliert (KALEBIC et al. 2018). Eine hohe Anzahl an Extensionen ermöglicht es der Zelle effektiver Proliferations-signale aus der Umgebung zu erhalten. In zukünftigen Studien gilt es, die konkreten Signale, die eine sich wiederholende Teilung der NPCs im sich entwickelnden Neokortex ermöglichen, sowie deren Übertragungswege zu entschlüsseln. Da bIPs im Primaten unter anderem aus Zellteilungen von bRGs hervorgehen, wäre es zudem interessant zu untersuchen, ob das Proliferations-signal gegebenenfalls von der bRG-Mutterzelle bevorzugt an die Pax6+ bIP-Tochterzelle während der Zellteilung weitergegeben wird.

In Verbindung mit den schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen einer kongenitalen Zikavirusinfektion für das Neugeborene stellt dieser zelluläre Prozess möglicherweise ein Angriffspunkt in der Forschung und Therapie gegen das Zikavirus dar. Die Mehrzahl der bIPs im *Tupaia belangeri* und Primaten (inkl. Mensch) exprimiert die Transkriptionsproteine Pax6 und Tbr2. Das Virus hemmt die Tbr2 Expression, was wiederum zur Mikrozephalie führt (RASMUSSEN et al. 2016, PETERSEN et al. 2016). Hier scheint das *Tupaia belangeri* als Forschungsgrundlage geeignet zu sein.

Die schwere Form der Spina bifida geht beim Menschen mit einem Neuronenschwund einher. In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass dem eine Störung der pränatalen kortikalen Neurogenese zugrunde liegt. Insbesondere sind die bIPs im sich entwickelnden

humanen Neokortex von Spina bifida-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant reduziert (FIETZ et al. 2020). Da die vorliegende Studie große Gemeinsamkeiten in den BP-Subpopulationen zwischen Mensch und *Tupaia belangeri* offenlegt, ist es als Modelltier für weitergehende Untersuchungen zur Pathogenese der humanen Spina bifida einsetzbar. Ähnliches gilt für die Analyse der humanen kongenitalen Toxoplasmose. Aufgrund der deutlichen Gemeinsamkeiten in den NPC-Subpopulationen erscheint das *Tupaia belangeri* geeignet, um erstmalig zu ermitteln, ob und in welchem Umfang *T. gondii* NPCs im pränatalen Neokortex infiziert und welche Auswirkung die Infektion auf die Funktion der jeweiligen NPCs und die Anzahl der von ihnen gebildeten Neurone hat.

Die Ergebnisse zeigten zudem, dass die allgemeine Sequenz der Neurogenese der tiefen und oberen Schichten sowie die Platzierung der zugehörigen Neurone im sich entwickelnden Neokortex von *Tupaia belangeri* und Primaten ähnlich verlaufen. Weitere Untersuchungen, bspw. dreidimensionale Migrations- und Differenzierungsassays, sind notwendig, um zu ermitteln, ob das *T. belangeri* auch für die Analyse humaner neuronaler Migrationsstörungen, wie sie bspw. der Lissenzephalie zugrunde liegen, einsetzbar ist.

Durch die vorliegende Studie wird mit dem *Tupaia belangeri* der biomedizinischen Forschung und translationalen Medizin ein besonders geeignetes Tiermodell - als Alternative zu Maus, Ratte, Frettchen und Primaten - für die Untersuchung von entwicklungsbedingten Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex zur Verfügung gestellt. Spezifika in der Entwicklung des humanen Neokortex und kongenitale Fehlbildungen könnten genauer abgebildet und ein besseres Verständnis für die physiologischen und pathologischen Mechanismen erlangt werden. Zudem sind die gewonnenen Ergebnisse für die Grundlagenforschung von großer Bedeutung, da sie weitreichende Einsichten in die Evolution des Gehirns und die Phylogenese der NPCs der Säugetiere ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Sebastian Römer

Charakterisierung neuraler Vorläuferzellen im pränatalen Neokortex des Nördlichen Spitzhörnchens (*Tupaia belangeri*)

Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

eingereicht Oktober 2021

Seiten: 39, Abbildungen: 8, Tabellen: 2, Literaturangaben: 169

Schlüsselwörter: neokortikale Entwicklung, Neuralstamm- und Progenitorzelle, basale radiale Gliazelle, Spitzhörnchen, *Tupaia belangeri*

Einleitung: Im Verlauf der Evolution entwickelte sich der Neokortex zum komplexesten Anteil des Säugetiergehirns. Ausdifferenzierungen und eine immense Expansion des Neokortex, vor allem in der Primatenabstammungslinie, waren die Folge. Der größte Teil der neokortikalen Neurone wird während der Embryonal- und Fetalphase gebildet und stammt von sogenannten neuralen Stamm- und Progenitorzellen (NPCs) ab. Diese entstehen in zwei unterschiedlichen Keimschichten, der Ventrikulärzone (VZ) und der Subventrikulärzone (SVZ). Vorangegangene Studien zeigten, dass sich die Dicke der SVZ als auch das Vorhandensein und die Häufigkeit bestimmter NPCs, besonders die der basalen radialen Gliazelle (bRG), zwischen lissenzephalen Nagetieren und gyrenzephalen Primaten erheblich unterscheidet. Bislang werden überwiegend Nagetiere in Untersuchungen zu gehirnassoziierten Fragestellungen eingesetzt, wohlwissentlich dass es deutliche Unterschiede in der neokortikalen Entwicklung (d.h. in der Abundanz und Verteilung der unterschiedlichen NPCs) zwischen Mensch und Nagetier gibt. Die Etablierung eines Tiermodells, das eine ähnliche NPC-Ausstattung wie der Mensch besitzt, ist für das bessere Verständnis der humanen Neokortexentwicklung sowie neokortikaler Entwicklungsstörungen und Erkrankungen essenziell. Das nördliche Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) ist ein rattengroßes Tier mit einem hohen Gehirnkörpermasse-Verhältnis und steht phylogenetisch zwischen den Nagetieren und den Primaten.

Ziel der Untersuchung: Ziel dieser Arbeit war es, die Präsenz, die Abundanz und die Verteilung der bRGs und anderer NPCs in den Keimzonen (VZ und SVZ) des sich entwickelnden Neokortex des *Tupaia belangeri* zu erfassen. Die erhobenen Daten wurden mit vorhandenen Daten von Makaken, Frettchen, Ratte und Maus verglichen, um zu erfahren, ob Schlüsselmerkmale der Neokortexentwicklung größere Gemeinsamkeiten zu gyrenzephalen Primaten oder lissenzephalen Nagetieren zeigen.

Tiere, Material und Methoden: Die Tupaiaehirne stammen von Tieren aus dem Institut für Biologie der Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie und dem Institut für Zoologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Das Alter der Proben bewegte sich von Embryonaltag 32 (n=2), 37 (n=2), 45 (n=2) bis hin zu Postnataltag (P) 1 (n=2). Die exakte Bestimmung des Alters der Tiere erfolgte über eine Scheitel-Steißlängen-Wachstumskurve. Die Gehirne wurden entnommen, fixiert und das gesamte Telenzephalon wurde von rostral nach kaudal in Einzelschnitte von 30 µm Dicke geschnitten und immunhistochemisch gefärbt. Dabei wurden fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper verwendet. Die visuelle Darstellung erfolgte mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Leica SP8). Die Aufnahmen wurden mittels Fiji und Adobe Photoshop Software prozessiert. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mittels Fiji Software (Multiclass Cell Counter plug in). Die statistische Auswertung erfolgte durch R Software. Im Rahmen einer Ranganalyse wurden nichttransformierte Werte verschiedener neokortikaler Parameter unterschiedlicher Spezies verglichen und mit dem Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Conover post-hoc-Test auf eine statistische Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft. Darüber hinaus wurde nach Standardisierung mittels z-Score eine Hauptkomponentenanalyse, euklidische Distanzberechnung und hierarchisches Clustern durchgeführt.

Ergebnisse: Drei grundlegende Erkenntnisse stellen sich dar. Der sich entwickelnde Neokortex des *Tupaia belangeri* verfügt über (i) eine relativ große SVZ, (ii) eine hohe Abundanz von Pax6+ NPCs in der SVZ sowie über (iii) einen hohen Prozentsatz von bRGs zum Zeitpunkt der Bildung der oberen Kortexschichten. Durch die statistische Auswertung stellte sich heraus, dass bestimmte Schlüsselmerkmale in der Neokortexentstehung des *Tupaia* (d.h. Entwicklung der Keimzonen, Verteilung und Abundanz von unterschiedlichen NPCs) größere Ähnlichkeiten zu denen der gyrenzephalen Primaten als zu denen der lissenzephalen Nagetiere aufweisen. Beim Rangvergleich der untersuchten Parameter wurde eine statistische Signifikanz (siehe Tiere, Material und Methoden mit $p < 0.05$) festgestellt.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass große Ähnlichkeiten zwischen den NPC Populationen im sich entwickelnden Neokortex von gyrenzephalen Primaten und *Tupaia belangeri* bestehen. Somit wird mit dem *Tupaia belangeri* der biomedizinischen Forschung und translationalen Medizin für die Untersuchung von entwicklungsbedingten Fehlbildungen und Erkrankungen des Neokortex ein besonders geeignetes Tiermodell - als Alternative zu Maus, Ratte, Frettchen und Primaten - zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus bieten die gewonnenen Ergebnisse weitreichende Einsichten in die Evolution des Gehirns und die Phylogenese der NPCs der Säugetiere und sind somit für die Grundlagenforschung von großer Bedeutung.

6 Summary

Sebastian Römer

Characterization of neural progenitor cells in the prenatal neocortex of the northern treeshrew (*Tupaia belangeri*)

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in October 2021

Pages: 39, figures: 8, tables: 2, references: 169

Keywords: neocortex, neurogenesis, neural stem and progenitor cells, basal radial glial cell, treeshrews, *Tupaia belangeri*

Introduction: During evolution, the neocortex has developed into the most complex part of the mammalian brain. This is accompanied by differentiation and an immense expansion of the neocortex, especially within the primate lineage. Most of the neocortical neurons are generated by neural stem and progenitor cells (NPCs) during embryonic and fetal development. NPCs reside in two different germinal layers, the ventricular zone (VZ) and the subventricular zone (SVZ). Previous studies have shown that the thickness of the SVZ as well as the presence and percentage of distinct NPCs, especially of basal radial glial (bRG), differ markedly between lissencephalic rodents and gyrencephalic primates. So far, rodents have predominantly been used as animal models in research on brain-related issues, knowing that there are clear differences in neocortical development (i.e. in the abundance and distribution of the different NPCs) between rodents and humans. The establishment of an animal model that exhibit similar NPC characteristics as humans is essential in order to better understand human neocortex development as well as neurodevelopmental disorders and diseases. The northern treeshrew (*Tupaia belangeri*) is a rat-sized animal with a high brain-to-body mass ratio, which stands phylogenetically mid-way between rodents and primates.

Aim of the study: The objective of this research was to determine the presence, abundance and the distribution of bRGs and other distinct NPCs in the germinal zones (VZ and SVZ) of the developing neocortex of the *Tupaia belangeri*. Data obtained were compared with existing data from macaque, ferret, rat and mouse in order to investigate whether key features of neocortex development show greater similarities to gyrencephalic primates or lissencephalic rodents.

Animals, material and methods: *Tupaia* brains were obtained from animals from the Institute for Biology at the University of Leipzig, Faculty for Biosciences, Pharmacy and Psychology and the Institute for Zoology at the University of Veterinary Medicine, Hannover. The age of the samples ranged from embryonic day 32 (n = 2), 37 (n = 2), 45 (n = 2) to postnatal day (P) 1 (n = 2). The exact determination of the age of the animals was carried out using a crown-rump length growth curve. After dissection and fixation of the brain, telencephalon was cut into 30- μ m sections from rostral to caudal and stained by immunohistochemistry. Fluorescently labeled secondary antibodies were used. Image acquisition was carried out using a confocal laser microscope (Leica SP8). Images were processed using Fiji and Adobe Photoshop software. Cells were quantified using Fiji software (Multiclass Cell Counter plug in). Statistical analysis was carried out using R software. For rank analysis, non-transformed values of various neocortical parameters of different species were used and checked for statistical significance ($p < 0.05$) with the Kruskal-Wallis test followed by Conover post-hoc test. In addition, after standardization using z-Score transformation, a principal component analysis, Euclidean distance calculation and hierarchical clustering were carried out.

Results: Three fundamental findings were observed. The developing neocortex of the *Tupaia belangeri* exhibits (i) a relatively large SVZ, (ii) a high abundance of Pax6+ NPCs in the SVZ and (iii) a high percentage of bRGs at the time of upper-layer corticogenesis. The statistical analysis revealed that distinct key features of *Tupaia* neocortex development (i.e. development of the germinal zones, distribution and abundance of different NPCs) are more similar to those of gyrencephalic primates than to those of lissencephalic rodents. In the rank analysis, a statistical significance was detected (see animals, material and methods with $p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study show that there are great similarities between the NPC populations in the developing neocortex of gyrencephalic primates and *Tupaia belangeri*. Therefore, the *Tupaia belangeri* appears as a highly suitable and alternative animal model for the analysis of developmental malformations and diseases of the neocortex in biomedical research and translational medicine. Furthermore, the results offer insights into the evolution of the brain and the phylogeny of mammalian NPCs and are therefore of great importance for basic research.

7 Literaturverzeichnis

Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol.* 1996 Dec 15;180(2):664-79. doi: 10.1006/dbio.1996.0336.

Aaku-Saraste E, Oback B, Hellwig A, Huttner WB. Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech Dev.* 1997 Dec;69(1-2):71-81. doi: 10.1016/s0925-4773(97)00156-1.

Alruwaili AA, M Das J. Myelomeningocele. 2021 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 31536302. Ohne doi.

Andersen ML, Winter LMF. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(suppl 1):e20170238. doi: 10.1590/0001-3765201720170238. Epub 2017 Sep 4.

Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One.* 2008 Jun 11;3(6):e2388. doi: 10.1371/journal.pone.0002388.

Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol.* 2009 Apr 10;513(5):532-41. doi: 10.1002/cne.21974.

Barbi L, Coelho AVC, Alencar LCA, Crovella S. Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. *Braz J Infect Dis.* 2018 Mar-Apr;22(2):137-141. doi: 10.1016/j.bjid.2018.02.005.

Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain.* 2012 May;135(Pt 5):1348-69. doi: 10.1093/brain/aws019.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics.* 1996 Apr;27(2):59-63. doi: 10.1055/s-2007-973750.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology.* 2005 Dec 27;65(12):1873-87. doi: 10.1212/01.wnl.0000183747.05269.2d.

Barnhill A, Joffe S, Miller FG. The Ethics of Infection Challenges in Primates. *Hastings Cent Rep.* 2016 Jul;46(4):20-6. doi: 10.1002/hast.580. Epub 2016 Mar 21.

Bayatti N, Moss JA, Sun L, Ambrose P, Ward JF, Lindsay S, et al. A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. *Cereb Cortex.* 2008 Jul;18(7):1536-48. doi: 10.1093/cercor/bhm184. Epub 2007 Oct 26.

Bershteyn M, Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Nene A, Wynshaw-Boris A, et al. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell.* 2017 Apr 6;20(4):435-449.e4. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.007.

Betizeau M, Cortay V, Patti D, Pfister S, Gautier E, Bellemin-Ménard A, et al. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron.* 2013 Oct 16;80(2):442-57. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.032.

Binz H, Zurhorst C, Zimmermann E, Rahmann H. Neuronal substrates involved in processing of communicative acoustic signals in tree shrews: a 2-deoxyglucose study. *Neurosci Lett.* 1990 Apr 20;112(1):25-30. doi: 10.1016/0304-3940(90)90316-2.

Blencowe H, Kancharla V, Moorthie S, Darlison MW, Modell B. Estimates of global and regional prevalence of neural tube defects for 2015: a systematic analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Feb;1414(1):31-46. doi: 10.1111/nyas.13548.

Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, et al. *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron.* 2008 Feb 7;57(3):378-92. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.028.

Brunet J, Pfaff AW, Abidi A et al. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol.* 2008 Apr;10(4):908-20. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01093.x. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18005238.

Campbell NA, Reece JB, Markl J. *Biologie*. 6. Aufl [2. dt. Ausg.]. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch); 2003.

Cao J, Yang EB, Su JJ, Li Y, Chow P. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. *J Med Primatol.* 2003 Jun;32(3):123-30. doi: 10.1034/j.1600-0684.2003.00022.x.

Chenn A, Zhang YA, Chang BT, McConnell SK. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Mol Cell Neurosci.* 1998 Jul;11(4):183-93. doi: 10.1006/mcne.1998.0680.

Cheung AF, Kondo S, Abdel-Mannan O, Chodroff RA, Sirey TM, Bluy LE, et al. The subventricular zone is the developmental milestone of a 6-layered neocortex: comparisons in metatherian and eutherian mammals. *Cereb Cortex*. 2010 May;20(5):1071-81. doi: 10.1093/cercor/bhp168.

Costa MR, Wen G, Lepier A, Schroeder T, Götz M. Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Development*. 2008 Jan;135(1):11-22. doi: 10.1242/dev.009951.

Cremer R. Arbeitsgemeinschaft Spina bifida und Hydrocephalus e.V. (ASBH): Spina bifida. [Homepage]. Ohne Ort. Ohne Verlag. 2009. Zitiert vom 17.05.2019.<<https://asbh.de/themen/spina-bifida/>>.

De Juan Romero C, Borrell V. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia*. 2015 Aug;63(8):1303-19. doi: 10.1002/glia.22827.

DeGrazia D. Nonhuman Primates, Human Need, and Ethical Constraints. *Hastings Cent Rep*. 2016 Jul;46(4):27-8. doi: 10.1002/hast.601.

De Lahunta A, Glass E, Kent M. VETERINARY NEUROANATOMY AND CLINICAL NEUROLOGY. Fourth Edition. St. Louis; Elsevier Saunders; 2014.

Denk W. Der Schaltplan des Gehirns. [Homepage]. Martinsried: Max- Planck- Institut für Neurobiologie. 2016. Zitiert vom 17.05.2019. <https://www.neuro.mpg.de/3341345/research_report_9919510?c=374257>.

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V (DGGG). Stellungnahme der DGGG zum Thema Zika-Virus Infektion während der Schwangerschaft, Auswirkungen auf den Feten und Empfehlungen zur Überwachung und Diagnostik. [Homepage]. Erlangen: Frauenklinik Universitätsklinikum Erlangen. April 2018. zitiert vom 17.05.2019. <<https://www.dggg.de/leitlinien-stellungnahmen/stellungnahmen/zika-virus-infektion-waehrend-der-schwangerschaft-auswirkungen-auf-den-feten-und-empfehlungen-zur-ueberwachung-und-diagnostik-636/>>.

Di Donato N. Genetik der kortikalen Fehlbildungen. *Medgen*. 2018; 30(1): 21–36. doi: 10.1007/s11825-017-0165-z

Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, Czapansky-Beilman D, Dubeau F, Dulac O, et al. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology*. 1996 Aug;47(2):331-9. doi: 10.1212/wnl.47.2.331.

Elston GN, Elston A, Casagrande V, Kaas JH. Areal specialization of pyramidal cell structure in the visual cortex of the tree shrew: a new twist revealed in the evolution of cortical circuitry. *Exp Brain Res*. 2005 May;163(1):13-20. doi: 10.1007/s00221-004-2131-7.

Engelhardt W. (unter Mitwirkung von Gerhard Breves). *Physiologie der Haustiere*. 3. überarbeitete Auflage. Stuttgart; Enke; 2009.

Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, et al. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci*. 2005 Jan 5;25(1):247-51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.

Fan Y, Huang ZY, Cao CC, Chen CS, Chen YX, Fan DD, et al. Genome of the Chinese tree shrew. *Nat Commun*. 2013;4:1426. doi: 10.1038/ncomms2416.

Fernández V, Llinares-Benadero C, Borrell V. Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J*. 2016 May 17;35(10):1021-44. doi: 10.15252/embj.201593701.

Fietz SA, Huttner WB. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 2011 Feb;21(1):23-35. doi: 10.1016/j.conb.2010.10.002.

Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Bräuning M, Stenzel D, Fish JL, et al. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci*. 2010 Jun;13(6):690-9. doi: 10.1038/nn.2553.

Fietz SA, Namba T, Kirsten H, Huttner WB, Lachmann R. Signs of Reduced Basal Progenitor Levels and Cortical Neurogenesis in Human Fetuses with Open Spina Bifida at 11-15 Weeks of Gestation. *J Neurosci*. 2020 Feb 19;40(8):1766-1777. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0192-19.2019.

Fish JL, Dehay C, Kennedy H, Huttner WB. Making bigger brains-the evolution of neural-progenitor-cell division. *J Cell Sci*. 2008 Sep 1;121(Pt 17):2783-93. doi: 10.1242/jcs.023465.

Fletcher JM, Copeland K, Frederick JA, et al. Spinal lesion level in spina bifida: a source of neural and cognitive heterogeneity. *J Neurosurg*. 2005;102(3 Suppl):268-279. DOI:10.3171/ped.2005.102.3.0268

Florio M, Albert M, Taverna E, Namba T, Brandl H, Lewitus E, et al. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science*. 2015 Mar 27;347(6229):1465-70. doi: 10.1126/science.aaa1975.

Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*. 2014 Jun;141(11):2182-94. doi: 10.1242/dev.090571.

- Fry AE, Cushion TD, Pilz DT. The genetics of lissencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014;166C(2):198–210. doi:10.1002/ajmg.c.31402.
- Fuchs E, Czéh B, Flügge G. Examining novel concepts of the pathophysiology of depression in the chronic psychosocial stress paradigm in tree shrews. *Behav Pharmacol.* 2004 Sep;15(5-6):315-25. doi: 10.1097/00008877-200409000-00003.
- Fuchs E, Flügge G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 Aug;73(1):247-58. doi: 10.1016/s0091-3057(02)00795-5.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci.* 2006 Jan 18;26(3):1045-56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4499-05.2006.
- Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science.* 2016 May 13;352(6287):816-8. doi: 10.1126/science.aaf6116.
- García-Moreno F, Vasistha NA, Trevia N, Bourne JA, Molnár Z. Compartmentalization of cerebral cortical germinal zones in a lissencephalic primate and gyrencephalic rodent. *Cereb Cortex.* 2012 Feb;22(2):482-92. doi: 10.1093/cercor/bhr312.
- Gertz CC, Lui JH, LaMonica BE, Wang X, Kriegstein AR. Diverse behaviors of outer radial glia in developing ferret and human cortex. *J Neurosci.* 2014 Feb 12;34(7):2559-70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2645-13.2014.
- Glatzle M, Hoops M, Kauffold J, Seeger J, Fietz SA. Development of Deep and Upper Neuronal Layers in the Domestic Cat, Sheep and Pig Neocortex. *Anat Histol Embryol.* 2017 Aug;46(4):397-404. doi: 10.1111/ahe.12282.
- Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Oct;6(10):777-88. doi: 10.1038/nrm1739.
- Götz M, Stoykova A, Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron.* 1998 Nov;21(5):1031-44. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80621-2.
- Grzimek B. Grzimeks Enzyklopädie Band 2 Säugetiere. 1. Auflage. München; Kindler-Verlag; 1988
- Han W, Sestan N. Cortical projection neurons: sprung from the same root. *Neuron.* 2013 Dec 4;80(5):1103-5. doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.016.

- Han KH, Sheldon FH, Stubeing RB. Interspecific relationships and biogeography of some Bornean tree shrews (Tupaiaidae: Tupaia), based on DNA hybridization and morphometric comparisons. *Biol J Linn Soc.* May 2000, Volume 70, Issue 1, Pages 1–14, <<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb00197.x>>.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature.* 2010 Mar 25;464(7288):554-561. doi: 10.1038/nature08845.
- Hansen DV, Lui JH, Flandin P, Yoshikawa K, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Kriegstein AR. Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nat Neurosci.* 2013 Nov;16(11):1576-87. doi: 10.1038/nn.3541.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):3196-201. doi: 10.1073/pnas.0308600100.
- Hehr U, Uyanik G, Aigner L, Couillard-Despres S, Winkler J. *DCX-Related Disorders.* 2007 Oct 19 [updated 2019 Feb 7]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021.
- Heide M, Haffner C, Murayama A, Kurotaki Y, Shinohara H, Okano H, et al. Human-specific *ARHGAP11B* increases size and folding of primate neocortex in the fetal marmoset. *Science.* 2020 Jul 31;369(6503):546-550. doi: 10.1126/science.abb2401.
- Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci.* 2009 Nov 9;3:31. doi: 10.3389/neuro.09.031.2009.
- Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH. Cellular scaling rules for primate brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3562-7. doi: 10.1073/pnas.0611396104.
- Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 8;103(32):12138-43. doi: 10.1073/pnas.0604911103.
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, et al. *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron.* 2001 Feb;29(2):353-66. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00211-2.
- Hofer H, Schultz AH, Starck D. *PRIMATOLOGIA, Handbuch der Primatenkunde, Systematik, Phlogenie, Ontogenie.* 1. Auflage. Basel und New York; S. Karger; 1956.

- Ida M, Shuo T, Hirano K, Tokita Y, Nakanishi K, Matsui F, et al. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J Biol Chem*. 2006 Mar 3;281(9):5982-91. doi: 10.1074/jbc.M507130200.
- Janecka JE, Miller W, Pringle TH, Wiens F, Zitzmann A, Helgen KM, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science*. 2007 Nov 2;318(5851):792-4. doi: 10.1126/science.1147555.
- Juranek J, Fletcher JM, Hasan KM, Breier JI, Cirino PT, Pazo-Alvarez P, et al. Neocortical reorganization in spina bifida. *Neuroimage*. 2008 May 1;40(4):1516-22. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.01.043.
- Juranek J, Salman MS. Anomalous development of brain structure and function in spina bifida myelomeningocele. *Dev Disabil Res Rev*. 2010;16(1):23-30. doi: 10.1002/ddrr.88.
- Kalebic N, Gilardi C, Albert M, Namba T, Long KR, Kostic M, et al. Human-specific *ARHGAP11B* induces hallmarks of neocortical expansion in developing ferret neocortex. *Elife*. 2018 Nov 28;7:e41241. doi: 10.7554/eLife.41241.
- Kelava I, Reillo I, Murayama AY, Kalinka AT, Stenzel D, Tomancak P, et al. Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb Cortex*. 2012 Feb;22(2):469-81. doi: 10.1093/cercor/bhr301.
- Kieffer F, Wallon M. Congenital toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013;112:1099-101. doi: 10.1016/B978-0-444-52910-7.00028-3.
- Kim MJ, Jung BK, Cho J et al. Exosomes Secreted by *Toxoplasma gondii*-Infected L6 Cells: Their Effects on Host Cell Proliferation and Cell Cycle Changes. *Korean J Parasitol*. 2016 Apr;54(2):147-54. doi: 10.3347/kjp.2016.54.2.147.
- Kaindl A, Boltshauser E, Schwabe GC, Bächli H. Springermedizin: Entwicklungsstörungen des Nervensystems.[Homepage]. Berlin: e.Medpedia. Ohne Jahr. Zitiert vom 02.03.2020. <https://www.springermedizin.de/emedpedia/paediatric/entwicklungsstoerungen-des-nervensystems?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-54671-6_250>.
- Kirkwood JK, Hubrecht R. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals, eight edition. Hoboken; Wiley-Blackwell; 2010.
- Knabe W, Kuhn HJ. Pattern of cell death during optic cup formation in the tree shrew *Tupaia belangeri*. *J Comp Neurol*. 1998 Nov 23;401(3):352-66. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981123)401:3<352::AID-CNE4>3.0.CO;2-A.

Knabe W, Washausen S. Early development of the nervous system of the eutherian *Tupaia belangeri*. *Primate Biol.* 2015; 2, 25–56. doi: 10.5194/pb-2-25-2015

Knabe W, Washausen S, Happel N, Kuhn HJ. Development of starburst cholinergic amacrine cells in the retina of *Tupaia belangeri*. *J Comp Neurol.* 2007 Jun 1;502(4):584-97. doi: 10.1002/cne.21324.

Knabe W, Washausen S, Happel N, Kuhn HJ. Diversity in mammalian chiasmatic architecture: ipsilateral axons are deflected at glial arches in the prechiasmatic optic nerve of the eutherian *Tupaia belangeri*. *J Comp Neurol.* 2008 May 20;508(3):437-57. doi: 10.1002/cne.21694.

Konerding WS, Brunke J, Schehka S, Zimmermann E. Is acoustic evaluation in a non-primate mammal, the tree shrew, affected by context? *Anim Cogn.* 2011 Nov;14(6):787-95. doi: 10.1007/s10071-011-0411-8.

König HE, Liebich H-G. Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 6. überarbeitete Auflage. Stuttgart; Schattauer; 2014.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:149-84. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.

Kriegstein A, Noctor S, Martínez-Cerdeño V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Nov;7(11):883-90. doi: 10.1038/nrn2008.

Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* 2003 Jul;43(1):37-43. doi: 10.1002/glia.10250.

Kuhn HJ, Schwaier A. Implantation, early placentation, and the chronology of embryogenesis in *Tupaia belangeri*. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1973 Dec 31;142(3):315-40. doi: 10.1007/BF00519135.

Kumar V, Hallström BM, Janke A. Coalescent-based genome analyses resolve the early branches of the euarchontoglires. *PLoS One.* 2013;8(4):e60019. doi: 10.1371/journal.pone.0060019.

LaMonica BE, Lui JH, Wang X, Kriegstein AR. OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2012 Oct;22(5):747-53. doi: 10.1016/j.conb.2012.03.006.

Langer P. Comparative Anatomy of the Gastrointestinal Tract in Eutheria; Taxonomy, Biogeography and Food, Volume 1: Introduction, Afrotheria, Xenarthra and Euarchontoglires. 1. Auflage. Berlin; De Gruyter; 2017.

Lewitus E, Kelava I, Huttner WB. Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Front Hum Neurosci*. 2013 Aug 1;7:424. doi: 10.3389/fnhum.2013.00424.

Li CH, Yan LZ, Ban WZ, Tu Q, Wu Y, Wang L, et al. Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Res*. 2017 Feb;27(2):241-252. doi: 10.1038/cr.2016.156.

Lin J, Chen G, Gu L, Shen Y, Zheng M, Zheng W, et al. Phylogenetic affinity of tree shrews to Glires is attributed to fast evolution rate. *Mol Phylogenet Evol*. 2014 Feb;71:193-200. doi: 10.1016/j.ympev.2013.12.001.

Manabe N, Hirai S, Imai F, Nakanishi H, Takai Y, Ohno S. Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. *Dev Dyn*. 2002 Sep;225(1):61-9. doi: 10.1002/dvdy.10139.

Marthiens V, French-Constant C. Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Rep*. 2009 May;10(5):515-20. doi: 10.1038/embor.2009.36.

Martínez-Cerdeño V, Camacho J, Ariza J, Rogers H, Horton-Sparks K, Kreutz A, et al. The Bat as a New Model of Cortical Development. *Cereb Cortex*. 2018 Nov. [Epub ahead of print in 2017]. 1;28(11):3880-3893. doi: 10.1093/cercor/bhx251.

Martínez-Cerdeño V, Cunningham CL, Camacho J, Antczak JL, Prakash AN, Cziep ME, et al. Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: evidence for an outer subventricular zone in rodents. *PLoS One*. 2012;7(1):e30178. doi: 10.1371/journal.pone.0030178.

Martínez-Cerdeño V, Noctor SC, Kriegstein AR. The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2006 Jul;16 Suppl 1:i152-61. doi: 10.1093/cercor/bhk017.

Mattle H, Mumenthaler M. *Neurologie*. 13. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. doi:10.1055/b-002-44918

McEvelly RJ, de Diaz MO, Schonemann MD, Hooshmand F, Rosenfeld MG. Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1528-32. doi: 10.1126/science.1067132.

McKusick VA (a). OMIM: Macrocephaly/Megalencephaly syndrom, autosomal recessive; mgcph. [Homepage]. Baltimore :John Hopkins University. 1986, [updated 2014]. Zitiert vom 06.10.2021. <<https://omim.org/entry/248000>>.

- McKusick VA (b). OMIM: Megalencephaly, autosomal dominant. [Homepage]. Baltimore: John Hopkins University. 1986. Zitiert vom 06.10.2021. <<https://omim.org/entry/155350>>.
- Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, et al. Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science*. 2011 Oct 28;334(6055):521-4. doi: 10.1126/science.1211028.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*. 2004 Jul;131(13):3133-45. doi: 10.1242/dev.01173.
- Moldenhauer JS, Flake AW. Open fetal surgery for neural tube defects. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2019 Jul;58:121-132. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2019.03.004.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jun;8(6):427-37. doi: 10.1038/nrn2151.
- Montiel JF, Vasistha NA, Garcia-Moreno F, Molnár Z. From sauropsids to mammals and back: New approaches to comparative cortical development. *J Comp Neurol*. 2016 Feb 15;524(3):630-45. doi: 10.1002/cne.23871.
- Mühl-Benninghaus R. Spina bifida [Spina bifida]. *Radiologe*. 2018 Jul;58(7):659-663. German. doi: 10.1007/s00117-018-0401-9.
- Namba T, Huttner WB. Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2017 Jan;6(1). doi: 10.1002/wdev.256.
- Neuhaus CP. Ethical issues when modelling brain disorders in non-human primates. *J Med Ethics*. 2018 May [Epub ahead of print in 2017];44(5):323-327. doi: 10.1136/medethics-2016-104088.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*. 2004 Feb;7(2):136-44. doi: 10.1038/nn1172.
- Norton TT, McBrien NA. Normal development of refractive state and ocular component dimensions in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Vision Res*. 1992 May;32(5):833-42. doi: 10.1016/0042-6989(92)90026-f.
- Nowakowski TJ, Pollen AA, Sandoval-Espinosa C, Kriegstein AR. Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron*. 2016 Sep 21;91(6):1219-1227. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.005.

O'Leary MA, Bloch JI, Flynn JJ, Gaudin TJ, Giallombardo A, Giannini NP, et al. Response to comment on "The placental mammal ancestor and the post-K-Pg radiation of placentals". *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):613. doi: 10.1126/science.1238162.

Orphanet (a). Megalencephaly. [Homepage]. ohne Jahr. Zitiert vom 05.10.2021. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=2290>.

Orphanet (b). Mikrozephalie, primäre, autosomal-rezessive. [Homepage]. ohne Jahr. Zitiert vom 05.10.2021. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=DE&data_id=732>.

Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1663-72. doi: 10.1634/stemcells.2007-0884.

Parlog A, Schlüter D, Dunay IR. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol*. 2015 Mar;37(3):159-70. doi: 10.1111/pim.12157.

Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016 Apr 21;374(16):1552-63. doi: 10.1056/NEJMra1602113.

Pilz GA, Shitamukai A, Reillo I, Pacary E, Schwausch J, Stahl R, et al. Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nat Commun*. 2013;4:2125. doi: 10.1038/ncomms3125.

Pirozzi F, Nelson B, Mirzaa G. From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. *Dialogues Clin Neurosci*. 2018 Dec;20(4):267-282. doi: 10.31887/DCNS.2018.20.4/gmirzaa.

Pohlert T. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R Package. 2014. Available at: <<https://cran.r-project.org/package=PMCMR>>

Pogledic I. Migrations- und Gyrierungsstörungen [Disorders of migration and gyration]. *Radiologe*. 2018 Jul;58(7):653-658. German. doi: 10.1007/s00117-018-0400-x.

Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*. 1972 May;145(1):61-83. doi: 10.1002/cne.901450105.

Rakic P. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*. 1995 Sep;18(9):383-8. doi: 10.1016/0166-2236(95)93934-p.

Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects-- Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016 May 19;374(20):1981-7. doi: 10.1056/NEJMSr1604338.

Reillo I, de Juan Romero C, García-Cabezas MÁ, Borrell V. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2011 Jul;21(7):1674-94. doi: 10.1093/cercor/bhq238.

Reiss-Zimmermann M, Weber D, Sorge I, Merckenschlager A, Hirsch W. Heterotopie, Polymikrogyrie, Lissenzephalie und Co - Malformationen der kortikalen Hirnentwicklung [Developmental malformations of the cerebral cortex]. *Rofo*. 2010 Jun;182(6):472-8. German. doi: 10.1055/s-0029-1245258.

Remple MS, Reed JL, Stepniewska I, Kaas JH. Organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). I. Architecture, microelectrode maps, and corticospinal connections. *J Comp Neurol*. 2006 Jul 1;497(1):133-54. doi: 10.1002/cne.20975.

Remple MS, Reed JL, Stepniewska I, Lyon DC, Kaas JH. The organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*): II. Connectional evidence for a frontal-posterior parietal network. *J Comp Neurol*. 2007 Mar 1;501(1):121-49. doi: 10.1002/cne.21226.

Remple MS, Reed JL, Stepniewska I, Kaas JH. Organization of frontoparietal cortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). I. Architecture, microelectrode maps, and corticospinal connections. *J Comp Neurol*. 2006 Jul 1;497(1):133-54. doi: 10.1002/cne.20975.

Robert Koch Institut (RKI). Antworten auf häufig gestellte Fragen: Zikavirus-Infektionen. [Homepage]. 24.10.2019. Zitiert vom 17.11.2019.
<<https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Zikavirus/Zikavirus-Infektionen.html>>.

Robert Koch Institut (RKI). Röteln RKI Ratgeber. [Homepage]. überarbeitete Fassung vom Mai 2020. Zitiert vom 05.08.2020.
<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Roeteln.html>.

Robert Koch Institut (RKI). Toxoplasmose. RKI Ratgeber. [Homepage]. 2018.
<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html#doc2390224bodyText2>.

Robert Koch Institut (RKI). Vorkommen und Bedeutung von *Toxoplasma gondii* in Deutschland, Erläuterungen zu einer Veröffentlichung in *Scientific Reports* vom 03.03.2016. [Homepage]. 2016. Zitiert vom 17.05.2019.
<https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Toxoplasmose/Toxoplasma_gondii_in_Deutschland.html>.

Rüsse I, Sinowatz F. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 3. Durchgesehene Auflage. Stuttgart; Parey; 2010.

Salomon F-V, Geyer H, Gille U. Anatomie für die Tiermedizin. 1. Auflage. Stuttgart; MVS Medizinverlage; 2005.

Sauerland C, Menzies BR, Glatzle M, Seeger J, Renfree MB, Fietz SA. The Basal Radial Glia Occurs in Marsupials and Underlies the Evolution of an Expanded Neocortex in Therian Mammals. *Cereb Cortex*. 2018 Jan 1;28(1):145-157. doi: 10.1093/cercor/bhw360.

Schehka S, Esser KH, Zimmermann E. Acoustical expression of arousal in conflict situations in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2007 Aug;193(8):845-52. doi: 10.1007/s00359-007-0236-8.

Schehka S, Zimmermann E. Acoustic features to arousal and identity in disturbance calls of tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Behav Brain Res*. 2009 Nov 5;203(2):223-31. doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.007.

Schehka S, Zimmermann E. Affect intensity in voice recognized by tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Emotion*. 2012 Jun;12(3):632-9. doi: 10.1037/a0026893.

Schnorr B, Kressin M. Embryologie der Haustiere. 6. Auflage. Stuttgart; Enke; 2011.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-82. doi: 10.1038/nmeth.2019.

Smart IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex*. 2002 Jan;12(1):37-53. doi: 10.1093/cercor/12.1.37.

Song S, Liu L, Edwards SV, Wu S. Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 11;109(37):14942-7. doi: 10.1073/pnas.1211733109.

Stancik EK, Navarro-Quiroga I, Sellke R, Haydar TF. Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J Neurosci*. 2010 May 19;30(20):7028-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6131-09.2010.

Stoffel MH. Funktionelle Neuroanatomie für die Tiermedizin. Stuttgart; Enke; 2011.

Sugitani Y, Nakai S, Minowa O, Nishi M, Jishage K, Kawano H, et al. Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev.* 2002 Jul 15;16(14):1760-5. doi: 10.1101/gad.978002.

Sur M, Weller RE, Kaas JH. Representation of the body surface in somatosensory area I of tree shrews, *Tupaia glis*. *J Comp Neurol.* 1980 Nov 1;194(1):71-95. doi: 10.1002/cne.901940105.

Tallinen T, Chung JG, Rousseau F, Girard N, Lefèvre J, Mahadevan L. On the growth and form of cortical convolutions. *Nature Phys.* 2016; 12(6) 588–593. doi: 10.1038/nphys3632.

Treble A, Juranek J, Stuebing KK, Dennis M, Fletcher JM. Functional significance of atypical cortical organization in spina bifida myelomeningocele: relations of cortical thickness and gyrification with IQ and fine motor dexterity. *Cereb Cortex.* 2013 Oct;23(10):2357-69. doi: 10.1093/cercor/bhs226.

Toma K, Hanashima C. Switching modes in corticogenesis: mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. *Front Neurosci.* 2015 Aug 11;9:274. doi: 10.3389/fnins.2015.00274.

Uyanik G, Hehr U. Angeborene Hirnfehlbildungen und geistige Behinderung. *Medgen.* 2009; 21(2): 217–223. doi: 10.1007/s11825-009-0165-8.

Veit J, Bhattacharyya A, Kretz R, Rainer G. Neural response dynamics of spiking and local field potential activity depend on CRT monitor refresh rate in the tree shrew primary visual cortex. *J Neurophysiol.* 2011 Nov;106(5):2303-13. doi: 10.1152/jn.00388.2011.

Vink R. Large animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Res.* 2018 Apr;96(4):527-535. doi: 10.1002/jnr.24079. Epub 2017 May 13.

Wang G, Gao M. Influence of *Toxoplasma gondii* on in vitro proliferation and apoptosis of hepatoma carcinoma H7402 cell. *Asian Pac J Trop Med.* 2016 Jan;9(1):63-6. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.12.013.

Wang X, Tsai JW, LaMonica B, Kriegstein AR. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci.* 2011 May;14(5):555-61. doi: 10.1038/nn.2807.

Washausen S, Obermayer B, Brunnett G, Kuhn HJ, Knabe W. Apoptosis and proliferation in developing, mature, and regressing epibranchial placodes. *Dev Biol.* 2005 Feb 1;278(1):86-102. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.10.016.

Westheide W, Rieger G. Spezielle Zoologie. Teil 2, Wirbel- oder Schädeltiere. 2. Auflage. Heidelberg; Spektrum Akademischer Verlag; 2010.

- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep*. 2016 Mar 3;6:22551. doi: 10.1038/srep22551.
- Wilson DE, Mittermeier RA. Handbook of THE MAMMALS OF THE WORLD. Vol 8: Insectivores, Sloths and Colugos. Barcelona; Lynx; 2018.
- Wilson DE, Reeder DM. Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. third edition. Baltimore; Johns Hopkins Univ. Press; 2005.
- Wimsatt J, Johnson JD, Wrigley RH, Biggins DE, Godbey JL. Noninvasive monitoring of fetal growth and development in the Siberian polecat (*Mustela eversmanni*). *J Zoo Wildl Med*. 1998 Dec;29(4):423-31. doi: keine.
- Wong P, Kaas JH. An architectonic study of the neocortex of the short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Brain Behav Evol*. 2009;73(3):206-28. doi: 10.1159/000225381.
- Wong P, Kaas JH. Architectonic subdivisions of neocortex in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Anat Rec (Hoboken)*. 2009 Jul;292(7):994-1027. doi: 10.1002/ar.20916.
- Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Sep;7(9):687-96. doi: 10.1038/nrn1954.
- Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci*. 2013 Apr 24;33(17):7368-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013.
- Xiao J, Liu R, Chen CS. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model. *Zool Res*. 2017 May 18;38(3):127-137. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.033.
- Yamashita A, Fuchs E, Taira M, Yamamoto T, Hayashi M. Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques. *J Med Primatol*. 2012 Jun;41(3):147-57. doi: 10.1111/j.1600-0684.2012.00540.x.
- Yao YG. Creating animal models, why not use the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*)? *Zool Res*. 2017 May 18;38(3):118-126. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.032.

8 Danksagung

Ich danke in erster Linie Frau Prof. Dr. Dr. Simone Fietz für ihre kontinuierliche Unterstützung und Ermutigung zur Fertigstellung dieser Dissertation.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Institutsmitarbeitern, die mich auf welchem Wege auch immer unterstützt haben.

Ich danke der Tiho Hannover, allen voran Frau Hassfurther für Ihre Unterstützung bei allen Fragen der Konzeption.

Ich danke Frau Herbert für die liebevolle Versorgung der Tiere in Leipzig.

Ich danke meinen Eltern für ihre mentale Unterstützung.

Ich danke Christin, die mir die Zeit gab meine Arbeit trotz „Job“ und Familie fertig zu stellen und natürlich Emma und Mattis für Ihr Verständnis dafür.

Ich danke David Jurisch für seine „technische“ Unterstützung.