

INHIBITORISCHE UND EXZITATORISCHE NEURONE  
DES COLLICULUS INFERIOR DER MAUS:  
IH-STRÖME UND ERREGENDE EINGÄNGE

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Victor Naumov

2021

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ursula Koch im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin im Zeitraum von Oktober 2012 bis Juni 2021 angefertigt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Ursula Koch

2. Gutachter: Prof. Dr. Gary R. Lewin

Disputation am 28. Oktober 2021

Моим дорогим маме и папе посвящается





**Inhaltsverzeichnis**

**Zusammenfassung..... V**

**Summary ..... VII**

**1 Einleitung..... 1**

**1.1 Das auditorische System der Säugetiere: Aufbau und Physiologie ..... 1**

    1.1.1 Wahrnehmung und Transduktion der akustischen Signale im Ohr..... 1

    1.1.2 Aufbau der Hörbahn von Säugetieren ..... 2

**1.2 Neuronenprofile und Verschaltungen im Colliculus inferior..... 6**

    1.2.1 Neurotransmitterphänotypen ..... 7

    1.2.2 Morphologie der Neurone ..... 7

    1.2.3 Molekulare Marker bei der Charakterisierung der Neurone ..... 8

    1.2.4 Physiologie der CIC-Neurone ..... 9

    1.2.5 Verschaltungen der Neurone im IC ..... 10

    1.2.6 GABAerge und glutamaterge Neurone im IC ..... 11

**1.3 HCN-Kanäle und Ih-Strom im auditorischen System ..... 13**

    1.3.1 Aufbau und Funktionsweise der HCN-Kanäle..... 13

    1.3.2 Physiologische Bedeutung des Ih im Gehirn..... 15

    1.3.3 HCN-Kanäle im auditorischen System..... 17

**1.4 Glutamaterge synaptische Übertragung im auditorischen System ..... 19**

    1.4.1 Funktionsweise der glutamatergen Synapse..... 19

    1.4.2 Signaltransduktion über AMPA-Rezeptoren..... 21

    1.4.3 AMPA-Rezeptoren im auditorischen System ..... 23

**1.5 Fragestellung im Kontext des aktuellen Forschungsstandes..... 23**

**2 Methodik..... 26**

**2.1 Tiermodell: Die transgene VGAT-ChR2-EYFP-Maus..... 26**

**2.2 Verifizierung der inhibitorischen und exzitatorischen Neurone in der VGAT-ChR2-EYFP-Maus..... 27**

**2.3 Präparation der Gehirnschnitte für die Patch-Clamp Experimente..... 30**

<b>2.4 Patch-Clamp Setup.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 Lösungen in den Patch-Clamp Experimenten.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Datenerfassung .....</b>	<b>33</b>
<b>2.7 Designs der elektrophysiologischen Experimente und Datenanalyse.....</b>	<b>33</b>
2.7.1    CIC – das Zielgebiet.....	33
2.7.2    Pharmakologisch isolierte Ih-Ströme .....	34
2.7.3    Membraneigenschaften und AP-Feuermuster .....	35
2.7.4    Miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme (mEPSC).....	36
2.7.5    Evozieren der exzitatorischen postsynaptische Ströme und Aktionspotentiale in CIC-Neuronen mittels der Stimulation der Fasern des Lemniscus lateralis .....	37
<b>2.8 Statistik.....</b>	<b>40</b>
<b>2.9 Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie .....</b>	<b>40</b>
2.9.1    Perfusion, Präparation der Gehirnschnitte und IHC-Färbung .....	40
2.9.2    Füllung der Neurone mit den fluoreszierenden Farbstoffen während Patch- Clamp Experimenten.....	43
2.9.3    Konfokalmikroskopie .....	43
2.9.4    Quantitative Auswertung der KLSM-Aufnahmen .....	44
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Teil 1. Ih-Ströme in inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen.....</b>	<b>47</b>
3.1.1    Unterschiedliche Ih-Ströme in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen 47	
3.1.2    GABAerge Neurone waren positiv für HCN4- und negativ für HCN1- Immunreaktivität .....	50
3.1.3    Die AP-Feuermuster der GABAergen Neurone waren adaptierend, nicht- GABAergen Neurone zeigten unterschiedliche Feuermuster .....	52
3.1.4    AP-Adaptationsraten der GABAergen und nicht-GABAergen Neurone unterschieden sich geringfügig .....	56
<b>3.2 Teil 2. AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Eingänge an inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen .....</b>	<b>59</b>
3.2.1    Schnellere Kinetik und variablere Stromamplituden der mEPSC in inhibitorischen Neuronen im Vergleich zu exzitatorischen Neuronen .....	59

3.2.2	Erregende LL-Eingänge an inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen unterschieden sich hinsichtlich Kinetik und Amplitudenvariation voneinander .....	62
3.2.3	Glutamatrezeptor 4 (GluR4)-Expression in GABAergen Neuronen, aber keine GluR4-Expression in nicht-GABAergen Neuronen.....	65
3.2.4	Latenzunterschiede der erregenden synaptischen Ströme an LL-Eingängen an exzitatorischen und inhibitorischen CIC-Neuronen.....	67
3.2.5	Stimulation der Axone in LL evozierte in inhibitorischen CIC-Neuronen Aktionspotentiale mit einer längeren Latenz als in exzitatorischen Neuronen.....	74
3.2.6	Mehr als zwei Drittel der VGAT-positiven Neurone erhalten somatische Eingänge, die den vesikulären Glutamattransporter 2 (VGluT2) exprimieren .....	76
3.2.7	GABAerge Neurone: Schnelle erregende Eingänge mit langer Latenz korrelieren mit der VGluT2-Expression in perisomatischen Synapsen.....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Ih-Ströme in inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen .....</b>	<b>84</b>
4.1.1	Exzitatorische und inhibitorische Neurone im CIC exprimieren unterschiedliche HCN-Untereinheiten und weisen unterschiedliche Eigenschaften der Ih-Ströme auf.....	85
4.1.2	GABAerge Neurone waren homogen in ihren Ih-Strom Eigenschaften und AP-Feuermuster.....	86
4.1.3	Eine kleine Population der exzitatorischen CIC-Neurone ähneln den Neuronen der medialen und lateralen oberen Olive.....	88
<b>4.2</b>	<b>Unterschiedliche AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Eingänge an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen im CIC.....</b>	<b>89</b>
4.2.1	Schnelle Glutamatrezeptor 4 (GluR4) vermittelte Eingänge an den GABAergen Neuronen vs. langsamere, nicht-GluR4-Eingänge an den glutamatergen Neuronen .....	90
4.2.2	Mögliche feed-forward Erregung der GABAergen und direkte Erregung der glutamatergen CIC-Neurone über Lemniscus lateralis .....	95
4.2.3	GABAerge CIC-Neurone mit VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen als mögliches Ziel der feed-forward Erregung aus dem LL.....	99
<b>4.3</b>	<b>Schnelle AMPA-Rezeptoren und langsame Ih-Ströme in inhibitorischen CIC-Neuronen mit somatischen VGluT2-positiven Eingängen .....</b>	<b>103</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>105</b>

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen .....</b>	<b>127</b>
<b>Beteiligungserklärung .....</b>	<b>128</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>129</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>130</b>

## Zusammenfassung

Akustische Informationen werden in den Hirnstammnuklei der Hörbahn verarbeitet und konvergieren auf ihrem Weg zum auditorischen Cortex in dem Colliculus inferior (IC, engl.) des Mittelhirns, insbesondere in seinem zentralen Nukleus (CIC). Der CIC stellt ein Relais dar, in dem neben bilateralen aufsteigenden Projektionen auch kommissurale, intrinsische und von höheren Gehirnregionen absteigende Projektionen verarbeitet werden. Trotz der bedeutenden Rolle des IC bei der neuronalen Verarbeitung der akustischen Signale sind die unterschiedlichen Neuronentypen sowie, deren Verschaltungen noch nicht ausreichend charakterisiert. In dieser Arbeit wurden die inhibitorischen (GABAergen) und exzitatorischen (glutamatergen) CIC-Neurone hinsichtlich ihrer Membraneigenschaften – Ih-Ströme und erregende Eingänge – mittels elektrophysiologischer Experimente an Gehirnschnitten, sowie immunhistochemischen (IHC-) Färbungen in jungen adulten Mäusen (postnatales Alter über 22 Tage) verglichen. Für diese Experimente wurde der transgene Mausstamm VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 verwendet. Dieser Mausstamm exprimiert unter dem Promotor für den vesikulären GABA/Glycin Transporter (VGAT) *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) und *channelrhodopsin 2* (ChR2), wodurch es möglich ist GABAerge und nicht-GABAerge (glutamaterge) Neurone visuell und anhand ihrer Reaktion auf optogenetische Stimulation zu unterscheiden.

Die HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel*, engl.) bzw. deren physiologische Korrelat – hyperpolarisations-aktivierende Strom (Ih, engl.) tragen zur Integration der synaptischen Eingänge in der aufsteigenden Hörbahn bei, ihr Vorkommen im IC wurde bereits gezeigt. Die Fragen, ob die Expression verschiedener HCN-Isoformen (HCN1, 2 und 4), Ih-Ströme, sowie Antworten der Neurone auf die hyper- und depolarisierenden Strominjektionen spezifisch für GABAerge und glutamaterge Neurone im IC sind, blieb bisher unbeantwortet. Messungen der pharmakologisch isolierten Ih-Ströme zeigten, dass alle GABAergen Neurone der Stichprobe langsam-aktivierende Ih-Ströme mit mittleren Amplituden aufweisen. Die glutamatergen Neurone waren stattdessen variabel in ihren Ih-Eigenschaften, dabei zeigte ein Teil der Neurone schnell-aktivierende Ih-Ströme mit hohen Amplituden. Die positive Immunreaktivität (IR) für die schnell-aktivierenden HCN1- in den Zellmembranen von exzitatorischen Neuronen und positive IR für die langsam-aktivierenden HCN4-Kanäle um die Somata der inhibitorischen Neurone unterstützen diese Funde. Beide Neuronengruppen waren positiv für die HCN2-IR. Des Weiteren wurden die Eigenschaften der Ih-Ströme und Neurotransmitterphänotyp mit dem Aktionspotential-(AP)-Feuermuster, das mittels depolarisierender Strominjektionen gemessen wurde, korreliert. Alle GABAergen Neurone zeigten ein adaptierendes AP-Feuermuster, das ähnlich dem der meisten glutamatergen Neurone war. Glutamaterge Neurone zeigten zu *ca.* 15% Onset-AP-Feuermuster, das immer in Kombination mit dem schnell aktivierenden und in seiner Amplitude großen Ih-Strom auftrat. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HCN-Kanäle 1 und 4 zwischen den Neuronentypen im CIC unterschiedlich verteilt sind und dass sie mit dem Neurotransmitterphänotyp und AP-Feuermuster korrelieren. Im Kontrast zu anderen Gehirnregionen ähnelten im CIC die GABAergen Neurone *ca.* zu einem Drittel der glutamatergen

Neurone hinsichtlich ihrer Membraneigenschaften und AP-Feuermuster. Die restlichen glutamatergen Neurone konnten hinsichtlich ihrer Ih-Eigenschaften und AP-Feuermuster in mindestens drei weiteren Populationen aufgeteilt werden.

Die Glutamatrezeptoren aus der Gruppe der AMPA-Rezeptoren (GluR), u.a. die Rezeptoren mit der Untereinheit 4 (GluR4-UE), die schnelle Kinetik aufweist, sind für die zeitlich genaue Signalübertragung im auditorischen System bedeutend. Somit wurde (a) die Expression der GluR4-UE und des vesikulären Glutamatttransporters 2 (VGluT2), (b) die Eigenschaften der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs, engl.) und (c) die mögliche Verschaltung der aufsteigenden glutamatergen Projektionen, über den Lemniscus lateralis (LL), zum IC mit dem Neurotransmitterphänotyp der CIC-Neurone korreliert. Die IHC-Färbung gegen die GluR4-UE zeigte, dass die meisten GABAergen Neurone der Stichprobe diese exprimieren, während die glutamatergen Neurone keine GluR4-IR aufwiesen. Elektrophysiologische Messungen der miniatur EPSCs (mEPSCs) und der EPSCs, die durch die elektrische Stimulation der Axonen im LL in CIC-Neuronen evoziert wurden, unterstützen diese Ergebnisse, da die Kinetik der (m)EPSCs bei den meisten GABAergen Neuronen deutlich schneller als bei den glutamatergen Neuronen war. Ferner war die Latenz der durch LL-Stimulation evozierten EPSCs und APs bei den GABAergen Neuronen fast doppelt so lang und viel variabler wie bei den glutamatergen Neuronen. Dies könnte auf eine Verschaltung über mehr als eine Synapse hindeuten, bzw. dass die Erregung aus dem LL über *feed-forward* (engl.) Verschaltung zu einem AP bei den GABAergen Neuronen führt. Glutamaterge Neurone werden stattdessen vermutlich über die direkten Eingänge aus dem LL angeregt. Die IHC-Färbung gegen VGluT2 zeigte, dass *ca.* 2/3 der GABAergen CIC-Neurone von somatischen VGluT2-positiven Synapsen umgeben sind. Konsistent dazu wurde gezeigt, dass die Mehrheit der GABAergen Neurone, die nach den elektrophysiologischen Experimenten auf die VGluT2-Expression in perisomatischen Eingängen verifiziert wurden, EPSCs mit schneller Kinetik und langer Latenz aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass diese Population der GABAergen CIC-Neurone ein mögliches Ziel der schnellen GluR4-vermittelten *feed-forward* Erregung aus dem LL sein könnten.

Die Expression der schnellen GluR4-Rezeptoren und die Präsenz vieler VGluT2-positiver somatischer Synapsen korrelieren vermutlich bei einer großen Population der GABAergen Neurone mit der Expression der langsam aktivierenden HCN4-Kanäle und heben somit diese Neuronengruppe von den, in ihren Membraneigenschaften variablen glutamatergen CIC-Neuronen ab. Die HCN4-Kanäle könnten die Summation, der an diesen GABAergen Neuronen konvergierenden erregenden aufsteigenden Eingänge begünstigen und somit zur Verarbeitung der Schallinformationen im IC beitragen.

## Summary

Acoustic information is processed in brainstem nuclei of the auditory pathway and converges on its way to the auditory cortex in the inferior colliculus (IC) in the midbrain, especially in its central nucleus (CIC). CIC represents a relay in which bilateral ascending projections as well as commissural, intrinsic, and descending projections from higher brain regions are processed. Despite the important role of IC in neuronal processing of acoustic signals, the different neuron-types as well as their circuitry have not yet been sufficiently characterized. Herewith, inhibitory (GABAergic) and excitatory (glutamatergic) CIC neurons were compared with respect to their membrane properties –  $I_h$  currents and excitatory inputs by means of electrophysiological experiments on brain slices and immunohistochemical (IHC) stainings in young adult mice (older than postnatal day 22). An optogenetic approach in transgenic mouse strain VGAT-ChR2-EYFP line 8, in which enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) and channel rhodopsin 2 (ChR2) are expressed under the promoter for vesicular GABA/glycine transporter (VGAT), allowed to distinguish GABAergic and non-GABAergic (glutamatergic) neurons.

The hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels (HCN) or their physiological correlate – hyperpolarization-activating current ( $I_h$ ) contribute to the integration of synaptic inputs in the ascending auditory pathway and have already been shown in IC. Whether expression of HCN isoforms (HCN1, 2 and 4),  $I_h$  currents as well as responses of neurons to hyperpolarizing and depolarizing current injections are neurotransmitter specific in IC remained open. Measurements of pharmacologically isolated  $I_h$ -currents show that all GABAergic neurons in the sample showed slow-activating  $I_h$  currents with intermediate amplitudes. Instead, the glutamatergic neurons were variable in their  $I_h$  properties, with a proportion of neurons showing fast-activating  $I_h$  currents with high amplitudes. Positive immunoreactivity (IR) for the fast-activating HCN1 channels in the cell membranes of excitatory neurons and positive IR for the slow-activating HCN4 channels around the somas of inhibitory neurons support these findings. Both groups of neurons show IR for HCN2. Furthermore, properties of  $I_h$  currents and neurotransmitter phenotype were correlated with action potential firing patterns measured by depolarizing current injections. All GABAergic neurons showed adapting firing patterns, which was similar in most glutamatergic neurons. Glutamatergic neurons showed to about 15% onset AP firing pattern which always occurred in combination with the fast-activating  $I_h$  current with large amplitude. These results indicate that HCN channels 1 and 4 are differentially distributed among neuron types in CIC and that they correlate with the neurotransmitter phenotype and firing pattern. In contrast to other brain regions, GABAergic neurons in CIC resembled approximately one-third of glutamatergic neurons in terms of their membrane properties and firing patterns. The remaining glutamatergic neurons could be divided into at least three other populations according to their  $I_h$  and firing patterns.

Glutamate receptors from the group of AMPA receptors (GluR), including the fast kinetics receptor subunit 4 (GluR4), are important for temporally accurate signal transmission in the auditory system. Thus, (a) expression of GluR4 and vesicular glutamate transporter 2

(VGluT2), (b) properties of excitatory post synaptic currents (EPSCs) as well as (c) putative wiring of the ascending glutamatergic Projections *via* lateral lemniscus (LL) to IC was correlated with the neurotransmitter phenotype of CIC neurons. IHC staining against the GluR4 showed that most of the GABAergic neurons in the sample expressed it, whereas the glutamatergic neurons did not exhibit GluR4-IR. Electrophysiological recordings in CIC of miniature EPSCs (mEPSCs) and EPSCs, which were electrically evoked *via* stimulation of Axons in LL, support these findings. Most GABAergic neurons showed significantly faster EPSC-kinetic than glutamatergic neurons. Furthermore, the latency of evoked EPSCs and action potentials was almost twice so long in GABAergic neurons and much more variable as in glutamatergic neurons. This could indicate circuitry with more than one synapse, or rather that excitation from the LL leads to an AP in GABAergic neurons *via* feed-forward circuitry. In contrary, glutamatergic neurons are likely excited *via* direct inputs from the LL. IHC staining against VGluT2 showed that approximately 2/3 of GABAergic CIC neurons are surrounded by somatic VGluT2-positive synapses. Consistently, most GABAergic neurons verified for VGluT2 expression in somatic synapses were shown to exhibit EPSCs with fast kinetics and long latency. This suggests that this population of GABAergic CIC neurons may be a possible target of fast GluR4-mediated feed-forward excitation from the LL.

Expression of fast-kinetic GluR4 receptors and VGluT2 in somatic synapses presumably correlate in a large population of GABAergic neurons with the expression of the slow-activating HCN4 channels, thus distinguishing them from the glutamatergic CIC-neurons with their variable membrane properties. The HCN4 channels could favor the summation of ascending excitatory inputs, which converge in GABAergic neurons, thus contribute to the processing of sound information in IC.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das auditorische System der Säugetiere: Aufbau und Physiologie

Die Schallwellen sind ein unentbehrlicher Teil unserer Umgebung und werden von vielen Tieren als ein wichtiger Informationsträger genutzt. Sie ermöglichen inner- und zwischenartliche Kommunikation, Feind- und Beutedetektion, Orientierung im Raum oder geben Aufschlüsse über die Beschaffenheit von Gegenständen. Die Wahrnehmung der Schallereignisse sowie die neuronale Verarbeitung der mit den Schallwellen übertragenen Informationen wird durch das auditorische System umgesetzt. Somit stellt das auditorische System ein Komplex aus dem schallwahrnehmenden Organ – dem Ohr – und neuronalen Strukturen, die auditorische Informationen verarbeiten und integrieren, dar. Während der Evolution entstanden in vielen Tiergruppen vielfältig konzipierte Schalldetektionsorgane. Die Funktion dieser Organe ist jedoch ähnlich und besteht daraus, physikalische Komponenten des Schalls wie die Frequenz der Druckschwankungen der Luft, ihre Amplitude (Schalldruck), die Schallenergie (Schallintensität) und den zeitlichen Verlauf der Amplitudenmodulation mittels mechano-elektrischer Transduktion in neuronale Aktivität umzuwandeln. Zu den neuronalen Strukturen gehört die Hörbahn, die aus bilateralen neuronalen Netzwerken (auditorische Nuklei) und Projektionsbahnen besteht und zum auditorischen Cortex führt. Diese neuronalen Komponenten geben Rückschlüsse auf den räumlichen Ursprung der Schallereignisse (Schalllokalisation) und deren Bedeutung.

### 1.1.1 *Wahrnehmung und Transduktion der akustischen Signale im Ohr*

Das schallwahrnehmende Organ der Säugetiere ist das Ohr. Dieses wird anatomisch in Außen-, Mittel- und Innenohr unterteilt. Das Außenohr des Menschen besteht aus der Ohrmuschel, die in den Gehörgang übergeht, welches mit einem Trommelfell endet. Alle Schallereignisse werden vom Außenohr gesammelt, verstärkt und auf das Trommelfell übertragen, welches dadurch in Schwingungen versetzt wird. Im Mittelohr werden die Schwingungen des Trommelfells über die drei Gehörknöchelchen auf die Membran des ovalen Fensters ins Innenohr übertragen. Die Gehörknöchelchen passen die niedrige Impedanz der Luft an die hohe Impedanz der Innenohrflüssigkeiten an. Im Innenohr befindet sich die Cochlea, in der die Hörwahrnehmung stattfindet. Der cochleäre Schlauch wird mit der Basilar- und der Reissner-Membran in Kammern unterteilt, die mit der Peri- bzw. Endolymphe gefüllt sind. Nachdem die Schallwellen nun das Außen- und das Mittelohr passieren, erzeugen sie Druckschwankungen auf dem ovalen Fenster des Innenohrs. Dieses verursacht seinerseits Druckschwankungen der Perilymphe, was wiederum in Auf- und Abwärtsbewegungen (Wanderwelle) der Basilarmembran endet. An der Basilarmembran befindet sich das Corti-Organ, in

dem die mechano-elektrische Transduktion stattfindet. Im Corti-Organ liegen die Hörrezeptoren: die inneren und äußeren Haarzellen. Die Haarzellen weisen auf ihren Spitzen Stereocilien auf. Unmittelbar über dem Corti-Organ liegt die Tektorialmembran. Diese steht im mechanischen Kontakt zu den Stereocilien der äußeren Haarzellen (Schmidt et al. 2006). Die Stereocilien sind miteinander über die tip-link-Filamente zu einem Bündel zusammengefasst. Geht eine Wanderwelle durch die Basilarmembran, werden die Stereocilien aus ihrer ursprünglichen Position versetzt. (Pickles et al. 1984, Siemens et al. 2004). An den Spitzen der Stereocilien befinden sich für  $K^+$  durchlässige *transient receptor potential*-Kanäle. Bei der Auslenkung der Stereocilien interagieren diese Kanäle mit tip-link-Filamenten und werden geöffnet. Dies führt zu einem  $K^+$ -Einstrom in das Innere der Haarzelle. Abhängig von der Auslenkungsrichtung führt das zur Hyper- oder Depolarisation der Haarzellenmembran und zur Entstehung des Rezeptorpotentials (Lewis and Hudspeth 1983, Schmidt et al. 2006).

Die Basilarmembran breitet sich zur Cochleaspitze hin aus und ist am Beginn der Cochlea steifer als an ihrer Spitze. Die Kombination dieser Eigenschaften macht die Verbreitungsweite der Druckwanderwelle von der Frequenz ihrer Schwankungen abhängig: Eine hochfrequente Wanderwelle propagiert nur am steifen und breiten Beginn der Basilarmembran, während eine tieffrequente Wanderwelle bis an die Spitze der Basilarmembran vordringt. Diese frequenzabhängige Wanderwellenverbreitung ist die Grundlage der Tonotopie der Cochlea: Hochfrequente Töne regen die Haarzellen am Beginn der Basilarmembran, tieffrequente an ihrem Ende (von Békésy 1960, Ehret 1978). Äußere Haarzellen verstärken die Amplitude der Wanderwelle bei niedrigem Schalldruckpegel (Nobili et al. 1998). Des Weiteren wird die Schallwelle, die durch die Haarzellen des Corti-Organ in die neuronale Aktivität (Rezeptorpotential) transduziert wurde, über die bipolaren Neurone des Spiralganglions in den cochleären Nucleus (CN) der Hörbahn weitergeleitet (Ryugo and Parks 2003).

### **1.1.2 Aufbau der Hörbahn von Säugetieren**

Die Hörbahn fängt in der Cochlea an und verläuft über den Hirnstamm (Hinterhirn und Mittelhirn) zum Vorderhirn (Zwischenhirn und Endhirn). Sie besteht aus einer Reihe der bilateral angeordneten auditorischen Nuklei. Die Nuklei sind über die in Richtung des auditorischen Cortex verlaufenden – aufsteigenden, oder aus der Richtung des Cortex verlaufenden – absteigenden (*feed-back*, engl.) sowie kommissuralen Projektionen verbunden. Die auf- und absteigenden Projektionen können ipsi- und kontralateraler Natur sein. Außerdem verfügen die auditorischen Nuklei über intrinsische neuronale Verbindungen. Auch nicht-auditorische Eingänge enden an den Neuronen der Hörbahn sowie *vice versa* (Cant and Oliver 2018).

Im Folgenden wird die Hörbahn der Säugetiere aus der Perspektive der zu dem Colliculus inferior (engl. *inferior colliculus*, IC) und weiter zum auditorischen Cortex (AC) verlaufen-

den aufsteigenden auditorischen Projektionen beschrieben (Abb. 1, A). Die von dem auditorischen Cortex und IC absteigenden auditorischen Bahnen werden zusammenfassend am Ende des Kapitels erläutert. Es werden die aus dem Englischen stammenden Abkürzungen der anatomischen Bezeichnungen verwendet.

Die exzitatorischen Afferenzen von den äußeren und inneren Haarzellen der Cochlea werden über den auditorischen Nerv (achten Hirnnerv) in den cochleären Nukleus (CN), eingespeist (Abb. 1, A) (Ryugo and Parks 2003). Der CN wird in dorsalen und ventralen CN unterteilt (DCN und VCN). Der VCN wird weiterhin in den antero-ventralen und postero-ventralen CN – den AVCN bzw. PVCN aufgeteilt (Cant and Benson 2003). Im CN bilden die Axone der äußeren Haarzellen unterschiedlich große Synapsen, unter anderem die großen Synapsen an den sphärischen Bushy-Neuronen (engl. *spherical bushy cells*) des AVCN, die so genannten *endbulb of Held* (engl.) (Held 1893, Sento and Ryugo 1989). Die Eingänge aus Cochlea verteilen sich im VCN und DCN tonotop – anatomisch sortiert nach der Frequenz des Schalls (Kaltenbach and Lazor 1991). Das Prinzip der tonotopen Verarbeitung der akustischen Information, das in der Cochlea etabliert ist (von Békésy 1960, Ehret 1978), bleibt in allen weiteren Nuklei (im IC, Abb. 1, B) der Hörbahn vorzufinden (Osen 1972, Friauf 1992). Dem DCN wird die monoaurale Schalllokalisierung, Schallintensitätsverarbeitung und Integrationsfunktion zugeschrieben. Der CN bekommt kommissurale, intrinsische sowie absteigende Projektionen von den nachgeschalteten auditorischen Nuklei (inclusive des IC (Malmierca et al. 1996)) und dem auditorischen Cortex oder nicht-auditorischen Regionen (Cant and Oliver 2018, Rubio 2018).

Der CN projiziert zum IC (Osen 1972), dem medialen Kniehöcker (engl. *medial geniculate body*, MGB) (Malmierca et al. 2002) und dem oberen Olivenkomplex (engl. *superior olivary complex*, SOC) (Friauf and Ostwald 1988). Letzteres besteht bei den Nagetieren aus mehreren Nuklei: mediale und laterale obere Olive (engl. *medial superior olive*, MSO und *lateral superior olive*, LSO), medialer, lateraler und ventraler Nukleus des Trapezkörpers (engl. *medial/lateral/ventral nucleus of trapezoid body*, MNTB, LNTB und VNTB) sowie superiore paraolivärer Nukleus (SPN) (Abb. 1, A) (Cant and Oliver 2018). Die LSO und MSO (MSO ist unterrepräsentiert bei Mäusen (Fischl et al. 2016)) spielen eine entscheidende Rolle bei der Schalllokalisierung in der horizontalen Ebene. Bei der Lokalisierung der Quelle der tief-frequenten Töne werden die interauralen Laufzeitunterschiede (engl. *interaural time difference*, ITD) und bei den hochfrequenten Tönen – die interauralen Lautstärkeunterschiede (engl. *interaural level difference*, ILD) ausgewertet (Grothe et al. 2010). Bei der ITD-Auswertung enden die exzitatorischen ipsi- und kontralateralen Projektionen der sphärischen Bushy-Neurone der AVCN an den Koinzidenzdetektor-Neuronen der MSO (Goldberg and Brown 1969, Lindsey 1975, Grothe et al. 2010).

Im Fall der ILD-Auswertung erhalten die LSO-Neurone erregende ipsilaterale Eingänge von den sphärischen Bushy-Neuronen der AVCN (Friauf and Ostwald 1988) und simultane glycinerge Eingänge von den ebenso ipsilateralen MNTB-Neuronen (Spangler et al. 1985, Wenthold et al. 1987). Letzteren erhalten die erregenden Eingänge von den globularen Bushy-Neuronen aus dem kontralateralen AVCN (Harrison and Warr 1962). Dank dieser Verschaltung erhält jeder LSO-Kern bei der binauralen akustischen Stimulation die kontralateral induzierte Inhibition aus dem ipsilateralen MNTB und die ipsilaterale Erregung aus dem AVCN (Grothe et al. 2010). Die globularen Bushy-Neurone (engl. *globular bushy cells*) des AVCN bilden an inhibitorischen primären Neuronen des MNTB riesige axo-somatische glutamaterge Synapsen – *calyx of Held* (engl.) (Held 1893, Morest 1968, Smith et al. 1991).

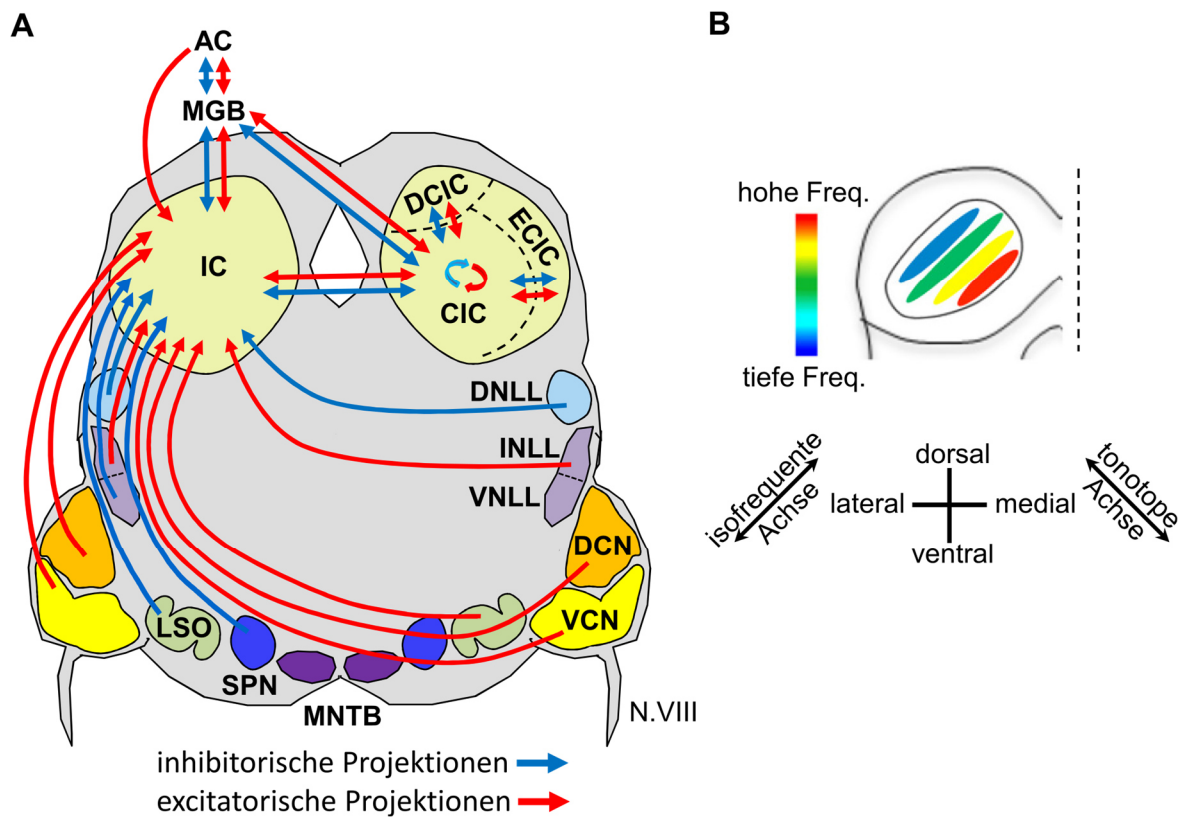


Abb. 1. Schematische Darstellung der wichtigsten Nuklei in der Hörbahn von Mäusen auf einem koronalen Gehirnschnitt (A). Aufsteigende Projektionen zu dem Colliculus inferior (IC), dem medialen Kniehöcker (engl. *medial geniculate body*, MGB) und auditorischen Cortex (AC) sind übersichtshalber nur an der linken Hemisphäre und die intrinsischen IC-Projektionen auf der rechten Hemisphäre gezeigt. Exzitatorische Projektionen sind rot und inhibitorische Projektionen blau gekennzeichnet. Achter Hirnnerv (N.VIII) von der Cochlea zu dem cochleären Nucleus: ventrale- und dorsale cochleäre Nuclei (VCN und DCN); laterale superiore Olive (engl. *lateral superior olive*, LSO); medialer Nucleus des Trapezkörpers (engl. *medial nucleus of trapezoid body*, MNTB); superiore paraolivärer Nucleus (SPN); dorsale, intermediäre und ventrale Nuclei von dem Lemniscus lateralis (DNLL, INLL, VNLL); zentraler Nucleus sowie dorsaler und externer Cortex von IC (CIC, DCIC und ECIC). Die mediale superiore Olive, die bei den Mäusen unterrepräsentiert ist (Fischl et al. 2016) und der laterale und ventrale Nucleus des Trapezkörpers sind übersichtshalber nicht gezeigt. Schematische Darstellung der tonotopischen Organisation von CIC an einer koronalen Sektion der linken IC-Hälfte (B). B – nach Sturm et al. 2014, verändert.

Des Weiteren verläuft die aufsteigende Hörbahn zu dem Nukleus des Lemniscus lateralis (engl. *nucleus of the lateral lemniscus*, NLL) im Pons (Abb. 1, A). Der NLL wird in den dorsalen, intermediären und ventralen Nukleus unterteilt (DNLL, INLL, VNLL) (Cant and Oliver 2018). Eingänge zu den VNLL und INLL stammen überwiegend aus dem kontralateralen VCN. Der DNLL erhält bilaterale Eingänge aus dem CN (Glendenning et al. 1981), der LSO und MSO (Shneiderman et al. 1988), sowie Eingänge von dem kontralateralen DNLL *via* Kommissur von Probst (Glendenning et al. 1981, Chen et al. 1999).

Fast alle beschriebenen auditorischen Nuklei senden ipsi- und/oder kontralaterale inhibitorische und/oder exzitatorische Eingänge zum auditorischen Mittelhirn – dem IC (Abb. 1, A). Außerdem verbinden exzitatorische und inhibitorische kommissurale Projektionen die rechte und linke IC-Hälfte (Saldaña and Merchañ 1992, González-Hernández et al. 1996). Aufgrund der Cytochrome-Oxidase-Färbung, Morphologie der Dendriten und Ausrichtung der Axone, die fibro-dendritische Laminae bilden wird der IC in den zentralen Nukleus (engl. *central nucleus of inferior colliculus*, CIC) sowie den dorsalen und externen (lateralen) Cortex von IC (engl. *dorsal/external cortex of inferior colliculus*, DCIC, bzw. ECIC) unterteilt (Abb. 1, A) (Oliver and Morest 1984, Paxinos and Franklin 2004, Cant and Benson 2005). Der ECIC wird in drei Schichten unterteilt, wobei Schicht 2 durch Inseln der GABAergen-Neurone gekennzeichnet ist (Paxinos and Franklin 2004, Loftus et al. 2008). Die o.g. Regionen des IC sind über GABAerge und glutamaterge Projektionen mit einander verbunden (Chen et al. 2018).

Die aufsteigenden Projektionen zum IC sind wie folgt organisiert (Abb. 1, A). Die ipsi- und kontralateralen Eingänge des CNs (VCN: AVCN und PVCN; DCN) zum IC sind glutamaterg (Ito and Oliver 2010) und sind im CIC tonotop organisiert – sie geben die Tonotopie der Cochlea wieder (Osen 1972). Die tonotope Achse des CIC verläuft dorso-medial, die isofrequente Axis verläuft dorso-lateral und parallel zu der anatomisch definierten fibro-dendritischen Lamina, (Abb. 1, B) (Malmierca et al. 2008). Die ipsilateralen MSO- und kontralateralen LSO-Eingänge zum IC sind glutamaterg (Ito and Oliver 2010), die ipsilateralen LSO-Eingänge sind stattdessen glycinerg (Saint Marie and Baker 1990). Die SPN-Projektionen zum IC sind GABAerg (González-Hernández et al. 1996, Saldaña et al. 2009). Der DNLL sendet bilaterale GABAerge (González-Hernández et al. 1996) und INLL – bilaterale (in der Maus) glutamaterge Eingänge zum IC (Frisina et al. 1998, Ito and Oliver 2010). Die ipsilateralen Projektionen aus dem VNLL sind inhibitorisch (GABA, Glycin oder beides) (Saint Marie and Baker 1990, González-Hernández et al. 1996). Des Weiteren erhält der IC (DCIC, CIC) auch absteigende ipsi- und kontralaterale glutamaterge Projektionen aus dem auditorischen Cortex, (Saldaña et al. 1996, Winer et al. 2002). Auch nicht-auditorische Regionen u.a.: Amygdala (Marsh et al. 2002), somatosensorische Cortex (Robards 1979), superioren Colliculus (Coleman and Clerici 1987), Retina (Itaya and Van Hoesen 1982), subparafasziculare thalamische Nukleus (SPF) (Nevue et al. 2016) projizieren zum IC.

Dem IC ist über das Brachium vom IC der MGB bilateral nachgeschaltet (Abb. 1, A) (Kudo and Niimi 1978, Andersen et al. 1980). Diese im Zwischenhirn liegende Struktur des auditorischen Thalamus wird in ventrale, mediale und dorsale Regionen unterteilt (Winer and Schreiner 2005). Der Ventrale MGB erhält überwiegend die ipsilateralen aufsteigenden GABA- und glutamatergen Eingänge aus dem CIC (Winer et al. 1996, Peruzzi et al. 1997) und wird als die Fortsetzung der Hörbahn zum auditorischen Cortex betrachtet (Cant and Oliver 2018). Der dorsale und mediale MGB erhalten Eingänge aus allen IC-Regionen (Mellott et al. 2014). Des Weiteren enden aufsteigende Projektionen vom CN (Schofield et al. 2014), LL (Bajo et al. 1993) und SOC (Henkel and Spangler 1983) im MGB.

Die aufsteigenden auditorischen Projektionen enden im Endhirn – dem auditorischen Cortex (AC, Abb. 1, A,) (Kratz and Manis 2015). Der Informationsfluss endet jedoch nicht im AC, denn er hat extensive Verbindungen zu den weiteren kortikalen Regionen (Kraus and Canlon 2012) sowie unterschiedliche absteigende Projektionen u.a. zum IC (Saldaña et al. 1996, Winer et al. 2002).

Die Komplexität der Hörbahn wird neben aufsteigenden Projektionen, über die von unterschiedlichen auditorischen Kerngebieten absteigenden Projektionen vervollständigt. Der AC projiziert zum MGB (Andersen et al. 1980) und topographisch zum IC (Herbert et al. 1991, Saldaña et al. 1996, Winer et al. 2002). Der IC projiziert zum ipsilateralen DNLL und bilateralen CN (Caicedo and Herbert 1993), INLL, VNLL und SOC (Thompson and Thompson 1993, Malmierca et al. 1996) sowie zu nicht auditorischen Kerngebieten (Schweizer 1981). Die absteigenden Projektionen aus dem IC reichen u.a. über Verschaltungen im olivokochleären System (Vetter et al. 1993) bis zu den äußeren Haarzellen in der Cochlea (Mulders and Robertson 2000, 2002).

## **1.2 Neuronenprofile und Verschaltungen im Colliculus inferior**

Der IC ist einer der größten Nuklei in dem auditorischen Mittelhirn und stellt in der aufsteigenden Hörbahn das erste Integrationszentrum dar. Im IC treffen sowohl aufsteigende Projektionen, die von der Cochlea aus über auditorische Nuklei eintreffen, als auch absteigende Eingänge aus kortikalen und subkortikalen Regionen, kommissurale Projektionen und intrinsische neuronale Netzwerke aufeinander (Abb. 1, A) (Winer and Schreiner 2005). Im Vergleich zu den vorgeschalteten auditorischen Nuklei macht der IC einen Sprung in der funktionalen Komplexität: Es integriert die schalllokalisations- und schallidentifikationsbezogenen Informationsströme (Pickles 2008). Da die IC-Neurone selektiv auf die Frequenz (tonotopie Organisation des IC, Abb. 1, B) sowie den zeitlichen Verlauf des Schalls reagieren, ist der IC bei der Identifikation der Kommunikationssignale – Sprache – beteiligt. (Portfors and Sinex 2005, Winer and Schreiner 2005, Felix et al. 2018). Ferner ist der IC nicht nur in die Verarbeitung auditorischer Informationen verantwortlich, sondern zeigt auch lokomotionsbezogene neuronale Aktivität (Yang et al. 2020) und ist bei der Ausführung des akustisch

induzierten Fluchtverhaltens beteiligt (Xiong et al. 2015). Solchen vielfältigen und komplexen integrativen Funktionen des IC liegen neben der Konvergenz der zahlreichen Projektionen auch unterschiedliche Neuronenprofile und deren Verschaltungen zu Grunde.

Zur Klassifizierung der Neuronenprofile von IC-Neuronen werden solche Merkmale wie Neurotransmitter, Morphologie, physiologische (Membran-)Eigenschaften, molekulare Marker, Auftrennung nach dem Ursprung und Ziel der synaptischen Eingänge und Antworten auf akustische Stimulation *in vivo* genutzt. In nicht-auditorischen Gehirnarealen wie Neocortex und Hippocampus konnten anhand solcher Merkmale viele unterschiedliche Typen der GABAergen Neurone (Interneurone) bereits unterschieden werden (Markram et al. 2004, Rudy et al. 2011). Im Folgenden werden die Erkenntnisse über die IC-Neuronenprofile und die Verschaltungen der IC-Neurone zusammengefasst.

### **1.2.1 Neurotransmitterphänotypen**

Der Anteil der GABAergen Neurone an allen IC-Neuronen beträgt abhängig von der Tierart 20-30% (Ito and Malmierca 2018). Bei Hausmeerschweinchen machen die GABAergen Neurone *ca.* 21%, (Mellott et al. 2014), bei den Ratten *ca.* 25% (Malmierca et al. 2005) und bei den Katzen *ca.* 20% des Gesamtanteils aus (Oliver et al. 1994). Die restlichen Neurone im IC benutzen Glutamat als Neurotransmitter (Ito et al. 2011, Ito and Oliver 2012). Glycinerge Neurone im IC wurden nicht nachgewiesen. Der Glycinetransporter (GlyT), der für solche Neurone charakteristisch ist (Aubrey et al. 2007), konnte in den IC-Neuronen nicht gezeigt werden (Tanaka and Ezure 2004). Die GABAergen Neurone sind im CIC gleichverteilt, weisen jedoch inhibitorische „Inseln“ in der zweiten Schicht des ECICs auf (Chernock et al. 2004).

### **1.2.2 Morphologie der Neurone**

Morphologisch werden CIC-Neurone in disk- (flache) und sternförmige Nervenzellen unterteilt (Oliver and Morest 1984, Malmierca et al. 1993). Diskförmige Neurone machen die Mehrheit der IC-Neurone aus und verbleiben mit ihrem Dendritenbaum und Axonen innerhalb der isofrequenten (und gleichzeitig fibrodendritischen) Lamina, während die sternförmigen Neurone ihre Dendritenbäume und Axone über mehrere Laminae erstrecken und somit vermutlich zur Integration der unterschiedlichen Frequenzen beitragen (Oliver et al. 1991). Die disk- und sternförmigen IC-Neurone können GABA oder Glutamat als Neurotransmitter verwenden (Oliver et al. 1994, Ono et al. 2005).

Die GABAergen Neurone haben durchschnittlich größere Somadurchmesser als nicht-GABAergen Neurone. Sie sind die größten Nervenzellen im IC (Oliver et al. 1994, Ito et al. 2009). Im Vergleich zu Nagetieren sind die Somata GABAerger Neurone im IC von Menschen durchschnittlich kleiner als die der glutamatergen (Mansour et al. 2019).

### 1.2.3 Molekulare Marker bei der Charakterisierung der Neurone

Der vesikuläre Glutamattransporter (VGluT) ermöglicht den Transport von Glutamat aus dem Zytoplasma in die synaptischen Vesikel der glutamatergen Synapsen (Fremeau et al. 2001). Somit kann dieser als molekularer Marker der glutamatergen Eingänge eingesetzt werden (Fujiyama et al. 2001). Es sind drei Typen von VGluT bekannt: VGluT1, VGluT2 und VGluT3 (Takamori 2006), wobei VGluT3 nicht im IC vertreten ist (Ito et al., 2009). Die VGluT1-positiven axo-dendritischen präsynaptischen Endigungen wurden an den exzitatorischen Neuronen detektiert (Altschuler et al. 2008). Die koexprimierenden VGluT1/VGluT2 (Eingänge aus dem AVCN und PVCN) werden ebenso an exzitatorischen IC-Neuronen nachgewiesen (Ito et al. 2009, 2011). Die perisomatischen glutamatergen Eingänge an den GABAergen Neuronen sind ausschließlich VGluT2-positiv (Ito et al. 2009, 2015, Geis and Borst 2013).

Neben dem VGluT werden die perineuronalen Netze (PN) zur Charakterisierung der GABAergen Neurone genutzt. In Kombination mit VGluT2 können vier Subpopulationen der GABAergen Neurone im IC unterscheiden werden. Das sind Neurone ohne PN und VGluT2-Eingänge, Neurone mit PN und VGluT2 sowie Neurone mit ausschließlich PN oder VGluT2-Eingängen. Dabei weisen die VGluT2+/PN+ GABAerge Neurone größere Soma-durchmesser als die glutamatergen Neurone auf (Beebe et al. 2016). Die kleineren VGluT2- und PN-negativen GABAergen Neurone machen im Vergleich zu den anderen drei Neuronenpopulationen den größten Anteil von allen inhibitorischen Projektionen zum MGB aus (Beebe et al. 2018).

Des Weiteren konnten GABAergen IC-Neurone anhand der Expression von Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), aber nicht vom  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein Parvalbumin (PV) in PV+/NOS+ und PV+/NOS- Neurone aufgetrennt werden. Die Glutamatergen Neurone waren stattdessen überwiegend NOS-positiv und konnten nur aufgrund ihrer Expression von Parvalbumin aufgetrennt in PV-/NOS+ vs. PV+/NOS+ unterschieden werden (Fujimoto et al. 2017).

Anhand des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP), eines weiteren molekularen Markers, wurde eine Klasse der glutamatergen, sternförmigen Neurone (*ca.* 20% dieser IC-Neurone) charakterisiert. Diese Neurone erhalten die exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge von dem kontralateralen IC. Auch die direkten exzitatorischen oder *feed-forward* inhibitorischen Eingänge aus dem DCN enden an diesen Neuronen. Die VIP-Neurone projizieren zum MGB, kontralateralen IC, SOC und superioren Colliculus (Goyer et al. 2019).



### 1.2.4 Physiologie der CIC-Neurone

Neurone im CIC wurden anhand ihrer Antworten auf de- und hyperpolarisierende Strominjektionen in Gehirnschnitten der jungen Ratten (<P17) in sechs Typen unterteilt. Zur Klassifizierung der Neurone werden das zeitliche Erscheinungsbild der Aktionspotentiale (AP) – AP-Feuermuster und der Ausmaß an Adaptation des AP-Feuermusters – Veränderung der AP-Frequenz mit der Zeit, herangezogen (Sivaramakrishnan and Oliver 2001). Die Onset-Neurone produzieren nur wenige APs am Anfang der depolarisierenden Strominjektion und machen 8,6% der CIC-Neurone aus. Die restlichen IC-Neurone produzieren APs während der ganzen Dauer der Depolarisation und werden als *sustained*-Neurone (hier und weiter sind die Begriffe aus dem Englischen kursiv) definiert. Die *sustained regular* Neurone machen 19,2 % der CIC-Neurone aus und feuern die APs mit ungefähr gleichen inter-AP-Intervallen. Sie zeigen somit eine niedrige Adaptation der AP-Feuerrate. Neurone, bei denen das erste inter-AP-Intervall deutlich länger als die restlichen ist (A-Typ-Strom, K<sup>+</sup>), werden als *pause/buildup* gekennzeichnet und machen 12,5% der CIC-Neurone aus. Neurone, die nur ein AP, bzw. eine AP-Salve unmittelbar nach dem Ende der hyperpolarisierenden Strominjektion aufweisen, werden als *rebound*-Neurone (bzw. *rebound-AP*, im Weiteren Rebound) genannt. Sie werden anhand ihres AP-Feuermusters in die tonischen *rebound regular* (10,6%), phasischen *rebound adapting* (25%) und stark phasischen *rebound transient* (21,1%) Neurone unterteilt (Sivaramakrishnan and Oliver 2001). Diese physiologischen Parameter korrelieren nicht mit der Morphologie der Neurone. Die beschriebenen Neuronentypen sind nicht immer deutlich voneinander abgrenzbar (Peruzzi et al. 2000, Sivaramakrishnan and Oliver 2001).

Bei den hyperpolarisierenden Strominjektionen zeigen einige Neuronentypen im IC die hyperpolarisations-aktivierende Spannungseinsackung (*Ih-sag*, wobei I für Strom steht), den hyperpolarisations-aktivierenden Spannungshügel (*Ih-hump*) oder Rebound-AP (Sivaramakrishnan and Oliver 2001, Koch and Grothe 2003, Ono et al. 2005, Tan et al. 2007). Dies deutet auf die Expression der hyperpolarisations-aktivierenden Ionenkanäle in den Membranen dieser Nervenzellen (HCN-Kanäle, *hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel*) hin. Da die vorliegende Arbeit unter anderem der Charakterisierung dieser Kanäle im CIC gewidmet ist, werden diese in einem separaten Kapitel behandelt (Seite 13).

Die GABAergen Neurone im IC werden anhand der *Ih*-Ströme und des Adaptationsausmaßes ihres AP-Feuermusters in vier Gruppen unterteilt: tonisch-feuernde (regulär-feuernde und *pauser/builtup*) sowie phasisch-feuernden (mit und ohne den *Ih-hump*). Dabei kommen die Neurone, die ein Afterhyperpolarisationspotential bilden überwiegend im DCIC und ECIC vor. Die tonisch-feuernden Neurone wurden im CIC nachgewiesen. (Ono et al. 2005). Die glutamatergen IC-Neurone wurden insgesamt weniger intensiv erforscht als die GABAergen Neurone. Die gleiche Studie (Ono et al. 2005) zeigte dennoch, dass Antworten dieser

Neurone auf die de- und hyperpolarisierenden Strominjektionen eine Vielfalt in der Membran- und AP-Feurmuster-Eigenschaften aufdeckt. Es wurden regulär-feuernde, phasisch-feuernde (unterschiedlich stark adaptierend) und schnell-feuernde (*fast-spiking*) sowie Onset-Neurone beschrieben. Dabei unterschieden sich die AP-Feurmuster der regulär-feuernden glutamatergen Neurone wenig von denen der GABAergen Neurone. Dennoch hebt die Präsenz der schnell-feuernden- sowie die Abwesenheit der *pause/buildup*-Neurone sie von den GABAergen Neuronen ab. Darüber hinaus zeigen glutamaterge Neurone variable Ausprägungen des *Ih-hump*.

### 1.2.5 Verschaltungen der Neurone im IC

Die neuronalen Verbindungen werden oft aus der Perspektive des Neurotransmitters beschrieben. Bedingt durch Neurotransmitterphänotypen der IC-Neurone (Seite 7) sind intrinsische (innerhalb vom Nukleus) Verschaltungen GABA- oder glutamaterg. Die Projektionen, die in den IC eingehen (detailliert auf Seite 2) setzen neben Glutamat und GABA auch Glycine als Neurotransmitter ein (Buentello et al. 2015). Andere Neurotransmitter treten im IC nur diffus auf (Ito and Malmierca 2018).

Die neuronalen Verschaltungen im IC wurden in tonotop organisierten zentralen Nukleus des IC (CIC) erforscht. Es wird vermutet, dass die isofrequenten fibro-dendritischen Laminae im CIC eine Basis für die unterschiedliche funktionale Felder bildet. Diese Felder überlappen sich mit den so genannten synaptischen Domänen: IC-Regionen, wo die vorgeschalteten auditorischen Nuklei ihre Projektionen einspeisen (Ito and Malmierca 2018). Im IC wurden folgenden funktionalen Felder nachgewiesen: (a) kaudaler CIC, erhält Projektionen aus dem kontralateralen CN und ipsilateralen VNLL und zeigt Sensitivität für monoaurale akustische Stimuli, (b) dorsaler CIC erhält Projektionen aus der MSO und ipsilateralen LSO und zeigt Sensitivität für ITD-Stimulation, (c) rostraler CIC erhält bilaterale Projektionen aus dem SOC und zeigt ebenfalls ITD-Sensitivität (Loftus et al. 2010). Ferner überlappen sich auch die synaptischen Domänen. Die Projektionen aus dem kontralateralen DNLL überlappen sich mit denen aus dem ipsilateralen LSO. Sie bleiben jedoch getrennt von den kontralateralen DCN- und LSO-Projektionen (Fathke and Gabriele 2009). Die Projektionen der synaptischen CIC-Domänen, die zu MGB aufsteigen, verbleiben überwiegend parallel (Cant and Benson 2007).

Die letzten Studien zeigen, dass sich IC-Regionen hinsichtlich der Eingänge an ihren inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen unterscheiden. Für den CIC (*IC-core*, engl.) wurde gezeigt, dass die exzitatorischen Neurone Eingänge von unterschiedlichen Kombinationen der auditorischen Nuklei erhalten. Die inhibitorischen Neurone bekommen ihre Eingänge stattdessen von der gleichen Kombination der Nuklei (Chen et al. 2018). Die Eingänge an den glutamatergen Neuronen stammen dabei aus: INLL, DCN, LSO, VCN (AVCN und

PVCN) (Ito and Oliver 2010, Chen et al. 2018) Somit könnten diese Neuronentypen unterschiedliche funktionale Felder im IC (Loftus et al. 2010) repräsentieren.

CIC-Neurone bilden neben den absteigenden und aufsteigenden axonalen Projektionen auch zahlreiche axonale Kollaterale zu den lokalen Neuronen. Dabei bilden sie intralaminare wie auch interlaminare Projektionen. Studien der letzten Dekade deuten auf zahlreiche Interneurone im IC hin (Ito and Malmierca 2018). So wurde für eine Klasse der GABAergen Neurone – den großen GABAergen Neurone (engl. *large GABAergic neurons*, LG-Neurone, Ito et al. 2009) gezeigt, dass sie glutamaterge Eingänge von den lokalen und kommissuralen Neuronen erhalten (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Außerdem erhalten Dutzende in der gleichen fibro-dendritischen (isofrequenten) Lamina liegenden LG-Neurone axo-somatische Eingänge von einem einzigen lokalen glutamatergen Neuron. Da einzelne lokale exzitatorische Neurone nur wenige somatische Eingänge auf einem LG-Neuron bilden, wird vermutet, dass die LG-Neurone innerhalb der Lamina Eingänge von den zahlreichen lokalen exzitatorischen Neuronen integrieren und ihrerseits zum MGB projizieren (Ito and Oliver 2014). In dem CIC der Maus wurde gezeigt, dass die exzitatorischen als auch inhibitorischen Netzwerke bereits in dem postnatalen Alter von zwei Tagen entwickelt sind. Diese Netzwerke liegen in der gleichen fibro-dendritischen Lamina und überlappen sich. Dabei bildet sich nach dem Einsetzen des Hörvermögens die Dominanz der inhibitorischen über die exzitatorischen Netzwerke (Sturm et al. 2014). Des Weiteren wurden die GABAergen CIC-Neurone in Bezug auf die Balance zwischen lokalen inhibitorischen und exzitatorischen Eingängen in zwei Gruppen differenziert: Eine mit Prävalenz der inhibitorischen über die exzitatorische Eingänge und die andere mit entgegengesetztem Verhältnis der Eingänge, wobei die Inhibition in dieser Gruppe minimal ist. Die glutamatergen Neurone waren in dieser Hinsicht ähnlich der ersten Gruppe der GABAergen Neurone (Sturm et al. 2017).

### ***1.2.6 GABAerge und glutamaterge Neurone im IC***

Anhand der molekularen synaptischen Marker und Tracerinjektionen wurde bis jetzt nur unter GABAergen Neuronen eine Klassifizierung in die funktionalen Gruppen durchgeführt. Im IC von unterschiedlichen Säugetieren inklusive der Maus wurden zwei Klassen der GABAergen Neurone anhand deren Morphologie und der exzitatorischen Eingängen charakterisiert (Ito et al. 2016). Eine Klasse dieser Neurone sind die großen (Ratte, Soma-Diameter  $> 16,5 \mu\text{m}$ ) GABAergen Neurone (bereits erwähnt, LG-Neurone). Sie weisen zahlreiche somatische glutamaterge (VGlut2-positive und VGlut1-negative) Eingänge auf. Die zweite Klasse beinhaltet die kleinen GABAergen Neurone (engl. *small GABAergic neuron*, SG-Neurone) mit Soma-Diameter  $< 10,7 \mu\text{m}$ . Diese Neurone weisen keine VGlut2-vermittelten somatischen Eingänge auf. Im CIC der Ratte zeigen *ca.* 50% (von Autoren berichtet 73%) aller GABAergen Neurone viele somatische VGlut2-positive Eingänge auf. Die Nervenzellen mit einem intermediären Soma-Durchmesser weisen gemischte Eigenschaften auf (Ito et

al. 2009, Ito and Oliver 2012). LG-Neurone erhalten deutlich mehr axo-somatische erregende Eingänge als SG- oder glutamaterge Neurone. LG- als auch SG-Neurone erhalten deutlich mehr erregende axo-dendritische Eingänge als glutamaterge Neurone. Ferner bekommen LG-Neurone deutlich mehr inhibitorische axo-dendritische Eingänge als glutamaterge Neurone. Anzahl der inhibitorischen axo-somatischen Eingänge ist zwischen den LG-, SG- und glutamatergen Neuronen nicht unterschiedlich (Ito 2020).

Die somatischen VGluT2-Eingänge an den LG-Neuronen entstammen aus dem INLL, SOC, DCN, von kommissuralen Projektionen sowie den lokalen IC-Neuronen. Dabei können am Soma eines LG-Neurons Eingänge von mehreren auditorischen Nuklei konvergieren (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Absteigende kortikale Eingänge im IC sind VGluT1-positiv und VGluT2-negativ (Fujiyama et al. 2001) und bilden somit nicht die somatischen VGluT2-Eingänge an LG-Somata. Auch aufsteigende erregende Projektionen aus dem VCN bilden nicht die VGluT2-positiven Synapsen an LG-Somata (Ito et al. 2009).

Der Ursprung der somatischen Eingänge an den LG-Neuronen korreliert mit der IC-Region. LG-Neurone im CIC erhalten glutamaterge Eingänge überwiegend aus dem kontralateralen DCN, dem ipsi- und kontralateralen SOC und ipsilateralen INLL, während die Neurone im Cortex von IC überwiegend ipsilaterale INLL-Eingänge erhalten. Auch innerhalb des CIC findet eine Auftrennung der Eingangsquellen statt. Der kontralaterale DCN projiziert überwiegend zu den LG-Neuronen in dem ventralen und kaudalen CIC, die SOC-Eingänge decken den lateralen und rostralen Teil ab und der INLL den dorsalen und rostralen CIC (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Die LG-, SG- und exzitatorischen IC-Neurone erhalten GABAerge und/oder glycinerge Inhibition (Malmierca et al. 2005, Ito 2020).

Ito konnte die LG-, SG- und glutamatergen Neurone hinsichtlich ihrer Antworten auf die akustischen Stimuli *in vivo* charakterisieren. LG-Neurone zeigen breitere Tuningkurven sowie stärkere Antworten auf die frequenz-modulierte Stimuli als die SG- oder glutamatergen Neurone. Dementgegen sind weder Bestfrequenz, noch Antworten auf ipsi-, kontra- und bilaterale Pegelunterschiede oder die Latenz der Antworten auf Bestfrequenzöne bzw. Rauschen-Pulse zwischen diesen Neuronengruppen unterschiedlich (Ito 2020). Des Weiteren können glutamaterge Neurone (bzw. deren Feuerraten) besser den amplituden-modulierten Stimuli folgen als die GABAerge Neurone (Ono et al. 2017). Ono und Kollegen zeigen bei *ca.* der Hälfte der glutamatergen und GABAergen CIC-Neurone eine Sensitivität zu den interauralen Laufzeitunterschieden (ITD) (Ono et al. 2020).

In einer *in vivo* Studie in der Maus wurde gezeigt, dass akustische Stimulation EPSCs in den großen GABAergen DCIC-Neuronen mit einer kürzeren Latenz als in den kleineren GABAergen Neuronen hervorruft. Diese GABAergen Neurone leiten eine schnelle *feed-forward* Inhibition zum MGB (Geis and Borst 2013). Eine andere Studie zeigte, dass die IPSCs, die im Brachium des IC evoziert wurden, früher als die EPSCs im MGB registriert werden (Pezuzzi et al. 1997). Ito und Kollegen zeigten, dass 82% der LG-Neurone zum MGB projizieren

(Ito et al. 2009). Anhand dieser Evidenzen wird vermutet, dass LG-Neurone die Quelle der schnellen *feed-forward* Inhibition zum MGB darstellen (Ito and Malmierca 2018). Die letzten Studien konnten dennoch belegen, dass kleine GABAerge Neurone ohne somatische VGluT2-positive Eingänge den größten Anteil von allen inhibitorischen Projektionen zum MGB ausmachen (Beebe et al. 2018).

### 1.3 HCN-Kanäle und Ih-Strom im auditorischen System

Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Ionenkanäle in den Membranen der Neurone bestimmt im Wesentlichen ihre Physiologie und Funktion. Eines dieser Kanäle sind die spannungsabhängigen ionenselektiven Porenschleifen-Kationenkanäle mit der englischsprachigen Abkürzung HCN – *hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel*. Wie aus der Bezeichnung hervorgeht werden sie, im Gegensatz zu den meisten spannungsgesteuerten Ionenkanälen, über die Hyper- und nicht über die Depolarisation aktiviert. Aus diesem Grund wird der durch die HCN-Öffnung hervorgerufene Kationenstrom – Ih-Strom, vom englischen *hyperpolarisation current*, wobei I für Formelzeichen der elektrischen Stromstärke steht, genannt (Biel et al. 2009). Eine weitere Besonderheit der HCN-Kanäle besteht darin, dass sie über eine direkte Interaktion mit dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) (DiFrancesco and Tortora 1991) oder auch mit dem zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) moduliert werden können (Ludwig et al. 1998). Bei Wirbeltieren wurden sie im Herz (Brown et al. 1979, Yanagihara and Irisawa 1980, DiFrancesco 1981), Gehirn, Rückenmark (Halliwell and Adams 1982, Maccaferri et al. 1993, Milligan et al. 2006) und peripheren Nervensystem (Chaplan et al. 2003) nachgewiesen. Sie bilden die Grundlage der kardialen (Schrittmacherpotential) (Brown et al. 1979, Yanagihara and Irisawa 1980) und neuronalen (McCormick and Pape 1990) Rhythmizität. Darüber hinaus beeinflussen sie den Ruhemembranpotential (Lupica et al. 2001, Nolan et al. 2007), die Integration axo-dentritischer Eingänge (Magee 1999) und die synaptische Signalübertragung (Beaumont and Zucker 2000), die Entstehung der Langzeitpotenzierung (LTP) (Nolan et al. 2004) oder die zeitliche Integration der visuellen Stimuli in der Retina (Demontis et al. 1999). In dem auditorischen System wurden die HCN-Kanäle bzw. Ih-Ströme ebenso mehrfach beschrieben (Banks et al. 1993, Golding et al. 1995, 1999, Smith 1995, Santoro et al. 2000, Koch and Grothe 2003, Koch et al. 2004, Notomi and Shigemoto 2004, Leao et al. 2006, Oertel et al. 2009, Khurana et al. 2012, Baumann et al. 2013, Rusznák et al. 2013, Caspari et al. 2015).

#### 1.3.1 Aufbau und Funktionsweise der HCN-Kanäle

Die HCN-Kanäle in den Säugetieren werden von vier Genen kodiert (HCN1-4) und bestehen aus vier Untereinheiten (UE), die um eine Pore organisiert sind (Ludwig et al. 1998, 1999, Ishii et al. 1999, Wahl-Schott and Biel 2009). Die Untereinheiten können Homo- und Heterotetramere, mit Ausnahme der HCN2- und HCN3-Heteromeren, bilden. Die Isoformen der

HCN-Kanäle unterscheiden sich in ihrer Kinetik, Spannungsabhängigkeit und cAMP-Sensitivität (Ludwig et al. 1999, Moosmang et al. 2001, Altomare et al. 2003, Much et al. 2003, Baruscotti et al. 2010).

Die Aktivierung der HCN-Kanäle resultiert in einem Einwärtsstrom von  $\text{Na}^+$ - und Auswärtsstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen, im Verhältnis ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ ) 0,2 bis 0,4. Der  $\text{Na}^+$ -Einstrom hängt dabei stark von der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration ab (Pape 1996). Eine relativ niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität wurde HCN4-Isoformen nachgewiesen (Yu et al. 2004). Das Umkehrpotential des I<sub>h</sub>-Stromes liegt bei -35 bis -40 mV (Bal and Oertel 2000, Funahashi et al. 2003).

HCN-Kanäle öffnen bei Membranpotentialen zwischen -45 und -60 mV, in der Nähe des Ruhemembranpotentials, und schließen bei den positiven Membranpotentialen. Die Deaktivierung der HCN-Kanäle ist nicht spannungsabhängig (Pape 1996, Ludwig et al. 2003). Sie werden von den extrazellulären  $\text{Cs}^+$ -Ionen sowie von dem Antagonisten ZD-7288 blockiert. HCN-Kanäle sind nicht sensitiv für  $\text{Ba}^+$  (Blocker von *inward rectifier* (engl.)  $\text{K}^+$ -Kanälen ( $\text{K}_{\text{ir}}$ )), Tetraethylammonium (TEA) sowie 4-Aminopyridin (Blocker der spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle) (DiFrancesco 1982, Ludwig et al. 1998, Bal and Oertel 2000).

Die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung (Strom-Spannungskurve) unterliegt einer sigmoidalen Abhängigkeit und wird mit Hilfe der Boltzmannfunktion beschrieben (Abb. 2, C). Als Mittelpunkt auf der Kurve wird dabei das halbmaximale Aktivierungspotential bestimmt (Abb. 2, C, rote Punktierlinie). Die halbmaximale Aktivierung variiert zwischen den HCN-Isoformen, dabei findet sie bei HCN1 bei positiveren Spannungen als bei HCN4 statt (Ludwig et al. 1999, Moosmang et al. 2001, Altomare et al. 2003). Die cAMP und cGMP sind zwar nicht ausreichend um HCN-Kanäle zu öffnen (dafür ist Hyperpolarisation notwendig), sie modulieren jedoch das Potenzial der halbmaximalen Aktivierung in Richtung der weniger negativen Spannungen (DiFrancesco and Tortora 1991). Die HCN1- und HCN3-Kanäle sind am wenigsten sensitiv für cAMP, während die HCN2 und HCN4 wesentlich stärker davon moduliert werden (Viscomi et al. 2001, Altomare et al. 2003, Stieber et al. 2005).

Die Kinetik der HCN-Kanäle wird über die Aktivierungszeitkonstanten beschrieben. Diese werden über die einfachen oder doppelten exponentiellen Trendlinien bestimmt (Banks et al. 1993, Biel et al. 2009). Die Kinetik der HCN-Kanäle hängt maßgeblich von der Zusammensetzung der Untereinheiten des Kanals ab (Abb. 2, A) (Santoro et al. 2000, Moosmang et al. 2001, Altomare et al. 2003).

Die HCN1-Isoform besitzt die schnellste Kinetik: 30-300 ms, und die höchste halbmaximale Aktivierungsspannung (-70 bis -90 mV) im Vergleich zu den anderen drei HCN-Isoformen (Abb. 2, A, C). Die HCN4-Kanäle besitzen die langsamste Kinetik: Die Aktivierungszeitkonstanten, abhängig von der Höhe der hyperpolarisierenden Spannung, liegen zwischen Hunderten von Millisekunden und einigen Sekunden. Die halbmaximale Aktivierung von

HCN4 und HCN2 liegt zwischen -70 und -100 mV. Die Aktivierungszeitkonstante und halbmaximale Aktivierung von HCN2 und HCN3 liegen zwischen denen von HCN1 und HCN4 (Ishii et al. 1999, 2001, Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999, Santoro et al. 2000, Stieber et al. 2005).

### 1.3.2 *Physiologische Bedeutung des Ih im Gehirn*

HCN-Kanäle werden von den Spannungen in der Nähe des Ruhemembranpotentials geöffnet. Deswegen beeinflussen sie maßgeblich das Ruhemembranpotential (Lupica et al. 2001, Ludwig et al. 2003, Nolan et al. 2007). Grundsätzlich verfügen die HCN-Kanäle über eine persistierende funktionale Dualität. Sie können sowohl der Hyper- als auch der Depolarisation der Membran entgegenwirken. Wenn die HCN-Kanäle z. B. durch eine hyperpolarisierende Strominjektion aktiviert werden, ermöglichen sie einen depolarisierenden  $\text{Na}^+$ -Einwärtsstrom; im Gegenteil, wenn die Zelle depolarisiert wird, begünstigen sie die Hyperpolarisation, indem sie inaktiviert werden. Auf diese Weise trägt Ih zur Stabilisierung des Membranpotentials sowohl bei inhibitorischen als auch exzitatorischen Stimuli bei. Die Aktivierung und Deaktivierung der HCN-Kanäle wird bei den hyper- und depolarisierenden Strominjektionen anhand einer Spannungseinsackung – so genannten *Ih-sag* (engl.) gut sichtbar (Abb. 2, B) (Nolan et al. 2007, Biel et al. 2009). Der nach dem Ende der hyperpolarisierenden Strominjektion entstehende *Ih-hump* (engl. Hügel) begünstigt das Entstehen des so genannten Rebound-AP (Koch and Grothe 2003, Nagtegaal and Borst 2010). Außerdem senkt der Ih-Strom den Eingangswiderstand der Neurone und beschleunigt die Membranzeitkonstante (Golding et al. 1995, Bal and Oertel 2000, Ludwig et al. 2003, Nolan et al. 2007).

Die physiologische Bedeutung des Ih-Stroms kommt bei der dendritischen Integration in den pyramidalen Neuronen im Hippocampus (CA1) zur Geltung. Entsprechend der Kabeleigenschaften der Dendriten sollten die EPSPs, die an den distalen Dendritenenden eintreffen, stärker und über eine längere Zeitskala als die proximalen Eingänge aufsummiert werden. In der Realität führt jedoch der HCN1-vermittelte Ih in den pyramidalen CA1-Neuronen dazu, dass die Amplitude und Dauer der zeitlichen Summation der distalen und proximalen dendritischen Eingänge ähnlich bleiben. Der Ih-Strom begünstigt auch die Weiterleitung der EPSCs entlang der Dendriten, denn er wirkt dem Amplitudenverlust entgegen und beschleunigt die Kinetik der postsynaptischen Ströme (Magee 1998, 1999, 2000, Tsay et al. 2007, Biel et al. 2009). In dem auditorischen System wurde gezeigt, dass die Ih-Ströme die zeitliche Summation von IPSCs und EPSCs reduzieren (Abb. 2, D) (Golding et al. 1995, Koch and Grothe 2003).

Des Weiteren ermöglicht der Ih-Strom die Ausprägung der Resonanzeigenschaften in kortikalen pyramidalen Neuronen, da er sowohl high-pass- als auch low-pass- Filtereigenschaften der Membran unterstützt. Bei niedrigen Frequenzen stabilisiert der langsam aktivierende Ih-Strom die Membranzeitkonstante, was zur Tiefpassfilterung führt. Bei höheren Frequenzen bleibt für die Aktivierung des Ih nicht ausreichend Zeit, was zur Hochpassfilterung führt. (Ulrich 2002).

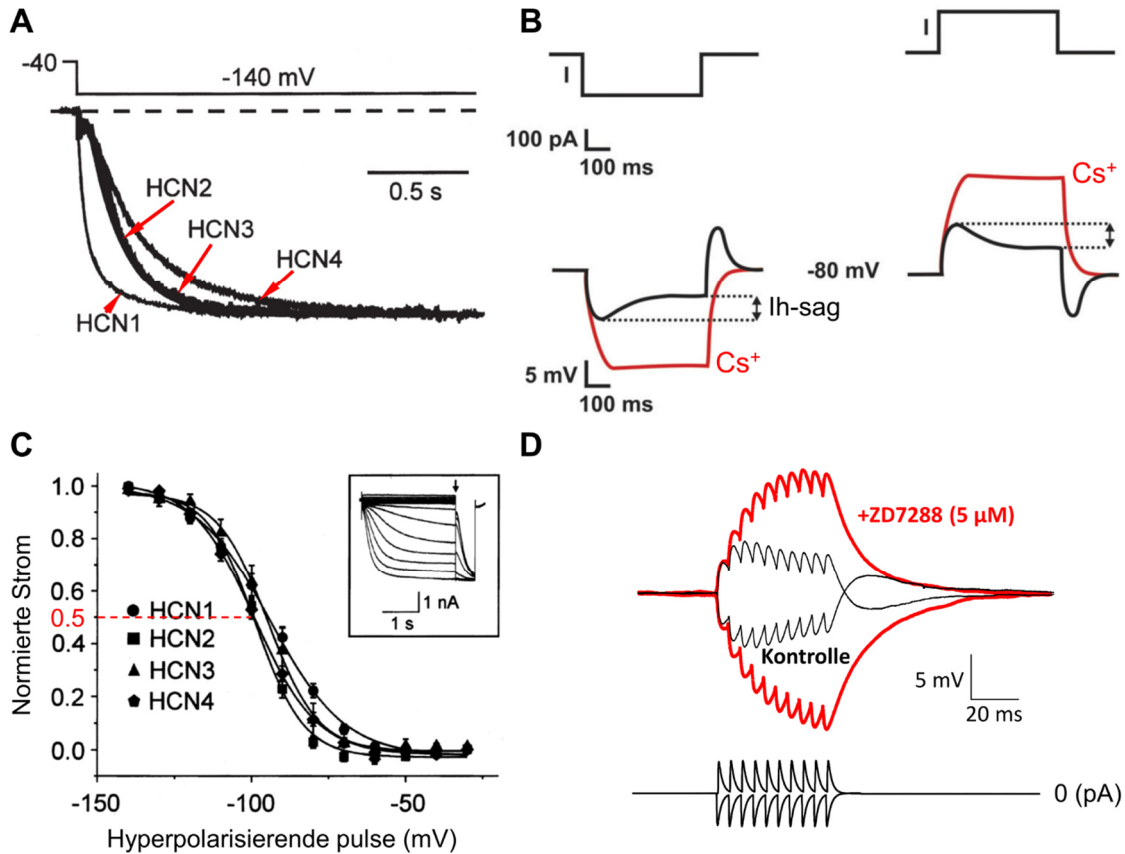


Abb. 2. Physiologische Eigenschaften des Ih-Stroms und der Isoformen der HCN-Kanäle (HCN1-4). Exemplarische Ableitungen von vier HEK293-Zellen, die unterschiedliche Isoformen des HCN-Kanals (1-4) exprimieren (A). Gezeigte Ströme wurden anhand einer hyperpolarisierenden Spannungsinjektion von -100 mV hervorgerufen (Moosmang et al. 2001). Schematische Darstellung der ruhemembranpotentialstabilisierenden Wirkung des Ih-Stroms (B). Bei hyperpolarisierenden Strominjektionen von -200 pA verändert sich die Membranspannung unter Ausbildung eines depolarisierenden Ih-sag (linkes Panel), bei der depolarisierenden Strominjektion bildet sich der hyperpolarisierende Ih-sag (rechtes Panel). Die Inaktivierung der HCN-Kanäle mit Cs<sup>+</sup> (rot) eliminiert den Ih-sag, verlangsamt die Membranzeitkonstante und senkt den Eingangswiderstand (Biel et al. 2009). Spannungsabhängigkeit der HCN-Kanalaktivierung (C), es sind die sigmoidalen Boltzmannkurven für die HCN1-4 Isoformen, die in den HEK293-Zellen exprimiert sind, gezeigt. Halbmaximale Aktivierung (50% der normierten Stromstärke) ist mit der roten Punktierlinie gezeigt. Inset zeigt exemplarische Veränderung der Stromstärke für den jeweiligen Spannungspuls, Pfeil zeigt den Zeitpunkt, zu dem der in der Abbildung gezeigte Reststrom ermittelt wurde. Halbmaximale Aktivierung von HCN1 findet bei positiveren Spannungen statt als von HCN4 (Moosmang et al. 2001). Das Blockieren von HCN-Kanälen mit ZD7288 verstärkt die zeitliche Summation der EPSP und IPSP (rot, oben), die mit zehn simulierten positiven und negativen Strompulsen (Wiederholungsfrequenz von 200Hz, unten) in einem Onset-Neuron im CIC der Ratte hervorgerufen wurden (D). In Abwesenheit von ZD7288 bleibt die Summation der EPSP und IPSP minimal (oben, Kontrolle) (Koch and Grothe 2003).



Auch die Oszillationseigenschaften (Schrittmachereigenschaften) der Neurone werden vom Ih ähnlich zu dem Schrittmacherpotential im Herz von Vertebraten beeinflusst. Dabei werden die theta-Oszillationen (4-9 Hz) im Hippocampus der Mäuse über die HCN1 Kanäle vermittelt. (Nolan et al. 2004). In dem präfrontalen Cortex wird über die cAMP-Konzentrationsregulation und die darauffolgende Veränderung der Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle die Ausprägung des räumlichen Gedächtnisses beeinflusst (Wang et al. 2007). In CA1-Neuronen des Hippocampus hemmen die HCN1-Kanäle die Entstehung der von der  $Ca^{2+}$ -Konzentration abhängigen dendritischen APs und setzen somit die Langzeitpotenzierung (engl. *long-term potentiation*, LTP) herab (Tsay et al. 2007). Die Abwesenheit der membranpotentialstabilisierenden HCN-Kanäle begünstigt Epilepsien (Nishitani et al. 2019). In der Retina beeinflusst der Ih die Verarbeitung der visuellen Signale in der zeitlichen Ebene (Demontis et al. 1999).

### 1.3.3 HCN-Kanäle im auditorischen System

In den auditorischen Nuklei des Hirnstamms und Thalamus sind die unterschiedlichen Isoformen der HCN-Kanäle weit vertreten. Die Immunreaktivität bzw. mRNA-Expression für HCN1-Isoformen wurden in VCN, AVCN, PVCN, LSO, MSO, SPN, MNTB, VNLL (jedoch nicht im DNLL), IC und MGB gezeigt. Die HCN2-Isoform wurde in den gleichen Nuklei und zusätzlich noch im DNLL nachgewiesen, wobei es in VCN fehlte. HCN3- und HCN4-Kanäle wurden im DCN, VCN, SOC, LL, IC und MGB gezeigt. Wobei die HCN3-Isoform im Vergleich zu HCN1-, -2 und -4 Isoformen im IC gering vertreten ist (Moosmang et al. 1999, Monteggia et al. 2000, Santoro et al. 2000, Koch et al. 2004, Notomi and Shigemoto 2004, Oertel et al. 2009, Khurana et al. 2012, Rusznák et al. 2013, Caspari et al. 2015).

Im auditorischen System tragen die HCN-Kanäle zusammen mit den bei niedrigen Membranspannungen aktivierenden Kaliumkanälen (engl. *low voltage activated potassium channels*) zu einer Erhöhung der Präzision der Signalverarbeitung in der Zeitebene (Koinzidenzdetektion) bei und verhindern die Integration bzw. zeitliche Summation der Eingänge (Koch and Grothe 2003, Yamada et al. 2005, Nagtegaal and Borst 2010, Khurana et al. 2011, 2012). Dabei sind die Neurone mit schnell-aktivierenden Ih-Strömen (z.B. über die schnellen HCN1-Kanäle vermittelt) für niedrige zeitliche Summation der synaptischen Eingänge und zeitlich genaue Signaltransduktion besser gewappnet als Neurone mit langsam-aktivierenden Ih-Strömen (Nagtegaal and Borst 2010).

Bei binauralen Koinzidenzdetektor-Neuronen in der MSO, die interauralen Laufzeitunterschiede (ITD) auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden detektieren und somit zur Lokalisation der tieffrequenten Töne in der horizontalen Ebene beitragen, tragen die HCN-Kanäle zur Koinzidenzdetektion der exzitatorischen Eingänge bei (Khurana et al. 2012). Dabei von vier HCN-Isoformen vor allem HCN1 und -4 sind in der MSO vertreten. Die MSO-

Neurone zeigen eine starke Veränderung der Ih-Eigenschaften während der postnatalen Entwicklung. Nach der Aktivierung des Hörvermögens werden die Ih-Ströme bei mehr depolarisierenden Spannungen aktiviert und zeigen eine schnellere Kinetik. In dem Nukleus Laminaris der Vögel, der ein Analog zu der MSO bezüglich der Schallokalisation darstellt, tragen die ebenso schnell-aktivierenden HCN1 (und HCN2) zur Koinzidenzfunktion bei (Yamada et al. 2005). Auch in den Oktopusneuronen des PVCN, die auf Onset der Stimuli zeitlich sehr präzise reagieren und koinzidente Aktivierung der Axone des auditorischen Nervs detektieren, wurden Ih-Ströme und HCN-Kanäle nachgewiesen. Dabei tragen neben den HCN-Kanälen (schnelle HCN1 im VCN) auch die bei den niedrigen (depolarisierenden) Spannungen aktivierenden  $K^+$ -Kanäle zu dieser Eigenschaft bei (Bal and Oertel 2000, Oertel et al. 2009). Beide Kanäle senken den Membraneingangswiderstand, was zu den schnellen Membranzeitkonstanten (*ca.* 200  $\mu$ s) und als Folge zu einer kurzen Integrationszeit (*ca.* 1 ms) führt (Golding et al. 1995, 1999).

Im IC wurde der Einfluss des Ih-Stroms auf die Integration der über den Nucleus lateralis aufsteigenden inhibitorischen und exzitatorischen Eingänge gezeigt. Die zeitliche Summation der schnell wiederholenden de- bzw. hyperpolarisierenden Strompulsinjektionen wurde in Onset-Neuronen dank des Ih-Stroms reduziert (Abb. 2, D, Kontrolle). Die Deaktivierung der HCN-Kanäle mit dem ZD7288-Reagent führte im Gegenteil zu einer Verstärkung der zeitlichen Summation der Eingänge und folglich zum Verlust der zeitlichen Auflösung der Signaltransduktion (Abb. 2, D, rot) (Koch and Grothe 2003).

Darüber hinaus wurde in den tonotop organisierten auditorischen Nuklei (Nucleus Laminaris der Vögel und MSO der Nagetiere) ein Gradient der Ih-Eigenschaften (u.a. Kinetik) gezeigt (Yamada et al. 2005, Baumann et al. 2013).

Im IC wurden anhand der de- und hyperpolarisierenden Strominjektionen unterschiedliche Neuronentypen beschrieben. Es wurde dabei bei den GABAergen sowie den glutamatergen Neuronen die Präsenz von Ih-Strömen gezeigt (Peruzzi et al. 1997, Sivaramakrishnan and Oliver 2001, Koch and Grothe 2003, Ono et al. 2005, Tan et al. 2007). Im CIC wurde gezeigt, dass die Kinetik des Ih-Stroms bei Onset- und adaptierenden (phasische) Neuronen schneller ist als bei den regelmäßig (tonisch) feuernden Neuronen (Koch and Grothe 2003). Diese Evidenzen weisen auf eine Expression von unterschiedlichen HCN-Isoformen bei den IC-Neuronen hin. Ob die Expression der unterschiedlichen HCN-Isoformen neurotransmitter-spezifisch ist, wurde im CIC der adulten Tiere bis *dato* nicht untersucht.

## 1.4 Glutamaterge synaptische Übertragung im auditorischen System

### 1.4.1 Funktionsweise der glutamatergen Synapse

L-Glutamat tritt als exzitatorischer Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem der Säugetiere auf. Im gesamten Gehirn ist Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter (Purves 2004, Traynelis et al. 2010). Ungefähr 75% der Neurone im IC werden als glutamaterg eingestuft (Ito et al. 2011, Ito and Oliver 2012).

Der Neurotransmitter L-Glutamat wird bei dem Krebs-Zyklus aus der Glukose synthetisiert und mit der Glutaminase aus dem Glutamin umgewandelt (Erecińska and Silver 1990). Mit Hilfe des vesikulären Glutamat-Transporters (VGluT1, 2 oder 3 (Takamori 2006)) wird Glutamat in die Vesikel der Präsynapse transportiert und dort angereicht (Abb. 3). Das Eintreffen des AP an der präsynaptischen Endigung aktiviert die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Präsynapse begünstigt die Aktion von SNARE-Proteinen (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) in der Präsynapse und ermöglicht die Sezernierung des Glutamats in den synaptischen Spalt (Bear et al. 2018).

Im synaptischen Spalt kann Glutamat unterschiedliche ionotrope und metabotrope Rezeptoren aktivieren (Bear et al. 2018). Die metabotrope (G-Protein-gekoppelten) Glutamatrezeptoren (mGluR) können prä- oder postsynaptisch oder an den Gliazellen lokalisiert sein (Conn 2003, Nicoletti et al. 2011). Zu den ionotropen ligandgesteuerten Kationenkanälen gehören folgende Rezeptoren: Kainat – benannt nach dem Agonisten Kainsäure, NMDA – benannt nach dem Agonisten N-Methyl-D-Aspartat und AMPA-Rezeptoren – benannt nach dem Agonisten  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionische Säure. Kainatrezeptoren können post- und/oder präsynaptisch lokalisiert sein, während AMPA und NMDA postsynaptisch (Traynelis et al. 2010).

Die Aktivierung der ionotropen Rezeptoren an der postsynaptischen Endigung verursacht bei den NMDA-Rezeptoren  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Einstrom sowie bei den AMPA-Rezeptoren überwiegend nur  $\text{Na}^{+}$ - und weniger oft  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und/oder  $\text{Na}^{+}$  wird vom  $\text{K}^{+}$ -Ausstrom in den synaptischen Spalt begleitet. Da die Ionen entlang ihrer Konzentrationsgradienten die postsynaptische Membran passieren, findet die Depolarisation der postsynaptischen Membran statt und führt zum Entstehen des exzitatorischen post-synaptischen Potentials (EPSP) oder des AP (Bear et al. 2018). Glutamat wird mit dem exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT (engl. *excitatory amino-acid transporter*) aus dem synaptischen Spalt in die Gliazellen aufgenommen, mit Gln-Synthetase zurück in das Glutamin hydrolysiert und in die Neurone (Präsynapse) transportiert (Sanacora et al. 2008, Bear et al. 2018).

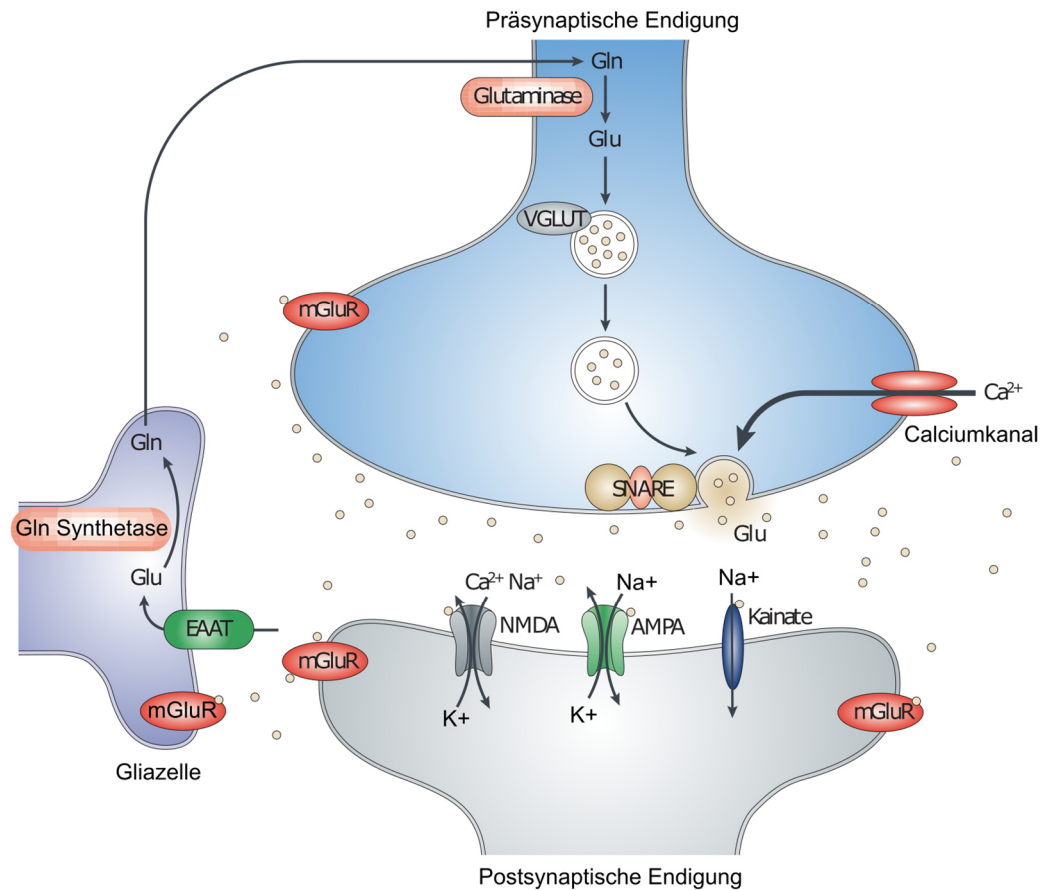


Abb. 3. Glutamaterge synaptische Übertragung. Glutamat (Glu) wird aus Glutamin (Gln) mithilfe der Glutaminase synthetisiert. Glu wird mit dem vesikulären Glutamatttransporter (VGLUT) in die Vesikel der Präsynapse geladen. Bei der Depolarisation der Membran der Präsynapse öffnen die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, Calciumeinstrom löst das Sezernieren von Glu in den synaptischen Spalt. Glutamat aktiviert Kainat-, NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor) und AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionische Säure Rezeptor) sowie prä- und postsynaptische oder an den Gliazellen lokalisierte metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR). Bei dem Glu-Recycling wird dieser mit EAAT – *excitatory amino-acid transporter* (engl.) aus dem synaptischen Spalt in die Gliazellen aufgenommen und mit Gln-Synthetase in Glutamin zurückumgewandelt. Aus Sanacora et al. 2008, verändert.

Die Aktivierung der metabotropen mGluR (1-8) Rezeptoren verursacht die Modulation vieler anderer Rezeptoren, z.B. Gruppe I und II der mGluR modulieren AMPA- und  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren im IC und beeinflussen somit die Balance zwischen Exzitation und Inhibition (Farazifard and Wu 2010). Die mGluR sind an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt (Lu 2014, Bear et al. 2018) oder tragen zu der Ausprägung von Gehirnerkrankungen wie Autismus – Fragiles-X-Syndrom (FXS) (Dölen et al. 2007) – oder Schizophrenie bei (Patil et al. 2007).

Die NMDA-Rezeptoren sind für  $\text{Na}^+$ - und vor allem für  $\text{Ca}^{2+}$  durchlässig und unterscheiden sich von den AMPA-Rezeptoren dadurch, dass sie spannungsabhängigen einwärtsgerichteten Strom aufweisen. Selbst bei einem durch Glutamat aktivierten Rezeptor bleibt der Kanal bei dem Ruhemembranpotential durch  $\text{Mg}^+$  verschlossen. Die AMPA- und NMDA-Rezeptoren kommen oft in den gleichen Synapsen vor. Die Aktivierung der AMPA-

Rezeptoren ermöglicht die Depolarisation der Postsynapse, so dass der  $Mg^{+}$ -Block aufgehoben wird (Monyer et al. 1992, Kullmann and Lamsa 2007). Die NMDA-Rezeptoren brauchen zur Aktivierung den Koagonisten Glycin (Purves 2004). Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom, der die Aktivierung der NMDA-Kanäle begleitet, kann wie ein *second messenger* lange andauernde Veränderungen verursachen: Veränderung der Genexpression, Einleitung der Apoptose, Förderung der Langzeitpotenzierung (LTP) oder Langzeitdepression (LTD) und trägt somit zur Bildung des Langzeitgedächtnisses bei (Hille 2001, Bear et al. 2018).

Im Gegensatz zu der relativ langsamen Kinetik der NMDA-Rezeptoren (10-1000 ms) ermöglichen die AMPA-Rezeptoren die schnellste binnen wenigen Millisekunden ablaufende Signalweiterleitung (Mosbacher et al. 1994, Trussell 1998, Hille 2001, Traynelis et al. 2010).

#### **1.4.2 Signaltransduktion über AMPA-Rezeptoren**

AMPA-Rezeptoren vermitteln den Großteil der schnellen erregenden Übertragung im zentralen Nervensystem und sind entscheidend für ihre Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems (Traynelis et al. 2010). Im auditorischen System, wo die zeitliche Präzision der Signalweiterleitung von großer Bedeutung ist, sind die AMPA-Rezeptoren wegen ihrer schnellen Kinetik bedeutend (Geiger et al. 1995, Trussell 1999, Joshi et al. 2004, Yang et al. 2011).

AMPA-Rezeptoren sind tetra- oder pentamerische Homo- oder Heteromere, die aus vier Untereinheiten 1-4 (GluR1-4) bestehen können. Die Untereinheiten (UE) können durch das alternative Splicing *flip*- oder *flop*-Form annehmen (Mosbacher et al. 1994, Traynelis et al. 2010). Die Zusammensetzung der Einheiten, die *flip-flop*-Variation sowie die Editierung der mRNA bestimmen die Eigenschaften der Ionenkanäle. Zu diesen Eigenschaften gehören die Permeabilität für die Ionen ( $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), Kinetik oder die Desensibilisierung (Mosbacher et al. 1994, Lambolez 1996, Parks 2000). Die GluR1, GluR3 und GluR4-UE-zusammengesetzten Rezeptoren sind für  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  und  $Ca^{2+}$  permeabel, während die Ionenkanäle mit GluR2-UE fast ausschließlich nur  $Na^{+}$  und  $K^{+}$  durchlassen (Hollmann et al. 1991, Burnashev 1996).

Bei der synaptischen Übertragung ist die zeitliche Komponente der Signalweiterleitung von großer Bedeutung, da diese z. B. für Koinzidenz der Signale ausschlaggebend sein kann (Parks 2000). Der Zeitverlauf der Ionenströme hängt von der Diffusionsgeschwindigkeit des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt und der Kinetik der Glutamattransporter. Außerdem hängt die Stromkinetik von solchen Rezeptoreigenschaften ab wie Reaktionszeit der Kanal-Öffnung/-Schließung sowie Desensibilisierung des Rezeptors oder die Zeit, bis sich das Glutamat von dem Rezeptor wieder entkoppelt (Parks 2000). Diese Eigenschaften sind zwischen den Untereinheiten des AMPA-Rezeptors (GluR1-4) sowie deren Isoformen unter-

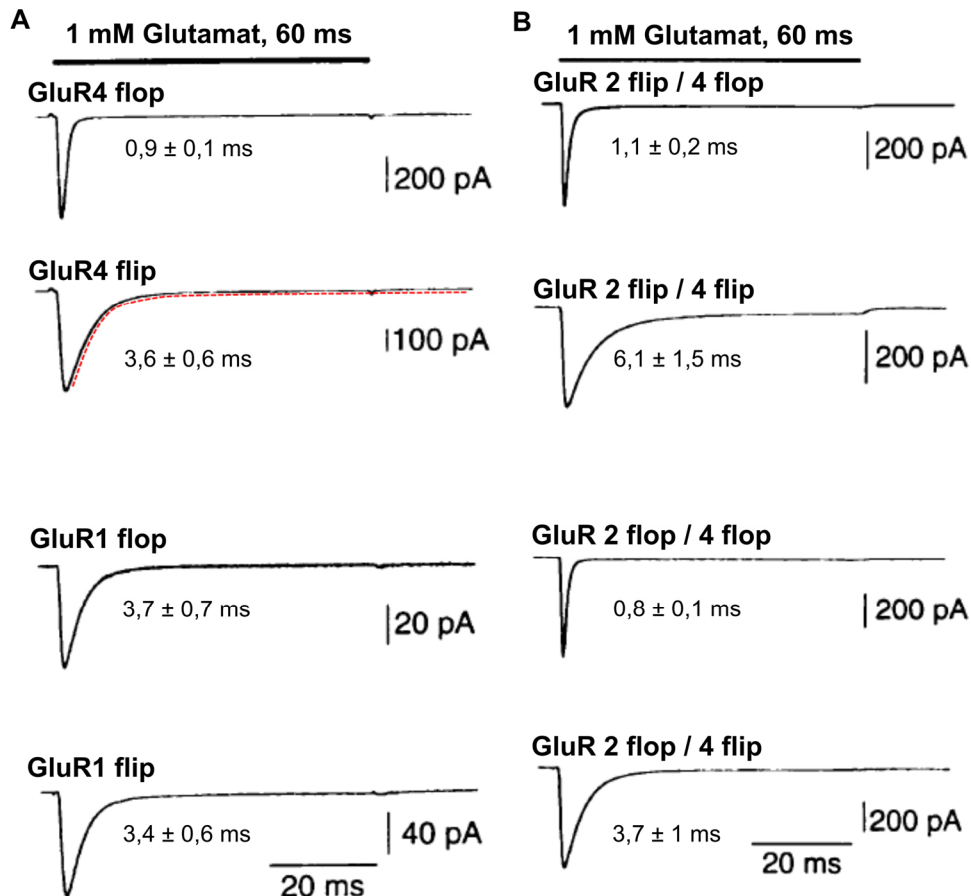


Abb. 4. Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten/Untereinheitsisoformen und ihrer Kinetik am Beispiel der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC). Die EPSCs wurden anhand der 60 ms langen Glutamatapplikationen in den Oozyten von *Xenopus laevis* evoziert. Die Kinetik der AMPA-Rezeptoren wird mit den Abfallzeitkonstanten erfasst, die über die einfache exponentielle Trendlinie ermittelt wurden (gestrichelte rote Linie), Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Homomere GluR4 und GluR1 (A) sowie Heteromere GluR2/4 in ihrer *flip* und *flop*-Isoform. Aus Mosbacher et al. 1994, verändert.

schiedlich. Im Experiment lässt sich die Rezeptorkinetik mit Hilfe der elektrophysiologischen Patch-Clamp-Technik, kombiniert mit der pharmakologischen Isolierung der Rezeptoren, erfassen. Dabei werden die exzitatorischen postsynaptischen Ströme (engl. *excitatory post synaptic currents*, EPSC) aufgezeichnet. Die Rezeptorkinetik wird anhand folgender Kenngrößen beschrieben. Zum einen ist es die Anstiegszeit der EPSC, diese entspricht der Aktivierung des Ionenkanals (ein Zeitfenster zwischen 10% und 90% vom EPSC-Amplitudenmaximum). Zum anderen ist das die Zeitkonstante ( $\tau$ ) des EPSC-Abfalls, die der Kanaldesensibilisierung entspricht und anhand der einfachen exponentiellen Funktionen ermittelt wird (Abb. 4, A rote Punktierlinie). So zeigen die homo- als auch heteromeren AMPA-Rezeptoren, die GluR4<sub>flop</sub>-UE beinhalten, die schnellsten EPSC-Abfallzeitkonstanten ( $\leq 1.3$  ms, Abb. 4) im Vergleich zu den restlichen GluR-Isoformen. Die GluR1 sowohl in ihrer *flip* als auch *flop*-Isoform zeigen stattdessen eine relativ langsame Kinetik (Abb. 4, A) (Sommer et al. 1990, Mosbacher et al. 1994, Quirk et al. 2004, Traynelis et al. 2010).

### 1.4.3 AMPA-Rezeptoren im auditorischen System

Die Expression der unterschiedlichen Isoformen der AMPA-Rezeptoren wurde in vielen auditorischen Nuklei (CN, SOC, NLL) nachgewiesen, unter anderem auch im IC (Petralia and Wenthold 1992, Gaza and Ribak 1997, Caicedo and Eybalin 1999). Exzitatorische Synapsen an GABA- und glutamatergen Neuronen machen *ca.* 60% aller Synapsen im IC aus (Nakamoto et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass die Expression der AMPA-Rezeptor-Isoformen sich während der postnatalen Entwicklung verändert. Eine deutliche Expression der  $\text{Ca}^{2+}$ -durchlässigen AMPA-Rezeptoren (bei denen die GluR2-UE fehlt (Bochet et al. 1994)) findet schon ab P4 im ECIC statt. Im CIC ist diese nur geringfügig erst ab P8 präsent und verbleibt in der weiteren postnatalen Entwicklung relativ niedrig (Caicedo et al. 1998). Eine leichte bis moderate GluR1-Immunreaktivität erscheint im IC ab P12. Die GluR4-IR wird stattdessen schon ab P4 detektiert und wird bis P12 immer prominenter. Eine leichte bis moderate GluR2 und GluR2/3-IR im IC erscheint ab P4. Diese unterliegt keinen großen Schwankungen während der postnatalen Entwicklung (Caicedo and Eybalin 1999).

In dem auditorischen System spielen die AMPA-Rezeptoren wegen ihrer schnellen Kinetik eine wichtige Rolle. Bei der Schalllokalisation werden die feinen Zeitunterschiede im Eintreffen der akustischen Signale an den Ohren – die binaurale Laufzeitdifferenz (ITD) oder auch die binaurale Pegelunterschiede (ILD) unter Beteiligung dieser Rezeptoren verarbeitet (Grothe et al. 2010, Yang et al. 2011, Rubio et al. 2017). In dem ILD-Netzwerk sind AMPA-Rezeptoren, die GluR3 und 4-UE enthalten, für die schnelle und genaue Signalweiterleitung zwischen den globularen Bushy-Neuronen des AVCN über *calyx of Held* Synapsen zu den primären Neuronen der MNTB unentbehrlich. Die GluR3-UE sind für das Netzwerk dabei weniger von Bedeutung (Yang et al. 2011). Die Verteilung dieser schnellen GluR3- und GluR4-Rezeptoren hängt im CN von dem Ziel-Neuron ab. So weisen die Synapsen an den Bushy-Neuronen im VCN – GluR3; an den fusiformen Neuronen im DCN – GluR4 auf (Rubio et al. 2017). Im IC ermöglichen sowohl AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren die Antworten der Neurone auf die amplitudenmodulierten Reize (Zhang and Kelly 2003). Die funktionelle Rolle der unterschiedlichen AMPA-Rezeptor-Isoformen im IC und ob ihre Expression neurotransmitterspezifisch ist, bleibt noch weitgehend ungeklärt.

## 1.5 Fragestellung im Kontext des aktuellen Forschungsstandes

Auf dem Weg zum Verständnis der Funktionsprinzipien des IC werden die Eigenschaften der einzelnen Neurone (Morphologie, Membraneigenschaften, molekulare Marker, Neurotransmittertyp) wie auch deren eingehenden, internen und ausgehenden Verschaltungen inklusive der Aspekte der synaptischen Übertragung (Oliver et al. 2018) oder auch Antworten der Neurone bei der akustischen Stimulation (Ono et al. 2016, 2017, 2020, Ito 2020) unter-

sucht. Dabei ist es eine der Strategien, die Neurone mit ähnlichen Eigenschaften zu gruppieren. Versuche, die exklusiven Merkmale von exzitatorischen oder inhibitorischen Neuronen zu finden, sind im IC im Kontrast z.B. zu dem auditorischen Cortex (Budinger and Kanold 2018) bisher weniger erfolgreich gewesen. Weder neurotransmitterspezifische zelluläre Morphologie (Oliver et al. 1994) noch für die GABAergen Neurone spezifische molekulare Marker (Schofield and Beebe 2019) wurden im IC gezeigt. Weder wurden die übergreifenden Neurotransmitterphänotyp-bezogenen Unterschiede in der Antwort der Neurone auf eintönige akustische Reize (Ono et al. 2017), noch wurden Unterschiede in ihrer Plastizität (andauerndes Neuronenfeuern nach dem Ende der akustischen Stimulation (engl. *long-lasting sound-evoked afterdischarge*, LSA (Ono et al. 2016)) gezeigt. Des Weiteren konnten weder deutlichen Unterschiede in der Sensitivität auf die ITD (engl. *interaural time difference*) von der Schall-Hüllkurven (Ono et al. 2020), noch in den Antworten auf de- und hyperpolarisierende Strominjektionen (Ono et al. 2005) zwischen inhibitorischen und exzitatorischen IC-Neuronen nachgewiesen werden. Die letzten Studien deuten jedoch an, dass Kombinieren unterschiedlicher Merkmale (molekularen Marker, Neurotransmitterphänotyp) ein Potential bei der Auftrennung der IC-Neurone hinsichtlich deren Antworten auf frequenz-modulierte Stimuli birgt (Ito 2020). Darüber hinaus wurden einige der IC-Studien in jungen Tieren durchgeführt. In der Studie von Ono und Kollegen (Ono et al. 2005) waren nur wenige Neurone enthalten, die den Tieren älter als P13 stammen. Da Reifung der Neurone und neuronalen Netzwerke nach dem Einsetzen der Hörvermögens nicht abgeschlossen ist (Caicedo and Eybalin 1999, Ono et al. 2005, Walcher et al. 2011, Khurana et al. 2012), wurden die Experimente der vorliegenden Arbeit erst in jungen adulten Tieren (>P22) durchgeführt.

Im IC wurden hyperpolarisierenden Ströme (I<sub>h</sub>) unterschiedlicher Kinetik bereits gezeigt, diese wurden auch den Antworten der Neurone auf die depolarisierende Strominjektionen gegenübergestellt (Koch and Grothe 2003, Nagtegaal and Borst 2010). Auch die Expression der unterschiedlichen Untereinheiten der HCN-Kanäle (HCN1, 2, 4) wurde im IC gezeigt, wobei die Expression der HCN3-Isoform im IC gering ist (Moosmang et al. 1999, Koch et al. 2004, Notomi and Shigemoto 2004). Ono und Kollegen brachten Indizien für die Präsenz der I<sub>h</sub>-Ströme in den inhibitorischen und einigen Gruppen der exzitatorischen IC-Neurone (Ono et al. 2005). Somit stellt sich die Frage, *ob die Expression der HCN-Isoformen (1, 2 und 4), I<sub>h</sub>-Ströme sowie die Antworten der Neurone auf die hyper- und depolarisierenden Strominjektionen neurotransmitterspezifisch in dem CIC sind.* Resultate der Experimente zu dieser Fragestellung wurden in dem Journal of Neurophysiology von mir und Kolleginnen veröffentlicht (Naumov et al. 2019).

Zahlreiche aufsteigenden glutamatergen Projektionen von INLL, DCN, LSO, VCN (AVCN und PVCN) erreichen den CIC über ihre durch den Lemniscus lateralis (LL) verlaufenden Afferenzen (Ito and Oliver 2010, Chen et al. 2018). Dabei erhalten exzitatorische und inhibitorische CIC-Neurone Eingänge von unterschiedlichen Kombinationen dieser Nuklei



(Chen et al. 2018). Diese Indizien könnten darauf hindeuten, dass GABAerge und glutamaterge IC-Neurone unterschiedliche Rezeptoren exprimieren könnten. Die Signalübertragung aus dem LL wird über die NMDA- und AMPA-Rezeptoren im IC vermittelt (Wagner 1996, Moore et al. 1998, Ma et al. 2002), außerdem wurde Expression unterschiedlicher AMPA-Rezeptor-Isoformen (GluR1-4) im IC bereits gezeigt (Gaza and Ribak 1997, Caicedo and Eybalin 1999). Deswegen und da insbesondere AMPA-Rezeptoren (darunter GluR4-Untereinheit) für die zeitlich genaue Signalübertragung in auditorischem System von Bedeutung sind (Yang et al. 2011, Rubio et al. 2017) stellt sich die Frage: *Ob die Signalübertragung aus dem LL an GABA- und glutamatergen CIC-Neuronen durch unterschiedliche AMPA-Rezeptoren vermittelt wird?*

Eine Klasse der inhibitorischen IC-Neurone – große GABAerge Neurone (engl. *LG-neuron*), wurden hinsichtlich ihrer perisomatische VGluT2-positiven Eingänge (vesikulärer Glutamattransporter 2) charakterisiert (Ito et al. 2009). Dabei wurde gezeigt, dass, diese Eingänge u.a. dem LL und lokalen IC-Netzwerken abstammen (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Von einigen Autoren werden diese Neurone als Quelle der schnellen *feed-forward*-Inhibition (Erregung trifft mit längeren Latenz als Inhibition ein) zum MGB diskutiert (Peruzzi et al. 1997, Ito et al. 2009, Geis and Borst 2013, Ito and Malmierca 2018). Dennoch projizieren überwiegend nicht-LG Neurone zum MGB (Beebe et al. 2018) außerdem ist die Latenz der inhibitorischen Eingänge nicht immer kürzer als die Latenz der exzitatorischen Eingänge in MGB-Neuronen (Bartlett and Smith 1999). Deswegen erscheint eine erregende Verschaltung an GABAergen Neuronen über mehr als eine Synapse nicht ausgeschlossen zu sein. Darum wurde in den abschließenden Experimenten überprüft (a) *ob die GABAergen Neurone, die hier elektrophysiologisch untersucht wurden zur Gruppe der LG-Neurone gehören* und (b), *ob die dem LL entstammenden erregende Eingänge an den GABA- und glutamatergen CIC-Neuronen direkt verschaltet sind, oder über mehrere Synapsen verschaltet sein könnten.*

## 2 Methodik

### 2.1 Tiermodell: Die transgene VGAT-ChR2-EYFP-Maus

Alle Tierexperimente dieser Arbeit sowie Haltung der Versuchstiere wurden entsprechend der Vorschriften der EU-Tierversuchsrichtlinie und des deutschen Tierschutzgesetzes und mit der Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LAGESO, Berlin) durchgeführt.

Transgene VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mäuse (B6.Cg-Tg (Slc32a1-COP4\*H134R/EYFP) 8Gfng/J) von Jackson Laboratories (JAX, Bar Harbor, Maine, USA, Stocknummer: #014548) wurden in allen Experimenten dieser Arbeit eingesetzt, denn sie ermöglichen Identifikation der inhibitorischen Neurone in den lebenden und fixierten Gehirnschnitten. Bei diesem Mausstamm wurde das Transgen des künstlichen bakteriellen Chromosoms (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC) unter dem Promotor für den vesikulären GABA und Glycin Transporter (VGAT, Gen Slc32a1) eingebaut. Dabei kodiert das BAC-Transgen das Fusionsprotein mhChR2-EYFP, das aus dem veränderten *Channelrhodopsin2* (engl. ChR2/H134R) und *enhanced yellow fluorescent protein* (engl. EYFP) besteht. Somit wird in inhibitorischen (VGAT-positiven) Neuronen ChR2 und EYFP exprimiert. Tiere sind überlebensfähig, fertil und zeigen keine nachweisbare Hörvermögensminderung (Zhao et al. 2011, Xie and Manis 2014, Ono et al. 2016).

Da der Mausstamm hemizygot für das VGAT-ChR2-YFP BAC Transgen ist (Zhao et al. 2011) und für die Experimente die mhChR2-EYFP-Konstrukt-exprimierenden Tiere (EYFP+) von Bedeutung waren, wurden die Mauswelpen in postnatalem Alter von 2-3 Tagen (P2-3) auf die EYFP-Expression untersucht. Dafür wurden sie mit einer EYFP-anregenden Blaulichtlampe (460-495 nm, FS/ULS-02B2, BLS-Ltd, Ungarn) und einer YFP-Emissionsfilterbrille (520-560 nm) inspiziert. Bei den EYFP+ Mauswelpen schimmerte das wenig myelinisierte und an GABAergen Neuronen reiche Cerebellum durch die durchsichtige Schädeldecke (Abb. 5, Mauswelpen links). Dagegen fehlte bei den EYFP-negativen Mauswelpen jegliche EYFP-Fluoreszenz (Abb. 5, Mauswelpen rechts).

Der genetische Hintergrund des VGAT-ChR2-EYFP-Mausmodells ist der C57/Bl6 Mausstamm. Deswegen wurden beide Mausstämme und beide Geschlechter bei der Kolonieinstandhaltung eingesetzt. Dabei wurden die EYFP-positive Tiere mit den EYFP-negativen verpaart. Die Tierhaltung unterlag einem 12/12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die Mäuse hatten *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Mausfutterpellets.

Abb. 5. Nachweis der Expression des mhChR2-EYFP Konstruktes im Gehirn der juvenilen (P3) heterozygoten VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mäusen. Fotografische Aufnahme über den EYFP-Emissionsfilter (520-560 nm) zeigt die Dorsalansicht der Mäuse im Licht einer EYFP-anregenden Blaulichtlampe (460-495 nm). Der Schimmer durch die Schädeldecke bei der Maus links (EYFP+) weist die Expression von mhChR2-EYFP in dem an VGAT-positiven Neuronen in Cerebellum nach, wogegen bei dem EYFP-negativer Maus (rechts) der Schimmer ausblieb.



## 2.2 Verifizierung der inhibitorischen und exzitatorischen Neurone in der VGAT-ChR2-EYFP-Maus

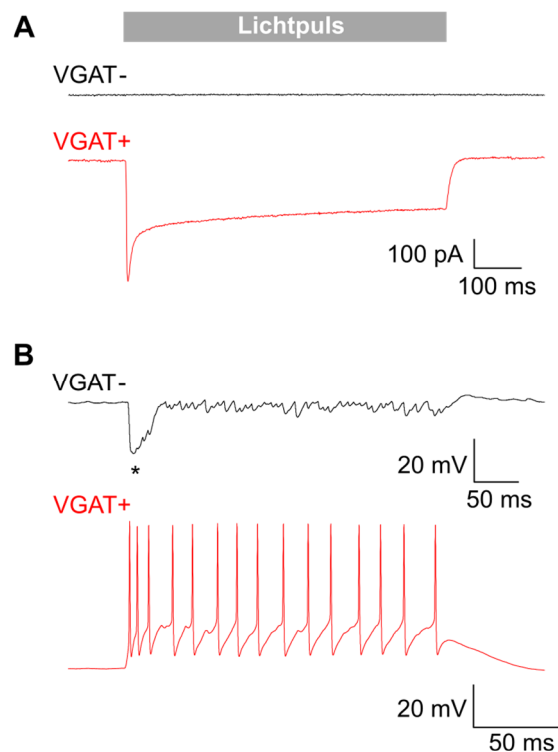
Bei dem VGAT-ChR2-EYFP-Mausstamm lassen sich die VGAT-positiven – inhibitorischen Neurone auf zweifache Weise identifizieren: optisch – mit Hilfe der EYFP-Fluoreszenz und optogenetisch – anhand der ChR2-vermittelten Ionenströme, bzw. der depolarisierenden Membranpotentialen. Das Epifluoreszenzmikroskop (Axio Examiner.A1, Carl Zeiss), der bei den elektrophysiologischen Experimenten eingesetzt wurde, erlaubte keine zuverlässige Verifizierung der VGAT+ Neurone *via* EYFP-Signal. Dies geschah wegen dem niedrigen Signal/Rauschen Verhältnis für EYFP-Signal im Durchlichtmikroskop. Deswegen wurde robustere optogenetische Verifizierungsmethode während der Patch-Clamp Experimenten entschieden.

Bei dem optogenetischen Einsatz ließen sich die ChR2-exprimierenden – also VGAT+ Neuro mit den 0.5–1s – langen Blaulichtpulsen (490–510 nm, HXP 120 C, Carl Zeiss, mittlere Intensität der Geräteskala) über das 40x / 0,75 nA Objektiv aktivieren. Somit wurden die abgeleiteten Neurone in Bezug auf den Neurotransmittertyp „blind“ ausgesucht: Erst während der Ableitung erfolgte ein kurzer ChR2-Lichttest. In den Voltage-Clamp Experimenten zeigte dabei *ca.* ein Drittel der IC-Neurone einen schnell aktivierenden und langsam inaktivierenden Einwärtsstrom (Abb. 6 A, VGAT+). Bei den restlichen (VGAT-) Neuronen blieben diese Ströme aus (Abb. 6 A, VGAT-). Bei diesen Experimenten wurden die Inhibitionsblocker: SR95531 (Gabazin, allosterischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist), Strychnin Hydrochlorid (kompetitiver Antagonist der Glycinrezeptoren) und weitere Blocker der synaptischen Transmission: TTX (Tetrodotoxin, Blocker der spannungsabhängigen Na-Kanäle), AP5 (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, Antagonist der NMDA-Rezeptoren), DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione, Antagonist der AMPA- und Kainsäurerezeptoren) hinzugegeben. Da die ChR2 nichtselektive Kationenkanäle sind, die u.a. für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und H<sup>+</sup> permeabel sind (Schneider et al. 2015) und die synaptische Übertragung

in meisten Experimenten blockiert wurde, war der ChR2-vermittelter Einwärtsstrom vermutlich überwiegend durch  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen bestimmt.

In den Current-Clamp Experimenten ohne Inhibitionsblocker rief die Photoaktivierung von ChR2 in VGAT-positiven (VGAT+) Neuronen die Depolarisation des Membranpotentials hervor, dies löste Aktionspotentiale aus (Abb. 6 B, VGAT+). Restliche Neurone (VGAT-) zeigten am Anfang der Lichtstimulation eine starke Hyperpolarisation (Abb. 6 B, Stern) und nachfolgende kleinere inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) (Abb. 6 B, VGAT-). Diese Potentiale sind der Lichtaktivierung der präsynaptischen inhibitorischen (ChR2-positiven) Endigungen zuzuschreiben (Xie and Manis 2014). Die Lichtstimulation rief nicht in allen Neuronen IPSPs oder Membrandepolarisation auf. Bei der Zugabe der Inhibitionsblocker blieben die IPSPs aus. Somit wurden alle Neurone mit ausbleibenden depolarisierenden Photopotentiale als VGAT- eingestuft.

Abb. 6. Optogenetische Verifizierung der inhibitorischen (GABAergen) und exzitatorischen CIC-Neurone im Gehirnschnitt der VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus. Inhibitorische Neurone exprimierten vesikulären GABA-Transporter (VGAT+) zusammen mit Channelrhodopsin2 und EYFP. Aktivierung von ChR2 (rot) mit Blaulichtpulsen (490–510 nm) in Voltage-Clamp (A) und in Current-Clamp (B) Modus. Während der Voltage-Clamp Experimente wurden die Blocker der synaptischen Übertragung (siehe Text) hinzugegeben, so dass ChR2-Aktivierung in den GABAergen Neuronen ausschließlich einen Einstrom verursachte (A, VGAT+), wogegen in den exzitatorischen Neuronen dieser ausblieb (A, VGAT-). In den Current-Clamp Experimenten führte die ChR2-Aktivierung in den GABAergen Neuronen zum Feuern der Aktionspotentiale (B, VGAT+). Bei den meisten exzitatorischen Neuronen entstanden dabei große inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs, B, VGAT-, Stern), mit nachfolgenden kleineren IPSPs.

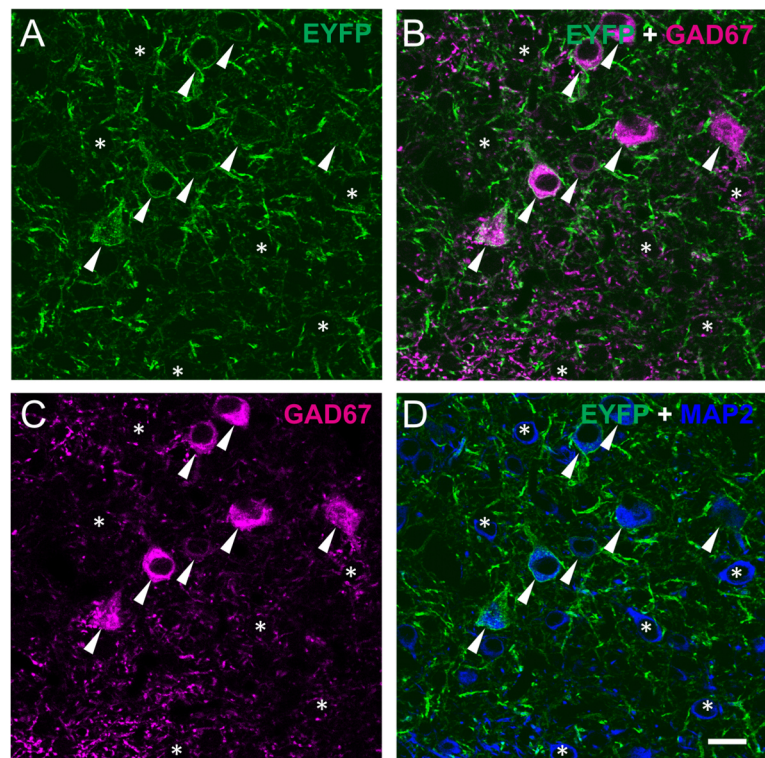


Das VGAT-ChR2-EYFP Mausmodell bietet neben dem optogenetischen Ansatz auch die Möglichkeit die Inhibitorischen (VGAT+) Neurone anhand der EYFP-Expression und demzufolge EYFP-Fluoreszenz mit dem Konfokalmikroskop zu identifizieren. Darüber hinaus erlaubt es die Koexpression des VGAT-EYFP-Komplexes mit unterschiedlichen molekularen Markern (Rezeptoren, Ionenkanäle, *etc.*) anhand der immunhistochemischer (IHC) Färbungen zu untersuchen. Wie zuverlässig die Verifikation der inhibitorischen CIC-Neurone mittels EYFP-Expression funktioniert, wurde anhand einer IHC Färbung bestätigt. Dabei wurden Antikörper gegen den spezifischen Marker der GABAergen Neurone – Glutamat-Decarboxylase (67 kDa Isoform: GAD67, Enzym decarboxyliert Glutamat zu GABA) und

ein panneuronaler Marker – Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) – angewendet. Die IHC-Färbung zeigte, dass fast alle GAD67-Immunreaktivität-positiven Neurone auch für das EYFP-Emissionssignal positiv waren (Abb. 7 A-C). Dabei war das EYFP-Emissionssignal mehr an den Zellmembranen als im Zytosol präsent, da EYFP im Komplex mit Chr2 expriert wird. Die exzitatorischen Neurone wiesen im Gegenteil weder GAD67 noch EYFP-Immunreaktivität auf und waren nur MAP2-positiv (Abb. 7 B, D). Dies bestätigt die bisherigen Resultate (Zhao et al. 2011) und zeigt, dass fast alle CIC-Neurone, die EYFP+ (und Chr2+) waren, GAD67 exprimierten und somit GABAerg waren.

Der VGAT ist sowohl für GABAerge als auch für glycinerge Neurone charakteristisch (Chaudhry et al. 1998). Da die inhibitorischen Neurone im IC ausschließlich GABA als Neurotransmitter verwenden (Ito and Malmierca 2018) und keine glycinerge Neuronen im IC nachgewiesen wurden (Merchán et al. 2005, Milinkeviciute et al. 2017), wurden alle Neurone die Photoströme bei blockierten Inhibition oder depolarisierenden Photopotentiale oder EYFP-Signal aufweisen als VGAT+ bzw. als GABAerg deklariert. Da im IC neben den GABAergen nur glutamaterge Neurone nachgewiesen wurden (Ito et al. 2011, Ito and Oliver 2012), wurden alle VGAT- und somit EYFP-negative, bzw. Chr2-negative Neurone als glutamaterg definiert.

Abb. 7. Immunhistochemische Verifizierung der Koexpression von EYFP und GAD67 (Glutamat-Decarboxylase 67 kDa) in den für vesikulären GABA-Transporter (VGAT) positiven CIC-Neuronen in der VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus. VGAT-positive Neurone exprimieren EYFP (A, Pfeile). Immunreaktivität von GAD67 (C, B, Magenta) und MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2, D, blau) zeigt, dass die EYFP-positive Neuronen GAD67 (B, D, Pfeile) exprimieren, während bei allen EYFP-negativen Neuronen die Expression von GAD67 ausblieb (C, D Sterne). Alle KLSM-Aufnahmen stellen eine einzelne und derselbe optische Ebene dar. Messbalkenlänge beträgt 20  $\mu\text{m}$ .





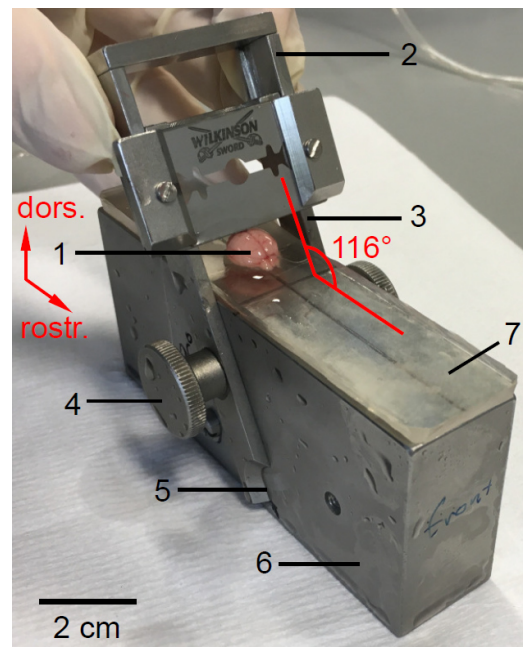
### 2.3 Präparation der Gehirnschnitte für die Patch-Clamp Experimente

In den elektrophysiologischen Experimenten wurden geschlechtlich gleichproportional ausgewählte (Geschlechtsverhältnis  $\approx 1:1$ ) junge adulte (P22-28) Mäuse, die Expression von ChR2-EYFP-Konstrukt aufwiesen eingesetzt.

Die Tiere wurden unter Isofluran-Anästhesie (Forene 100% V/V, Abbott) dekapitiert. Die Gehirne wurden binnen weniger Minuten präpariert und in eisgekühlte oxygenierte (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) Saccharose-Lösung (siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32) zu ca. ½ minütiger Abkühlung überführt.

Für einige Fragestellungen dieser Arbeit waren koronale Gehirnschnitte erforderlich, die sowohl den IC, als auch die Fasern des Lemniscus lateralis enthielten (Abb. 15, A). Dies war zu erreichen, wenn die Koronalschnitte mit einem zu Längsachse um 116° verlaufendem Winkel gefertigt wurden. Um diesen Winkel stets zu reproduzieren, wurde eine Gehirnschneidevorrichtung entwickelt (Abb. 8, V. Naumov und H. Binkowski, Feinmechanikwerkstatt des Institutes für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin). Der dorso-ventrale Schnitt erfolgte im Bereich des koronalen Cortex (Abb. 8, 1, rot). Danach wurde die kaudale Gehirnhälfte mit ihrer Schnittfläche auf die Oberfläche der Schneidekammer des Vibratoms (VT1200S, Leica Biosystems) mit Sekundenkleber geklebt. Anschließend wurden in eisgekühlter und oxygenierter Saccharose-Lösung die 200-µm-dicken von dorsal zu ventral verlaufenden Gehirnschnitte gefertigt.

Abb. 8. Gehirnschneidevorrichtung (V. Naumov, H. Binkowski) zur Reproduzierbarkeit der koronalen Gehirnschnitte (116° zur Längsachse), bei denen die Fasern des Lemniscus lateralis und IC in der gleichen Ebene liegen. 1 – dorso-rostral zum Betrachter gerichtetes Gehirn einer P25 Maus, 2 – vertikal bewegliche Fassung mit einer handelsüblichen Rasierklinge, 3 – fixierbare Führung für die Klingenfassung, 4 – Rändelschraube zum genauen Einstellen der Führungsneigung, 5 – Winkelskala (°), 6 – Stativ, 7 – Silikonunterlage. Gehirnausrichtung und Schnittwinkel sind rot gekennzeichnet. Material der Metallbauteile: Edelstahl.



Unmittelbar nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf ein Sieb aus Mullbinde übertragen. Dieser befand sich in einem Inkubationsbecherglas und wurde mit oxygenierter künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (engl. *artificial cerebral spinal fluid*, ACSF, siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32) umgeben. Das Inkubationsbecherglas mit den Schnitten ruhte für ca.

eine Stunde in einem Wasserbad (#1052, GFL, Deutschland) bei 32° C und wurde anschließend bei Raumtemperatur gelassen.

## 2.4 Patch-Clamp Setup

Die Visualisierung der abzuleitenden Neurone erfolgte am Axio Examiner.A1 (Carl Zeiss) mit Hilfe der infraroten differentiellen Interferenzkontrastoptik (DIK) und einer CCD Mikroskopkamera (Pike F-145B, Allied Vision Technologies). Das Echtzeitsignal der Kamera wurde über den PC an einem Flachbildschirm dargestellt. Es wurde das Wasserimmersionsobjektiv W N-Achroplan 40x / 0,75 nA und A-Plan 5x / 0,12 nA Objektiv (Carl Zeiss) eingesetzt.

Für die Patch-Clamp-Experimente wurden die Schnitte aus dem Inkubationsbecher in die Ableitungskammer des o.g. Mikroskops übertragen. Durch die Kammer floss kontinuierlich (1-2 ml/min) die oxygenierte (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) ACSF-Lösung (siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32) (Schlauchpumpe Reglo Analog MS 4/12, Ismatec). Ableitungen erfolgten bei der nahezu physiologischen Temperatur von 32°C (Badcontroller V, TC05, Luigs & Neumann).

Damit die Schnitte in der Kammer von der ACSF-Strömung nicht bewegt werden, wurden diese an dem Boden der Kammer mit der handgefertigten s.g. elektrophysiologischen Harfe fixiert. Die Harfe bestand aus einem U-förmigen Platindraht, über den die Strumpfnylonfäden gespannt und mit Sekundenkleber befestigt waren.

Die Ableitungselektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (BM150F-10P, BioMedical Instruments) mit dem Elektrodenzieher (DMZ Universal Puller, Zeitz Instruments) hergestellt. Mit der Elektrodenlösung (siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32) gefüllten Elektroden wiesen einen Widerstand von 2-4 MΩ auf. Um die Verstopfung der Glaselektroden zu vermeiden, wurde oral über eine Mundstück-Schlauch-Elektrodenhalter-Vorrichtung und unter Kontrolle des Differenzdruckmessgeräts (DD890, Dostmann) Überdruck der Ableitelektrodenlösung (*ca.* 50 mbar) erreicht.

Ein chlorierter Silberdraht (Ø 0,25 mm) des Ableitungselektrodenhalters (ISO-S-1.5G, G23 Instruments) diente als elektrischer Leiter zwischen der Elektrodenlösung und dem Vorverstärker (Headstage CV-7B, Axon Instruments). Der Letztere leitete die elektrischen Signale über den Verstärker (MultiClamp 700B, Molecular Devices) zum Analog-Digitalwandler (Axon Digidata 1550A mit HumSilencer, Molecular Devices), der seinerseits das Signal in den PC einspeiste (HP ProDesk 600 G1 TWR, Hewlett-Packard mit Windows 8 Pro). Zwei in dem Ableitbad verbauten Ag/AgCl Elektrodenpellets (EP1, World Precision Instruments) wurden an der Vorverstärkererdung bzw. an die Erdung von Biphasic Stimulus Isolator (BSI-950, Dagan Corporation) angeschlossen und dienten als Referenz bzw. Erdungselektrode.

Die Ableitkammer mit dem Gehirnschnitt war am schwingungsdämpfenden Setuptisch (63-500 Series, Technical Manufacturing Corporation) stationär verbaut. Das Mikroskop stand auf der zweidimensional motorisierten Plattform (V240, Luigs & Neumann) und wurde somit über die Ableitkammer bewegt. Die Ableitelektrode und die Stimulationselektrode wurde mittels dreidimensional steuerbaren Mikromanipulatorarmen (SM7, Luigs & Neumann) bewegt.

Zur elektrischen Stimulation am Gehirnschnitt wurden bipolare Spannungspulse (je 0,2 ms lang) mit der pClamp-Software (Version 10.5.1.0, Molecular Devices) getriggert. Des Weiteren wurde das Signal vom o.g. PC über den Analog-Digitalwandler (Axon Digidata 1550A mit HumSilencer, Molecular Devices) an das Potentiometer (4,7 kOhm, max. 100 V) und anschließend an den Biphasic Stimulus Isolator (BSI-950, Dagan Corporation) weitergeleitet. Der Letztere leitete Spannungspulse über einen Silberdraht ( $\varnothing$  0,25 mm) in die Borosilikatglaselektrode (Widerstand 2-2,5 M $\Omega$ ), die mit dem 2M NaCl befüllt wurde. Damit an der Spitze der Stimulationselektrode kein überdruckbedingter NaCl-Austritt stattfindet, wurde an dem Schaft des Elektrodenhalters eine Bohrung eingebracht. Diese ermöglichte den Druckausgleich zwischen der NaCl-Lösung und dem Atmosphärendruck.

## 2.5 Lösungen in den Patch-Clamp Experimenten

**Saccharose-Lösung** wurde bei der Präparation der Gehirne und der Herstellung der Gehirnschnitte angewendet. Sie beinhaltete (in mM): 2,5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 6 MgCl<sub>2</sub>, 25 Glukose, 200 Saccharose. pH-Wert betrug 7,4.

**Künstliche Zerebrospinalflüssigkeit, ACSF** (engl. *artificial cerebrospinal fluid*) wurde für die Inkubation der Gehirnschnitte angewendet. Diese beinhaltete (in mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 Glukose. pH-Wert betrug 7,4. Bei der Aufnahme der pharmakologisch isolierten I<sub>h</sub>-Ströme wurde die NaCl-Konzentration der ACSF auf 115 mM gesenkt, da die Zugabe der Pharmaka die Isoosmolarität der ACSF-Lösung sonst beeinträchtigte.

**K-Glukonat-Elektrodenlösung** wurde für Messungen in Current- und Voltage-Clamp (Messung der pharmakologisch isolierten I<sub>h</sub>-Ströme, Messung der Membraneigenschaften bei den de- und hyperpolarisierenden Strompulsen, Messung der über die LL-Stimulation evozierten Aktionspotentiale) angewendet. Diese beinhaltete (in mM): 125 Kalium D-Glukonat, 5 KCl, 10 HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure), 1 EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), 2 Na<sub>2</sub>-ATP, 2 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP und 10 Kreatinphosphat Dinatriumsalz Hydrat. Der pH-Wert von 7,25 wurde mit KOH eingestellt. Osmolarität der Lösung betrug ca. 280 mOsm (Osmomat 3000, Gonotec).



**Cs-Methansulfonate Elektrodenlösung** wurde zur Messung der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC) in Voltage-Clamp-Modus angewendet. Diese beinhaltete (in mM): 135 Cs-Methansulfonate, 5 TEA-Cl (Tetraethylammoniumchlorid), 10 HEPES, 1 EGTA, 2 Na<sub>2</sub>-ATP, 2 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 10 Kreatinphosphat Dinatriumsalz Hydrat und 5 QX314 (N-(2,6-Dimethylphenylcarbamoylmethyl) triethylammonium Bromid). Der pH-Wert von 7,25 wurde mit Cs-OH eingestellt. Osmolarität der Lösung betrug *ca.* 280 mOsm.

Alle o.g. Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich oder Biotrend erworben, wenn nicht anderweitig gekennzeichnet.

## 2.6 Datenerfassung

Die Aufzeichnung der elektrophysiologischen Ableitungen erfolgte mit dem Verstärker MultiClamp 700B mit integriertem HumSilencer (Molecular Devices) und unter Kontrolle der pClamp Software (ver. 10.5.1.0 Molecular Devices). Sowohl Voltage- als auch Current-Clamp Aufnahmen wurden mittels Tiefpassfilter (10 kHz) und Bessel-Filter 4. Ordnung gefiltert und mit einer Abtastrate von 50 kHz bzw. 100 kHz erstellt. Bei den Voltage-Clamp-Experimenten (außer bei der Aufnahme von miniatur EPSCs) erfolgte die Kompensation der Gesamtzellkapazität (engl. *whole cell capacitance*). Der Serienwiderstand (<12 MΩ) wurde ebenso zu 2 MΩ kompensiert. Um das Kompensationsprozedere auch während der Ableitung zu kontrollieren wurden 20 ms lange Spannungspulse (-10 mV) in das Ableitungsprotokoll integriert. Das Haltepotential bei den Voltage-Clamp-Aufzeichnungen betrug -60 mV. Bei den Current-Clamp-Aufzeichnungen wurde der Brückenwiderstand (engl. *bridge balance*) justiert, so dass elektrodenwiderstandbedingte Artefakte kompensiert wurden. Alle Membranpotentialmessungen wurden erst während der Analyse auf das Flüssigkeitsübergangspotential (engl. *liquid junction potential*) von -10,5 mV korrigiert.

## 2.7 Designs der elektrophysiologischen Experimente und Datenanalyse

### 2.7.1 CIC – das Zielgebiet

Alle Patch-Clamp-Experimente wurden in dem zentralen Nukleus des Colliculus inferior durchgeführt. Der CIC wurde visuell mit der Orientierung aus dem *mouse brain atlas* (Paxinos and Franklin 2004) identifiziert. Es wurde dabei die Unterteilung von IC in den zentralen Nukleus sowie externen- und dorsalen Cortex von IC angewendet (Abb. 15, A). Außerdem dienten die gut sichtbaren „Inseln“ der EYFP-positiven Neurone (inhibitorischen Neurone) im ECIC sowie diffuse EYFP-positive Neurone im CIC zur Unterscheidung zwischen diesen Regionen (Abb. 11, A<sub>2</sub>) (Ono et al. 2005).

### 2.7.2 *Pharmakologisch isolierte Ih-Ströme*

Die hyperpolarisations-aktivierenden Ströme (I<sub>h</sub>) wurden pharmakologisch isoliert. Dafür wurden Spannungs- und Ligand-aktivierende Ionenkanäle mittels Zugabe entsprechender Blocker zur ACSF wie folgt blockiert (in mM): 1 3,4-diaminopyridine (Blocker der K<sup>+</sup>-Kanäle, K<sub>v</sub>1), 10 Tetraethylammoniumchlorid (Blocker der K<sup>+</sup>-Kanäle), 0,2 BaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (Blocker der K<sup>+</sup>-Kanäle), 0,05 NiCl<sub>2</sub> (Blocker der T-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle), 0,1 CdCl<sub>2</sub> (Blocker der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle), 0,001 TTX (Tetrodotoxin, Blocker der spannungsabhängigen Na<sup>+</sup>-Kanäle), 0,01 DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-Dione, AMPA- und Kainsäurerezeptorantagonist), 0,025 DL-AP5 (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, NMDA-Rezeptorantagonist), 0,001 Strychnin Hydrochlorid (kompetitiver Antagonist der Glycinrezeptoren), 0,01 SR-95531 (Gabazin, allosterischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist). Da die Zugabe dieser Blocker die Isoosmolarität der ASCF-Lösung beeinträchtigte, wurde die NaCl-Konzentration der ASCF von 125 auf 115 mM gesenkt.

Pharmakologisch isolierte I<sub>h</sub>-Ströme wurden mit 1s langen de- und hyperpolarisierenden Spannungspulsen von -55,5 bis -120,5 mV mit der Schrittweite von 5 mV aktiviert. Restströme (engl. *tail currents*) wurden anhand der nach jedem der Spannungsschritte folgenden 0,5 s langen Haltepotential von -100,5 mV erfasst. Alle Angaben hier und im Weiteren sind auf das Flüssigkeitsübergangspotential (engl. *liquid junction potential*) von -10,5 V korrigiert.

Zur Erfassung der Aktivierungszeitkonstanten der I<sub>h</sub>-Ströme wurden einfache exponentielle Trendlinien über die Ströme, die bei den hyperpolarisierenden Spannungspulsen (-100,5 bis -120,5 mV) aufgenommenen wurden, angewendet. Anschließend wurden bei der Spannung von -100,5 mV vermessene Zeitkonstanten verglichen. Bei den Neuronen mit den langsamen Zeitkonstanten (> 235 ms) konnte der I<sub>h</sub>-Strom während der 1-sekundigen Spannungsapplikation nicht vollständig aktiviert werden. Da jedoch die Zeitkonstanten der langsamen Ströme in jedem Fall eine Unterschätzung darstellen, sind sowohl die Neurone mit den schnellen als auch die mit den langsamen Zeitkonstanten durchaus miteinander vergleichbar.

Die Amplituden der I<sub>h</sub>-Ströme wurden am Ende der Spannungspulse bei 1 s vermessen. Die Stromdichte (pA/pF) wurde als Division der Stromamplitude durch die Zellkapazität kalkuliert. Die Zellkapazität wurde bei der datenakquisitionbegleitenden Kapazitätskompensation ermittelt.

Die halbmaximale Aktivierung der I<sub>h</sub>-Ströme wurde anhand der Restströme analysiert. Die Reststromamplituden wurden *ca.* 20 ms nach Ende von jedem de- und hyperpolarisierenden Spannungspuls während des Haltepotentials (-100,5 mV) bestimmt. Des Weiteren wurden die Amplituden für jedes Neuron auf die maximale und minimale Amplitude mit der folgenden Gleichung:  $(I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})$  normiert, wobei I für die Stromamplitude steht. An-

schließlich wurde zu dem Spannung-Reststrom Datensatz von jedem Neuron die Boltzmannsche Funktion angewendet und die halbmaximale Spannung ( $V_{0,5}$ ) ermittelt (Igor Pro, WaveMetrics, Inc). Die Abb. 9 (F) zeigt, zur Übersichtlichkeit, die anhand der Boltzmannschen Funktion ermittelten sigmoidalen Trendlinien, die für die Strom-Restspannung Mittelwerte der jeweiligen Neuronengruppe kalkuliert wurden.

### 2.7.3 Membraneigenschaften und AP-Feuermuster

Passive und aktive Membraneigenschaften der Neurone wurden im Current-Clamp-Modus anhand der de- und hyperpolarisierenden rechteckigen 0,5 s langen Strompulsen ermittelt. Die Stromstärke wurde dabei schrittweise (50 pA) geändert. Zum Berechnen des Eingangswiderstandes (M $\Omega$ ) der Neurone wurde zuerst das Membranpotential am Ende des -50 pA Strompulses, – im *steady state* (engl.) ermittelt. Weiterhin wurde das Ohm'sche Gesetz angewendet.

Das Ruhemembranpotential wurde als Mittelwert über die ersten 500 ms der Ableitung ermittelt. Membranzeitkonstanten wurden anhand der einfachen exponentiellen Trendlinien über die Membranpotentialauslenkung, die bei der Applikation der -50 pA Strompulse entsteht kalkuliert (pClamp, Version 10.5.1.0, Molecular Devices).

Um die Aktivierung der hyperpolarisations-aktivierenden Ströme ( $I_h$ ) in den Current-Clamp Messungen abzuschätzen, wurde die Spannungseinsenkung, die bei den hyperpolarisierenden Strompulsen entsteht – *Ih-sag* (engl. *hyperpolarisation current (I) activated sag*) wie folgt quantifiziert. Zum einen wurde die Kinetik der  $I_h$ -Aktivierung bei den -200 pA Strompulsen charakterisiert. Dafür wurde eine einfache exponentielle Trendlinie über die depolarisierende Spannungsauslenkung gelegt und die Zeitkonstante bestimmt. Zum anderen wurde die Amplitude der  $I_h$ -Aktivierung bei den -200 pA Pulsen abgeschätzt. Dafür wurde die relative Amplitude von  $I_h$ -sag ( $V_{rel. sag}$ ) wie folgt berechnet:  $V_{rel. sag} = (V_{max} - V_{ss}) / V_{max} * 100\%$ . Wobei  $V_{max}$  für maximale Spannungsauslenkung und  $V_{ss}$  für die Auslenkung in *steady state* stehen

wurden entsprechend ihrem AP-Feuermuster in die folgenden Kategorien unterteilt. Als Onset-Neurone wurden die Neurone deklariert, die 1-3 APs bei den Stromapplikationen bis zu 250 pA über der AP-Schwelle feuerten. Die restlichen Neurone wurden adaptierende Neurone genannt. Unter beiden Neuronengruppen gab es Neurone mit Rebound-AP. Dabei wurden Rebound-AP-Neurone als solche bezeichnet, nur wenn der Rebound-AP bei Spannungsauslenkungen nicht weniger als -90,5 mV (gemessen in *steady state*) hervorgerufen wurden. Die Spannung von -90,5 mV galt als Entscheidungskriterium, da diese dem Umkehrpotential der inhibitorischen Synapsen entspricht.

Zur Quantifizierung der zeitlichen Veränderung der AP-Feuerraten bei adaptierenden Neuronen wurden die Antworten auf die depolarisierenden Strompulse ausgewählt, welche eine

Feuerrate von *ca.* 100 Hz aufwiesen. Dabei wurden ein VGAT+ und 8 VGAT- Neurone mit AP-Feuerraten niedriger als 75 Hz aus der Auswertung ausgeschlossen. Es wurden zwei Auswertungsmethoden angewendet. Bei der Ersten wurden die Feuerraten für jedes einzelnes AP aus den Inter-AP-Intervallen bestimmt, danach wurden mittleren Feuerraten über ein Zeitraster mit der Fensterbreite von 50 ms bestimmt. Folglich wurden diese mittleren Feuerraten für jedes Zeitfenster und jede Neuronengruppe gemittelt und anschließend gegen die Zeitachse des Rasters aufgetragen. Bei der zweiten Methode wurde die Adaptation der Neurone anhand der Adaptationszeitkonstanten analysiert. Es wurde die s.g. fortlaufende Frequenz wie folgt berechnet. Die Feuerfrequenz wurde zwischen dem ersten AP und jedem fortlaufenden AP bestimmt und anschließend gegen den Zeitpunkt des jeweiligen fortlaufenden AP aufgetragen. Danach wurde eine doppelte exponentielle Funktion  $f(t) = A_1 \exp(-t/\tau_{schn.}) + A_2 \exp(-t/\tau_{langs.})$  über die Graphik der fortlaufenden Frequenz von jedem Neuron gelegt (Clampfit, Version 10.5.1.0, Molecular Devices). Dabei sind  $A_1$  und  $A_2$  die Koeffizienten der exponentiellen Funktion,  $t$  ist Zeit,  $\tau_{schn.}$  und  $\tau_{langs.}$  sind die schnelle und langsame Zeitkonstante. Anschließend wurde für jedes Neuron die gewichtete Adaptationszeitkonstante anhand der folgenden Gleichung kalkuliert:  $\tau_{gewichtet} = (A_1 * \tau_{schn.} + A_2 * \tau_{langs.}) / (A_1 + A_2)$ .

#### **2.7.4 Miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme (mEPSC)**

Zur pharmakologischen Isolierung der AMPA-Rezeptoren-vermittelten miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme (engl. *miniature excitatory postsynaptic current*, mEPSC) wurden der ACSF folgende Pharmaka hinzugegeben (in mM): 0,001 Tetrodotoxin (TTX) – Blocker der spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle, 0,001 Strychnin Hydrochlorid – kompetitiver Antagonist der Glycinrezeptoren, 0,01 SR-95531 (Gabazin) – allosterischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist und 0,025 DL-AP5 (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) – NMDA-Rezeptorantagonist.

Die Membranströme wurden im Voltage-Clamp Modus über 180 s aufgenommen. Es wurde die Cs-Methansulfonate-Elektrodenlösung angewendet (Zusammensetzung siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32). Die Gesamtzellkapazität und der Serienwiderstand wurden nicht kompensiert.

Einzelne mEPSC wurden in der Software pClamp (Version 10.5.1.0, Molecular Devices) anhand der Maskensuchfunktion (engl. *template search*) im Zeitfenster 70-180 s unter Augenscheinkontrolle gesammelt. Die Genauigkeitsschwelle für die Übereinstimmung der gesammelten mEPSC mit der Suchmaske wurde auf 6 gelegt. Wenige Ereignisse mit Amplituden  $<10$  pA und Abfallzeitkonstanten  $>7$  ms wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Es wurde die Häufigkeit (Hz) der mEPSCs ermittelt. Des Weiteren wurde ein durchschnittliches mEPSC für das jeweilige Neuron ermittelt und die Stromamplitude bestimmt. Ebenso wurde

die Abfallzeitkonstante anhand der einfachen exponentiellen Funktion bestimmt. Die Anstiegszeit wurde von der Stromauslenkung, die im Bereich 10-90% von der maximalen Stromauslenkung lag berechnet.

Mittlere Amplitude und Abfallzeitkonstante der mEPSC für die Häufigkeitshistogramme (Abb. 14, B, C) für diese Parameter wurde Folgendes kalkuliert. Zuerst wurde die Abfallzeitkonstante und Amplitude von jedem mEPSC eines jeden gesammelten Neuron ermittelt. Danach wurde ein Histogramm für jedes einzelne Neuron berechnet, wobei die Klassengröße für die Abfallzeitkonstante – 0,1 ms und Amplitude – 1,5 pA betrug. Diese Histogramme wurden auf den maximalen Häufigkeitswert der Amplituden bzw. Abfallzeitkonstanten für das jeweilige Neuron normiert. Anschließend wurden die normierten Histogramme über alle VGAT+ und alle VGAT- Neurone gemittelt. Zur Übersichtlichkeit wurden die gemittelten Histogramme von beiden Neuronengruppen auf den Maximalwert für die jeweilige Neuronengruppe normiert.

Anhand der Amplituden sowie Abfallzeitkonstanten, die für jedes mEPSC von dem jeweiligen Neuron bestimmt wurden, wurde für jedes Neuron der Variationskoeffizient der Amplituden sowie der Variationskoeffizient der Abfallzeitkonstanten bestimmt. Dies erfolgte als Division der Standardabweichung durch den Mittelwert für das jeweilige Neuron.

Das Amplitude-Abfallzeitkonstante-Konturdiagramm (Abb. 14, E) für VGAT+ und VGAT- Neurone wurde wie folgt berechnet. Zuerst wurde das Amplitude-Abfallzeitkonstante-Konturdiagramm mit der Klassengröße 0,15 ms, 2 pA für jedes einzelne Neuron erstellt. Danach wurde jedes Diagramm auf den maximalen Häufigkeitswert für das jeweilige Neuron normiert. Anschließend wurden die Diagramme über alle VGAT+ und alle VGAT- Neurone gemittelt und die Konturdiagramme: 25, 50 und 75 % für die jeweilige Neuronengruppe kalkuliert.

### ***2.7.5 Evozieren der exzitatorischen postsynaptische Ströme und Aktionspotentiale in CIC-Neuronen mittels der Stimulation der Fasern des Lemniscus lateralis***

Die Ableitung der exzitatorischen postsynaptischen Ströme und Aktionspotentiale, die anhand der elektrischen Stimulation des Lemniscus lateralis evoziert wurden, erfolgte unter der pharmakologischen Blockade der inhibitorischen synaptischen Übertragung durch Zugabe von Strychnin Hydrochlorid (0,001 mM) und SR-95531 (Gabazin, 0,01 mM) in die ACSF.

EPSC und AP wurden im CIC anhand der elektrischen Stimulation der Axonen, die über den LL zum IC verlaufen evoziert. Damit beides: LL und IC in koronalen Schnitten präsent waren, wurde der koronale Schnittwinkel von 116° angewendet (siehe Kapitel „Präparation der Gehirnschnitte“, Seite 30). Die Stimulation erfolgte im Bereich des DNLLs. Da DNLL überwiegend inhibitorische Neurone enthält (Adams and Mugnaini 1984) konnte dieser mittels

EYFP-Emissionssignals, das bei der Anregung mit dem Blaulicht von den VGAT-positiven Neuronen ausging, deutlich erkannt werden (Abb. 15, A).

Die Stimulation erfolgte mittels der Applikation bipolarer 0,2 ms langen Spannungspulse (siehe Kapitel „Patch-Clamp Setup“, Seite 31). Bei dem Hervorrufen von EPSCs wurden 30-100 Pulse mit einer Interpulpause von 4 s appliziert. Zur Anregung der AP wurden 20 Pulse mit der Interpulpause von 10 s entsandt.

Die evozierten EPSCs wurden bei der minimalen, minimalen plus 20 V und bei einigen VGAT- Neuronen maximalen Stimulationsspannung aufgenommen. Die Stimulationsspannung wurde als minimal definiert, wenn während der kontinuierlichen Erhöhung der Stimulationsstärke von 0 auf max. 70 V die EPSCs mit gelegentlichen Ausfällen auftraten. Als maximale Stimulationsstärke wurde die Spannung definiert, bei der, keine Änderung der EPSC-Amplitude stattfand.

Um die APs anzuregen, wurde die Stimulationsspannung eingestellt, die der minimalen Stimulationsspannung (detektierbare APs) plus 20 V entspricht. Eine höhere als minimale Stimulationsspannung wurde angewendet, um möglichst große Netzwerke zu aktivieren. Die mittlere Spannungsstärke war zwischen den beiden Neuronengruppen nicht signifikant unterschiedlich und war bei den VGAT- Neuronen  $57 \pm 5$  V ( $n=13$ ) und bei den VGAT+ Neuronen  $67 \pm 4$  V ( $n=11$ ) (Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney Test,  $p=0,209$ ).

Ableitung der evozierten EPSCs erfolgte im Voltage-Clamp Modus mit der Cs-Methansulfonate-Elektrodenlösung (siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32). Bei einigen Experimenten wurde Lucifer Yellow CH K<sub>2</sub>-Salz (2 mM, L0144, Sigma-Aldrich) der Elektrodenlösung beigemischt. Dies Vorgehen ermöglichte nach der Fixierung der Schnitte in PFA und anti-VGluT2-Immunofärbung (siehe Kapitel „Immunchistochemie und Konfokalmikroskopie“ Seite 40) die Resultate der Elektrophysiologischen Experimenten mit der Expression von VGluT2 in den perisomatischen Eingängen sowie mit dem Somadurchmesser der abgeleiteten Neurone zu korrelieren.

Ableitung der evozierten APs erfolgte in dem Current-Clamp Modus, es wurde dabei die K-Glukonat-Elektrodenlösung (siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32) eingesetzt.

**Analyse der evozierten exzitatorischen postsynaptischen Ströme.** Die evozierten EPSCs traten in den VGAT+ Neuronen bei jeder Stimuluswiederholung mit einer unterschiedlichen Latenz auf. Deswegen wurden evozierte VGAT+ EPSCs anhand der gleichen Technik wie die mEPSCs ausgewertet (Maskensuchfunktion, siehe Kapitel „mEPSC“, Seite 36). Das Suchprotokoll wurde in dem Zeitfenster von den ersten 100 ms nach der Stimulation ausgeführt. Auf diese Weise wurden für jedes Neuron die mittlere EPSC-Amplitude und die EPSC-Abfallzeitkonstante bestimmt. Der Variationskoeffizient der Amplitude für das jeweilige Neuron wurde als Division der Standardabweichung durch den Mittelwert berechnet.

Die in den VGAT- Neuronen evozierten EPSCs traten mit der gleichen Latenz auf. Deswegen konnte von der Maskensuchfunktion abgesehen werden, so dass die Ableitungswiederholungen nun über ihre ganze Länge gemittelt wurden. Nachfolgend wurden für jedes Neuron die mittlere Amplitude, die Abfallzeitkonstante sowie der Variationskoeffizient der Amplitude bestimmt. Bei einem VGAT+ Neuron wurden die EPSCs detektiert, deren Abfallzeitkonstanten in zwei deutliche Populationen aufgetrennt werden konnten: schnelle (Mittelwert: 0,3 ms) und langsame (Mittelwert: 2,2 ms) Abfallzeitkonstanten. Bei der Auswertung der mittleren EPSC-Abfallzeitkonstante und Amplitude wurden nur die EPSCs mit den schnellen Abfallzeitkonstanten berücksichtigt.

Mittels der Zeitpunkte der EPSC-Minima wurde die Latenz der einzelnen EPSCs als Zeitintervall zwischen dem Anfang des Stimulationsartefaktes und dem Zeitpunkt der EPSC-Minima kalkuliert. Anhand dieser Daten wurden der Median sowie die Standardabweichung der EPSC-Latenz für das jeweilige Neuron berechnet.

Zusammenhang zwischen Latenz, Stromamplitude und Häufigkeit der EPSCs wurde für jedes einzelne Neuron anhand der folgenden 3D-Graphiken visualisiert.

*EPSC-Häufigkeit vs. EPSC-Latenz.* Dafür wurde Post-Stimulus-Zeit-Histogramm (engl. *post stimulus time histogram*, PSTH) mit Zeitrasterbreite 0,2 ms für jedes einzelne Neuron berechnet. Danach wurde jedes PSTH auf das Häufigkeitsmaximalwert von dem jeweiligen Neuron normiert. Die normierte EPSC-Häufigkeit (0-1) wurde in den Graphiken als Farbcode dargestellt (Abb. 20, A).

*EPSC-Amplitude vs. EPSC-Latenz.* Zuerst wurde für jedes Neuron mittlere Amplitude für das jeweilige Latenzzeitfenster (Zeitrasterbreite 0,2 ms) berechnet. Danach wurden derart gemittelte Amplituden auf den Maximalwert für das jeweilige Neuron normiert. Die normierten Amplitudenwerte wurden als Farbcode dargestellt (Abb. 20, B).

Da die beiden oben beschriebenen Histogramme die gleiche Zeitrasterbreite aufweisen und für jedes Neuron normiert wurden, wurden sie für VGAT+ bzw. VGAT- Neurone und für Amplitude bzw. Häufigkeit über jeweiligen Latenzrasterfenster gemittelt. Zur Übersichtlichkeit wurden derart gemittelte normierte Häufigkeit und gemittelte normierte Amplitude von beiden Neuronengruppen entlang der gleichen Latenzzeitachse aufgetragen (Abb. 19, C).

**Analyse der evozierten Aktionspotentiale.** Die Latenz der AP wurde als Zeitintervall zwischen dem Anfang des Stimulationsartefaktes und dem Zeitpunkt des AP-Maximums definiert. Zwei Neurone wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, da diese ausgehend aus ihrer sehr kurzen AP-Latenz (< 2 ms), direkt stimuliert wurden. Es wurde der Median sowie die Standardabweichung der AP-Latenz für das jeweilige Neuron bestimmt.

Alle abgeleiteten Neurone zeigten keine Spontanaktivität, die AP-Zeitpunkte wurden als Zeitpunkte der AP-Maxima im Zeitfenster 300 ms nach der Stimulation detektiert. Bei 4 von 11 VGAT+ Neuronen führte die Stimulation gelegentlich zu einer AP-Salve (bis zu 4 AP).

Da die APs in der AP-Salve von den mehreren vorgeschalteten Neuronen ausgelöst sein konnten, wurden alle AP-Zeitpunkte bei der Auswertung der Median sowie der Standardabweichung der AP-Zeitpunkte berücksichtigt.

Bei der Auswertung der AP-Latenz wurden mittlere normierte PSTH anhand der ersten AP während jeder Stimulationswiederholung sowohl für VGAT+ als auch für VGAT- Neurone wie folgt berechnet. Zuerst wurde für jedes einzelne Neuron ein PSTH mit der Latenzrasterbreite 0,6 ms berechnet. Diese PSTH wurden auf den maximalen Häufigkeitswert für das jeweilige Neuron normiert. Anschließend wurde für jedes Latenzrasterfenster ein Mittelwert über alle VGAT+ und alle VGAT- Neurone berechnet. Zur Übersichtlichkeit wurden beide mittleren PSTH auf den Maximalwert von der jeweiligen Neuronengruppe normiert.

## 2.8 Statistik

Alle Mittelwerte werden mit Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of mean*, SEM) dargestellt. Bei der statistischen Analyse wurde zuerst getestet, ob die Daten einer Normalverteilung angehören und über die gleiche Varianz verfügen. Dafür wurden der Shapiro-Wilk-Test und der Levene- oder der F-Varianztest angewendet. Wenn die Daten nicht-normalverteilt waren und/oder ungleiche Varianzen aufwiesen, wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test oder ein Mann-Whitney-Test oder ein Friedman-Test mit nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test angewendet. Wenn die Daten normalverteilt waren, kam einfaktorielle Varianzanalyse und nachfolgender Tukey's Post-hoc-Test oder T-Test zum Einsatz. Statistische Tests wurden in der Software GraphPad Prism 7 und Excel 2010 (Microsoft Office 2010) durchgeführt. Dabei wurde Excel mit dem Add-in Real Statistics Resource Pack (Charles Zaiontz) ausgestattet.

Datenanalyse und Erstellung der Graphen erfolgten in Excel und PowerPoint (Microsoft Office 2010), Inkscape 0.92, pClamp (Version 10.5, Molecular Devices) sowie Igor Pro (Version 6.2, WaveMetrics, Inc), das mit der Routine Neuromatic (UCL, London, UK) ausgestattet war.

## 2.9 Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie

### 2.9.1 Perfusion, Präparation der Gehirnschnitte und IHC-Färbung

Dreizehn VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mäuse (3 Männchen und 10 Weibchen) im Alter P28-73 wurden für die immunhistochemischen Färbungen (IHC) eingesetzt. Dabei wurden für die HCN1-, HCN2-, HCN4-IHCs jeweils 3 Tiere, für GluR4- und GAD67/MAP2-IHCs jeweils 1 Tier sowie für VGluT2/MAP2-IHC zwei Tiere verwendet.



Die Tiere wurden mittels einer intraperitonealen Injektion von Xylazin (Rompun 2%, Bayer) und Ketamin (Ketavet 100 mg/ml, Pfizer) in 0,9%-iger NaCl-Lösung tief anästhesiert. Dabei wurden Xylazin im Verhältnis 7,95 mg/kg Körpergewicht und Ketamin: 159 mg/kg Körpergewicht dosiert. Danach folgte die transkardiale Perfusion bei Raumtemperatur (RT). Dabei wurde nach der Präparation des Brustkorbes über eine Kanüle Phosphatpuffer (engl. *phosphate buffer*, PB, 0,1 M, pH 7,4) in den linken Ventrikel mit 4 ml/min Flussgeschwindigkeit in den Kreislauf reingewaschen. Ein Einschnitt in das rechte Atrium führte zum Auswaschen des Blutes aus dem Blutkreislauf des Tieres mit Perfusionslösungen. Der PB wurde für 3 min reingewaschen, dann folgte die 15 minutige Perfusion mit dem Fiksans Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth, 4% in 0,1 M PB, pH 7,4). Unmittelbar danach wurden die Gehirne entnommen und über Nacht bei 4° C in der PFA-Lösung nachfixiert. Die Nachfixierung sowie alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten am Schüttelgerät (Titramax 101, Heidolph). Am nächsten Tag wurden die Gehirne dreifach je 10 min bei RT in PB gewaschen. Mittels Vibratom (VT1200, Leica Biosystems) wurden aus den in Agaroseblock (4% in BP) eingebetteten Gehirnen koronale Schnitte (50 µm dick) im Bereich des IC gefertigt. Die in der Vibratomkammer im PB freischwimmenden Gehirnschnitte wurden dreifach je 10 min in der phosphatgepufferten Salzlösung (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS, 0,1 M, pH 7,4) gewaschen.

Anschließend wurden die IHC-Färbungen durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte zur Verhinderung der unspezifischen Antikörperbindung zuerst in der sog. Blockerlösung für 1 Stunde bei RT inkubiert. Diese Lösung beinhaltete 0,2 % Triton X-100 (Carl Roth, in manchen Fällen 0,02%) und entweder 10% Ziegen Serum (engl. *normal goat serum*, NGS, Sigma, G9023) oder 10% Esel Serum (engl. *normal donkey serum*, NDS, Gene Tex, GTX73245) in PBS. Das Serum wurde abhängig von dem Wirt der sekundären Antikörper (Tab. 2) ausgewählt. Nachfolgend wurden die Schnitte über Nacht bei 4° C in der Lösung mit den primären Antikörpern (Tab. 1) inkubiert. Diese PBS-Lösung beinhaltete neben den jeweiligen Antikörpern 0,2 % Triton X-100 (in manchen Fällen 0,02%) sowie, entweder 3% NGS oder 3% NDS.

Alle primären Antikörper wurden bereits für ihre Spezifität gegenüber dem Antigen validiert, entweder mittels Western Blot- oder in Knockout-Experimenten (siehe die Herstellerseiten und RRID-Einträge). Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte dreifach je 10 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte 2 Stunden bei RT und im Dunklen in der Lösung mit den sekundären Antikörpern (Tab. 2) inkubiert. Die PBS-Antikörper-Lösung beinhaltete neben den jeweiligen Antikörpern 0,2 % Triton X-100 sowie entweder 3% NGS oder 3% NDS. Für die Erstellung der negativen Kontrollen wurden die primären Antikörper bei der Färbung weggelassen. Folgend wurden die Schnitte erst dreifach je 10 min in PBS und anschließend zweifach je 10 min in PB gewaschen und in

0,05 M PB mit einigen Tropfen 10% Triton X-100 zur Montage auf die Objektträger vorbereitet. Die auf den Objektträger aufgebrauchten Schnitte trockneten *ca.* 10 min und wurden unter Beihilfe der hausgemachten Deckglasmontagelösung (Indig et al. 1997) zur mikroskopischen Präparaten finalisiert.

Antigen	Wirt	Poly-/Mono-klonal	Verdünnung	Hersteller, ID	Research Resource Identifiers (RRID)
<b>HCN1</b>	Maus	mono.	1:1000	UC Davis/NIH NeuroMab Facility, 75-110	AB 2115181
<b>HCN2</b>	Kaninchen	poly.	1:150	Alomone Labs, APC-030	AB 2313726
<b>HCN4</b>	Ziege	poly.	1:50	Santa Cruz Biotechnology, sc-19714	AB 2248528
<b>GAD67</b>	Maus	mono.	1:2500	Millipore, MAB5406	AB 2278725
<b>MAP2</b>	Hähnchen	-	1:1000	Neuromics, CH22103	AB 2314763
<b>VGluT2</b>	Meerschweinchen	poly.	1:1000	Synaptic Systems, 135404	AB 887884
<b>GluR4</b>	Ziege	poly.	1:500	Santa Cruz Biotechnology, sc-7614	AB 2114028

Tab. 1. Spezifikationen der primären Antikörper.

Fluorophor	Wirt	Antigen-Wirt	Verdünnung	Hersteller, ID	Anwendung mit
<b>Alexa 647</b>	Esel	Maus	1:200	Dianova, 115605205	<i>HCN1</i>
<b>Cy5</b>	Ziege	Kaninchen	1:300	Life Technologies, A10523	<i>HCN2</i>
<b>Alexa 633</b>	Esel	Ziege	1:500 1:250	Invitrogen, A21082	<i>HCN4</i> <i>GluR4</i>
<b>DyLight 405</b>	Esel	Maus	1:400	Jackson ImmunoResearch, 715475150	<i>GAD67</i>
<b>Alexa 647</b>	Esel	Hähnchen	1:500	Dianova, 703605155	<i>MAP2</i>
<b>Cy3</b>	Esel	Hähnchen	1:300	Dianova, 703165155	<i>MAP2</i>
<b>DyLight 405</b>	Esel	Hähnchen	1:150	Dianova, 703475155	<i>MAP2</i>
<b>Alexa 647</b>	Esel	Meerschweinchen	1:300	Dianova, 706605148	<i>VGluT2</i>

Tab. 2. Spezifikationen der sekundären Antikörper.

### **2.9.2 Füllung der Neurone mit den fluoreszierenden Farbstoffen während Patch-Clamp Experimenten**

Bei den Patch-Clamp Experimenten, bei denen die elektrisch evozierten EPSCs aufgenommen wurden, wurden die abgeleiteten Neurone mit fluoreszierendem Farbstoff befüllt. Dabei gelangte die in der Elektrodenlösung gelöste Farbstoff während den Ableitungen passiv aus der Glaselektrode in die Neurone hinein. Es wurde 2 mM Lucifer Yellow CH K2-Salz (L0144, Sigma-Aldrich) in der Cs-Methansulfonate-Elektrodenlösung (siehe Kapitel „Lösungen“, Seite 32).

Während die Ableitungselektrode noch an der Zelle war, wurden über das 5x Objektiv Fotoaufnahmen mit der Mikroskopkamera erstellt. Dies ermöglichte die nachträgliche Identifikation der Neurone während der Konfokalmikroskopie. Damit die Neurone beim Entfernen der Glaselektrode nicht platzen, wurde diese sehr langsam entfernt.

Nachdem die elektrophysiologischen Experimente beendet waren (max. 7 Stunden), wurden die Gehirnschnitte (200  $\mu\text{m}$ ) mit den gefüllten Neuronen in 4% PFA in PBS (0,1 M, pH 7,4) im Dunklen und auf dem Schüttelgerät fixiert. Im Fall von Lucifer Yellow-Befüllung erfolgte die Fixierung über Nacht bei 4°C. Nach der Fixierung wurden die Schnitte dreifach je 10 min in PBS (0,1 M, pH 7,4) gewaschen und entweder sofort zu mikroskopischen Präparaten verarbeitet oder zur VGluT2-IHC-Färbung weitergereicht. Aus Zeitgründen erfolgte die IHC-Färbung öfter erst nach 1-2 Tagen, dabei wurden die fixierte Schnitte in PBS bei 4°C gelassen.

Das Prozedere der Fertigung der mikroskopischen Präparate und der IHC-Färbungen ist dem Kapitel 2.9.2 mit folgenden Abweichungen zu entnehmen. Die Waschgänge mit PBS wurden bis auf 15 min verlängert, PBS enthielt 0,5% Triton X-100. Die primären Antikörper (VGluT2) wurden in PBS mit 1% NDS und 0,5% Triton X-100 aufgelöst. Die Inkubation mit dieser Lösung erfolgte über 3 Nächte bei 4°C. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa 647) erfolgte über eine Nacht bei 4°C.

### **2.9.3 Konfokalmikroskopie**

Mikrophotographische Aufnahmen der IHC-Präparate wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) TCS SP8 (Leica Microsystems) gefertigt. Dieses wurde mit folgenden Objektiven ausgestattet: 5x HCX PL Fluotar (nA 0,15), 20x HC PL APO Imm Corr (nA 0,75) und 63x HC PL APO CS2 Immersionsöl (nA 1,4). Die Lochblende wurde für jeden Kanal auf Airy-Scheibchengrößenordnung (engl. *airy disc*) 1 eingestellt. Zum Anregen der Fluorophore wurden folgenden Laser verwendet: Diode (405 nm), Argon/2 (514 nm, für EYPF), Diode (561 nm) und HeNe (633 nm). Die Laserstärke wurde zum Vermeiden des Ausbleichens möglichst niedrig eingestellt. Zur Erfassung der Fluorophoremmission wur-

den sowohl HyD- (engl. *high sensitivity hybrid detector*) als auch PMT- (engl. *photomultiplier tubes*) Sensoren eingesetzt. Zum Vermeiden der Signalüberlappungseffekte wurden die Fluorophoranregungs- und Signalerfassungswege für jedes Fluorophor aufgetrennt, die einzelnen Farbkanäle wurden sequenziell aufgenommen. Die Aufnahmeeinstellungen (Verstärkung) wurden so justiert, dass sie den dynamischen Bereich der Sensoren optimal deckten und wurden während der Aufnahme nicht geändert.

Es wurden sowohl die Aufnahmen der einzelnen optischen Ebenen als auch ein Aufnahmenblock entlang der Z-Achse durchgeführt (HCN4 und VGluT2/MAP2). Übersichtsaufnahmen mit den 5x- sowie 20x- Objektiven und die hochauflösenden Aufnahmen mit dem 63x-Objektiv stellen in meisten Fällen einzelne optische Ebenen dar. Die maximalen Projektionen von den drei optischen Ebenen, die mit Z-Abstand von 0,27  $\mu\text{m}$  lagen, wurden extra für HCN4-Aufnahmen erstellt.

#### **2.9.4 Quantitative Auswertung der KLSM-Aufnahmen**

Die Bildbearbeitung und Quantifizierung der KLSM-Aufnahmen fand in Fiji statt (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Zusätzlich wurde ImageJ (ImageJ Version 1.52i, National Institute of Health, USA) für die Bildbearbeitung eingesetzt.

Zum Quantifizieren der HCN1-IR entlang der dorsoventralen IC-Achse wurden in drei Tieren 2-4 koronale Gehirnschnitte entlang der rostro-kaudalen Achse ausgewählt. Alle Schnitte enthielten den CIC. Mit dem 5x-Objektiv wurden von insgesamt 9 IC-Schnitten die Aufnahmenblöcke erstellt. Jeder Aufnahmenblock bestand aus 4-6 optischen Ebenen, die entlang der Z-Achse mit Abstand von 9-11  $\mu\text{m}$  zu einander lagen. Des Weiteren wurde über den ganzen Aufnahmenblock für jede Z-Pixelkolumne ein Intensitätsmittelwert berechnet. Somit repräsentierte das resultierende Bild den ganzen Aufnahmenblock und wurde folgendermaßen weiterverarbeitet. Es wurden über die senkrecht zu der dorsoventralen IC-Achse liegenden Pixelsäulen (50  $\mu\text{m}$  Säulenbreite; 2,27  $\mu\text{m}$  Abstand zwischen den Säulen, Abb. 11, A<sub>1</sub>, rosa Balken) mittlere Grauwerte kalkuliert. Somit repräsentierte eine Reihe von mittleren Grauwerten und eine Reihe der dorsoventral angeordneten IC-Koordinatenwerten die HCN1-IR jeder IC-Hälfte. Die mittleren Grauwerte wurden auf den Maximalgrauwert von der jeweiligen IC-Hälfte normiert. Die dorsoventralen IC-Koordinatenwerte wurden zwischen 0 und 1 ebenso für jede IC-Hälfte normalisiert und in fünf gleiche dorsoventral angeordnete IC-Abschnitte unterteilt (0-20; 20-40; 40-60; 60-80 und 80-100% von dem IC-Ausmaß). Danach wurden die Grauwerte innerhalb von jedem Abschnitt für jeweilige IC-Hälfte gemittelt. Anschließend wurde mittlere Grauwert für jeweiligen IC-Abschnitt über alle rechten und alle linken IC-Hälften von jeweiligem Tier berechnet. Somit wurde jede der IC-Abschnitten mit 5 mittleren Grauwerten repräsentiert.

Um die Anzahl der VGAT-EYFP-positiven Neurone, die auch perisomatische HCN4-IR aufwiesen, zu bestimmen, wurden bei drei Tieren 5 CIC-enthaltenden Schnitte ausgewählt. Mit dem 63x-Objektiv wurden im CIC in jedem Schnitt 3-5 Aufnahmenblöcke, die aus 5-6 optischen Ebenen (Z-Abstand. 0,3  $\mu\text{m}$ ) bestanden, gefertigt. Anhand von Fiji Cell Counter wurden in jedem Aufnahmenblock die visuell identifizierten VGAT-EYFP-positiven Neurone markiert. Jedes markierte Neuron wurde auf die perisomatische HCN4-IR inspiziert und markiert, wenn die IR in mehr als einer optischen Ebene präsent war. Die gesamte Anzahl von VGAT-EYFP-positiven Neurone mit und ohne HCN4-IR wurde bestimmt.

Um die Somadurchmesser der VGAT-EYFP-positiven Neurone zu bestimmen sowie diese Neurone in zwei Gruppen zu unterteilen: Neurone mit perisomatischen VGluT2-positiven Eingängen und Neurone ohne den Letzten, wurden in zwei Tieren 4 CIC-enthaltenden Schnitte ausgesucht. Mit dem 63x-Objektiv wurden im CIC in jedem Schnitt 4 Aufnahmenblöcke, die aus 12-16 optischen Ebenen (Z-Abstand. 0,5  $\mu\text{m}$ ) bestanden, gefertigt. In jedem Aufnahmeblock wurden die optischen Ebenen ausgesucht in deren sowohl VGluT2 als auch MAP2-IR präsent war. Anhand von Fiji Cell Counter wurden in diesen Ebenen VGAT-EYFP-positiv Neurone visuell identifiziert und markiert. Jedes markierte Neuron wurde auf die perisomatische VGluT2-IR inspiziert. Wenn die perisomatische VGluT2-IR in mehr als einer optischen Ebene präsent war, wurde das Neuron als VGAT+VGluT2+ markiert. Es wurde parallel überprüft, ob die VGAT-EYFP-positiven Zellen auch für MAP2-positiv waren. Nur die Neurone, die für beide Marker positiv waren, wurden ausgewertet. Die gesamte Anzahl von VGAT-EYFP-positiven Neuronen mit und ohne perisomatischen VGluT2-IR wurde bestimmt. Somadurchmesser der VGAT-EYFP-positiven Neurone wurde in der optischen Ebene, wo sich der MAP2-negative Nukleus befindet, bestimmt. Dabei wurde zuerst der Perimeter von jedem Neuron bestimmt. Des Weiteren wurde der Neuronenperimeter als Kreisumfang ( $U$ ) behandelt und in Diameter (Somadurchmesser,  $d$ ) anhand der Gleichung:  $d = U/\pi$  umgerechnet. Es wurde der mittlere Somadurchmesser von den VGAT-EYFP-positiven Neuronen mit und ohne VGluT2-IR berechnet. Für die beiden Neuronengruppen wurde auch ein Histogramm mit der Klassenbreite 0,6  $\mu\text{m}$  für Somadurchmesser kalkuliert. Anschließend wurde die prozentuelle Verteilung der VGluT2-IR unter den großen ( $\emptyset > 17 \mu\text{m}$ ) und kleinen ( $\emptyset < 17 \mu\text{m}$ ) VGAT-EYFP-positiven Neuronen berechnet.

Somadurchmesser und VGluT2-IR der während der Patch-Clamp Experimente mit Lucifer Yellow gefüllten Neurone wurden anhand der mit dem 63x-Objektiv erstellten Abbildungsblöcke quantifiziert und evaluiert. Die Z-Tiefe der Abbildungsblöcke entsprach dem Durchmesser des jeweiligen Neurons. Der Z-Abstand zwischen den einzelnen optischen Ebenen betrug 0,4-0,5  $\mu\text{m}$ . Da die Nuclei nicht sichtbar waren und das Zentrum der Neurone schwierig abzuschätzen war, wurden maximale Projektionen über den ganzen Abbildungsblock erstellt. Anhand dieser wurde Perimeter des Neuronensomata (wie im oben beschriebenen Experiment) vermessen und anschließend der Somadurchmesser berechnet. Die Neurone wurden

doppelt auf den Neurotransmitterphänotyp verifiziert: Während den elektrophysiologischen Experimenten mittels optogenetischen Einsatzes (ChR2-Aktivierung mit dem Blaulicht) und während der Konfokalmikroskopie anhand des EYFP-Emissionssignals. Auch eine schematische IC-Zeichnung mit Topografie der gefüllten Neurone wurde benutzt. Letztendlich wurde Präsenz die VGluT2-positiven perisomatische Eingänge um abgeleitete Neurone bestimmt und mit Somadurchmessermessungen und Resultaten der elektrophysiologischen Experimente (Eigenschaften der EPSC, die bei der minimalen plus 20 V Stimulation des LL evoziert wurden) korreliert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Teil 1. Ih-Ströme in inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen

Eigenschaften der Ih-Ströme in GABAergen und nicht-GABAergen CIC-Neurone wurden mit dem Feuermuster, den Adaptations- und Membraneigenschaften der beiden Neuronengruppen in den jungen adulten (P22-P28) Tieren korreliert. Die Eigenschaften der Ih-Ströme wurden auch mit der HCN1-, HCN2- und HCN4-Immunreaktivität in den exzitatorischen und inhibitorischen CIC-Neuronen verglichen. Zur Verifikation der GABAergen (für vesikulären GABA Transporter positiven Neurone, VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-negativen) Neurone im CIC wurde der VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mausstamm eingesetzt (siehe Methodik, Seite 26).

##### 3.1.1 Unterschiedliche Ih-Ströme in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen

Durch Hyperpolarisation aktivierende Ströme (Ih) wurden im Voltage-Clamp Modus im CIC aufgenommen und zwischen inhibitorischen (VGAT+) und exzitatorischen (VGAT-) Neuronen verglichen (Abb. 9). Dafür wurden 1 s lange Haltepotentiale von -55,5 mV bis auf -120,5 mV schrittweise (5 mV) appliziert. Die sog. Restströme wurden bei dem Haltepotential von -105,5 mV, 0,5 s lang evoziert. Ih-Strome wurden in allen Experimenten pharmakologisch isoliert, indem Blocker der spannungs- und ligandgesteuerten Ionenkanäle der ACSF hinzugegeben wurden (siehe Methodik, Seite 34). In allen inhibitorischen Neuronen riefen die hyperpolarisierenden Spannungspulse einen langsam aktivierenden Einwärtsstrom hervor (VGAT+, Abb. 9, A<sub>1</sub>). Die exzitatorischen Neurone zeigten im Gegenteil Unterschiede in der Kinetik des Ih-Stromes und konnten in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Neuronengruppe zeigte im Vergleich zu VGAT+ Neuronen schnell aktivierende Ih-Ströme (schnelle Aktivierungszeitkonstante – tau, siehe Methodik, Seite 34) mit einer großen Amplitude (VGAT-, schnelle tau, Abb. 9, A<sub>2</sub>). Die zweite Gruppe wies langsame Ih-Ströme mit kleinen Amplituden auf, ähnlich der VGAT+ Neurone (VGAT-, langsame tau, Abb. 9, A<sub>3</sub>). Die dritte Gruppe zeichnete die Abwesenheit der Ih-Ströme aus (VGAT-, kein Ih, Abb. 9, A<sub>4</sub>), denn die hyperpolarisierenden Spannungspulse riefen keine langsam aktivierenden Einwärtsströme auf.

Durch Auftragen der Amplitude des Ih-Stroms gegen die Aktivierungszeitkonstante (tau) sowie der halbmaximalen Aktivierungsspannung wurden die exzitatorischen Neurone mit Ih-Strömen in zwei Gruppen auftrennt (Abb. 9, B). Eine Gruppe zeigte langsame Ih-Aktivierungszeitkonstanten (>235 ms, Abb. 9, B, vertikale Punktierlinie), hyperpolarisierte halbmaximale Aktivierungsspannungen und kleine Ih-Amplituden (VGAT-, langsame tau). Die zweite Gruppe wies stattdessen schnellere Aktivierungszeitkonstanten, depolarisierende halbmaximalen Aktivierungsspannungen sowie größere Ih-Amplituden auf (VGAT-,

schnelle tau). Beide o.g. Gruppen der VGAT- Neurone konnten bis auf zwei VGAT- Neurone mit intermediären Eigenschaften anhand der 235-ms-Grenze konsistent aufgeteilt werden. VGAT- Neurone mit langsamen Zeitkonstanten (>235 ms) zeigten ähnlich zu den VGAT+ Neuronen hyperpolarisierte halbmaximale Aktivierungsspannungen. Die Ih-Amplituden dieser VGAT- Neurone waren nur etwas niedriger im Vergleich zu VGAT+ Neuronen. Alle VGAT+ Neurone (33% aller Neuronen) zeigten langsame Zeitkonstanten. Die VGAT- Neurone mit den schnellen Zeitkonstanten machten 36% und die VGAT- Neurone mit langsamen Zeitkonstanten 25% von allen Neuronen aus. Lediglich 6% aller Neurone zeigten keinen Ih-Strom auf, diese Neurone waren alle VGAT- und somit exzitatorisch (Abb. 9, C).

Ih-Stromdichte, Aktivierungszeitkonstanten und die halbmaximalen Aktivierungsspannungen wurden zwischen den unterschiedlichen Gruppen der exzitatorischen und inhibitorischen Neurone verglichen. Ih-Stromdichte war ähnlich in den VGAT+ und den VGAT- Neuronen mit den langsamen Zeitkonstanten. In den VGAT- Neuronen mit schnellen Zeitkonstanten war die Ih-Stromdichte jedoch signifikant größer im Vergleich zu den ersten zwei Neuronengruppen (Tab. 3, Abb. 9, D, D'). Wie zu erwarten, zeigten die VGAT- Neurone mit den schnellen Zeitkonstanten signifikant schnellere tau-Werte als die VGAT+ Neurone und die VGAT- Neurone mit den langsamen Zeitkonstanten (Tab. 3, Abb. 9, E, E'). Die halbmaximale Aktivierungsspannung war signifikant negativer in den VGAT+ und VGAT- Neuronen mit den langsamen Zeitkonstanten im Vergleich zu den VGAT- Neuronen mit den schnellen Zeitkonstanten (Tab. 3, Abb. 9, F, F').

Die Unterschiede in der Ih-Strom Kinetik und der Ih-Strom/Spannungsabhängigkeit deuteten entweder auf die variable Verteilung der HCN-Kanaluntereinheiten unter den o.g. Neuronengruppen oder auf die Modulation der Ih -Ströme durch sog. *second messenger* hin.

Mittelwert ± SEM (n)	Ih-Aktivierungszeitkonstante (ms)	Dunn's Post-hoc-Test	Stromdichte (pA/pF)	Dunn's Post-hoc-Test	Halbmaximale Aktivierung (mV)	Dunn's Post-hoc-Test
<b>VGAT+</b>	389±30 (16)	VGAT-, schn. tau ***	-23,2±2,4 (16)	VGAT-, schn. tau ***	-98,8±1,3 (15)	VGAT-, schn. tau ***
<b>VGAT-, schnelle tau</b>	181±10 (17)	VGAT-, langs. tau ***	-62,3±4,9 (17)	VGAT-, langs. tau ***	-88,2±1,5 (17)	VGAT-, langs. tau ***
<b>VGAT-, langsame tau</b>	391±31 (12)		-17,4±3,0 (12)		-100,8±1,1 (11)	

Tab. 3. Vergleich der Eigenschaften der pharmakologisch isolierten Ih-Ströme in den VGAT+ sowie der VGAT- Neuronen mit den langsamen (langs.) und mit den schnellen (schn.) Ih-Aktivierungszeitkonstanten. Kruskal-Wallis Test mit dem nachfolgenden Dunn's Post-hoc-Test (\*\*\*) p < 0,001).



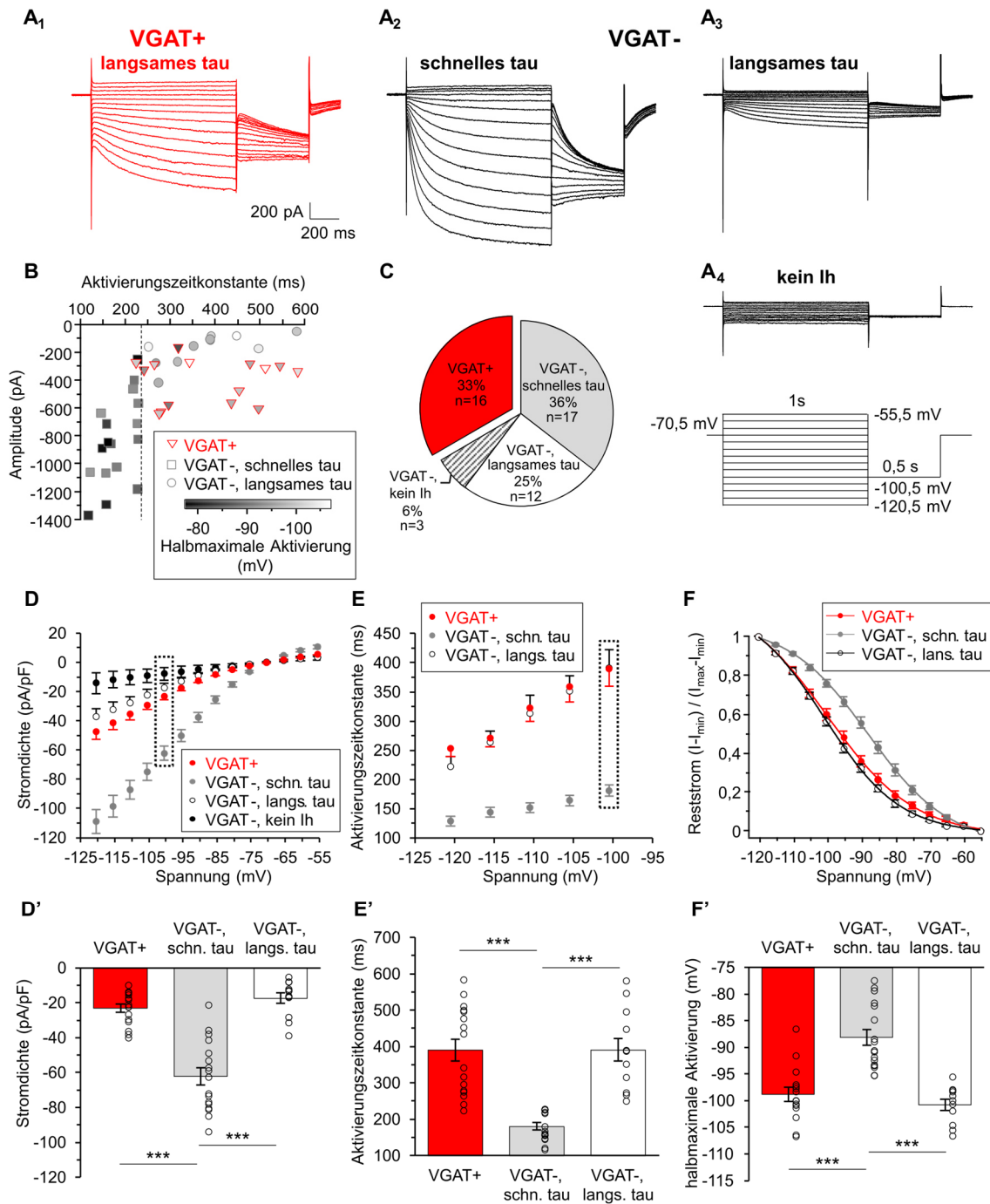


Abb. 9. Exemplarische Beispiele der pharmakologisch isolierten Ih-Ströme in GABAergen (VGAT+) (A<sub>1</sub>) und unterschiedlichen nicht-GABAergen Neuronen (VGAT-) (A<sub>2</sub>-A<sub>4</sub>), welche entsprechend ihrer Ih-Aktivierungszeitkonstante ( $\tau$ ) in langsame (langs.) und schnelle (schn.) sowie Neuronen ohne Ih-Ströme differenziert wurden. Zusammenhang zwischen Aktivierungszeitkonstante, halbmaximaler Aktivierung und Amplitude der Ih-Ströme in GABAergen und nicht-GABAergen Neuronen (B). Punktierlinie bei 235 ms teilt die nicht-GABAergen Zellen in Neurone mit schnellen und langsamen Ih-Aktivierungszeitkonstanten. Prozentuale Verteilung der Neuronengruppen (C). Quantifizierung der Eigenschaften der Ih-Ströme in den VGAT+ und unterschiedlichen nicht-GABAergen Neuronen (D-F'). GABAerge Neurone zeigten signifikant niedrigere Ih-Stromdichte (D, D'), langsamere Ih-Aktivierungszeitkonstanten (E, E') sowie hyperpolarisierende halbmaximale Ih-Aktivierung (F, F') im Vergleich zu den nicht-GABAergen Neuronen mit schnellen Ih-Zeitkonstanten. Gestrichelte Rechtecke in D und E zeigen die Daten, die in D' und F' repräsentiert sind. Graphiken zeigen Mittelwert  $\pm$  SEM. Kruskal-Wallis Test mit nachfolgenden Dunn's Post-hoc-Test (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### ***3.1.2 GABAerge Neurone waren positiv für HCN4- und negativ für HCN1-Immunreaktivität***

Zur Prüfung, ob die Expression der unterschiedlichen Untereinheiten der hyperpolarisationsaktivierenden und durch zyklische Nukleotide modulierenden Kanäle (engl. *hyperpolarisation activated and cyclic nucleotide-gated channel*, HCN) spezifisch für Neuronengruppen im IC ist, wurden an den PFA-fixierten Gehirnschnitten die immunhistochemischen Färbungen gegen HCN1-, HCN2-, und HCN4-Isoformen durchgeführt. Anschließend wurden die o.g. Färbungen mit der Expression von EYFP in GABAergen (VGAT+) Neuronen des VGAT-ChR2-EYFP-Mausmodells (siehe Methodik, Seite 40) verglichen. Von der immunhistochemischen Färbung gegen HCN3-Isoform wurde abgesehen, denn diese Isoform wird fast ausschließlich in den thalamischen und olfaktorischen Neuronen exprimiert (Moosmang et al. 1999, Notomi and Shigemoto 2004).

Deutliche HCN1-Immunreaktivität wurde um die Somata sowie im Neuropil in allen Bereichen des CICs nachgewiesen (Abb. 10, A<sub>1</sub> und Abb. 11, A<sub>1</sub>). Interessanterweise wiesen viele nicht-GABAerge EYFP-negative Neurone (Abb. 10, A<sub>2</sub>, Vergrößerung: Sterne) starke perisomatische HCN1-Immunreaktivität auf, die EYFP-positiven GABAergen Neurone zeigten stattdessen keine HCN1-Immunreaktivität um ihre Somata (Abb. 10, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, Vergrößerung: Pfeile). Dies deutete auf eine Expression der HCN1-Isoform bei exzitatorischen, jedoch nicht bei inhibitorischen Neuronen hin.

Die HCN2-Immunreaktivität war im Gegensatz zu HCN1 somatisch (Abb. 10, B<sub>1</sub>, Vergrößerung: Pfeile und Sterne) und deutlich sowohl in EYFP-positiven (Abb. 10, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, Vergrößerung: Pfeile) als auch EYFP-negativen (Abb. 10, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, Vergrößerung: Sterne) CIC Neuronen repräsentiert.

Die Immunreaktivität der HCN4-Isoform war überwiegend perisomatisch (Abb. 10, C<sub>1</sub>, Vergrößerung: Pfeile und Sterne) und war in fast allen EYFP-positiven und somit GABAergen Neuronen präsent (Abb. 10, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, Vergrößerung: Pfeile). Von den EYFP-positiven Neuronen zeigten 96% eine perisomatische HCN4-Immunreaktivität (74 von insgesamt 77 Neuronen). Perisomatische HCN4-Immunreaktivität war auch in manchen nicht-GABAergen Neuronen nachweisbar (Abb. 10, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, Vergrößerung: Sterne).

Die Resultate der oben beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass die I<sub>h</sub>-Ströme in den GABAergen Neuronen überwiegend über die HCN2- und HCN4-Isoform vermittelt werden. Im Gegensatz dazu finden sich bei exzitatorischen Neuronen unterschiedliche HCN-Typen: Neurone mit eher schnellen I<sub>h</sub>-Strömen, die über HCN1/HCN2-Isoformen vermittelt werden und die Neurone mit eher langsamen I<sub>h</sub>-Strömen, die über HCN2 und in manchen Fällen HCN4-Isoformen hervorgerufen werden.

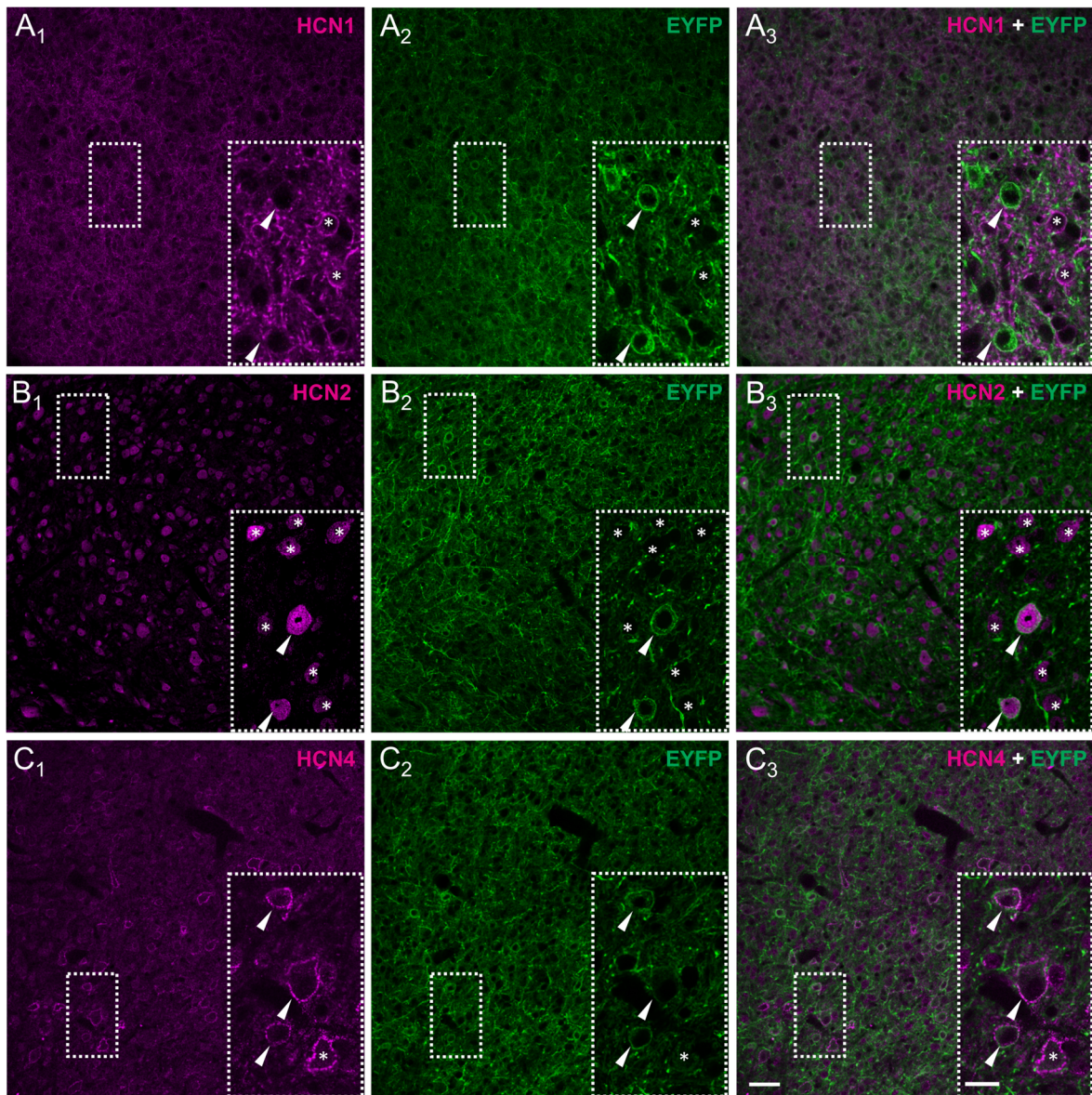


Abb. 10. HCN1- (A), HCN2- (B) und HCN4- (C) Immunreaktivität (Magenta) im CIC der transgenen VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mäusen. GABAerge (VGAT+) Neurone exprimieren EYFP (Grün, Pfeilköpfe), diese fehlt den nicht-GABAergen Neuronen (VGAT-, Sterne). (A) HCN1-Immunreaktivität fehlt in den GABAergen Neuronen, ist jedoch in vielen nicht-GABAergen Neuronen präsent. (B) HCN2-Immunreaktivität ist sowohl in den GABAergen als auch nicht-GABAergen Neuronen präsent. (C) HCN4-Immunreaktivität ist in GABAergen als auch einigen nicht-GABAergen Neuronen präsent. Messbalkenlänge der Übersichtsaufnahmen beträgt 50  $\mu\text{m}$ , der durch die punktierten Rechtecke gekennzeichneten Vergrößerungen: 20  $\mu\text{m}$ . IHC-Färbungen wurden von Dr. Julia Heyd konzipiert, durchgeführt, analysiert und interpretiert.

Um zu überprüfen, ob im IC der Maus ähnlich wie im IC der Ratte ein tonotoper Gradient der HCN1-Expression nachweisbar ist (Koch et al. 2004), wurde die HCN1-Immunreaktivität entlang der dorso-ventralen (tonotopen) IC-Achse quantifiziert (Abb. 11). Dafür wurden mittlere Grauwerte (engl. *mean grey values*, MGV) in einem 50  $\mu\text{m}$  breiten Messbereich, der entlang der dorso-ventralen IC-Achse gelegt wurde, bestimmt (siehe Methodik, Seite 44 und Abb. 11, A<sub>1</sub> (magentafarbener Balken), A<sub>2</sub>). Quantifizierung der MGV in 5 ICs wies keinen systematischen Gradienten der HCN1-Immunreaktivität innerhalb des



CICs auf (Abb. 11, B) (Friedman Test mit dem nachfolgenden Dunn's Post-hoc-Test,  $p = 0,66$ ). In drei ICs lag der dorsale Teil des Messbereiches im ECIC und zeigte eine deutlich niedrigere HCN1-Immunreaktivität im Vergleich zu dem Teil, der im CIC lag (Abb. 11, B, vgl. IC-Maß von 20-80% und 100%). Dies entsprach den Funden bei Ratten (Koch et al. 2004). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass in der Maus HCN1-positive Neurone mit den großen und schnellen Ih-Strömen nicht öfter im ventralen als im dorsalen Teil des CICs vorkommen.

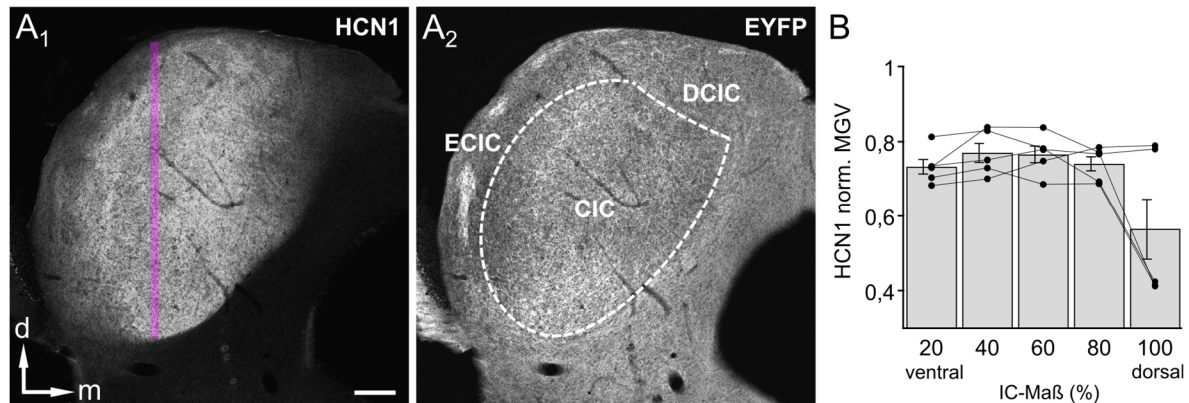


Abb. 11. Repräsentative Übersicht (bei 5x Objektiv) der HCN1-Immunreaktivität (A<sub>1</sub>) und EYFP-Fluoreszenz (A<sub>2</sub>) in einem koronalen Gehirnschnitt über den gesamten IC der VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus. (A<sub>1</sub>) Magenta Rechteck repräsentiert den Bereich, bei dem die mittleren Grauwerte (engl. *mean grey values*, MGv) von der HCN1-Immunreaktivität ausgewertet wurden. (A<sub>2</sub>) EYFP-Fluoreszenz mit den Abgrenzungen von dem zentralen Nucleus (CIC), externen Cortex (ECIC) und dorsalen Cortex (DCIC) von IC. (B) Quantifizierung der MGv von der HCN1-Immunreaktivität entlang dem dorsoventralen IC-Maß (Magenta Rechteck in A<sub>1</sub>, siehe Methodik). Es wurde kein Gradient der HCN1-Immunreaktivität entlang der dorsoventralen (tonotopen) CIC-Achse nachgewiesen. Friedman Test mit dem nachfolgenden Dunn's Post-hoc-Test ( $p=0,66$ ). Balkendiagramm zeigt Mittelwert  $\pm$  SEM. Messbalkenlänge in A<sub>1,2</sub> beträgt 250  $\mu$ m, d – dorsal, m – medial. IHC-Färbung wurde von Dr. Julia Heyd konzipiert, durchgeführt, analysiert und interpretiert. Quantifizierung der mittleren Grauwerte von der HCN1-Immunreaktivität führten Fauve de Arnal und Victor Naumov durch.

### 3.1.3 Die AP-Feuermuster der GABAergen Neurone waren adaptierend, nicht-GABAergen Neurone zeigten unterschiedliche Feuermuster

Nachdem GABAerge und nicht-GABAerge CIC-Neurone in unterschiedlichen Gruppen entsprechend ihrer Ih-Stromeigenschaften und Expression der HCN-Isoformen aufgetrennt worden waren, wurde überprüft, ob es eine Korrelation zwischen Ih-Eigenschaften und AP-Feuermuster bei diesen Neuronengruppen gibt. Dafür wurden Spannungsänderungen in GABAergen (VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-) Neuronen als Reaktion auf 0,5 s lange hyper- und depolarisierenden Strompulse aufgenommen. Des Weiteren wurden passive Membraneigenschaften, Ih-Stromaktivierung und Feuermuster analysiert und die VGAT+ und VGAT- Neurone in die Gruppen entsprechend ihrer Ih-Stromaktivierungskinetik und ihres Feuermuster aufgetrennt.

Fast alle GABAerge Neurone wiesen ein adaptierendes AP-Feuermuster auf (Abb. 12, A<sub>1</sub>), während die nicht-GABAergen Neurone sowohl Onset AP-Feuermuster (Abb. 12, A<sub>2</sub>) als auch adaptierenden AP-Feuermuster zeigten (Abb. 12, A<sub>3-5</sub>). Bei allen VGAT<sup>+</sup> sowie bei den meisten VGAT-Neuronen (90% von allen VGAT-Neuronen) riefen die hyperpolarisierenden Strompulse von -200 pA eine einsackende Spannungsauslenkung, *I<sub>h</sub>-sag* (engl.) hervor (Abb. 12, A<sub>1-5</sub>, B). Die Amplitude, sowie der zeitliche Verlauf des *I<sub>h</sub>-sag* bei hyperpolarisierenden Strompulsen von -200 pA wurden als ein annäherndes quantitatives Korrelat zu Kinetik und Amplitude der pharmakologisch isolierten *I<sub>h</sub>*-Ströme aus vorherigem Experiment behandelt (Seite 47). Um die Kinetik der *I<sub>h</sub>*-Stromaktivierung zu charakterisieren (Korrelat zur *I<sub>h</sub>*-Aktivierungszeitkonstante) wurde eine einfache exponentielle Trendlinie über die depolarisierende Spannungsauslenkung des *I<sub>h</sub>-sag* gelegt und die entsprechende Zeitkonstante für jedes Neuron berechnet. Als Korrelat zur Amplitude des *I<sub>h</sub>*-Stromes diente die *I<sub>h</sub>-sag* Amplitude von jedem Neuron (siehe Methodik, Seite 35). Die o.g. quantitativen Korrelate des *I<sub>h</sub>*-Stromes stellen nur eine Annäherung an die Amplitude und Aktivierungszeitkonstante der pharmakologisch isolierten Ströme dar, denn sie sind, neben den HCN-Kanälen, auch von der Zellkapazität sowie Aktivierung anderer spannungsgesteuerten Ionenkanälen abhängig. Anhand der Zeitkonstante und Amplitude des *I<sub>h</sub>-sag* wurden die VGAT<sup>+</sup> und VGAT-Neurone in Gruppen eingeteilt, die den Gruppen der pharmakologisch isolierten *I<sub>h</sub>*-Strommessungen entsprachen (Abb. 12, B). Die VGAT<sup>+</sup> Neurone wiesen den *I<sub>h</sub>-sag* mit einer relativ langsamen Kinetik (Zeitkonstanten >70 ms) und kleiner Amplitude (<50%) auf (Abb. 12, A<sub>1</sub>, C-E). Bei VGAT-Neuronen wies der *I<sub>h</sub>-sag* unterschiedliche Charakteristiken auf (Abb. 12, A<sub>2-5</sub>, C-D, Tab. 4). Alle VGAT-Neurone mit dem Onset AP-Feuermuster zeichneten sich durch einen schnellen *I<sub>h</sub>-sag* (Zeitkonstante <70 ms) und eine hohe *I<sub>h</sub>-sag* Amplitude (>50%) aus. Die VGAT-Neurone mit dem adaptierenden AP-Feuermuster konnten entsprechend ihren *I<sub>h</sub>-sag* Eigenschaften hingegen in drei Gruppen unterteilt werden (Abb. 12, A<sub>2-5</sub>, C-D, Tab. 4). Ungefähr die Hälfte dieser VGAT-Neurone zeigte schnell aktivierenden (<70 ms) *I<sub>h</sub>-sag* mit einer großen Amplitude, ähnlich zu den Onset-Neuronen. Die andere Hälfte der VGAT-Neurone wies einen langsam aktivierenden *I<sub>h</sub>-sag* mit niedriger Amplitude auf (Abb. 12, C-D). Somit ähnelten diese Neurone den VGAT<sup>+</sup> Neuronen. Ähnlich zu den Aufnahmen der pharmakologisch isolierten *I<sub>h</sub>*-Ströme zeigten auch in diesem Experiment manche VGAT-Neurone mit dem adaptierenden AP-Feuermuster keine *I<sub>h</sub>*-Aktivierung (Abb. 12, A<sub>5</sub>, B). Insgesamt war die relative Anzahl der Neurone in der o.g. Gruppen ähnlich zu den relativen Gruppengrößen, die basierend auf den Messungen der pharmakologisch isolierten *I<sub>h</sub>*-Ströme bereits ermittelt worden waren (vgl. Abb. 9, C und Abb. 12, B).

Als Nächstes wurden passive Membraneigenschaften: das Ruhemembranpotential, der Eingangswiderstand in *steady state* und die Membranzeitkonstanten zwischen den VGAT<sup>+</sup> und unterschiedlichen Gruppen der VGAT-Neurone verglichen. Alle diese Parameter waren signifikant unterschiedlich zwischen den VGAT<sup>+</sup> Neuronen und den VGAT-Neuronen mit

dem Onset AP-Feuermuster (Abb. 12, E-G, Tab. 5). Die restlichen VGAT- Neuronengruppen unterschieden sich ebenso in vielen dieser Parameter. Zusammenfassend unterschieden sich die VGAT+ Neurone hinsichtlich der passiven Membraneigenschaften und Ih-sag Eigenschaften nicht signifikant von den diversen VGAT- Neuronengruppen. Die VGAT- Onset-Neurone schienen stattdessen eine separate Klasse der Neurone zu bilden.

Manche Neurone zeigten nach den hyperpolarisierenden Stromapplikationen (0.5 s) einen Rebound-AP (Abb. 12, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub>). Deswegen wurde die relative Anzahl dieser Neuronen unter den VGAT+ und jeweiligen VGAT- Neuronengruppen bestimmt. Als Rebound-Neurone wurden diejenigen Zellen definiert, bei denen ein AP hervorgerufen wurde, wenn das Neuron auf ein Potential >-90,5 mV (in *steady-state*) hyperpolarisiert wurde (Abb. 12, H). Das Membranpotential von -90,5 mV wurde als Kriterium gewählt, denn es entspricht dem Umkehrpotential von Cl<sup>-</sup> in IC-Neuronen (Vale and Sanes 2002). Die Hyperpolarisation bis zu -90,5 mV löste ein Rebound-AP in allen VGAT- Onset-Neuronen auf. Auch 80% der VGAT- Neurone mit einem adaptierenden AP-Feuermuster und einem schnellen Ih-sag zeigten Rebound-AP. Die Mehrheit der VGAT+ und VGAT- Neurone mit einem adaptierenden AP-Feuermuster und einem langsamen Ih-sag zeigte stattdessen kein Rebound-AP. Dies deutet darauf, dass Rebound-APs überwiegend über die schnellen und großen Ih-Ströme hervorgerufen wurden und für bestimmte CIC-Neuronengruppen spezifisch waren.

Mittelwert ± SEM	Ih-sag (%)	Dunn's Post-hoc- Test	Ih-sag Zeitkon- stante (ms)	Dunn's Post-hoc- Test	n
<b>VGAT+</b>	30,6±2,6	VGAT-, schn. Ih*** VGAT-, Onset***	117,2±10,3	VGAT-, schn. Ih*** VGAT-, Onset***	25
<b>VGAT-, adapt., schn. Ih</b>	55,4±1,5	VGAT-, langs. Ih***	44,1±2,6	VGAT-, langs. Ih***	29
<b>VGAT-, Onset, schn. Ih</b>	62,0±2,1	VGAT-, langs. Ih***	33,2±3,4	VGAT-, langs. Ih***	12
<b>VGAT-, adapt., langs. Ih</b>	28,5±2,3		128,6±8,6		33

Tab. 4. Vergleich der VGAT+, VGAT- Onset sowie VGAT- Neurone mit adaptierenden AP-Feuermuster mit dem schnellen (schn.) und den langsamen (langs.) Ih-sag-Zeitkonstanten hinsichtlich der Eigenschaften ihres Ih-sag. Kruskal-Wallis Test mit nachfolgenden Dunn's Post-hoc-Test (\*\*\*) p < 0,001).

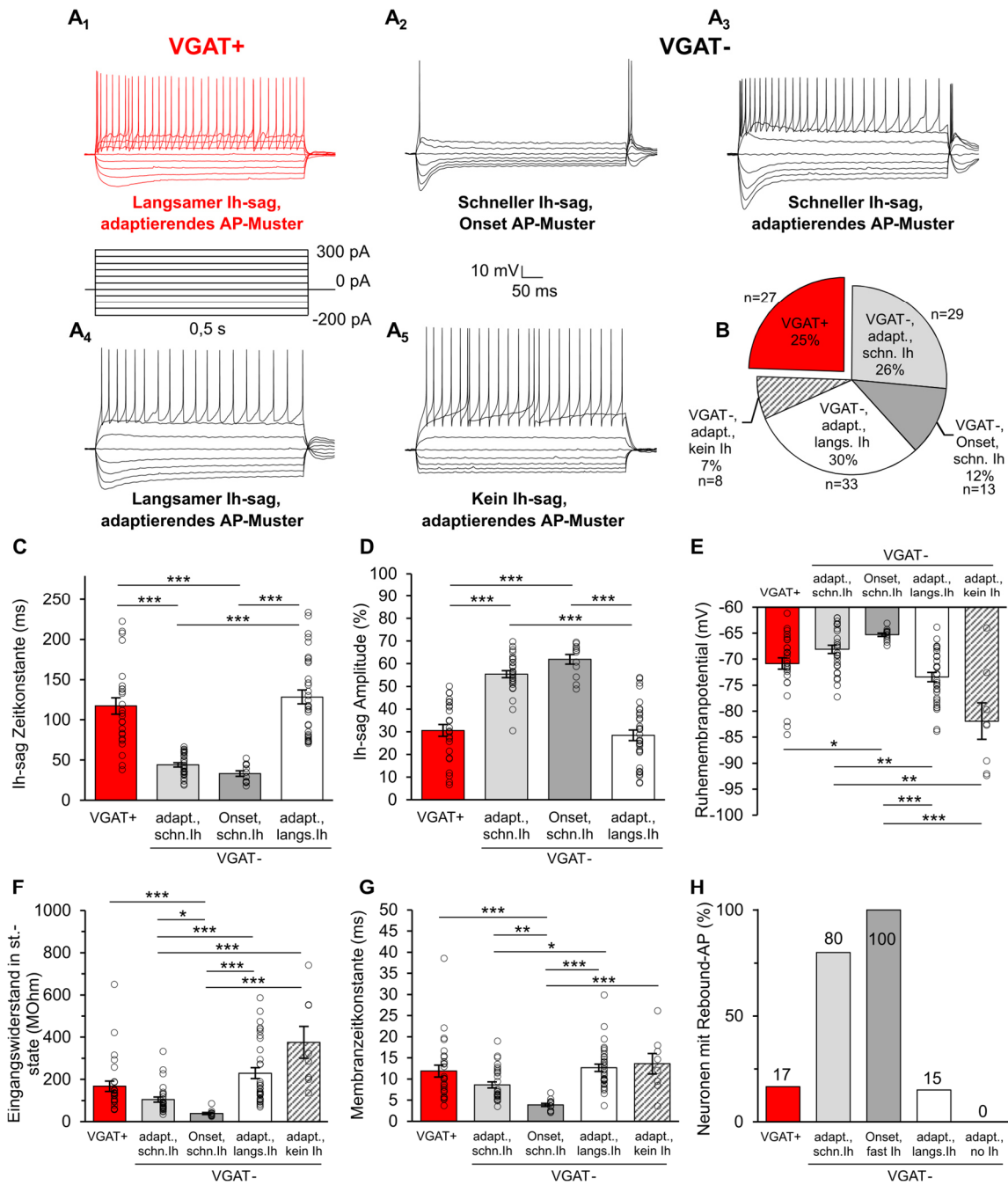


Abb. 12. Exemplarische Antworten der VGAT+ und unterschiedlichen VGAT- Neurone auf hyper- und depolarisierende Strompulse (A<sub>1</sub>-A<sub>5</sub>). Alle GABAerge Neurone (VGAT+) zeigten adaptierende AP-Feuermuster und einen langsamen Ih-sag bei hyperpolarisierenden Strompulsen (A<sub>1</sub>). Nicht-GABAerge Neurone (VGAT-) zeigten entweder Onset (A<sub>2</sub>) oder adaptierende AP-Feuermuster mit unterschiedlicher Kinetik des Ih-sag: mit schnellen (A<sub>3</sub>) und langsamen (A<sub>4</sub>) Zeitkonstanten des Ih-sags, sowie Neurone ohne Ih-sag (A<sub>5</sub>). Verteilung der Neurone entsprechend ihren Ih-sag-Eigenschaften (B). VGAT+ Neurone zeigten im Vergleich zu den VGAT- Onset- und adaptierenden VGAT- Neuronen mit dem schnellen Ih-sag signifikant langsame Ih-sag-Zeitkonstanten (C). Die relative Ih-sag-Amplitude war bei den VGAT+ Neuronen signifikant kleiner als bei den VGAT- Onset- und den VGAT- adaptierenden Neuronen mit dem schnellen Ih-sag (D). Ruhemembranpotential (E), Eingangswiderstand in *steady state* (F) und Membranzeitkonstanten (G) waren signifikant unterschiedlich zwischen den VGAT+ und VGAT- Onset Neuronen. Die meisten VGAT- Neurone mit schnellem Ih-sag zeigten ein Rebound-AP, während die Mehrheit der Neurone mit langsamem Ih-sag (VGAT+ und VGAT-) kein Rebound-AP zeigten. Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM. Kruskal-Wallis Test dem Dunn's Post-hoc-Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Mittelwert ± SEM	Ruhe- memb- ranpo- tential (mV)	Dunn's Post-hoc- Test	Eingangs- wider- stand in <i>steady</i> <i>state</i> (M $\Omega$ )	Dunn's Post-hoc- Test	Memb- ranzeit- kon- stante (ms)	Dunn's Post-hoc- Test	n
VGAT+	-70,8±1,1	VGAT-, On- set *	167,7±24,7	VGAT-, Onset ***	11,9±1,4	VGAT-, On- set ***	27
VGAT-, adapt., schn. Ih	-68,1±0,8	VGAT-, langs. Ih ** VGAT-, kein Ih **	104,2±12,2	VGAT-, Onset * VGAT-, langs. Ih*** VGAT-, kein Ih ***	8,6±0,7	VGAT-, On- set ** VGAT-, langs. Ih *	29
VGAT-, Onset, schn. Ih	-65,3±0,3	VGAT-, langs. Ih *** VGAT-, kein Ih ***	38,4±4,4	VGAT-, langs. Ih*** VGAT-, kein Ih ***	3,9±0,4	VGAT-, langs. Ih *** VGAT-, kein Ih ***	13
VGAT-, adapt., langs. Ih	-73,4±0,9		229,6±26,1		12,6±0,9		33
VGAT-, adapt., kein Ih	-81,9±3,5		375,2±76,1		13,6±2,4		8

Tab. 5. Vergleich der VGAT+, VGAT- Onset, VGAT- Neurone mit adaptierendem AP-Feuermuster mit den schnellen (schn.) und den langsamen (langs.) Ih-sag-Zeitkonstanten sowie Neurone ohne Ih-sag hinsichtlich ihrer passiven Membraneigenschaften. Kruskal-Wallis Test mit nachfolgenden Dunn's Post-hoc-Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

### 3.1.4 AP-Adaptationsraten der GABAergen und nicht-GABAergen Neurone unterscheiden sich geringfügig

Die Mehrheit der CIC-Neurone (88%) zeigen unabhängig von ihrem Neurotransmitterphänotyp Adaptation ihrer AP-Feuerraten während der depolarisierenden Strominjektionen. Das adaptierende AP-Feuermuster kann in seiner maximalen Feuerrate, seinem Stromamplitude/AP-Feuerrate Verhältnis oder Adaptationsrate variieren. Deswegen wurden bei allen Neuronen mit dem adaptierenden AP-Feuermuster diese Parameter analysiert und anschließend zwischen den VGAT+ und unterschiedlichen Gruppen der VGAT- Neurone verglichen. Abb. 13 A<sub>1-4</sub> zeigt die repräsentativen Antworten der Neurone auf die depolarisierenden Strominjektionen sowie ein Rasterdiagramm der AP-Zeitpunkte für jede Neuronengruppe. Als erstes wurden die AP-Feuerraten für jede depolarisierende Strominjektion festgestellt und gegen die Stromamplitude (Stromamplitude bei der AP-Schwelle) aufgetragen. Dieses Verhältnis unterschied sich nicht zwischen den VGAT+ und den unterschiedlichen Gruppen von VGAT- Neuronen (Abb. 13, B). Die statistische Analyse der Mittleren Feuerraten bei 200 pA über die AP-Entstehungsschwelle zeigten keine Unterschiede zwischen o.g. Neuronengruppen (Abb. 13, C, Tab. 6).



Beim Vergleich der Adaptationsraten zwischen den VGAT+ und unterschiedlichen VGAT- Neuronengruppen wurden für jedes Neuron die mittleren Feuerraten entlang einem Zeitra-ster (Fensterbreite 50 ms) berechnet und für jede Neuronengruppe gemittelt und gegen die Zeitachse des Rasters aufgetragen (siehe Methodik, Seite 35) (Abb. 13, D). Die VGAT+ Neurone zeigten durchschnittlich schnelle Adaptation der Feuerraten während der ersten 200 ms nach der Stromapplikation und adaptieren danach nicht mehr weiter (Abb. 13, D). Alle VGAT- Neurone zeigten stattdessen anhaltende Adaptation während der ganzen Dauer der Strominjektion.

Die Adaptationsraten für jedes Neuron wurden mit Hilfe einer doppelt exponentiellen Trend-linien über das Streudiagramm der fortlaufenden Frequenz berechnet. Um dieses Diagramm zu erstellen, wurden die Zeitintervalle zwischen dem ersten AP und jedem fortlaufenden AP in die Feuerfrequenz umgerechnet und anschließend gegen die Zeitpunkte der jeweiligen APs aufgetragen. Die Adaptationszeitkonstanten wurden als gewichtete Zeitkonstanten re-präsentiert (siehe Methodik, Seite 35). Die VGAT+ Neurone adaptierten signifikant schnel-ler (hatten kleinere gewichtete Adaptationszeitkonstanten) als die VGAT- Neurone mit dem langsamen Ih-sag und VGAT- Neurone ohne den Ih-sag (Abb. 13, E, Tab. 6). Zwischen den restlichen Neuronengruppen war die Adaptation nicht zu unterscheiden.

Mittelwert ± SEM (n)	Adapta- tionszeitkon- stante (ms)	Dunn's Post-hoc- Test	AP-Feuerrate bei 200 pA über die AP-Schwelle (Hz)	Tukey's Post-hoc Test
<b>VGAT+</b>	69±11 (24)	VGAT-, langs. Ih ** VGAT-, kein Ih **	115±10 (25)	ns
<b>VGAT-, schn. Ih</b>	153±58 (24)		117±11 (19)	ns
<b>VGAT-, langs. Ih</b>	167±32 (30)		117±7 (18)	ns
<b>VGAT-, kein Ih</b>	541±280 (7)		109±13 (5)	ns

Tab. 6. Vergleich der gewichteten Adaptationszeitkonstanten sowie Aktionspotentialfeuerraten bei 200 pA über die Aktionspotentialschwelle zwischen den VGAT+ und den VGAT- Neuronen mit adaptierenden AP-Feuermuster mit den schnellen (schn.) und langsamen (langs.) Ih-Zeitkonstanten sowie Neuronen ohne Ih-sag. Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test bzw. einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's Post-hoc Test (\*\* p < 0,01; ns, p > 0,98).

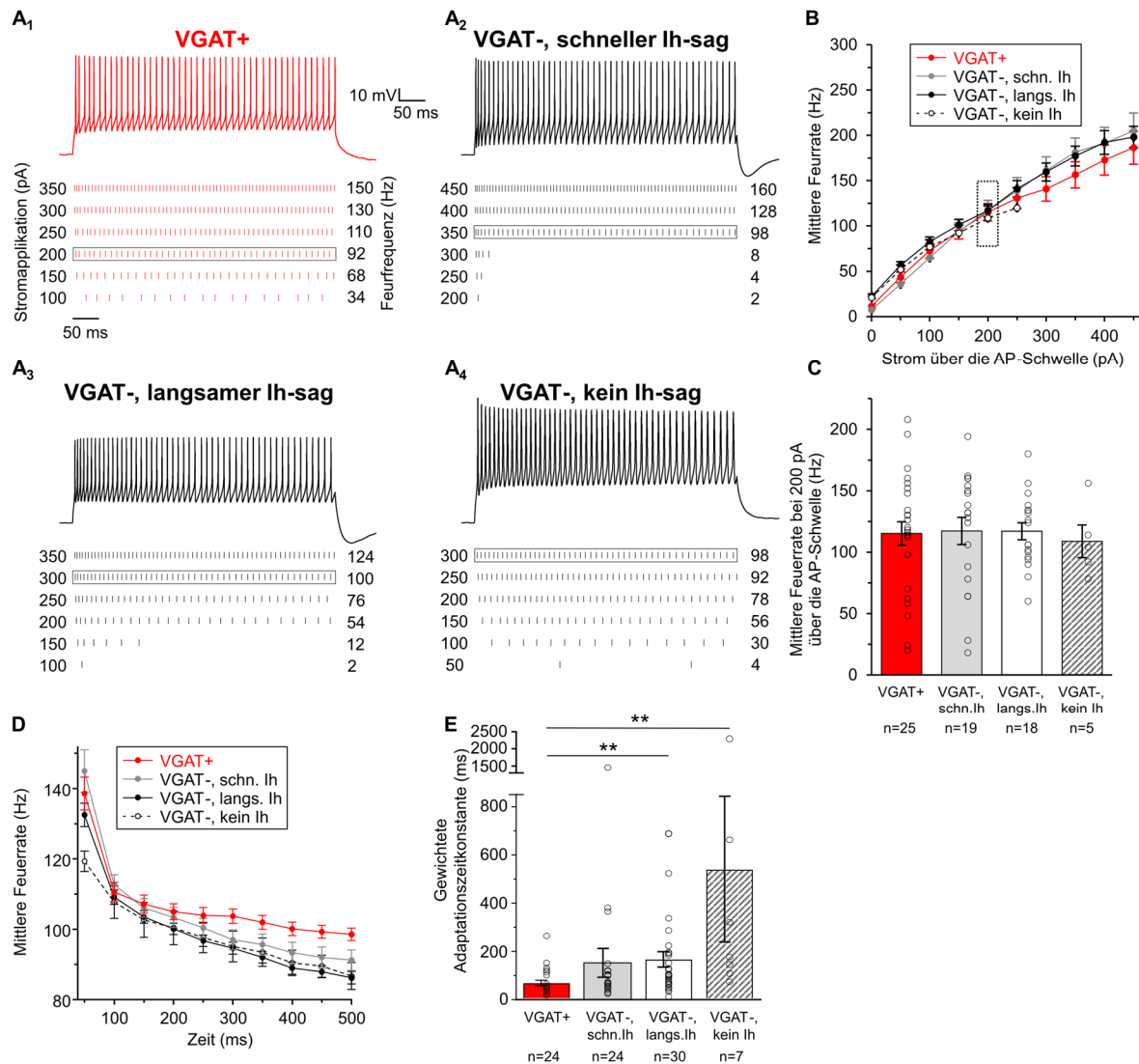


Abb. 13. AP-Feuerraten und Adaptationseigenschaften der VGAT+ und VGAT- Neurone mit adaptierendem AP-Feuermuster. Exemplarische Rasterdiagramme repräsentieren Neuronenantworten auf die depolarisierenden Strompulse (A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>). Umrahmte Rasterdiagramme repräsentieren die gezeigten Membran-Spannungsantworten und weisen die Feuerraten um 100 Hz auf (Durchschnitt 102±11 Hz) (A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>). Die Antworten mit den Feuerraten um 100 Hz wurden für die Quantifizierung der Adaptationsraten der VGAT+ (A<sub>1</sub>) und VGAT- Neurone mit dem schnellen (A<sub>2</sub>) und langsamen (A<sub>3</sub>) Zeitkonstanten von Ih-sag sowie Neurone ohne Ih-sag (A<sub>4</sub>) verwendet. Gemittelte Feuerraten vs. Stromamplitude über die AP-Schwelle für die VGAT+ und unterschiedliche VGAT- Neurone (B). Mittlere Feuerraten bei den 200 pA über AP-Schwelle liegenden Stromapplikationen (C, punktiertes Rechteck in B). Die Feuerraten waren zwischen den o.g. Neuronengruppen nicht unterschiedlich (einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Tukey's Post-hoc Test,  $p > 0,98$ ). Gemittelte Diagramme der AP-Feuerfrequenz (Zeitklassenbreite 50 ms) von den VGAT+ (n=24) und VGAT-Neuronen mit schnellem (n=24), langsamen (n=30) und keinem Ih-sag (n=7) (D). Daten sind als Mittelwert ± SEM gezeigt. Adaptationsraten (E) die als gewichtete Zeitkonstante für die Streudiagramme der fortlaufenden Frequenz kalkuliert wurden (siehe Methodik), zeigen, dass die VGAT+ Neuronen signifikant schneller als die VGAT- Neuronen mit dem langsamen Ih-sag sowie VGAT-Neuronen ohne den Ih-sag adaptieren. Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test (\*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.2 Teil 2. AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Eingänge an inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen

Glutamaterge Signalübertragung über AMPA-Rezeptoren im IC wurde anhand elektrophysiologischer Studien bereits belegt (Wagner 1996, Ma et al. 2002, Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Auch die Expression unterschiedlicher Isoformen der AMPA-Rezeptoren (GluR1-4) im IC wurde mittels bildgebender Verfahren nachgewiesen (Gaza and Ribak 1997, Caicedo et al. 1998, Caicedo and Eybalin 1999). Die Expression unterschiedlicher Isoformen der AMPA-Rezeptoren wurde jedoch im IC bis *dato* nicht in den Zusammenhang mit dem Neurotransmittertyp gebracht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden die AMPA-Rezeptor-vermittelten postsynaptischen Ströme im CIC zwischen exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Neuronen verglichen. Die synaptischen Eingänge wurden anhand der pharmakologisch isolierten miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme (mEPSC) sowie durch die elektrische Stimulation des Lemniscus lateralis evozierten EPSCs und Aktionspotentialen charakterisiert. Ferner erlaubte die Auswertung der Latenz evozierten EPSCs und APs Rückschlüsse auf mögliche Verschaltung erregender Eingänge zwischen LL und IC zu ziehen. Außerdem wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der synaptischen Übertragung mit der GluR4- und VGluT2/MAP2-Immunreaktivität, sowie mit dem Somadurchmesser der inhibitorischen und exzitatorischen Neurone korreliert. Um die Zugehörigkeit der CIC-Neurone zu dem inhibitorischen – GABAergen (positiv für die Expression von VGAT, VGAT+) oder zu dem exzitatorischen – nicht-GABAergen (VGAT-negativ, VGAT-) Neurotransmittertyp festzustellen, wurde der VGAT-ChR2-EYFP- Linie 8 Mausstamm eingesetzt (siehe Methodik, Seite 26).

#### 3.2.1 Schnellere Kinetik und variablere Stromamplituden der mEPSC in inhibitorischen Neuronen im Vergleich zu exzitatorischen Neuronen

Um die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Ströme an exzitatorischen und inhibitorischen CIC-Neuronen zu evaluieren, wurden pharmakologisch isolierte mEPSC aufgenommen (Abb. 14, A, n: 15 VGAT+, 34 VGAT-). Da die exzitatorischen Eingänge im IC neben der AMPA-Rezeptoren auch über die NMDA-Rezeptoren vermittelt werden können (Gaza and Ribak 1997, Zhang and Kelly 2001), wurden die Letzteren mit DL-AP5 (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) blockiert. Des Weiteren wurde auch die Signaltransduktion über die GABA- und Glycineren Synapsen im IC (Buentello et al. 2015) mittels der GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptorblocker SR-95531 (Gabazin) bzw. Strychnin Hydrochlorid blockiert. Das Entstehen der APs wurde mit Tetrodotoxin unterbunden (siehe Methodik, Seite 36).

Die normierten Häufigkeitshistogramme der Abfallzeitkonstanten der mEPSC für alle inhibitorischen (VGAT+) und alle exzitatorischen (VGAT-) Neurone (Abb. 14, B) zeigen, dass die Kinetik der in den VGAT+ Neuronen aufgenommenen Ströme schneller als die der

VGAT- ist. Beide Histogramme überlappen sich im Intervall von 0,7-1,3 ms. Die Häufigkeitshistogramme für die mEPSC-Amplitude (Abb. 14, C) zeigen, dass die Amplituden der VGAT+ Neurone größer, als die der VGAT- Neurone sind. Auch diese zwei Histogrammen zeigen Überlappung, wobei die VGAT+ Neurone sehr variable Amplituden – von 10 bis zu 120 pA aufweisen. Die Häufigkeitsverteilungen der Amplituden und der Abfallzeitkonstanten deuten bei beiden Neuronengruppen jeweils nur auf eine einzelne Verteilung der mEPSC-Parameter hin.

Wie die Häufigkeitsdiagramme bereits andeuten, weisen die inhibitorischen Neurone im Vergleich zu exzitatorischen Neuronen signifikant schnellere mittleren Abfallzeitkonstanten der mEPSC ( $\tau < 1$  ms) auf (Abb. 14, F, Tab. 7). Auch die mittlere Anstiegszeit der mEPSCs ist in den VGAT+ Neuronen schneller als in den VGAT- Neuronen (Abb. 14, G, Tab. 7). Bemerkenswert ist, dass zwei von insgesamt 15 VGAT+ Neuronen (13%) deutlich langsamere ( $\tau > 1$  ms) – ähnlich den VGAT- Neuronen – mittlere Abfallzeitkonstanten zeigen. Unter den mittleren Abfallzeitkonstanten der EPSCs von den VGAT- Neuronen treten keine schnellen Extremwerte ( $\tau < 0,5$  ms) auf. Die Variationskoeffizienten der mEPSC-Abfallzeitkonstanten der beiden Neuronengruppen sind nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 14, J, Tab. 7). Die Amplituden der mEPSCs der VGAT+ Neurone sind signifikant größer (Abb. 14, H, Tab. 7) und weisen deutlich höhere Variationskoeffizienten auf (Abb. 14, K, Tab. 7), als die der VGAT-negativen Neurone.

Im Gegensatz zu den signifikant höheren Variationskoeffizienten der mEPSCs-Amplituden der VGAT+ Neurone im Vergleich zu den VGAT-negativen Neuronen, ist die Kinetik von 75% der mEPSC der VGAT+ Neurone schnell und liegt in einem relativ engen Abfallzeitkonstantenintervall von 0,5-1 ms (Abb. 14, E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>). Das zeigt, dass die EPSC-Kinetik bei den VGAT+ Neuronen nicht mit den EPSC-Amplituden korrelierte. Die Frequenz der mEPSCs war bei den VGAT+ Neuronen höher als bei den VGAT- Neuronen (Abb. 14, I, Tab. 7).

Zusammenfassend wiesen die meisten inhibitorischen Neurone im Vergleich zu exzitatorischen Neuronen AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme mit einer deutlich schnelleren Kinetik (mEPSC-Abfallzeitkonstanten), größeren und variableren mEPSC-Amplituden und einer höheren mEPSC-Frequenz. Nur einzelnen GABAergen Neurone teilen die Kinetikeigenschaften der postsynaptischen Ströme der glutamatergen Neurone (und *vice versa* für glutamaterge Neurone). Da die Isoformen der AMPA-Rezeptoren (GluR1-4) sich über die Kinetik der Ionenströme die sie leiten unterscheiden lassen (Mosbacher et al. 1994, Lambolez 1996, Quirk et al. 2004), deuteten die o.g Ergebnisse auf die Expression unterschiedlicher GluR-Rezeptoren in inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen.

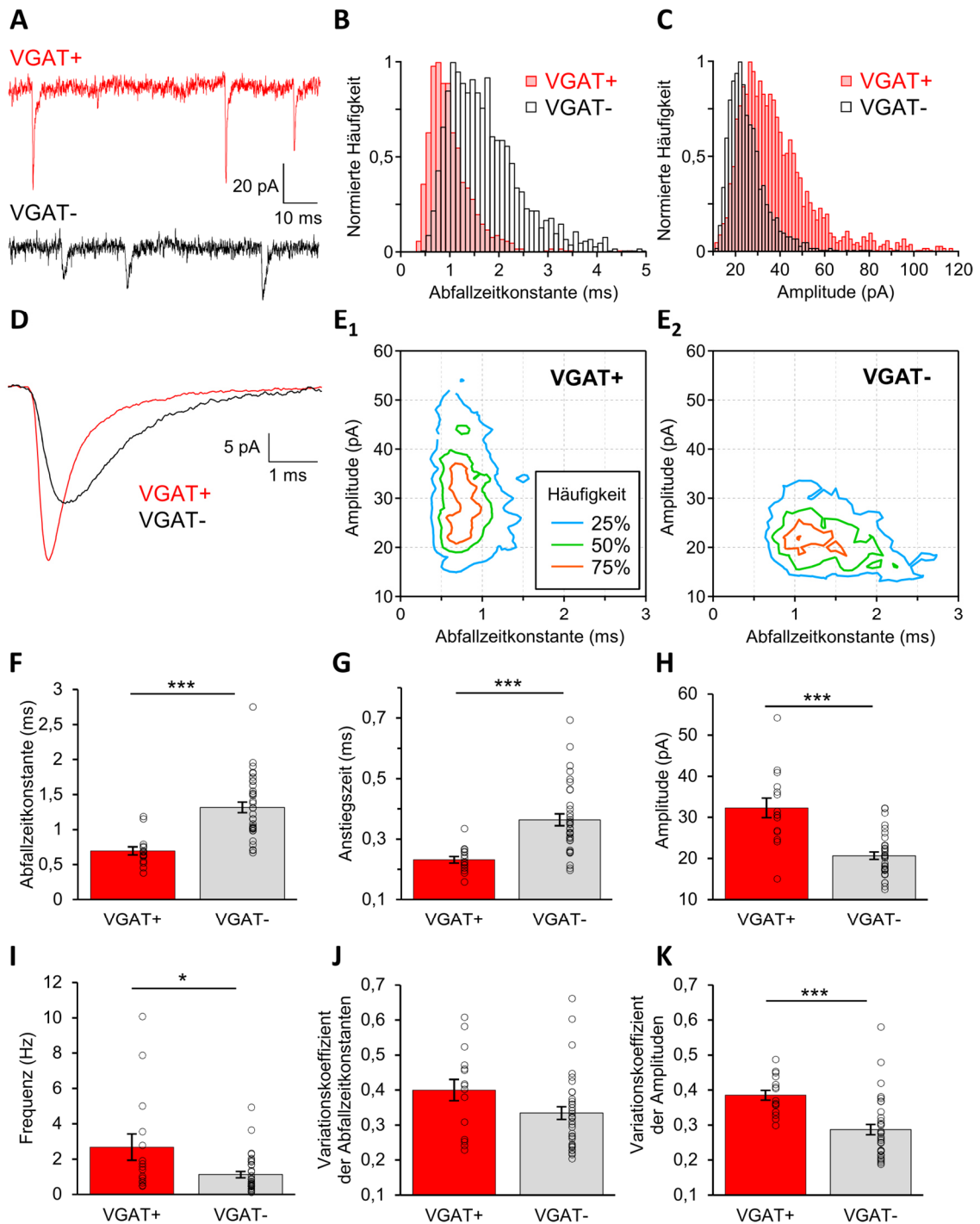


Abb. 14. Vergleich der AMPA-Rezeptor vermittelten miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme (mEPSC) in inhibitorischen (VGAT+) und exzitatorischen (VGAT-) Neuronen im CIC. Exemplarische Beispiele der Voltage-Clamp Aufzeichnungen (A). Mittlere normierte Häufigkeitsdiagramme für die mEPSC-Abfallzeitkonstante (Klassengröße 0,1 ms) und die mEPSC-Amplitude (Klassengröße 1,5 pA) von VGAT+ und VGAT- Neuronen (B, C). Exemplarische Beispiele der gemittelten mEPSCs bei einem VGAT+ und einem VGAT- Neuron (D). Normiertes Abfallzeitkonstante-Amplitude Konturdiagramm (Klassengrößen jeweils 0,15 ms und 2 pA) über alle VGAT+ und VGAT- Neurone (E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>). Mittlere Abfallzeitkonstante (F) und Anstiegszeitkonstante (G) sind bei den VGAT+ Neuronen deutlich schneller als bei den VGAT- Neuronen. Amplitude (H) und Frequenz der mEPSC (I) der VGAT+ Neurone sind höher als bei den VGAT- Neuronen. Variationskoeffizient der Abfallzeitkonstanten (J) unterscheidet sich nicht zw. beiden Neuronengruppen. Variationskoeffizient der Amplituden (K) ist bei den VGAT+ Neuronen wesentlich höher im Vergleich zu den VGAT- Neuronen. Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM, Mann-Whitney-Test (n: 15 VGAT+, 34 VGAT-, p<0,001 \*\*\*; p<0,05 \*).

Mittelwert $\pm$ SEM	VGAT+ n=15	VGAT- n=34	Mann-Whitney-Test, p
<b>Abfallzeitkonstante (ms)</b>	0,70 $\pm$ 0,06	1,32 $\pm$ 0,08	<0,0001; ***
<b>Anstiegszeit (ms)</b>	0,23 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,02	<0,0001; ***
<b>Amplitude (pA)</b>	32,33 $\pm$ 2,38	20,68 $\pm$ 0,89	<0,0001; ***
<b>mEPSC-Frequenz (Hz)</b>	2,68 $\pm$ 0,74	1,12 $\pm$ 0,18	0,004; *
<b>Variationskoeffizient der Abfallzeitkonstanten</b>	0,40 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,02	0,052
<b>Variationskoeffizient der Amplitude</b>	0,39 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	<0,0001; ***

Tab. 7. Vergleich der inhibitorischen (VGAT+) und exzitatorischen (VGAT-) CIC-Neurone hinsichtlich der Eigenschaften der miniatur postsynaptischen Ströme (mEPSC).

### 3.2.2 *Erregende LL-Eingänge an inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen unterschieden sich hinsichtlich Kinetik und Amplitudenvariation voneinander*

Die Ergebnisse der mEPSC-Aufnahmen deuteten an, dass inhibitorischen und exzitatorischen Neurone im CIC unterschiedliche GluR-Untereinheiten exprimieren. Es ist bekannt, dass AMPA-Rezeptor-vermittelte Eingänge im IC über Fasern des Lemniscus lateralis aktiviert werden (Saint Marie and Baker 1990, Wagner 1996, Ma et al. 2002, Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Auf Grund dieser Indizien stellt sich die Frage, ob die Erregung des LL die AMPA-Rezeptor-vermittelten postsynaptischen Ströme mit unterschiedlicher Kinetik in den inhibitorischen und exzitatorischen CIC Neuronen evoziert und somit auf die unterschiedliche Zusammensetzung der an der Signaltransduktion beteiligten AMPA-Rezeptoren hindeutet. Dafür wurden in den koronalen Schnitten, die sowohl IC als auch Fasern des LL enthalten (116° zur Längsachse, siehe Methodik, Seite 30) die Axone des LLs im Bereich des DNLL über bipolare Spannungspulse stimuliert (Abb. 15, A) und dabei evozierten EPSCs in den inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen aufgenommen (Abb. 15, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, n: 12 VGAT+ und 34 VGAT-). Anschließend wurden die EPSC-Abfallzeitkonstanten, -Amplitude und -Latenz zwischen beiden Neuronengruppen verglichen. Die EPSCs wurden bei minimaler Stimulationsstärke aufgenommen, diese entsprach der Stimulationsstärke bei der die EPSC erstmals auftraten. Diese Stimulationsstärke wurde angewendet, da bei höheren Spannungen bei einigen VGAT+ Neuronen überlappende EPSC-Salven auftraten. Bei diesen Neuronen konnten die Abfallzeitkonstanten und die Amplitudenmaxima der EPSC nicht eindeutig quantifiziert werden. Außerdem limitierte die minimale Stimulation die Aktivierung der eventuellen großen Netzwerke: glutamatergen Interneuronen, die an den GABAergen IC-Neuronen verschaltet sind (Ito et al. 2015). Die EPSC wurden mittels der GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptorblocker SR-95531 (Gabazin) bzw.

Strychnin Hydrochlorid isoliert (siehe Methodik, Seite 37). Von der Blockade der NMDA-Rezeptoren (Ma et al. 2002) wurde abgesehen (siehe Diskussion, Seite 90).

Abfallzeitkonstanten der evozierte EPSCs sind ähnlich zu spontanen mEPSCs: Die meisten VGAT+ Neurone weisen signifikant schnellere mittlere Abfallzeitkonstante ( $\tau < 1$  ms) (Abb. 15, D, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, Tab. 8) als die VGAT- Neurone auf. Somit sind die Resultate beider Experimente konsistent und deuteten auf die Expression unterschiedlicher GluR-Rezeptoren in beiden Neuronengruppen hin. Weder die Stärke der Spannungspulsen, die im LL appliziert wurden (Abb. 15, B, Tab. 8) noch die Amplituden der EPSC die in CIC-Neuronen evoziert wurden, waren zwischen den VGAT+ und VGAT- Neuronen unterschiedlich (Abb. 15, E, Tab. 8). Die Variationskoeffiziente der EPSC-Amplituden waren bei den VGAT+ Neuronen – wie im Fall von mEPSC – eindeutig höher als bei den VGAT- Neuronen (Abb. 15, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, F, Tab. 8).

Mittelwert $\pm$ SEM	VGAT+ n=12	VGAT n=34	Mann-Whitney-Test, p
<b>Abfallzeitkonstante (ms)</b>	0,37 $\pm$ 0,07	1,62 $\pm$ 0,14	<0,0001; ***
<b>Amplitude (pA)</b>	123 $\pm$ 22	229 $\pm$ 35	0,0867
<b>Variationskoeffizient der Amplitude</b>	0,59 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,02	<0,0001; ***
<b>Stimulationsstärke (V)</b>	41 $\pm$ 4	36 $\pm$ 2	0,446

Tab. 8. Vergleich der inhibitorischen (VGAT+) und exzitatorischen (VGAT-) CIC-Neurone hinsichtlich der Eigenschaften der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC), die durch die Stimulation des LL evoziert wurden.

Ferner zeigten zwei von insgesamt 12 VGAT+ Neuronen (16%) EPSCs mit relativ langsamen Abfallzeitkonstanten (1,14 ms und 2,22 ms). Interessanterweise zeigte eines dieser beiden Neurone neben EPSCs mit langsamer Kinetik auch EPSCs mit deutlich schnelleren Abfallzeitkonstanten: 0,29 ms (Abb. 16, A-C, Eingänge mit der langsamen Kinetik wurden für dieses Neuron bei der Auswertung nicht berücksichtigt). Dieser Fund der einzelnen VGAT+ Neurone mit langsamen Abfallzeitkonstanten ist mit den Ergebnissen der mEPSC-Aufnahmen konsistent. Dabei weisen 2 von 15 VGAT+ Neuronen (13%) ebenso deutlich langsame mittlere Abfallzeitkonstanten der mEPSC ( $\tau > 1$  ms) (Abb. 14, F). Außerdem weisen diese Neurone einen niedrigen Variationskoeffizient der Amplitude der langsamen EPSC (0,31 und 0,05) – erneut ähnlich zu den VGAT- Neuronen (Abb. 14, vgl. A und B).

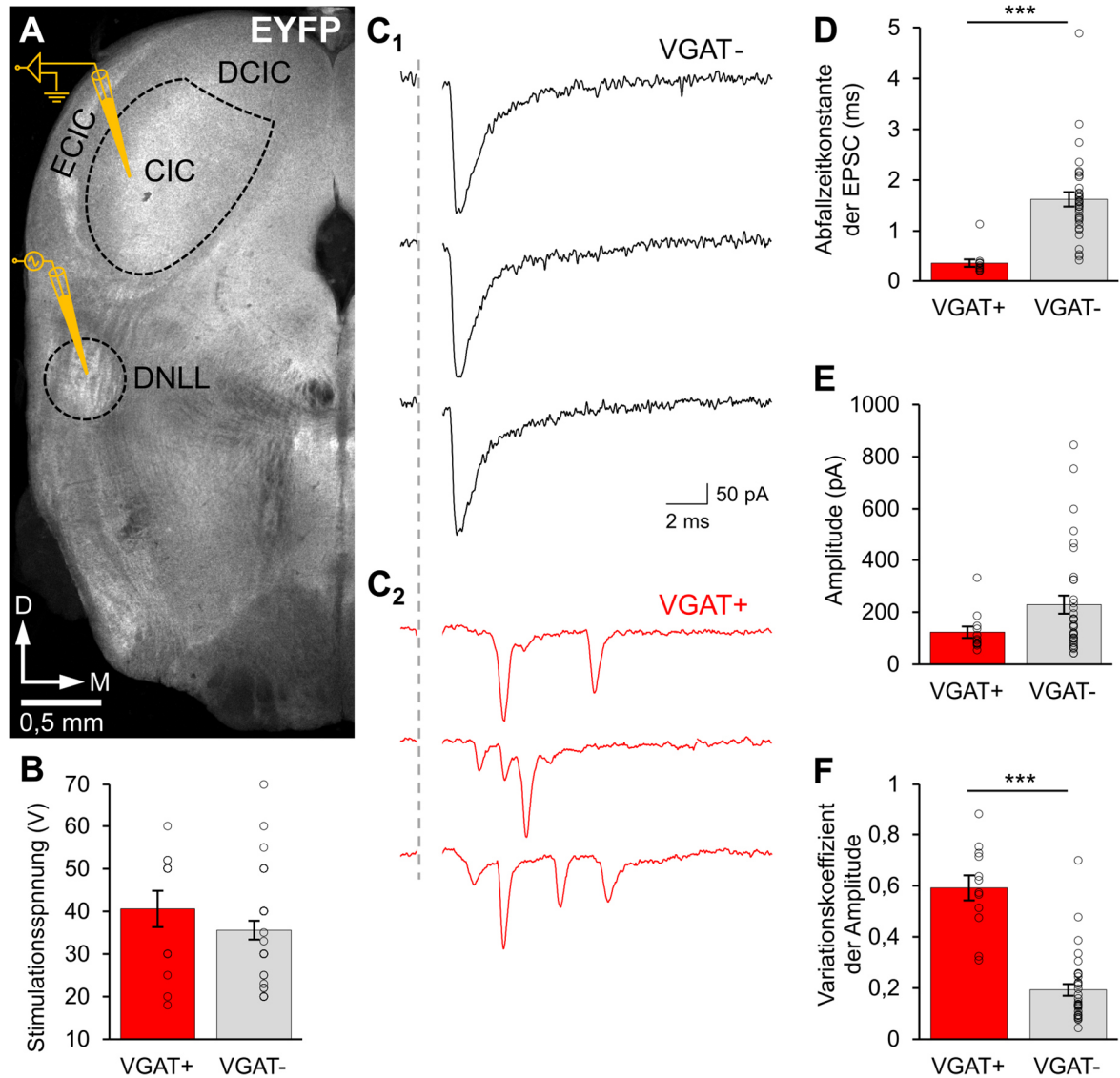
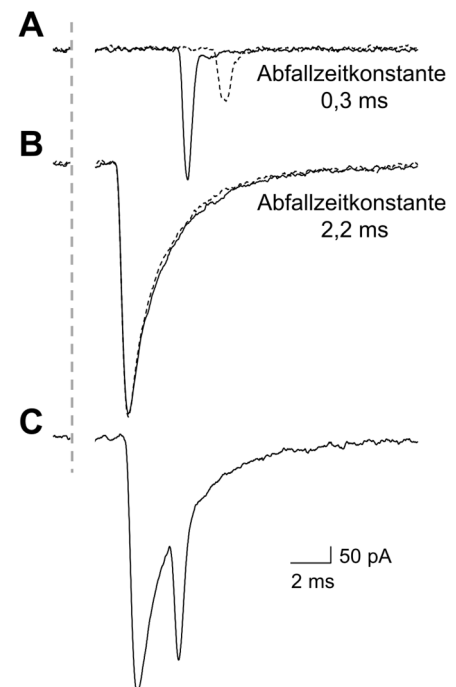


Abb. 15. Vergleich der inhibitorischen (VGAT+) und exzitatorischen (VGAT-) Neurone im CIC hinsichtlich der Eigenschaften ihrer exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC), die durch die Stimulation der Axonen des Lemniscus lateralis evoziert wurden. KLSM-Aufnahme des EYFP-Emissionssignals von VGAT+ Neuronen und VGAT+ Neuropils eines speziellen Koronalschnittes (116°, siehe Methodik) zeigt den dorsalen Nucleus des Lemniscus lateralis (DNLL), in dem die Spannungspulse appliziert wurden, sowie den zentralen Nucleus des Colliculus inferior (CIC), in dem EPSCs aufgenommen wurden. ECIC – externer Cortex und DCIC – dorsaler Cortex von IC (A). Spannungsstärke der minimalen Stimulation (siehe Methodik) ist zwischen beiden Neuronengruppen nicht unterschiedlich (B). Repräsentative Beispiele von jeweils drei Voltage-Clamp Aufzeichnungen der evozierten EPSCs von einem VGAT- (schwarz) (C<sub>1</sub>) und einem VGAT+ Neuron (rot) (C<sub>2</sub>), Stimulationsartefakt ist ausgeschnitten, vertikale Punktierlinie zeigt den Startpunkt der Applikation des bipolaren Spannungspulses (Pulslänge: 0,4 ms) an. Mittlere Abfallzeitkonstante (D) ist signifikant kürzer in den VGAT+ Neuronen als in den VGAT- Neuronen. Amplitude der EPSCs (E) der beiden Neuronengruppen ist nicht unterschiedlich. Variationskoeffizient der EPSC-Amplitude (F) ist bei den VGAT+ Neuronen wesentlich höher als bei den VGAT- Neuronen. Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM. Mann-Whitney-Test (n: 12 VGAT+, 34 VGAT-, p<0,001 \*\*\*).



Zusammenfassend evozierte die Stimulation des LL in den meisten GABAergen CIC-Neuronen AMPA-Rezeptor vermittelten postsynaptischen Ströme mit einer schnelleren Kinetik (Abfallzeitkonstanten) und variableren Amplituden als in exzitatorischen Neuronen. Diese Ergebnisse waren konsistent mit den Ergebnissen des mEPSC-Experimentes und deuten zusammen auf die Expression unterschiedlicher GluR-Rezeptoren in inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen. Außerdem deuten sehr variable EPSC-Amplitude und EPSC-Latenz (Abb. 15, C) bei den meisten VGAT+ Neuronen auf einen möglichen polysynaptischen Ursprung der erregenden Eingänge aus dem LL hin. Einzelne GABAerge Neurone, die deutlich langsame Abfallzeitkonstanten als die meisten VGAT+ Neurone in der Stichprobe von diesem Experiment sowie dem mEPSC-Experiment aufweisen, liefern einen Hinweis darauf, dass die GABAergen Neurone keine homogene Gruppe in Bezug auf die Expression der GluR-Untereinheiten sind.

Abb. 16. Repräsentative Beispiele von insgesamt fünf Aufzeichnungen der EPSCs in einem VGAT+ CIC-Neuron, die durch die Stimulation des LL evoziert wurden (fünf Stimulationswiederholungen). EPSCs lassen sich anhand der Abfallzeitkonstanten in zwei Populationen unterteilen: EPSC mit den kurzen Abfallzeitkonstanten (0,29 ms) und längeren variablen EPSC-Latenz (A) und EPSCs mit deutlich langsamen Abfallzeitkonstanten (2,22 ms) und mit kürzeren EPSC-Latenz (B). In C ist die Aktivierung der schnellen und langsamen EPSCs gezeigt. Eingänge mit der langsamen Kinetik wurden für dieses Neuron bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Einzelne Stimulationswiederholungen sind Anhand unterschiedlichen Linienbeschaffenheit gekennzeichnet. Das Stimulationsartefakt ist ausgeschnitten, die vertikale Punktierlinie zeigt den Startpunkt des bipolaren Spannungspulses (0,4 ms) an.



### 3.2.3 *Glutamatrezeptor 4 (GluR4)-Expression in GABAergen Neuronen, aber keine GluR4-Expression in nicht-GABAergen Neuronen*

Ausgehend aus den folgenden Tatsachen:

- (a) Deutlich schnellere Abfallzeitkonstanten der mEPSCs und evozierten EPSCs der meisten VGAT+ Neurone im Vergleich zu den VGAT- Neuronen,
- (b) sowohl homo- als auch heteromere AMPA-Rezeptoren, die GluR4<sub>top</sub>-Untereinheit beinhalten, weisen im Vergleich zu den anderen AMPA-Rezeptorisoformen die schnellsten Abfallzeitkonstanten auf (Abb. 4, (Mosbacher et al. 1994),
- (c) ab der zweiten postnatalen Woche wird GluR2-Expression im CIC reduziert, die GluR1-IR verschwindet beinahe vollständig, wogegen die GluR4-Expression immer

mehr zunimmt und GluR2/3-IR keinen großen Schwankungen während der Entwicklung unterliegt (in Ratten) (Caicedo and Eybalin 1999)

wurde die Hypothese aufgestellt, dass schnelle EPSCs der VGAT+ Neuronen über die GluR4-UE beinhaltende Rezeptoren vermittelt werden. Um dies zu überprüfen, wurde an einer adulten (P61) VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus eine anti-GluR4 und -MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) immunhistochemische Färbung durchgeführt. Dabei wurde es sich zu Nutze gemacht, dass die inhibitorischen (VGAT+) Neurone dieses Mausmodells EYFP exprimieren und somit auf den KLSM-Aufnahmen deutlich identifizierbar waren (siehe Methodik, Seite 27).

Die GluR4-Immunreaktivität im IC ist somatisch, wobei die Nuklei negativ für die IR sind (Abb. 17, C). Überlagerung des EYFP-Emissionssignals der VGAT+ Neurone und GluR4-IR zeigt Kollokalisierung beider Signale in den Neuronensomata (Abb. 17, A, C, D, Pfeile) und deutet somit auf die Expression der GluR4-UE in inhibitorischen (VGAT+) Neuronen hin. Überlagerung der IR des neuronalen Markers MAP2 und EYFP-Signals lässt die MAP2+/EYFP- (exzitatorische, VGAT-) Neuronensomata von den MAP2+/EYFP+ (VGAT+, inhibitorischen) Neuronensomata deutlich unterscheiden (Abb. 17, A, B, Pfeile vs. Sterne). Die VGAT- Neurone (MAP2+/EYFP-) weisen keine GluR4-Immunreaktivität auf (Abb. 17, D, E, Sterne). Die GluR4-positive Zellen sind auch für MAP2-positiv (Abb. 17, E), dies zeigt, dass die Neurone GluR4 exprimieren, Gliazellen hingegen nicht (Ceprian and Fulton 2019). Die Resultate der IHC-Färbung deuten darauf hin, dass GABAerge Neurone im Gegensatz zu exzitatorischen Neuronen GluR4 exprimieren.

Vergleichbare Resultate konnten mittels einer weiteren IHC-Färbung mit einem anderen GluR4-Antikörper (Millipore, AB1508, RRID: AB90711), mit GAD67- (Glutamat-Decarboxylase 67 kDa, Marker der GABAergen Neurone) und MAP2-Antikörper in dem Wildtyp der VGAT-ChR2-EYFP Maus (ChR2-EYFP-negativ) erzielt werden (hier nicht gezeigt, IHC-Färbung wurde von Dr. Julia Heyd konzipiert, durchgeführt, analysiert und interpretiert und auf der FENS-Konferenz, 2016, Kopenhagen, Poster D034 gezeigt). Demnach ist die GluR4-Immunreaktivität somatisch und die meisten GABAergen CIC-Neurone (GAD67+) sind GluR4-positiv. GABAerge Neurone ohne GluR4-Expression (GAD67+/GluR4-) treten äußerst selten auf. Die exzitatorische CIC-Neurone (GAD67-/MAP2+) sind ebenso selten GluR4-positiv. Diese Resultate sind konsistent mit Ergebnissen der IHC-Färbung der vorliegenden Arbeit und bestätigen die Hypothese, dass die EPSCs mit den schnellen Abfallzeitkonstanten in den GABAergen CIC-Neuronen über die GluR4-UE beinhaltende Rezeptoren vermittelt werden können. Die exzitatorische Neuronen exprimieren keine GluR4-UE beinhaltenden AMPA-Rezeptoren.

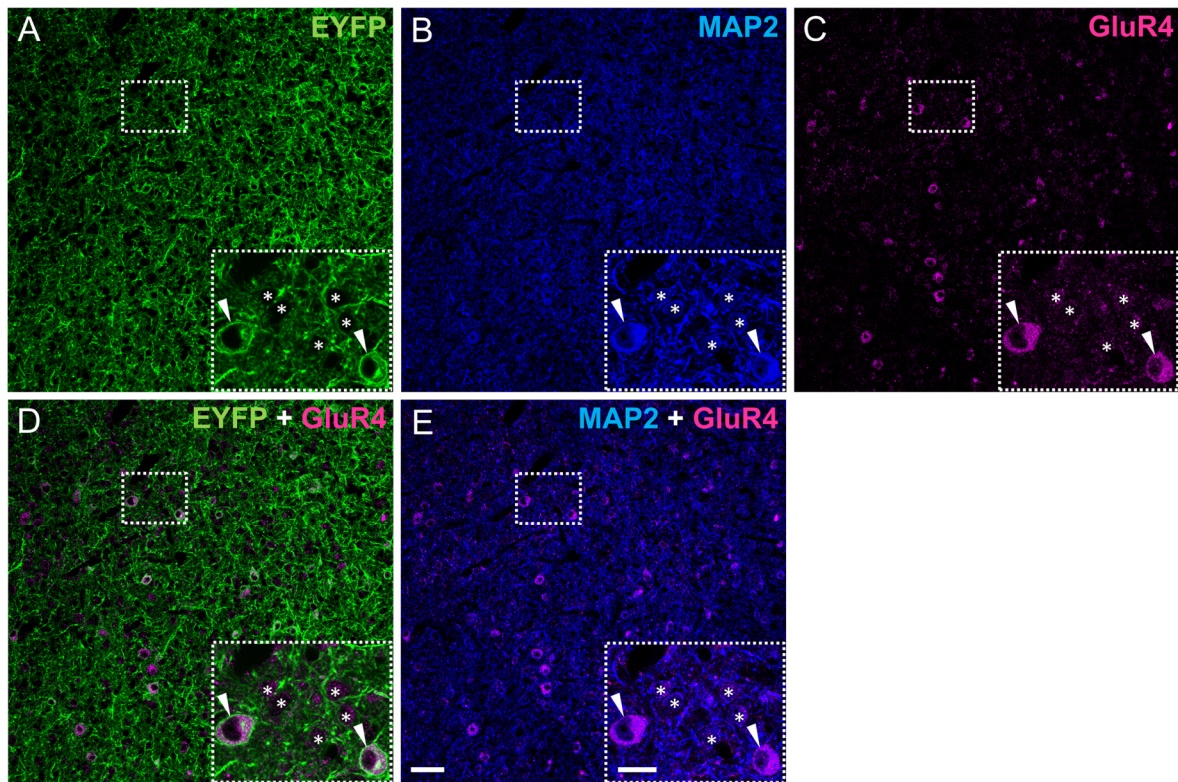


Abb. 17. Immunreaktivität (IR) des Glutamatrezeptors 4 (GluR4) und des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2) im CIC einer P61 VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus (A-E). EYFP-Emissionssignal lässt die Somata und Neuropil der EYFP-positiven (VGAT+, GABAergen) Neurone identifizieren (A, Pfeilköpfe). Die MAP2-IR in Kombination mit dem EYFP-Emissionssignal in (A) lässt die Somata der EYFP-negativen (VGAT-, nicht-GABAergen) Neurone lokalisieren (B, Sterne). Die GluR4-Immunreaktivität ist überwiegend somatisch (C). Überlagerung des EYFP- und GluR4-Signals zeigt, dass die meisten EYFP-positiven Neurone eine deutliche GluR4-IR zeigen, während die EYFP-negativen Neurone (Sterne) nur vereinzelte Punkte der GluR4-IR aufweisen (D). Überlagerung der MAP2- und GluR4-IR zeigt, dass die GluR4-IR meistens in Neuronensomata vorkommt (E). Alle Aufnahmen stellen eine einzelne und dieselbe optische Ebene dar. Die Messbalkenlänge der Übersichtsaufnahmen beträgt 50  $\mu\text{m}$ , in den durch die punktierten Rechtecke gekennzeichneten Vergrößerungen beträgt diese 20  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.4 Latenzunterschiede der erregenden synaptischen Ströme an LL-Eingängen an exzitatorischen und inhibitorischen CIC-Neuronen**

Die EPSCs, die in den GABAergen und nicht-GABAergen CIC-Neuronen durch die minimale elektrische Stimulation des Lemniscus lateralis evoziert wurden, unterschieden in ihrer Latenz. Die Mehrheit der VGAT+ Neurone zeigte bei jeder Stimulationswiederholung mehrere EPSCs, die mit unterschiedlichen und relativ langen (bis zu 10-15 ms) Latenz aufeinander folgten (Abb. 18, A, B<sub>2</sub>). Die VGAT- Neurone wiesen im Gegensatz dazu überwiegend einzelne EPSCs auf, die mit kurzer und bei jeder Stimuluswiederholung ähnlich langen Latenz auftraten (Abb. 18, A, B<sub>1</sub>). Eine erregende Verschaltung über mehrere Synapsen könnte im Vergleich zu einer direkten Verschaltung länger dauern und eine längere Latenz der postsynaptischen Ströme am Zielneuron zur Folge haben. Angesichts dieser Überlegung, sowie

der Tatsache, dass auf einer bestimmten Population GABAerger IC-Neurone bereits Eingänge von glutamaterger Interneuronen nachgewiesen wurden (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015) stellt sich die Frage, ob die Stimulation des LL erregende *feed-forward* (engl.) Verschaltung – über Interneurone – an GABAergen Neuronen aktivieren könnte? Um dieser Frage nachzugehen wurden Median und Standardabweichung der EPSC-Zeitpunkte sowie EPSC-Amplitude-Latenzmuster quantifiziert und zwischen den VGAT+ und VGAT- Neuronen verglichen.

Wie es die EPSC-Rasterdiagramme von den VGAT+ und VGAT- Neuronen bereits andeuten (Abb. 18, A), war der Median der EPSC-Latenz der VGAT+ Neurone signifikant größer – fast doppelt so lang wie der der VGAT- Neurone (Abb. 18, C, Tab. 9). Die Standardabweichung der EPSC-Latenz war bei den VGAT+ Neuronen ebenso signifikant höher als bei den VGAT- Neuronen (Abb. 18, D, Tab. 9). Zusammenfassend rief die Stimulation des LLs in VGAT+ Neuronen im Kontrast zu den VGAT- Neuronen EPSCs mit wesentlich längerer und variablerer Latenz sowie ebenso variableren Stromamplitude (Abb. 15, F, Tab. 8) auf. Interessanterweise zeigen 2 von 12 VGAT+ Neuronen (16%), die bereits in Zusammenhang mit den VGAT- Neuronen ähnlich langsamen EPSC-Abfallzeitkonstanten erwähnt wurden (Seite 62) ein besonderes EPSC-Latenzmuster. Dieses war ähnlich dem von der Mehrheit der VGAT- Neuronen: kurze Median der Latenz (2,86 und 3,14 ms), niedriger Standardabweichung der Latenz (0,34 und 0,13 ms) (Abb. 16).

Zusammenfassend unterstützen Ergebnisse dieses Experiments die Annahme, dass die Erregung aus dem LL bei den meisten VGAT+ Neuronen über eine *feed-forward* Verschaltung während bei den VGAT- Neuronen über eine direkte Verschaltung übertragen werden könnte, wobei einzelne VGAT+ und VGAT- Neurone von diesem Schema abweichen können.

Mittelwert ± SEM	VGAT+ n=12	VGAT n=34	Mann-Whitney-Test, p
<b>Median der EPSC-Latenz (ms)</b>	5,64±0,88	3,35±0,23	0,002; **
<b>Standardabweichung der EPSC-Latenz (ms)</b>	1,87±0,27	0,24±0,05	p<0,001; ***

Tab. 9. Vergleich der GABAergen (VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-) CIC-Neurone hinsichtlich der Latenz der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC), die durch die elektrische Stimulation des LL evoziert wurden.

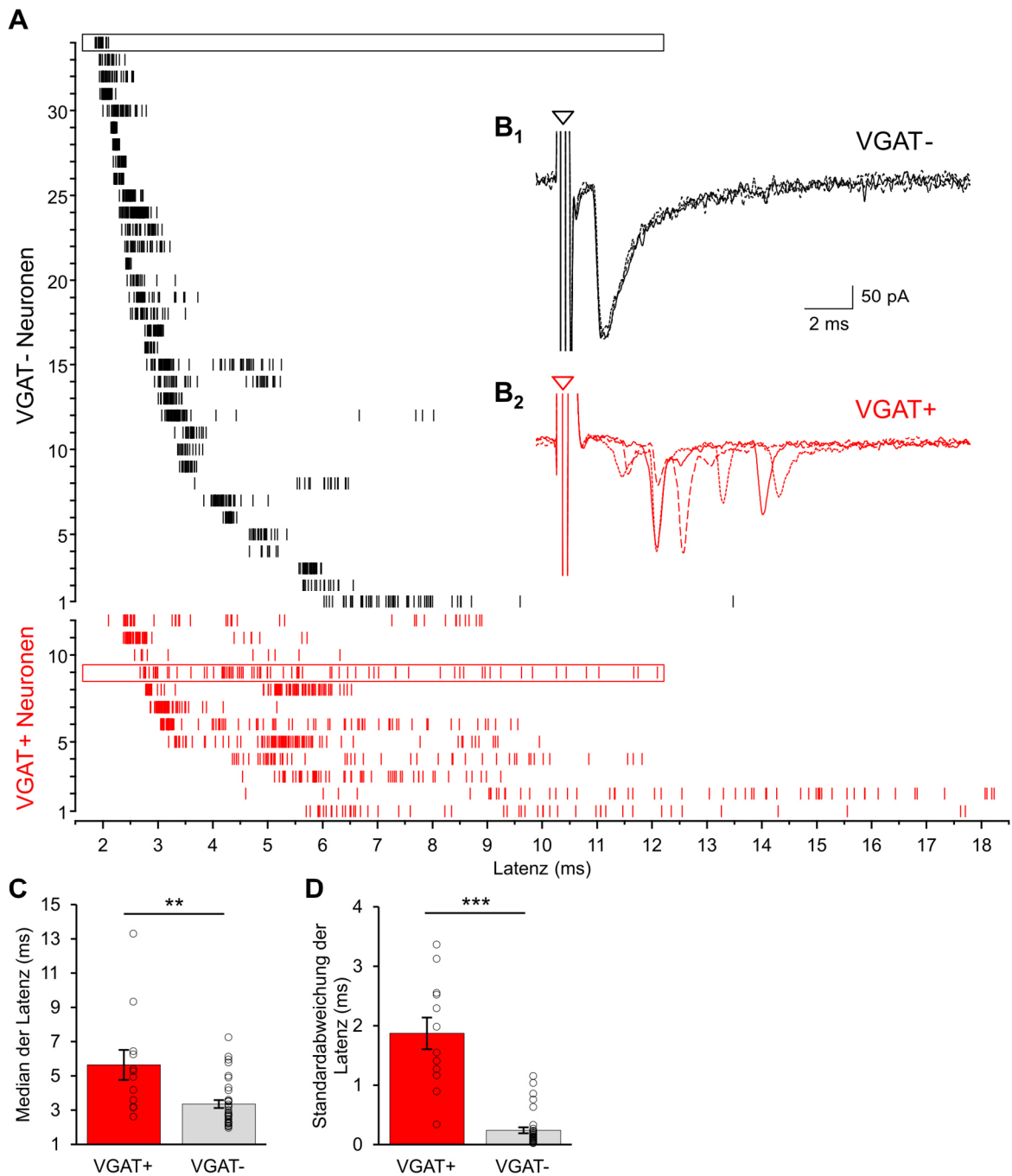


Abb. 18. Vergleich der GABAergen (VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-) Neurone im CIC hinsichtlich der Latenz der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs), die durch die elektrische Stimulation des Lemniscus lateralis evoziert wurden. Rasterdiagramm (A) der EPSC-Latenz von 12 VGAT+ (rot) und 34 VGAT- (schwarz) Neuronen. Nullwert der Latenz-Zeitachse repräsentiert den Anfang des Stimulationsartefaktes. Überlagerung dreier exemplarischer Current-Clamp Aufzeichnungen (18 ms lang) der evozierten EPSCs von einem VGAT- (B<sub>1</sub>) und einem VGAT+ (B<sub>2</sub>) Neuron. Einzelne Stimulationswiederholungen sind Anhand unterschiedlicher Linienbeschaffenheit gekennzeichnet. Aufzeichnungen entsprechen den umrahmten Rasterplots in A. Dreieck zeigt das Stimulationsartefakt an. Median der EPSC-Latenz (C) der VGAT+ Neurone ist signifikant länger als die der VGAT- Neurone. Die Standardabweichung der EPSC-Latenz (D) der VGAT+ Neurone ist wesentlich höher im Vergleich zu den VGAT- Neuronen. Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM, Mann-Whitney-Test (n: 12 VGAT+, 34 VGAT- p<0,01 \*\*, p<0,001 \*\*\*).

Die EPSC-Latenz-Unterschiede zwischen den VGAT+ und VGAT- Neuronen wurden mit den minimalen Spannungspulsen gezeigt. Die Amplitude dieser Pulse lag in einem breiten Spannungsintervall (18-70 V) und unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Neuronengruppen (Abb. 15, B, Tab. 8). Dennoch bleibt es nicht ausgeschlossen, dass die Größe des Netzwerks, das durch die Stimulation des LL aktiviert wird, von der Stimulationsstärke abhängt. Es ist denkbar, dass bei VGAT+ Neuronen große Netzwerke (*feed-forward* Verschaltung und als Folge lange EPSC-Latenz) schon bei der minimalen Stimulation des LL aktiviert werden können, während bei den VGAT- Neuronen für den gleichen Effekt lediglich eine Erhöhung der Amplitude der Spannungspulse ausreichen würde. Um den alleinigen Effekt der Stimulationsstärke auf die EPSC-Latenz bei den VGAT- Neuronen auszuschließen, wurden die EPSC bei minimalen und maximalen Stimulationsspannung aufgenommen. Minimale Stimulationsspannung wurde dabei wie im vorherigen Experiment definiert, die maximale Stimulationsstärke wurde als die Spannung deklariert, deren Erhöhung keine weitere EPSC-Amplitudenveränderung hervorruft. Erhöhung der minimalen Spannung bis zum Maximum führte zur Verkürzung der Latenz in den VGAT- Neuronen (Abb. 19, A, B<sub>1-2</sub>). Der Median der EPSC-Latenz bei der minimalen Stimulation ( $3,53 \pm 0,40$  ms) ist signifikant länger als bei der maximalen Stimulation ( $3,18 \pm 0,44$  ms, gepaarter t-Test,  $n=5$ ,  $p=0,002$ ). Die Standardabweichung der Latenz bleibt von der Erhöhung der Stimulationsspannung unverändert (Abb. 19, C, D) und beträgt bei der minimalen Stimulation  $0,11 \pm 0,02$  ms und bei der Maximalen  $0,10 \pm 0,02$  ms (gepaarter t-Test,  $n=5$ ,  $p=0,531$ ). Somit ruft die höhere als minimale Stimulationsspannung im LL in VGAT- Neuronen kein EPSC-Latenzmuster hervor, das den VGAT+ Neuronen ähnlich wäre (variable und relativ lange EPSC-Latenz) hervor. Es konnte somit nicht festgestellt werden, dass die Stimulation der aufsteigenden Bahnen des LL mit hohen Spannungen erweiterte neuronale Schaltkreise (z.B. *feed-forward* Signalweiterleitung) auf dem Weg zu VGAT-negativen CIC-Neuronen rekrutiert. Die 3-3,5 ms lange Latenz der EPSC, die bei der maximalen Stimulation evoziert wurden, deutet auf die direkte Innervation der VGAT- Neurone aus dem LL hin.

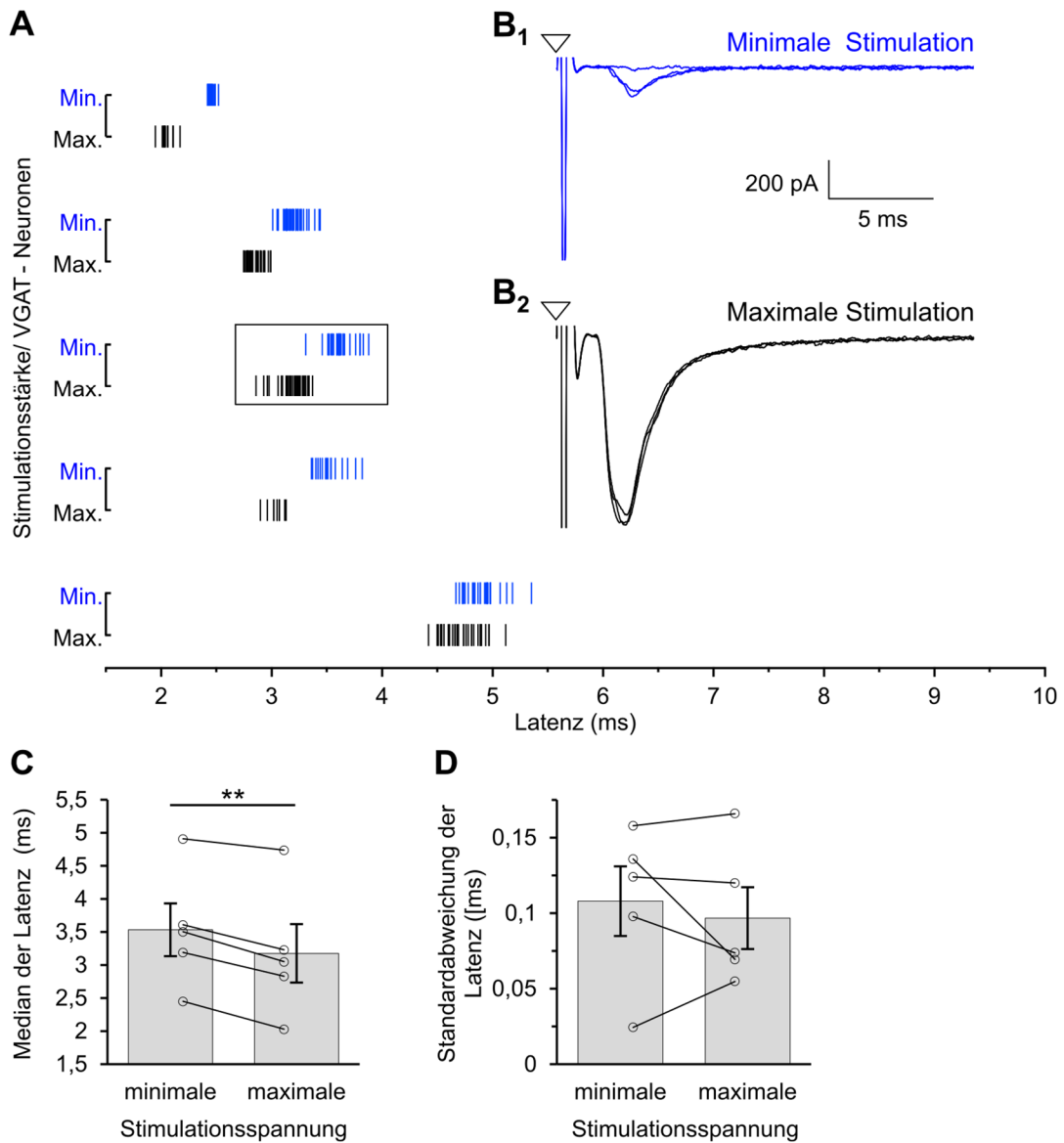


Abb. 19. Vergleich exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSCs) in nicht-GABAergen (VGAT-) CIC-Neuronen hinsichtlich deren Latenz bei minimaler und maximaler elektrischer Stimulation des LL. Rasterdiagramm (A) zeigt die EPSC-Latenz von fünf VGAT- Neuronen, die durch die minimale (Min., blau) und maximale (Max., schwarz) Stimulationsspannung evoziert wurden (13-40 Wiederholungen). Nullwert der Latenz-Zeitachse entspricht dem Anfang des Stimulationsartefaktes. Exemplarische Membranstrom-Aufzeichnungen (20 ms) von jeweils drei Stimulationswiederholungen bei der minimalen (B<sub>1</sub>, blau) (erste EPSC, eine Stimulationswiederholung ruft kein EPSC auf) und der maximalen (B<sub>2</sub>, schwarz) Stimulationsspannung (EPSC-Amplitude bleibt unverändert bei stärkerer Stimulation). B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> repräsentieren die umrahmten Rasterdiagramme in A. Dreiecke in B<sub>1-2</sub> zeigen den Anfang des Stimulationsartefaktes an. Median der EPSC-Latenz (C) ist bei der maximalen Stimulationsspannung signifikant kürzer als bei der minimalen Stimulation. Standardabweichung der EPSC-Latenz (D) ist bei den beiden Stimulationsmodi ähnlich. Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM. Gepaarter t-Test, n=5, p<0,01 \*\*. Daten sind normalverteilt und verfügen über die gleiche Varianz.

Die VGAT+ Neurone zeigen einen wesentlich höheren Variationskoeffizient der Amplitude der evozierten EPSCs ( $\gg 0,5$ ; Abb. 15, F) sowie signifikant höhere Standardabweichung der EPSC-Latenz (Abb. 18, B) als die VGAT- Neurone. Deswegen wurde die Veränderung der EPSC-Amplitude und -Häufigkeit in Abhängigkeit von der Latenz genauer untersucht. Dafür wurden die EPSC-Amplitude sowie -Häufigkeit (engl. *post stimulus time histogram*, PSTH) vs. EPSC-Latenz für jedes einzelne Neuron (34 VGAT- und 12 VGAT+ Neurone) aufgetragen (Abb. 20, A, B) und anschließend für VGAT+ und VGAT- Neuronengruppe über die Latenzklassen (0,2 ms) gemittelt (Abb. 20, C) (siehe Methodik, Seite 39). Die normierten PSTH (Abb. 20, A) zeigen, dass die EPSCs in VGAT- Neuronen am häufigsten im Zeitfenster von 2-4 ms nach der Stimulation auftreten, während bei den meisten VGAT+ Neuronen die EPSCs sowohl 2-4 ms als auch darüber hinaus: 4-8 ms nach der Stimulation sehr häufig detektiert werden. Die zeitliche Verteilung der EPSC-Amplitude (EPSC-Amplitude vs. EPSC-Latenz) ist in Abb. 20, B dargestellt. Die meisten VGAT- Neurone zeigten die höchsten EPSC-Amplituden binnen 2-4 ms nach der Stimulation. Die VGAT+ Neurone zeigen dagegen die höchsten EPSC-Amplituden sowohl 2-4 ms als auch im Zeitfenster 4-9 ms nach der Stimulation aufweisen. Somit sind die EPSC-Amplitude- und EPSC-Häufigkeitsverteilungen entlang der Latenzzeitachse sehr ähnlich für die jeweilige Neuronengruppe. Dies bestätigen die Histogramme für EPSC-Amplitude- und EPSC-Häufigkeit, die für jeweilige Neuronengruppe und über die jeweilige Latenzzeitklasse gemittelt wurden (Abb. 20, C). Die VGAT- Neurone zeigen am häufigsten EPSC mit höchsten Stromamplituden 2-4 ms nach der Stimulation. Im Kontrast dazu weisen die VGAT+ Neurone die meisten EPSC mit höchsten Stromamplituden bei *ca.* 2,2 ms und bei *ca.* 4,5 ms nach der Stimulation auf.

Zusammenfassend deuteten die Histogramme, darauf hin, dass die meisten erregenden CIC-Neurone starke und/oder synchrone exzitatorische Eingänge aus dem LL mit einer kurzen Latenz, vermutlich direkt verschaltet erhalten. Die VGAT+ Neurone erhalten stattdessen starke und/oder synchrone erregende Eingänge sowohl mit *ca.* 2,2 ms als auch mit etwa doppelt so langer Latenz von *ca.* 4,5 ms. Dies deutet darauf, dass die GABAerge CIC-Neurone sowohl indirekte (*feed-forward*, über Interneurone) als auch/oder direkte erregende Eingänge aus dem LL erhalten könnten.



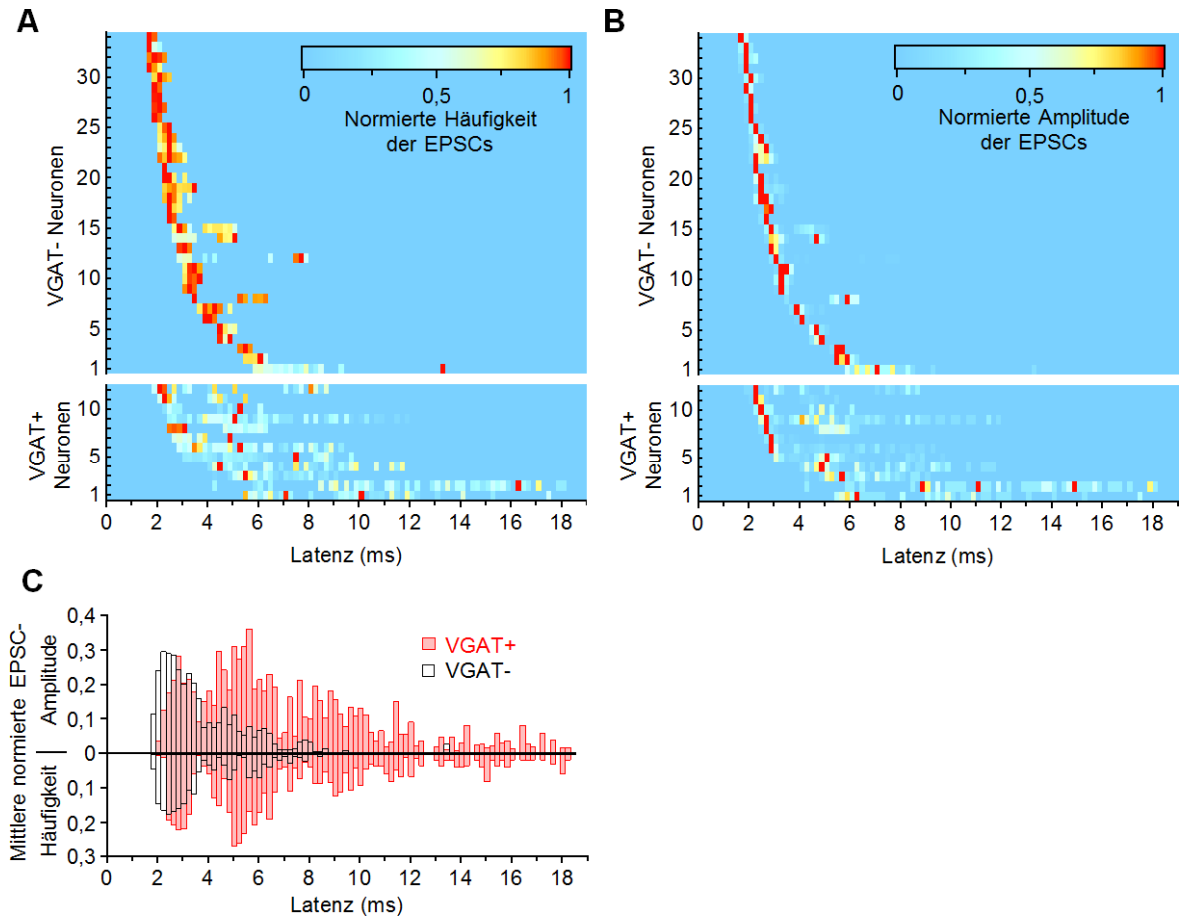


Abb. 20. Vergleich der GABAergen (VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-) CIC-Neurone hinsichtlich Häufigkeit, Amplitude und Latenz der EPSCs, die durch die elektrische Stimulation des LL evoziert wurden. Normierte *post stimulus time histogram* (PSTH) von 34 VGAT- und 12 VGAT+ Neuronen (A, Farbcode: EPSC-Häufigkeit) zeigen, dass bei den VGAT- Neuronen die EPSCs am häufigsten im Zeitfenster von 2-4 ms nach der Stimulation auftreten. Bei den VGAT+ Neuronen werden die EPSCs häufig sowohl während des 2-4 ms Zeitfensters als auch darüber hinaus detektiert. Normierte EPSC-Amplitude vs. EPSC-Latenz für die gleichen Neuronen wie in A (B, Farbcode: EPSC-Amplitude). Bei den meisten VGAT- Neuronen sind die EPSCs mit höchsten Stromamplituden während des Zeitfensters von 2-4 ms nach der Stimulation detektierbar. Bei den VGAT+ Neuronen treten die EPSCs mit der höchsten Amplitude sowohl 2-4 ms nach der Stimulation als auch darüber hinaus auf. Gegenüberstellung der mittleren EPSC-Häufigkeit (aus A) und mittleren EPSC-Amplitude (aus B) entlang der Latenz-Zeitachse (C). Diagramme stellen Mittelwert von jedem EPSC-Parameter über jeweilige Latenzzeitklasse. Bei den VGAT- Neuronen treten die EPSCs am häufigsten und mit höchsten Stromamplituden während der 2-4 ms nach der Stimulation auf. Bei den VGAT+ Neuronen erreicht die EPSC-Häufigkeit und EPSC-Amplitude zwei Maxima: bei ca. 2,2 ms und 4,5 ms nach der Stimulation. Neurone in A und B wurden entsprechend ihrer kürzesten Latenz absteigend angeordnet. Das Latenzklassenbreite in A, B und C beträgt 0,2 ms. Nullwert der Zeitachse aller Histogramme stellt den Anfangszeitpunkt der Stimulation dar. Genaue Kalkulationsbeschreibung entnehme der Methodik (Seite 39).

### 3.2.5 *Stimulation der Axone in LL evozierte in inhibitorischen CIC-Neuronen Aktionspotentiale mit einer längeren Latenz als in exzitatorischen Neuronen*

Die Latenzmessungen der EPSCs (Seite 67) deuteten auf eine unterschiedliche Verschaltung der erregenden Eingänge aus dem LL an den GABAergen und glutamatergen CIC Neuronen hin. Um diese Annahmen zu bekräftigen, wurden mit einer dem EPSC-Experiment ähnlichen Aufbau (Seite 37, Abb. 15, A), Aktionspotentiale in CIC-Neuronen evoziert und anschließend die AP-Latenz zwischen den GABAergen und glutamatergen Neuronen verglichen. Die Spannung der Stimulationspulse wurde dabei als minimale Stimulation plus 20 V festgelegt. Die minimale Stimulationsspannung entsprach dabei der Spannung, bei der die APs erstmals auftraten. Es wurde für eine höhere als minimale Spannung entschieden um im Fall der *feed-forward* Signalweiterleitung diese zu aktivieren. Die mittlere Spannungsstärke war zwischen den beiden Neuronengruppen nicht signifikant unterschiedlich (VGAT- Neurone:  $57 \pm 5$  V (n=13); VGAT+ Neurone:  $67 \pm 4$  V (n=11), Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney Test,  $p=0,209$ ). Die Aktivierung der GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptor vermittelten Inhibition wurde mit SR-95531 (Gabazin) bzw. Strychnin Hydrochlorid unterbunden (siehe Methodik, Seite 37).

Bei den meisten VGAT- Neuronen (11 von 13) traten APs bei jeder Stimuluswiederholung mit relativ gleicher Latenz auf (Abb. 21, A, B<sub>1</sub>). Bei den meisten VGAT+ Neuronen (10 von 11) war die AP-Latenz stattdessen länger, außerdem variierte sie zwischen den einzelnen Stimuluswiederholungen stark (Abb. 21, A, B<sub>2</sub>). Es wurde keine Spontanaktivität in beiden Neuronengruppen detektiert. Bei allen VGAT- Neuronen rief jede Stimulationswiederholung nur ein AP auf. Bei einigen VGAT+ Neuronen (4 von 11) rief die Stimulation des LL sowohl einzelne AP als auch AP-Salven (bis zu 4 APs) hervor. Bei der Auswertung der Mediane sowie der Standardabweichungen der AP-Zeitpunkten wurden alle APs berücksichtigt, da die APs in der AP-Salve von mehreren vorgeschalteten Neuronen ausgelöst sein konnten. Um die Latenz der AP-Zeitpunkte *via* PSTH zu charakterisieren (siehe Methodik) wurden die APs berücksichtigt, die bei jeder Stimulationswiederholung am frühesten auftraten.

Die gemittelten über alle VGAT+ und VGAT- Neurone normierten PSTH (Abb. 21, C) zeigen, dass die VGAT- Neurone überwiegend kurze AP-Latenz (4-5 ms) aufweisen, während die VGAT+ Neurone fast doppelt so lange AP-Zeitpunkte im Zeitfenster 6-10 ms hervorbringen. Die Quantifizierung aller AP-Zeitpunkten (inklusive AP-Salven) bestärkt diese Aussage der PSTH. So war die mittlere AP-Latenz bei den VGAT+ Neuronen signifikant länger und bei 8,2 ms fast doppelt so lang wie bei den VGAT- Neuronen (4,9 ms) (Abb. 21, D, Tab. 10). Auch die mittlere Standardabweichung der AP-Zeitpunkte ist bei den VGAT+ Neuronen signifikant größer (fast bei 2 ms) im Vergleich zu den VGAT- Neuronen (0,6 ms) (Abb. 21, E, Tab. 10). Interessanterweise zeigte eines von 11 VGAT+ Neuronen eine kurze – mit VGAT-Neuronen vergleichbare – AP-Latenz (Abb. 21, A, VGAT+ Neuron Nr. 11,

Median der Latenz: 3,5 ms). Sowie *vice versa* zwei von 13 VGAT- Neuronen (Abb. 21, A, VGAT- Neuronen Nr. 1 und 2;) weisen einen relativ langen Median der AP-Latenz (7-9 ms) auf.

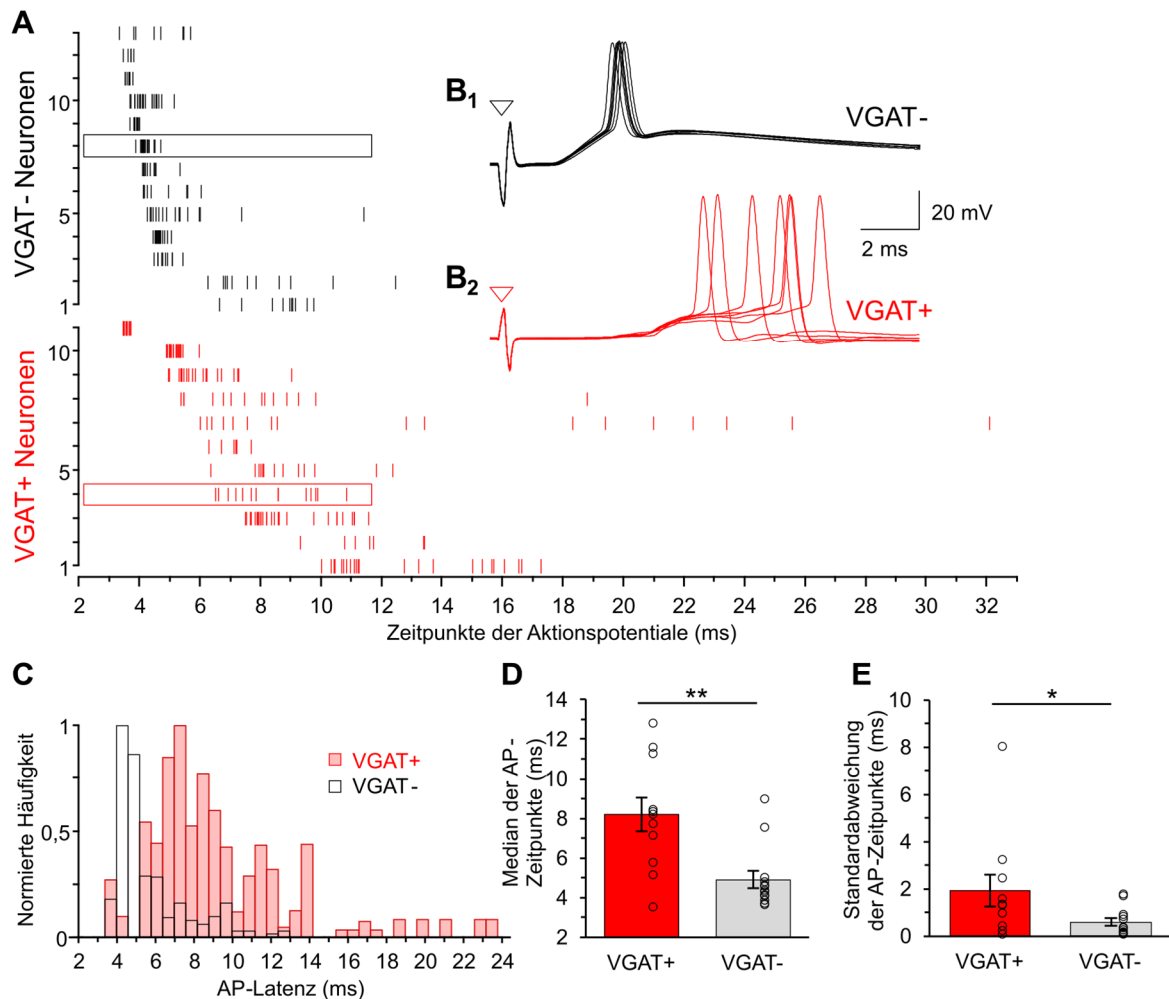


Abb. 21. Vergleich der GABAergen (VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-) CIC-Neurone hinsichtlich der Zeitpunkte der Aktionspotentiale, die mittels elektrischer Stimulation des LL in diesen Neuronen evoziert wurden. Rasterdiagramme der Zeitpunkte der Aktionspotentiale (A) für 13 VGAT- (schwarz) und 11 VGAT+ (rot) Neurone. Nullwert der Zeitachse repräsentiert den Anfangszeitpunkt der 0,4 ms-langen Stimulation. Sieben exemplarische Current-Clamp Aufzeichnungen (14 ms lang) von einem VGAT- (B<sub>1</sub>) und einem VGAT+ (B<sub>2</sub>) Neuron entsprechen den umrahmten Rasterplots in A. Dreieck zeigt das Stimulationsartefakt an. Das mittlere normierte *post stimulus time histogram* (PSTH, siehe Methodik) repräsentiert die Latenz des ersten AP für VGAT+ und VGAT- Neurone (C), Latenz-Klassengröße: 0,6 ms. Median der AP-Zeitpunkte (D) ist bei den VGAT+ Neuronen signifikant länger als bei den VGAT- Neuronen. Standardabweichung der AP-Zeitpunkte (E) ist signifikant höher bei den VGAT+ Neuronen im Vergleich zu den VGAT- Neuronen. Balkendiagramme zeigen Mittelwert  $\pm$  SEM. Mann-Whitney-Test (n: 11 VGAT+, 13 VGAT-, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Zusammenfassend sind die Latenzmessungen der in CIC-Neuronen evozierten AP konsistent mit den Messungen der Latenz der evozierten EPSCs. In beiden Experimenten ist die AP- oder EPSC-Latenz der meisten VGAT+ Neuronen fast doppelt so lang und insgesamt

deutlich variabler als bei den VGAT- Neuronen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die meisten VGAT+ Neuronen wahrscheinlich über *feed-forward* Verschaltungen – über mehr als eine Synapse *via* LL angeregt werden. Bei den meisten VGAT- Neuronen ist stattdessen eine direkte Erregung zu vermuten.

Mittelwert $\pm$ SEM	VGAT+ n=11	VGAT n=13	Mann-Whitney-Test, p
<b>Median der AP-Zeitpunkte (ms)</b>	8,18 $\pm$ 0,86	4,90 $\pm$ 0,44	0,0039; **
<b>Standardabweichung der AP-Zeitpunkte (ms)</b>	1,91 $\pm$ 0,67	0,58 $\pm$ 0,16	0,0352; *

Tab. 10. Vergleich der GABAergen (VGAT+) und nicht-GABAergen (VGAT-) CIC-Neurone hinsichtlich der Zeitpunkte der Aktionspotentiale, die mittels elektrischer Stimulation des LL evoziert wurden.

### 3.2.6 Mehr als zwei Drittel der VGAT-positiven Neurone erhalten somatische Eingänge, die den vesikulären Glutamatttransporter 2 (VGluT2) exprimieren

Messungen der Latenz der EPSCs und APs, die in CIC-Neuronen *via* Stimulation der Axone des LL evoziert wurden, sowie die hohe Variation der Amplitude dieser EPSCs lassen vermuten, dass viele GABAerge CIC-Neurone über polysynaptische erregende Eingänge verfügen und Erregung aus dem LL über lokale IC-Interneurone (*feed-forward*) erhalten. Erkenntnisse über eine bestimmte Klasse der GABAergen IC-Neurone unterstützt indirekt diese Funde. Die so genannten großen GABAergen Neurone (engl. *large GABAergic neurons*, LG-Neurone, Somadurchmesser > 16,5  $\mu$ m, Ito et al. 2009) zeigen viele perisomatische Eingänge, die für den vesikulären Glutamatttransporter 2 (VGluT2) positiv sind (Ito et al. 2009, 2015, Geis and Borst 2013, Ito and Oliver 2014). Diese Eingänge stammen unter anderem von den zahlreichen lokalen IC-Neuronen (Ito and Oliver 2014). Um zu prüfen, ob es sich bei den VGAT+ CIC-Neuronen, die lange Latenz der evozierten EPSCs und APs zeigten um die großen GABAergen Neurone mit somatischen VGluT2-positiven Eingängen (LG-Neurone) handeln könnte, wurden die folgenden zwei Experimente durchgeführt.

Beim ersten Experiment wurde anhand einer VGluT2-MAP2-immunohistochemischen Färbung in PFA-fixierten Gehirnschnitten der VGAT-ChR2-EYFP Maus Expression von VGluT2 in somatischen Eingängen an den GABAergen (VGAT+, EYFP+) CIC-Neuronen quantifiziert und mit dem Somadurchmesser dieser Neurone verglichen. Beim zweiten Experiment wurde überprüft, ob die Eigenschaften der EPSCs, die in CIC-Neuronen über LL-Stimulation evoziert wurden mit der Expression von VGluT2 in somatischen Synapsen an diesen Neuronen korrelieren. Diesem Experiment ist das nächste Kapitel gewidmet (Seite 78).

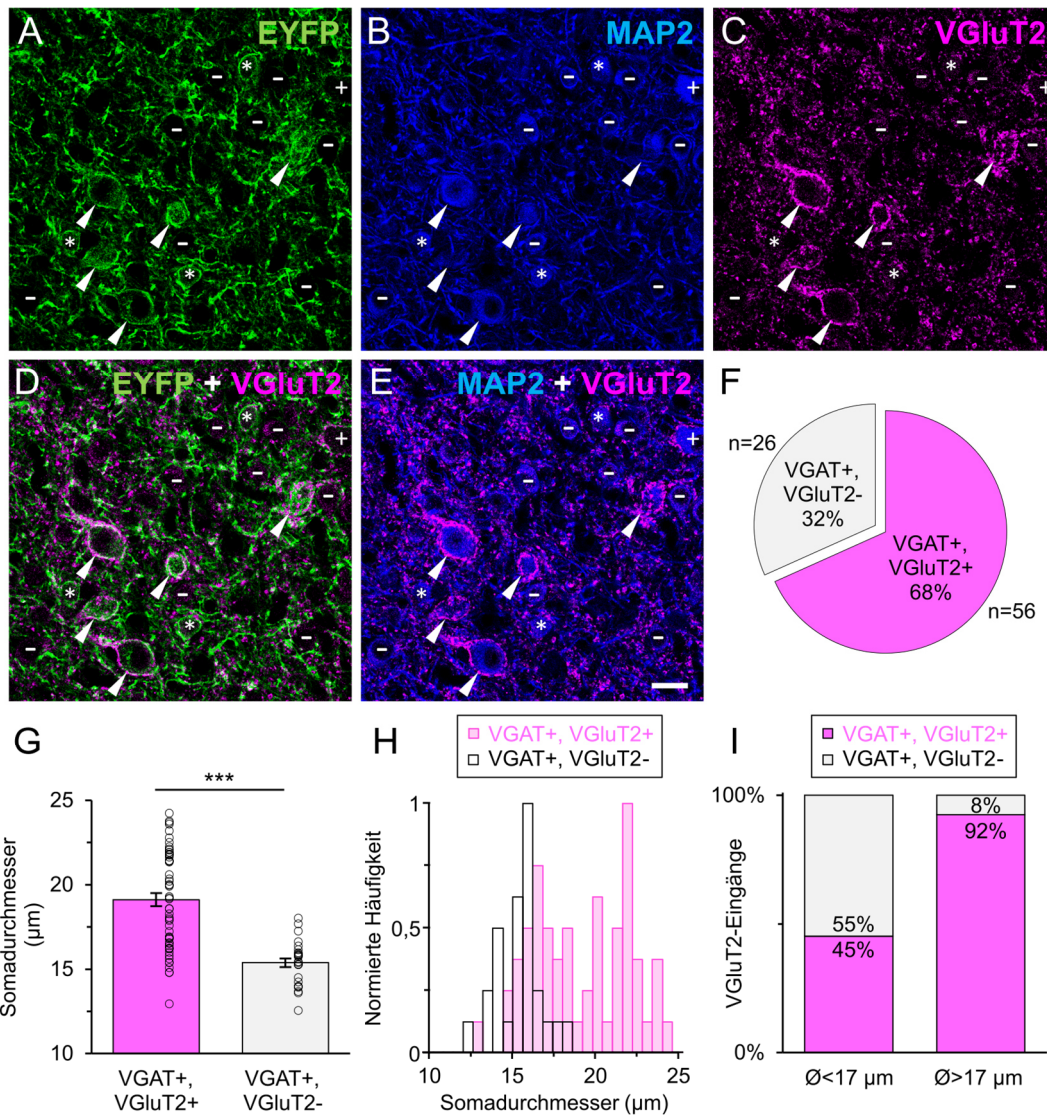


Abb. 22. Immunreaktivität (IR) des vesikulären Glutamattransporters 2 (VGluT2) und des Mikrotubuli-assoziierten Protein 2 (MAP2) im CIC der P28 VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus (A-E). GABAerge (VGAT+) Neurone exprimieren EYFP (A, grün, Pfeilköpfe und Sterne), nicht-GABAerge Neurone (VGAT-) sind EYFP-negativ (A, Minus und Plus). Die Kombination der somatischen MAP2-IR (B, blau) mit dem EYFP-Emissionssignal (A) erlaubt die nicht-GABAergen (EYFP-) Neurone zu identifizieren (D, MAP2+, EYFP-, Minus und Plus). VGluT2-IR (C, Magenta) visualisiert glutamaterge Eingänge im Neuropil sowie viele somatische Eingänge an EYFP+ Neuronen (D, Pfeilköpfe). GABAerge Neurone (EYFP+, Pfeilköpfe, D) mit VGluT2-positiven somatischen Eingängen (VGluT2+) und ohne diesen bzw. mit vereinzelt VGluT2-positiven Eingängen (EYFP+, D Sterne). Nicht-GABAerge Neurone (EYFP-, MAP2+, E) zeigen überwiegend keine somatische VGluT2-positiven Eingänge (E, Minus, Plus). Somadurchmesser und Anzahl der GABAergen Neurone (VGAT+) mit somatischen VGluT2-positiven Eingängen (VGAT+, VGluT2+) und GABAergen Neurone ohne diese Eingänge (VGAT+, VGluT2-) (F-I). VGAT+, VGluT2+ Neurone betragen ca. zwei Drittel aller VGAT+ Neurone (F). VGAT+, VGluT2- Neurone (n=26) zeigen einen signifikant kleineren Somadurchmesser auf, als die VGAT+, VGluT2+ Neurone (n=56) (G), Mann Whitney Test,  $p < 0,0001$ . Häufigkeitshistogramm der Somadurchmesser der VGAT+ Neurone mit und ohne VGluT2-positiven somatische Eingänge (H), Klassengröße: 0,6 µm. VGAT+ Neurone mit Somadurchmesser >17 µm weisen zu 92% VGluT2-positiven somatische Eingänge auf (37 von 40 Neuronen). Kleinere VGAT+ Neurone ( $\text{Ø} < 17 \mu\text{m}$ ) zeigen zu ungefähr gleichen Anteilen diese Eingänge (19 VGAT+, VGluT2- vs. 23 VGAT+ VGluT2+) (I). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Alle KLSM-Aufnahmen stellen eine einzelne und dieselbe optische Ebene dar. Messbalkenlänge in A-E beträgt 20 µm.

IHC-Färbungen gegen VGlut2 und MAP2, wurden in zwei P28 VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mäusen durchgeführt (Abb. 22, A-E). Die VGlut2-Immunreaktivität visualisiert sowohl einzelne glutamaterge Eingänge im Neuropil als auch zahlreiche somatische VGlut2-positive Eingänge an vielen Neuronen (Abb. 22, C, Pfeilköpfe, Plus). Überlagerung der Aufnahmen der EYFP-Emission- und VGlut2-Immunreaktivität (Abb. 22, A, C und D) zeigt GABAerge Neurone (EYFP+) mit (Abb. 22, D, Pfeilköpfe) und ohne somatische VGlut2-positive Eingänge (Abb. 22, D, Sterne). Die somatische MAP2-Immunreaktivität (Abb. 22, B) in Kombination mit dem EYFP-Emissionssignal (Abb. 22, A) lässt die nicht-GABAergen (EYFP-) Neurone identifizieren (Abb. 22, D, Minus und Plus). Überlagerung der Aufnahmen der MAP2- und VGlut2-Immunreaktivität zeigt, dass nicht-GABAerge Neurone mit und ohne VGlut2-positive somatische Eingänge vorkommen (Abb. 22, E, Minus, Plus).

Der Somadurchmesser und die Anwesenheit somatischer VGlut2-positiver Eingänge wurde für die GABAergen (EYFP+, VGAT+) CIC-Neurone ausgewertet. Mehr als zwei Drittel der VGAT+ Neurone wiesen somatische VGlut2-positive Eingänge (VGAT+, VGlut2+) auf (Abb. 22, F, n=82). Die meisten VGAT+, VGlut2- Neurone wiesen Somadurchmesser auf, die im Bereich 14-16  $\mu\text{m}$  lag. Die meisten VGAT+/VGlut2+ Neurone wiesen stattdessen Somadurchmesser im Bereich von 16-22  $\mu\text{m}$  auf (Abb. 22, H). Der mittlere Somadurchmesser der VGAT+, VGlut2+ Neurone ( $19,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ; n=26) war signifikant größer als der VGAT+, VGlut2- Neurone ( $15,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ; n=56; Mann Whitney Test,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 22, G). Mehrheit der VGAT+ Neurone mit Somadurchmesser  $> 17 \mu\text{m}$  (92%, 37 von 40 Neurone) zeigten somatische VGlut2-positive Eingänge (Abb. 22, I). Die VGAT+ Neurone mit Somadurchmesser  $< 17 \mu\text{m}$  zeigten stattdessen zu ungefähr gleichen Anteilen die somatischen VGlut2-positiven Eingänge (19 VGAT+, VGlut2- vs. 23 VGAT+, VGlut2- Neurone) (Abb. 22, I). Somit stehen Somadurchmesser der GABAergen CIC-Neurone und VGlut2-Expression in somatischen Eingängen an diesen Neuronen in VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mäusen in ähnlicher Korrelation, wie zuvor bei Ratten beschrieben (Ito et al. 2009, Ito and Oliver 2012).

### ***3.2.7 GABAerge Neurone: Schnelle erregende Eingänge mit langer Latenz korrelieren mit der VGlut2-Expression in perisomatischen Synapsen***

In dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob die GABAergen CIC-Neurone, die evozierte EPSCs mit langer Latenz, variablen Stromamplituden und schnellen Abfallzeitkonstanten aufweisen, somatische VGlut2-positiven Eingänge erhalten. Dafür wurde, ähnlich zu den vorherigen Experimenten (Seite 62, 67, 37) Fasern des LL elektrisch stimuliert (Abb. 15, A) und EPSCs in CIC-Neuronen aufgenommen Um das Aktivieren der möglichst großen IC-Netzwerken zu erzielen wurde die Stimulationsstärke auf 20 V über die minimale Stimulation festgelegt. Die EPSCs wurden pharmakologisch, identisch zu vorherigen (EPSC) Experimenten, isoliert. Während der elektrophysiologischen Ableitung wurden Neurone mit

dem Farbstoff Lucifer Yellow (LY), der in der Elektrodenlösung enthalten war, gefüllt. Danach wurden die Gehirnschnitte in PFA-Lösung fixiert und daraufhin immunhistochemisch gegen VGluT2 gefärbt. Anschließend wurden EPSC-Eigenschaften der GABAergen (VGAT+/ EYFP+) und nicht-GABAergen (VGAT-/ EYFP-) Neurone mit der VGluT2-Expression in somatischen Eingängen und dem Somadurchmesser korreliert. Die Verifikation der VGAT+/VGAT- Neurone erfolgte dabei doppelt: erstens durch Aktivierung von ChR2 während der elektrophysiologischen Experimente und zweitens visuell anhand der EYFP-Emission an fixierten Schnitten.

Alle 14 mit LY (Abb. 23, A<sub>2</sub>, blau) gefüllten, nicht-GABAergen Neurone (VGAT- / EYFP- Abb. 23, A<sub>1</sub>, grün) zeigten entweder keine oder nur wenige einzelne VGluT2-positive Eingänge am Soma (Abb. 23, A<sub>3-4</sub>, Pfeilköpfe). Von insgesamt 6 mit LY (Abb. 23, B<sub>2</sub>, blau) gefüllten GABAergen Neuronen (VGAT+/ EYFP+, Abb. 23, B<sub>1</sub>, grün) wurden 5 von vielen somatischen VGluT2-Eingängen umgeben (Abb. 23, A<sub>3-4</sub>, Pfeilköpfe). Ein VGAT+ Neuron (Abb. 24., A, grün) wies nur einzelne VGluT2-positive Eingänge an dem Soma und Dendriten, ähnlich zu den VGAT- Neuronen auf (Abb. 24., B-D, Pfeilköpfe).

Nicht-GABAerge Neurone ohne perisomatische VGluT2-Eingänge (n=14, VGAT-/VGluT2-) (Abb. 23, A<sub>5</sub>) zeigten im Vergleich zu GABAergen Neuronen mit perisomatischen VGluT2-Eingängen (n=5, VGAT+/VGluT2+) (Abb. 23, B<sub>5</sub>) deutliche Unterschiede in Kinetik, Latenz und Variationskoeffizient der Amplitude der evozierten EPSCs. Die Abfallzeitkonstanten der EPSCs der VGAT+/VGluT2+ Neurone waren signifikant schneller ( $\tau < 1$  ms) als die der VGAT-/VGluT2- Neurone (Abb. 23, C, Tab. 11). Die EPSC-Amplituden unterschieden sich nicht zwischen den beiden Neuronengruppen (Abb. 23, D, Tab. 11). Die Stimulationsspannung war ebenfalls nicht unterschiedlich (p=0,48; ungepaarter T-Test, Daten sind nicht gezeigt). Der Variationskoeffizient der Amplitude war allerdings deutlich höher bei VGAT+/VGluT2+ Neuronen (>0,5) im Vergleich zu VGAT-/VGluT2- Neuronen (<0,3) (Abb. 23, E, Tab. 11). Der Median der EPSC-Latenz war mehr als doppelt so hoch bei den VGAT+/VGluT2+ Neuronen (>6 ms) im Vergleich zu den meisten VGAT-/VGluT2- Neuronen (Abb. 23, F, Tab. 11). Die Standardabweichung der EPSC-Latenz mit 10 ms war ebenso wesentlich höher bei den GABAergen Neuronen ohne VGluT2-Eingänge im Vergleich zu den VGAT-/VGluT2- Neuronen (Abb. 23, G, Tab. 11). VGAT+/VGluT2+ Neurone zeigten variable Somadurchmesser: 13-22  $\mu\text{m}$ . Neuronensomata der VGAT-/VGluT2- Neurone waren fast alle kleiner als 17  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (Abb. 23, H, Tab. 11).

Somit ergaben sich Unterschiede in Kinetik, Latenz und Variationskoeffizienten der Stromamplitude der glutamatergen synaptischen Übertragung zwischen den meisten VGAT+/VGluT2+ und VGAT-/VGluT2- Neuronen, die ähnlich ausfallen, wie in den vorherigen Experimenten (Seite 62, 67) (vgl. Abb. 15, D, E, F und Abb. 18, C, D).



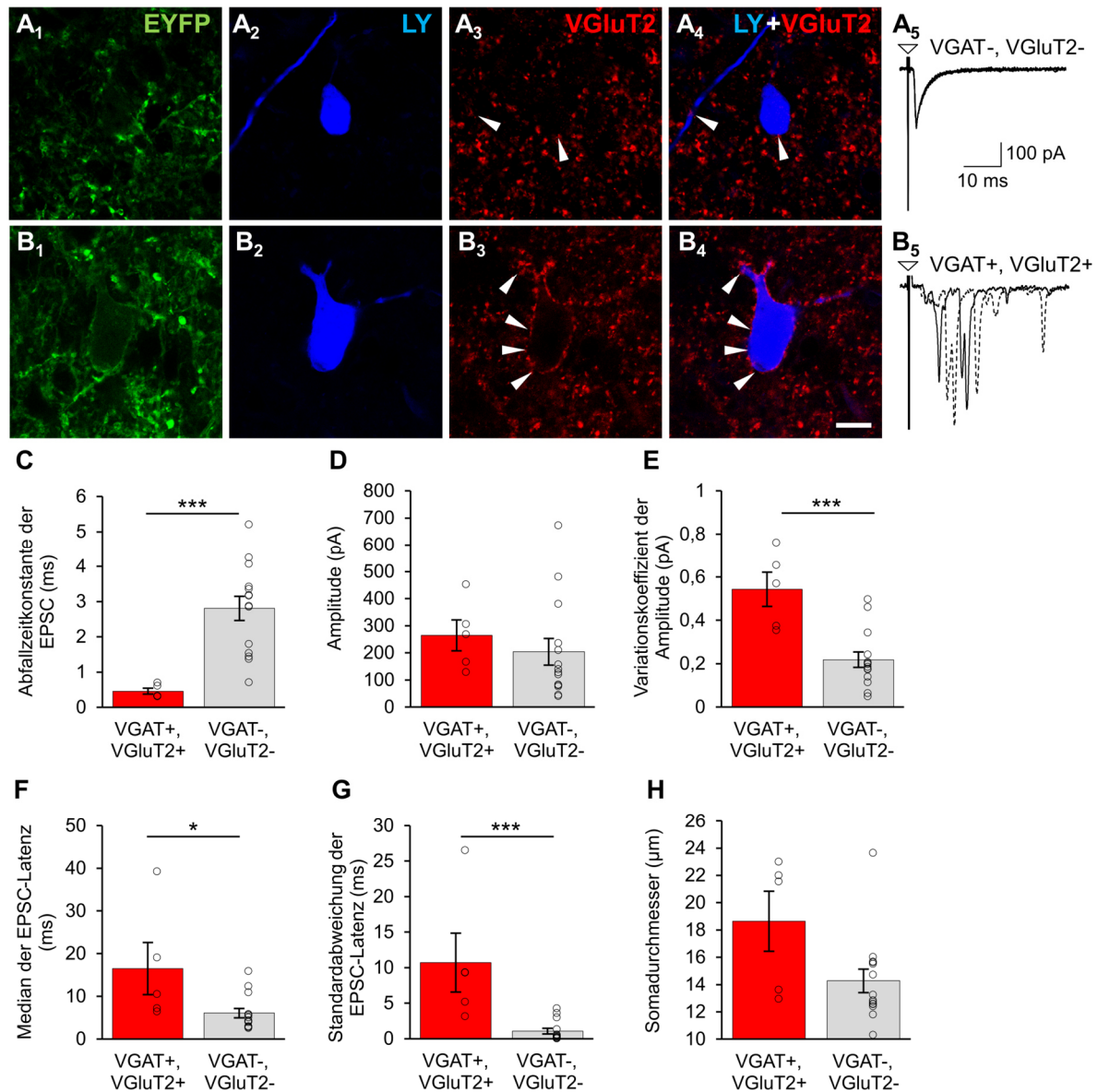


Abb. 23. Vergleich der EPSC-Eigenschaften der GABAergen Neurone (VGAT+) mit perisomatischen, den vesikulären Glutamattransporters 2 exprimierenden Eingängen (VGluT2+) und der nicht-GABAergen (VGAT-) Neurone ohne diese Eingänge (VGluT2-) im CIC der VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus. EPSCs wurden durch Stimulation des LL evoziert. Exemplarische Beispiele der VGAT- (A<sub>1</sub>, EYFP-) und VGAT+ (B<sub>1</sub>, grün, EYFP+) Neurone, die mit Lucifer Yellow gefüllt wurden (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, blau, LY) und anschließend immunhistochemisch gegen VGluT2 gefärbt wurden (A<sub>3-4</sub>, B<sub>3-4</sub>, rot). Überlagerung des LY-Signals und VGluT2-IR für das VGAT- Neuron (A<sub>1</sub>, EYFP-) zeigt nur einzelne perisomatische VGluT2-positive Eingänge (A<sub>3-4</sub>, Pfeilköpfe, VGluT2-), während das VGAT+ Neuron (B<sub>1</sub>, EYFP+) zahlreiche VGluT2-positive perisomatische Eingänge erhält (B<sub>3-4</sub>, Pfeilköpfe, VGluT2+). Exemplarische Voltage-Clamp Aufzeichnungen (jeweils 2-3) der EPSCs, die in Neuronen A und B evoziert wurden (A<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>). Die evozierten EPSCs der VGAT+/VGluT2+ Neurone (B<sub>5</sub>) zeigen im Vergleich zu VGAT-/VGluT2- Neuronen (A<sub>5</sub>) signifikant schnellere EPSC-Abfallzeitkonstante (C), keine Unterschiede in der Höhe der Stromamplitude (D), einen höheren Variationskoeffizienten der Stromamplitude (E), einen längeren Median der EPSC-Latenz (F) und deutlich höhere Standardabweichung der EPSC-Latenz (G). Der Somadurchmesser der VGAT+/VGluT2+ Neurone ist variabel jedoch nicht signifikant unterschiedlich von denen der nicht-GABAergen Neurone (H). Dreiecke in A<sub>5</sub> und B<sub>5</sub> zeigen die Stimulationsartefakte an. Alle KLSM-Aufnahmen stellen eine einzelne und dieselbe optische Ebene dar. Messbalkenlänge in A<sub>1-4</sub> und B<sub>1-4</sub> beträgt 10 µm. Balkendiagramme zeigen Mittelwert ± SEM. T-Test und Mann-Whitney-Test (n: 5 VGAT+, 14 VGAT-, p<0,05 \*, p<0,001 \*\*\*).



Eines der insgesamt 6 mit LY-gefüllten inhibitorischen Neurone (17%) besaß ähnlich zu den exzitatorischen Neuronen, keine VGluT2-positive somatische Eingänge (Abb. 24., B-D) und zudem auch eine langsame EPSC-Kinetik (Abfallzeitkonstante 1,78 ms), eine relativ kurze EPSC-Latenz (Median: 6,28 ms), eine niedrige Standardabweichung der EPSC-Latenz (0,18 ms) und niedrige Variation der EPSC-Amplitude (0,14) (vgl. Tab. 11). Somit teilte dieses Neuron die Eigenschaften der meisten VGAT-/VGluT2- Neuronen. Interessanterweise wurden in dem vorherigen Experiment (Seite 62, 67) auch zwei GABAerge Neurone (16%) mit ähnlich langsamer EPSC-Kinetik, relativ kurzem Median der EPSC-Latenz und wenig variablen EPSC-Amplituden bereits beschrieben (Abb. 16). Somit treten diese einzelnen GABAergen Neurone in beiden Experimenten konsistent auf.

Mittelwert $\pm$ SEM	VGAT+, VGluT2+ n=5	VGAT-, VGluT2- n=14	VGAT+, VGluT2+ vs. VGAT-, VGluT2-
<b>Abfallzeitkonstante der EPSC (ms)</b>	0,46 $\pm$ 0,08	2,81 $\pm$ 0,34	T-Test, p<0,0001; ***
<b>EPSC-Amplitude (pA)</b>	264,7 $\pm$ 57	203,9 $\pm$ 49,5	Mann-Whitney-Test, p=0,256; ns
<b>Variationskoeffizient der EPSC-Amplitude</b>	0,54 $\pm$ 0,08	0,22 $\pm$ 0,04	T-Test, p=0,0005; ***
<b>Median der EPSC-Latenz (ms)</b>	16,51 $\pm$ 6,11	6,08 $\pm$ 1,09	Mann-Whitney-Test, p=0,0134; *
<b>Standardabweichung der EPSC-Latenz (ms)</b>	10,71 $\pm$ 4,14	1,05 $\pm$ 0,39	Mann-Whitney-Test, p=0,0007; ***
<b>Somadurchmesser (<math>\mu</math>m)</b>	18,6 $\pm$ 2,2	14,3 $\pm$ 0,9	Mann-Whitney-Test, p=0,087; ns

Tab. 11. Vergleich der GABAergen (VGAT+) CIC-Neurone mit perisomatischen VGluT2-positiven Eingängen (VGluT2+) mit den nicht-GABAergen Neuronen (VGAT-) ohne diese Eingänge (VGluT2-) hinsichtlich der Somadurchmesser sowie Eigenschaften der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC), die durch die elektrische Stimulation des LL evoziert wurden.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse des Experiments mit LY-gefüllten Neuronen konsistent mit der immunhistochemischen MAP2/VGluT2-Färbung, denn die Mehrheit der GABAergen Neurone wiesen viele VGluT2-positive somatische Eingänge auf (68%, Seite 76). Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Studien an den Ratten, wo *ca.* 50% bzw. von Autoren berichtet: 73% (Ito et al. 2009, Ito and Oliver 2012)) aller GABAergen Neurone im CIC diese Eingänge zeigen. Resultate der o.g. Experimente und Literaturdaten lassen vermuten, dass viele GABAergen Neurone, die in restlichen Experimenten der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden (Seite 59, 62, 67 und 74), ebenso von den VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen umgeben sind. Die GABAergen Neurone ohne o.g. Synapsen sollten eine in der Stichprobe wenig vertrete Neuronenpopulation sein. Denn wenn die

GABAerge Neurone *ca.* 20-30% aller Neuronen im CIC betragen (Malmierca et al. 2005, Beebe et al. 2016) und nur 32% (Resultate Quantifizierung der MAP2/VGluT2-IR) von diesen Neuronen keine VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen aufweisen, lässt sich berechnen, dass diese Gruppe nur *ca.* 10% (von allen CIC-Neuronen) beträgt.

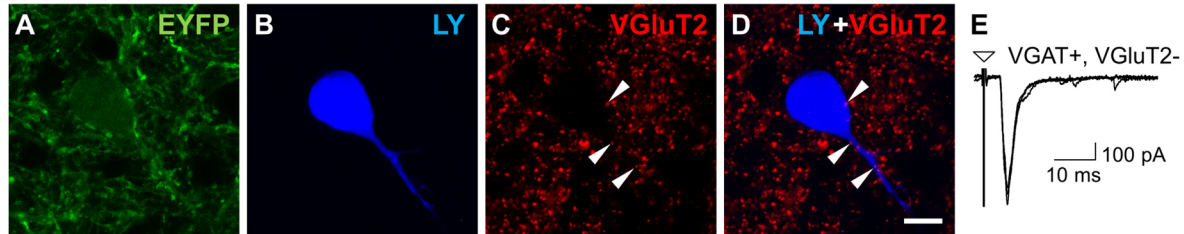


Abb. 24. Einzelnes mit Lucifer Yellow (B, blau) gefülltes GABAerges Neuron (A, grün, EYFP) im CIC der VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Maus, das keine perisomatische vesikulärer Glutamattransporter 2 positiven Eingänge (VGluT2, C, D rot) aufweist (1 von 6). Überlagerung der LY-Färbung und der anti-VGluT2-Immunreaktivität in D zeigt nur einzelne wenige perisomatische VGluT2-positive Eingänge (Pfeilköpfe). Drei exemplarischen Voltage-Clamp Aufzeichnungen der EPSCs, die durch die Stimulation des Lemniscus lateralis in diesem Neuron (A-D) evoziert wurden (E). Die evozierten EPSCs in E weisen eine längere EPSC-Abfallzeitkonstante (1,78 ms), einen kürzeren Median der EPSC-Latenz (6,28 ms), eine niedrigere Standardabweichung der EPSC-Latenz (0,18 ms) und einen niedrigeren Variationskoeffizient der Stromamplitude (0,14) im Vergleich zu den VGAT+/VGluT2+ Neuronen auf (vgl. Tab. 11). Der Somadurchmesser beträgt 18,8  $\mu\text{m}$ . Das Dreieck in E zeigt das Stimulationsartefakt an. Alle KLSM-Aufnahmen stellen eine einzelne und derselbe optische Ebene dar. Messbalkenlänge in A-D beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

Des Weiteren zeigten viele mit LY-gefüllten VGAT+/VGluT2+ Neurone relativ große Somadurchmesser ( $> 17 \mu\text{m}$ ), es lässt sich vermuten, dass diese den bereits beschriebenen großen GABAergen IC-Neuronen (LG-Neuronen), die viele somatische VGluT2-positive Eingänge aufweisen angehören können (Ito et al. 2009, 2015, Ito and Oliver 2014). Wobei auch einige wenige ( $n=2$ ) Neuronen mit Somadurchmesser 13-14  $\mu\text{m}$  – kleiner als bei LG-Neuronen (16,5  $\mu\text{m}$ ) detektiert wurden.

Die relativ lange Latenz der evozierten EPSCs ( $>16 \text{ ms}$ ), die bei den meisten VGAT+/VGluT2+ Neuronen nachgewiesen wurde, deutet auf eine indirekte Verschaltung hin (*feed-forward*) – über lokale IC-Neurone bewerkstelligte Erregung über/aus dem LL. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen über den Ursprung der somatischen VGluT2-positiven Eingänge an den LG-Neuronen: Sie stammen unter anderem von den Interneuronen im IC ab (Ito and Oliver 2014). Ob die schnellen EPSCs mit der langen Latenz durch die Erregung der VGluT2-positiven perisomatischen Präsynapsen an den VGAT+/VGluT2+ Neuronen evoziert wurden, bleibt offen.

Alle mit LY gefüllten glutamatergen Neurone wiesen keine VGluT2-positiven somatischen Eingänge und waren fast alle kleiner als 17  $\mu\text{m}$  im Durchmesser. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur (Ito et al. 2009, Beebe et al. 2016). Messungen der EPSC-Latenz und -Amplitude und -Abfallzeitkonstanten waren konsistent mit den anderen Experimenten dieser Arbeit (Seite 62, 67).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die GABAergen und glutamatergen Neurone im CIC hinsichtlich ihrer Membraneigenschaften – Ih-Ströme und AP-Feuermuster sowie ihren AMPA-Rezeptor-vermittelten glutamatergen Eingänge inklusive Aspekte der Verschaltung und Expression des vesikulären Glutamatransporter 2 (VGluT2) in perisomatischen Synapsen charakterisiert und differenziert. Dies wurde mittels der elektrophysiologischen Messungen an Gehirnschnitten sowie immunhistochemischen Färbungen in jungen adulten Mäusen ( $P \geq 22$ ) erreicht. Die GABAergen und nicht-GABAergen (glutamatergen) Neurone wurden mittels eines optogenetischen Einsatzes in dem transgenen Mausstamm VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 unterschieden. Bei diesem Mausstamm werden unter dem Promotor für vesikulären GABA/Glycin Transporter (VGAT) *enhanced yellow flouere-zent protein* (EYFP) und *channelrhodopsin 2* (ChR2) exprimiert (Zhao et al. 2011, Ono et al. 2016).

Experimente zeigen, dass die HCN-Kanäle 1 und 4 in GABAergen und glutamatergen Neuronen unterschiedlich exprimiert werden, was in unterschiedlicher Ausprägung des physiologischen Korrelates der HCN-Kanäle – des Ih-Stromes – zwischen beiden Neuronengruppen widerspiegelt. Ferner korrelieren diese Membraneigenschaften mit dem AP-Feuermuster. Die GABAergen Neurone waren homogen in ihren langsamen-aktivierenden Ih-Strömen und adaptierenden AP-Feuermuster und ähnelten *ca.* einem Drittel der glutamatergen Neurone. Die restlichen glutamatergen Neurone konnten hinsichtlich ihrer Ih-Ströme und AP-Feuermuster in mindestens drei weitere Populationen, u.a. Onset-Neurone mit schnell-aktivierenden und in seiner Amplitude großen Ih-Strömen, aufgeteilt werden.

Auch in Bezug auf synaptische Übertragung zeigten GABAerge und glutamaterge CIC-Neurone deutliche Unterschiede. Die Kinetik der AMPA-Rezeptor-vermittelten mEPSCs sowie EPSCs, die über elektrische Stimulation der Axonen im LL evoziert wurden, war in der Mehrzahl der GABAergen Neurone deutlich schneller als in den meisten glutamatergen Neuronen. Konsistent dazu wiesen die GABAergen Neurone GluR4-Rezeptor-Expression auf, in nicht-GABAergen Neuronen fehlte diese. Darüber hinaus deutete eine lange Latenz der evozierten EPSCs und APs in GABAergen Neuronen auf die Verschaltung über mehr als eine Synapse bei der Erregungweiterleitung aus dem LL. Die glutamatergen Neurone wurden stattdessen vermutlich direkt aus dem LL angeregt. In den GABAergen Neuronen korrelierten o.g. synaptische und Verschaltungseigenschaften mit der Expression der VGluT2 in den perisomatischen Synapsen. IHC-Färbungen gegen VGluT2 zeigten, dass *ca.* 2/3 aller GABAergen CIC-Neurone solche Synapsen aufweisen.

Ih-Ströme und erregenden Eingänge an den GABAergen und glutamatergen CIC-Neuronen werden zuerst einzeln diskutiert. Im letzten Kapitel wird der mögliche funktionelle Zusammenhang zwischen langsamen Ih-Strömen und schnellen GluR4-vermittelten Eingänge in den GABAergen Neuronen im CIC erläutert.

#### 4.1 Ih-Ströme in inhibitorischen und exzitatorischen CIC-Neuronen

Ih-Ströme in den GABAergen und glutamatergen Neuronen im Colliculus inferior wurden bereits mehrfach nachgewiesen (Sivaramakrishnan and Oliver 2001, Koch and Grothe 2003, Ono et al. 2005, Tan et al. 2007) und auch die Expression der unterschiedlichen Untereinheiten der HCN-Kanäle wurde bereits im IC gezeigt (Koch et al. 2004, Notomi and Shigemoto 2004). Hier wurde untersucht, ob die Eigenschaften der Hyperpolarisation-aktivierenden Ströme, Expression der HCN-Untereinheiten, passive Membraneigenschaften und die Eigenschaften des AP-Feuermusters mit dem Neurotransmitterphänotyp der Neurone in dem zentralen Nukleus des IC korreliert. Dafür wurden die o.g. Parameter zwischen den GABAergen und nicht-GABAergen CIC-Neuronen in jungen adulten VGAT-ChR2-EYFP Mäusen (P22-28) verglichen.

Alle GABAergen Neurone zeigten langsam aktivierende Ih-Ströme und exprimierten überwiegend HCN2- und HCN4-Untereinheiten. Des Weiteren zeigten diese Neurone adaptierende AP-Feuermuster (AP-Feuermuster) bei der Applikation der depolarisierenden Strompulse. Die glutamatergen Neurone hatten im Kontrast dazu Ih-Ströme mit variableren Eigenschaften sowie wiesen ferner mehrere unterschiedliche AP-Feuermuster auf. Das Onset-AP-Feuermuster mit den schnell aktivierenden Ih-Strömen zeigten *ca.* 10% der CIC-Neurone, diese Neurone waren glutamaterg. Die übrigen glutamatergen Neurone zeigten adaptierende AP-Feuermuster und wiesen entweder schnell oder langsam aktivierende Ih-Ströme auf.

Zum Identifizieren der inhibitorischen Neurone im CIC wurde eine transgene Mauslinie eingesetzt, bei der Channelrhodopsin 2 sowie EYFP unter dem Promotor für den vesikulären GABA/Glycin Transporter (VGAT) exprimiert wird. Die Aktivierung von ChR2 mit Blaulicht ermöglichte das eindeutige Differenzieren zwischen VGAT-positiven und VGAT-negativen Neuronen in den Gehirnschnitten der jungen adulten Mäusen (Zhao et al. 2011, Xie and Manis 2014, Caspari et al. 2015, Ono et al. 2016). Dabei wird ChR2 an der ganzen Zellmembran, inklusive präsynaptischen Endigungen, der GABAergen Neurone exprimiert. Deswegen verursachten die Blaulichtpulse, die zur Verifikation inhibitorischen Neurone im IC diente, starke hyperpolarisation sowohl in exzitatorischen als auch inhibitorischen Neuronen. Dieses Phänomen wurde auch von den anderen Autoren bereits beschrieben (Ono et al. 2016). Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die Aktivierung von ChR2 die Antworteigenschaften der GABAergen Neurone grundsätzlich veränderte. Dafür sprechen zuerst die Resultate der Untersuchungen der intrinsischen Eigenschaften der IC-Neurone an einem anderen Mausmodell. Diese waren ähnlich der Eigenschaften des AP-Feuermusters der CIC-Neurone der vorliegenden Arbeit (Ono et al. 2005, Tan et al. 2007). Zweitens zeigte eine Studie mit dem gleichen Mausmodell wie in der vorliegenden Arbeit, dass die Antworten der IC-Neurone auf die akustischen Stimuli sich nicht wesentlich von den Antworten der IC-Neurone in der Wildtyp-Mauslinie unterscheiden (Ono et al. 2017). Und drittens, Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand waren zwischen den GABAergen und nicht-

GABAergen Neuronen vergleichbar in dieser Arbeit. Diese Erkenntnisse sprechen gegen eine Aktivierung der depolarisierenden Ionenkanäle (ChR2) im Ruhezustand.

#### ***4.1.1 Exzitatorische und inhibitorische Neurone im CIC exprimieren unterschiedliche HCN-Untereinheiten und weisen unterschiedliche Eigenschaften der Ih-Ströme auf***

Zu den interessanten Funden zählt die Abwesenheit der HCN1-Immunreaktivität an der Membran der Somata der VGAT-EYFP-positiven, also GABAergen CIC-Neurone. Dies bedeutet, dass die HCN1-UE-beinhaltenden Kanäle ausschließlich für die exzitatorischen Neurone charakteristisch sind und die HCN4-UE überwiegend in den inhibitorischen Neuronen exprimiert wird. Die HCN2-UE wird deutlich sowohl in inhibitorischen als auch in exzitatorischen Neuronen exprimiert. Dies wurde auch anhand der physiologischen Eigenschaften der isolierten Ih-Ströme bestätigt, die zwischen unterschiedlichen Neuronengruppen im CIC variieren. Subpopulationen von IC-Neuronen mit schneller und langsamer Ih-Stromkinetik werden von einigen Studien bestätigt (Koch and Grothe 2003). Die Ih-Stromeigenschaften wurden jedoch bis *dato* nicht in Zusammenhang mit dem Neurotransmittertyp gebracht. Welche funktionelle Rolle die Unterschiede der Ih-Stromeigenschaften zwischen den exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen spielen, bleibt eine interessante Frage. Die Aktivierung der Ih-Ströme übt einen komplexen und manchmal auch gegenläufigen Effekt auf die Integration der exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge sowie auf das Feuern der APs der Neurone aus (Shah 2018). Die Aktivierung des Ih-Stromes depolarisiert das Membranpotential, dies erhöht seinerseits die Wahrscheinlichkeit, dass die eingehenden synaptischen Eingänge den AP-Schwellenwert überwinden. Dennoch hängt dieser depolarisierende Effekt des Ih-Stromes davon ab, ob der AP-Schwellenwert positiver oder negativer als das Umkehrpotential des Ih-Stromes ist, welches zwischen -35 und -40 mV gemessen wurde (Bal and Oertel 2000, Funahashi et al. 2003). Der AP-Schwellenwert der Mehrheit der GABAergen Neurone (*ca.* 90%) ist negativer als -40 mV und ist signifikant negativer als in allen Gruppen der glutamatergen Neurone (Daten nicht gezeigt). Somit könnten die langsamen Ih-Ströme in den GABAergen Neuronen das Membranpotential stabilisieren und somit wiederum die Spontanaktivität verhindern. In den exzitatorischen Neuronen könnte Ih-Strom stattdessen dazu beitragen, den AP-Schwellenwert leichter zu überwinden. Andererseits verringert der Ih-Strom den Eingangswiderstand der Neurone, was seinerseits die synaptischen Eingänge verhindert, den AP-Schwellenwert zu erreichen. Die Ih-Stromaktivierung übt ebenfalls einen depolarisierenden Effekt auf das Ruhemembranpotential aus. Dies erlaubt den Koinzidenzdetektoren der MSO ihren AP-Schwellenwert trotz der vielen inhibitorischen Eingänge, zu erreichen (Baumann et al. 2013).

Ein anderer wichtiger Effekt des Ih-Stromes zusammen mit seinem Gegenspieler – ein bei niedriger Membranspannung aktivierender Kaliumkanal – beruht auf der Verringerung der

zeitlichen Summation der sowohl der exzitatorischen als auch inhibitorischen synaptischen Eingänge (Koch and Grothe 2003, Nagtegaal and Borst 2010, Khurana et al. 2011). Demzufolge zeigen die Neurone mit den großen und schnell-aktivierenden Ih-Strömen eine relativ niedrige zeitliche Integration der synaptischen Eingänge und sind somit besser für die genaue Transmission des zeitlichen Musters der akustischen Signale geeignet (Oertel 1999, Khurana et al. 2012). Im Gegensatz dazu begünstigen Ih-Ströme mit langsamen Kinetik sowie die Abwesenheit der Ih-Ströme die zeitliche Integration der akustischen Eingänge (Nagtegaal and Borst 2010).

Ih-Ströme werden durch Kanäle geleitet, die aus unterschiedlichen Untereinheiten (HCN1-4) bestehen. Diese variieren nicht nur in ihrer Permeabilität und Abhängigkeit von dem Membranpotential, sondern auch in dem Ausmaß wie sie über *second messenger* (engl.) reguliert werden können. Die HCN4-UE beinhaltenden Kanäle werden im Gegensatz zu HCN1-Kanälen stärker von solchen *second messenger* wie cAMP oder anderen Molekülen wie Anionen oder Tyrosinkinasen moduliert (DiFrancesco and Tortora 1991, Ludwig et al. 1999, Seifert et al. 1999, Viscomi et al. 2001, Wahl-Schott and Biel 2009). Die Beschleunigung der Aktivierungszeitkonstante des Ih-Stromes sowie die Depolarisierung der halbmaximalen Aktivierung, die während der postnatalen Entwicklung stattfindet, kann nicht nur durch die Veränderung der Zusammensetzung der HCN-Untereinheiten stattfinden. Dies kann allein mittels der Konzentration des *second messenger* beeinflusst werden. Auf diese Weise werden die integrativen Eigenschaften der MSO-Neurone verändert (Khurana et al. 2012). Da die HCN4-UE überwiegend in den GABAergen CIC-Neuronen exprimiert wird, könnten neuromodulatorische Eingänge (z.B. die serotoninerge, die intrazelluläre Konzentration an *second messenger* erhöhen) die integrativen Eigenschaften vor allem dieser Neuronengruppe modulieren (Hurley et al. 2008, Ko et al. 2016).

#### ***4.1.2 GABAerge Neurone waren homogen in ihren Ih-Strom Eigenschaften und AP-Feuermuster***

Alle GABAergen Neurone in der vorliegenden Arbeit zeigten langsame Ih-Ströme, exprimierten HCN4-UE-beinhaltende Kanäle und hatten adaptierende AP-Feuermuster mit dem unterschiedlichen Ausmaß an Adaptation. Anhand dieser Parameter kann die Population der GABAergen Neurone nicht weiter aufgetrennt werden. Dennoch es ist nicht ausgeschlossen, dass weitere physiologische Subklassen der GABAergen Neurone existieren. Denn die Methodik der Gehirnschnittanfertigung sowie die Konfiguration der elektrophysiologischen Aufnahmen könnte die Erfassung der Neurone in Richtung einer bestimmten Neuronenpopulation verzerren. Darüber hinaus, wurden andere GABAerge Neurone mit einer Prävalenz, die weniger als 10% betrug, in der relativ niedrigen Stichprobengröße (16 Neurone im Experiment mit pharmakologisch isolierten Ih-Strömen und 27 Neurone im Experiment mit de- und hyperpolarisierenden Strompulsen) möglicherweise nicht erfasst.

Ebenfalls ist es auch möglich, dass die Erfassung weiterer physiologischer Parameter, eine erweiterte molekulare Charakterisierung in Kombination mit der Analyse der Eingänge und Projektionen zusätzliche Populationen der GABAergen Neurone im IC aufdecken würde, so wie das der Fall im Neocortex ist (Tremblay et al. 2016). Einige Studien identifizierten anhand der molekularen Markern, der ein- und ausgehenden Verbindungen zu IC oder des AP-Feuermusters unterschiedliche Populationen von GABAergen IC-Neuronen (Ono et al. 2005, Ito et al. 2009, Schofield and Beebe 2019). Eine kleine Population der glutamatergen IC-Neurone, die über die Expression des vasoaktiven Intestinalpeptides (VIP) charakterisiert ist, zeigen eine kleine Ih-sag-Amplitude bei den hyperpolarisierenden Strompulsen und eine niedrige AP-Adaptationsrate (Goyer et al. 2019). Diese Neuronenpopulation überschneidet sich in Ihren Ih-sag- und AP-Adaptationseigenschaften mit der ebenso kleinen Population der glutamatergen Neurone ohne Ih-sag, die hier beschrieben wurden. Eine weitere Population GABAerger IC-Neurone (ein Drittel aller GABAergen IC-Neurone) wurde anhand der Expression von Neuropeptid Y (NPY) charakterisiert (Silveira et al. 2020). Diese Neurone zeigen einen mäßigen Ih-sag, ein durchgehendes AP-Feuermuster und zeichnen sich über spontane APs aus. Der Letzte Merkmal wurde in der vorliegenden Arbeit bei den GABAergen CIC-Neuronen nicht detektiert. Es lässt sich somit vermuten, dass die NPY-Neurone in der Stichprobe nicht enthalten sind.

Eine andere Studie, bei der die GABAergen IC-Neurone anhand der GAD67-GFP-Markierung visuell identifiziert wurden, zeigte eine große Population an GABAergen CIC-Neuronen, die ein reguläres AP-Feuermuster mit gewissem Ausmaß an Adaption aufwiesen (Ono et al. 2005). Die gleiche Studie identifizierte die Population der GABAergen Neurone mit s.g. *pause* oder *buildup* (engl.) AP-Feuermuster (das erste inter-AP-Intervall deutlich länger als die restlichen Intervalle sind). In dieser Arbeit wurden solche CIC-Neurone nicht detektiert. Ein denkbarer Grund dafür wäre, dass die Anzahl der *pause*- oder *buildup*-Neurone während der Maturation des Gehirns kleiner wird. In der Tat waren nur wenige Neurone in der Studie von Ono et.al (2005) von den Tieren älter als P13. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass die adulten Tiere eine niedrige Expressionsrate der spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen Kv 4.2 und Kv 4.3 zeigen. Diese Kanäle stellen das molekulare Substrat des A-Typ-Stroms dar und verantworten die Ausprägung des *pause* oder *buildup* AP-Feuermusters (Peruzzi et al. 2000, Sivaramakrishnan and Oliver 2001, Jung et al. 2005). Auch die in der Arbeit gezeigten Eingangswiderstände und die Membranzeitkonstanten der GABAergen Neurone waren bemerkenswert kleiner im Vergleich zu der vorherigen Studie (Ono et al. 2005). Dies deutet ebenso darauf, dass die Membraneigenschaften auch im postnatalen Alter über 18 Tagen sich weiter verändern.

Andere Studien trennten die GABAergen Neurone anhand der anatomischen Kriterien in unterschiedliche Populationen auf. So erhalten ca. 60% der GABAergen Neurone, die auch über einen großen Somadurchmesser ausgezeichnet sind, zahlreiche somatischen Eingänge,

welche für die Expression des vesikulären Glutamat Transporters-2 positiv (VGluT2) sind. Die Population der GABAergen Neurone, welche einen kleineren Somadurchmesser aufweisen, erhalten solche somatischen Eingänge nicht (Ito et al. 2009, 2016, Beebe et al. 2016). Der Ursprung dieser VGluT2-positiven Eingänge liegt vermutlich im DCN, in der MSO, in der LSO, im INLL sowie in den IC-Neuronen selbst (Ito and Oliver 2010). Diese großen GABAergen Neurone mit VGluT2-positiven somatischen Eingängen geben den schnellen inhibitorischen Eingänge in den medialen Kniehöcker (Ito et al. 2009, Geis and Borst 2013). Obwohl die Verteilung der VGluT2-positiven somatischen Eingänge unter den kleineren und größeren GABAergen Neuronen in der vorliegenden Arbeit ähnlich wie in den anderen Studien war (Ito et al. 2009, Ito and Oliver 2012), konnten die GABAergen Neurone nicht in unterschiedliche Population anhand der Ih-Stromeigenschaften unterteilt werden. Darüber hinaus zeigten zwei Studien *in vivo*, dass die GABAergen und glutamatergen IC-Neurone im IC anhand deren Antworten auf die akustische Stimulation (Ono et al. 2017) oder mittels Unterschieden in ihrer Plastizität (andauerndes Neuronenfeuern nach dem Ende der akustischen Stimulation) (Ono et al. 2016) nicht unterschieden werden können. Dies steht im Gegensatz zu den Erfolgen im Cortex und Hippocampus, wo zahlreiche GABAerge Interneurone von den exzitatorischen Neuronen anhand ihrer aktiven und passiven Membraneigenschaften sowie AP-Feuermuster unterschieden werden konnten (Budinger and Kanold 2018).

#### ***4.1.3 Eine kleine Population der exzitatorischen CIC-Neurone ähneln den Neuronen der medialen und lateralen oberen Olive***

Alle Neurone, welche ein oder nur einige Aktionspotentiale am Anfang der depolarisierenden Strompulse feuerten (Onset-Neurone) waren nicht-GABAerg und somit exzitatorisch. Diese Neurone hatten einen niedrigen Eingangswiderstand und wurden über die schnell-aktivierenden Ih-Ströme mit den großen Amplituden gekennzeichnet. Die Ih-Ströme in diesen Neuronen wurden höchstwahrscheinlich über die HCN1-UE-beinhaltenen Kanäle hervorgerufen. Membraneigenschaften dieser Neurone sind sehr ähnlich zu den Membraneigenschaften der Hauptneurone (engl. *principal neuron*) der medialen und lateralen oberen Olive, die eine starke Expression der HCN1-Kanäle und der bei den niedrigen Spannung-aktivierenden Kaliumkanälen ( $K_v 1.x$ ) aufweisen (Barnes-Davies et al. 2004, Leao et al. 2006, Hassfurth et al. 2009, Khurana et al. 2011, 2012). Die Eigenschaften der HCN1-, sowie der bei niedrigen Spannung-aktivierenden Kaliumkanälen ( $K_{LT}$ ) verschafften diesen Neuronen sowohl einen niedrigen Eingangswiderstand beim Ruhemembranpotential als auch beschleunigten sie die Membranzeitkonstante. Diese Effekte ermöglichten diesen Neuronen die exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge auf einer schnellen und präzisen Zeitskala zu integrieren (Magnusson et al. 2005, Scott et al. 2005, Walcher et al. 2011).



Der tonotop Gradient der Kv.1.1-Expression wurde in der Population der IC-Neurone bereits nachgewiesen (Grigg et al. 2000, Rosenberger et al. 2003). Dieser Gradient korrelierte mit der HCN1-Immunreaktivität im IC der Ratten (Koch et al. 2004). Deswegen ist es wahrscheinlich, dass die exzitatorischen IC-Neurone, die diese zwei Ionenkanäle exprimieren, den Neuronen der oberen Olive in ihren Eigenschaften ähnlich sind und mit einer hohen zeitlichen Auflösung auf die amplitudenmodulierten akustischen Signale reagieren (Ashida et al. 2016). Diese exzitatorischen CIC-Onset-Neurone stellen möglicherweise die kleine Population der IC-Neurone dar, die bei der Verarbeitung der sinusförmig amplitudenmodulierten akustischen Signale Hochpassfilterung aufweisen (eng. *high-pass modulation transfer function*) (Ono et al. 2017) und eine erhöhte Sensitivität für die interauralen Laufzeitunterschiede (ITD) zeigten (Ono et al. 2020). Die Untersuchungen der anatomischen Eigenschaften der Eingänge sowie Projektionen dieser exzitatorischen IC-Neurone in Kombination mit den Aufnahmen ihrer neuronalen Antwort auf die akustische Stimulation werden ihre Rolle bei der auditorischen Verarbeitung aufklären.

#### **4.2 Unterschiedliche AMPA-Rezeptor vermittelte synaptische Eingänge an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen im CIC**

Die AMPA-Rezeptoren vermittelte Erregung wurde zwischen den GABAergen und nicht-GABAergen Neuronen im zentralen Nucleus des Colliculus inferior in den jungen adulten Mäusen im postnatalen Alter von 22-28 Tagen verglichen. Um den Neurotransmitterphänotyp der CIC-Neurone zu identifizieren, wurde wie in vorherigen Experimenten der transgene VGAT-ChR2-EYFP Linie 8 Mausstamm eingesetzt. Die meisten inhibitorischen Neurone wiesen dabei schnelle Abfallzeitkonstanten der sowohl miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme (mEPSC) als auch der EPSCs auf, die über die elektrische Stimulation des Lemniscus lateralis evoziert wurden. Dieser Fund korrelierte mit der positiven Immunreaktivität für den Glutamatrezeptor 4 (GluR4) (somatisch) sowie für den vesikulären Glutamattransporter 2 (VGluT2) in den perisomatischen Synapsen. Die glutamatergen Neurone zeigten im Gegensatz dazu die mEPSCs und EPSCs mit deutlich langsameren Abfallzeitkonstanten. Sie waren größtenteils GluR4-negativ und wiesen keine VGluT2-positiven perisomatischen Eingänge auf. Ferner zeigten die meisten exzitatorischen Neurone eine kurze Latenz der über die Stimulation des LL evozierten APs und EPSCs. Dies deutet auf eine direkte Erregung aus/über den LL hin. Bei der Mehrheit der inhibitorischen Neurone (auch die, die VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen aufwiesen) traten die APs und EPSCs stattdessen mit fast doppelt so langer Latenz auf. Dies deutet auf eine mögliche *feed-forward* Verschaltung der Erregung aus/über den LL hin.

#### 4.2.1 *Schnelle Glutamatrezeptor 4 (GluR4) vermittelte Eingänge an den GABAergen Neuronen vs. langsamere, nicht-GluR4-Eingänge an den glutamatergen Neuronen*

Zu den interessanten Funden zählt die Immunreaktivität für die GluR4-Untereinheit in den Somata vieler GABAerger CIC-Neurone, sowie die Abwesenheit der GluR4-IR bei den meisten glutamatergen Neuronen. Dies bedeutet, dass in den jungen adulten Tieren AMPA-Rezeptor vermittelte Erregung bei den exzitatorischen und inhibitorischen CIC-Neuronen über unterschiedlich zusammengesetzte AMPA-Rezeptoren hervorgerufen wird. Resultate der elektrophysiologischen Experimente bestätigten diese Annahme. Die AMPA-Rezeptor-vermittelten miniatur postsynaptischen Ströme sowie postsynaptische Ströme, die über die Stimulation des LL evoziert wurden, zeigten beide bei den meisten GABAergen Neuronen eine schnelle Kinetik. Bei den meisten exzitatorischen Neuronen hingegen war der zeitliche Verlauf dieser Ströme wesentlich langsamer.

AMPA-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion im IC wurde durch die elektrophysiologischen Studien belegt (Wagner 1996, Ma et al. 2002, Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Auch die IR für die unterschiedlichen AMPA-Rezeptor-Untereinheiten (GluR1-4) wurde im IC gezeigt (Gaza and Ribak 1997, Caicedo et al. 1998, Caicedo and Eybalin 1999). Wobei die Vielfalt der AMPA-Rezeptor Isoformen mittels IHC-Färbungen aus der Perspektive der postnatalen Entwicklung charakterisiert wurde. Versuche unterschiedliche AMPA-Rezeptor-Isoformen den Neuronengruppen (u.a. den GABAergen und glutamatergen Neuronen) im IC zuzuordnen, wurden in den jungen adulten Tieren bis *dato* nicht unternommen.

Eine IHC-Studie zeigte, dass die GluR1-IR im IC erst ab P12 erscheint, und mit fortschreitendem Alter der Tiere allerdings niedrig bis moderat wird. Eine moderate GluR2- und GluR2/3-IR zeigte sich im IC schon bei P4; sie unterlag keinen wesentlichen Veränderungen während der postnatalen Entwicklung. Die GluR4-Immunreaktivität wurde bereits im IC der juvenilen (P4) Tieren gezeigt, eine moderate Ausprägung erreichte sie jedoch erst in den jungen (P12) und adulten Tieren. In anderen auditorischen Nuklei (LSO, VCN, VNLL) war die GluR4-IR ebenso erst in adulten Gehirnen deutlich (Caicedo and Eybalin 1999). Resultate der vorliegenden Arbeit sind konsistent mit der o.g. Studie, denn hier wurde eine deutliche GluR4-Immunreaktivität im CIC in relativ adulten Tieren (P22-P28) gezeigt. Caicedo und Eybalin zeigten außerdem, dass vor allem die großen CIC-Neurone – GluR4-positiv, während die kleineren Neurone – GluR4-negativ, dafür aber GluR2- oder GluR2/3-positiv waren (Caicedo and Eybalin 1999). In Anbetracht der Tatsache, dass die Somata der GABAergen Neurone im IC tendenziell größer im Vergleich zu den exzitatorischen Neuronen sind (eigene Messungen, (Oliver et al. 1994, Beebe et al. 2016)) stimmt der Fund der positiven GluR4-Immunreaktivität bei den größeren Neuronen (vermutlich inhibitorische Neurone) sowie GluR4-Abwesenheit bei vielen kleineren Neuronen (vermutlich exzitatorische Neurone) in der Studie von Caicedo and Eybalin (1999) überein.

Die elektrophysiologischen Messungen der Kinetik der pharmakologisch isolierten miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme (mEPSC) bestätigten die Unterschiede zwischen den GABAergen und exzitatorischen CIC-Neuronen bezüglich der GluR4-Immunreaktivität. Die Kinetik der über die AMPA-Rezeptoren vermittelten Ströme hängt unter anderem stark von der Kombination der Rezeptor-Untereinheiten (tetra- und penta- Homo- und Heteromere sind möglich) sowie von ihrer Untereinheit-Isoform (*flip*- oder *flop* Isoform, dank dem alternativen Splicing möglich) ab (Sommer et al. 1990, Mosbacher et al. 1994, Quirk et al. 2004, Traynelis et al. 2010). Mittels der rekombinanten AMPA-Rezeptoren wurde die entscheidende Rolle der GluR4-UE in ihrer *flop*-Isoform für die schnelle Kinetik der AMPA-Rezeptoren gezeigt. Die Abfallzeitkonstanten der evozierten Ströme waren mit *ca.* 1 ms sowohl bei den GluR4<sub>*flop*</sub>-Homomeren als auch bei den GluR4<sub>*flop*</sub>/GluR2<sub>*flop*</sub> oder GluR4<sub>*flop*</sub>/GluR2<sub>*flip*</sub>-Heteromeren deutlich schneller als die übrigen Rezeptorformen (GluR1/2/3/*flip*/*flop*). Nur der Homomer-GluR3<sub>*flop*</sub> sowie der Heteromer-GluR2<sub>*flop*</sub> /3<sub>*flop*</sub> zeigten eine vergleichbar schnelle Kinetik (Mosbacher et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit zeigten die GABAergen Neurone sowohl die positive GluR4-Immunreaktivität als auch eine schnelle mittlere Abfallzeitkonstante (<1 ms) und Anstiegszeit der mEPSC. Überdies waren diese Abfallzeitkonstanten vergleichbar mit den schnellen GluR4-vermittelten mEPSC-Abfallzeitkonstanten der *calyx of Held* Synapse-bildenden MNTB-Neurone (Yang et al. 2011). Somit können die GluR4-Rezeptoren (womöglich in ihrer *flop*-Isoform) für GABAergen CIC-Neuronen charakteristisch sein.

*Es bleibt offen welche weiteren GluR-Untereinheiten, neben GluR4, in den GABAergen CIC-Neuronen während der Maturaton der Gehirne exprimiert werden.* Da (a) die Heteromere GluR4<sub>*flop*</sub>/GluR2<sub>*flop*</sub> oder *flip* eine vergleichbar schnelle mit Homomeren GluR4<sub>*flop*</sub> -Rezeptoren Kinetik zeigen (Mosbacher et al. 1994) und (b) eine moderate GluR2-IR, im IC der adulten Tiere bereits gezeigt wurde (Caicedo and Eybalin 1999) könnte die Koexpression der GluR2- und GluR4-UE in GABAergen CIC-Neuronen nicht ausgeschlossen werden. Während die GluR4-UE zusammengesetzte Rezeptoren (wie auch GluR1 und -3) neben Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> auch für Ca<sup>2+</sup> Ionen durchlässig sind, ist die GluR2-UE fast ausschließlich nur für Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> Ionen durchlässig (Hollmann et al. 1991, Burnashev 1996). In der *calyx of Held* Synapse der inhibitorischen Hauptzellen des MNTB wurde die Reduktion der GluR2-UE zusammengesetzten Rezeptoren als auch Zunahme der Ca<sup>2+</sup>-durchlässigen Rezeptoren bei adulten Tieren gezeigt (Yang et al. 2011, Lujan et al. 2019). Auch in den Koinzidenzdetektorneuronen der MSO wird die Signalübertragung mit der fortschreitenden postnatalen Entwicklung der Tiere immer weniger über die Ca<sup>2+</sup>-undurchlässigen Rezeptoren (vermutlich GluR2) und immer mehr von den Ca<sup>2+</sup>-durchlässigen Rezeptoren (vermutlich GluR4) vermittelt (Franzen et al. 2020). Analog zu MNTB und MSO oder Interneuronen des Hippocampus (Geiger et al. 1995) könnte auch in inhibitorischen CIC-Neuronen die Reduktion der GluR2-Expression und Prävalenz der Ca<sup>2+</sup>-durchlässigen GluR4-Rezeptoren bei adulten Tieren vermutet werden. Anhand der elektrophysiologischen Messungen des Umkehrpotentials für Ca<sup>2+</sup> ließe

sich der Anteil von  $\text{Ca}^{2+}$ -undurchlässigen Rezeptoren (GluR2) in GABAergen (und glutamatergen) CIC-Neuronen bei der Maturation abschätzen.

*Die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren in glutamatergen CIC-Neuronen, bleibt weitgehend ungeklärt.* Die im Vergleich zu GABAergen Neuronen fast doppelt so langsame mittleren mEPSC-Abfallzeitkonstante ( $>1$  ms) und -Anstiegszeit der mEPSC in glutamatergen Neuronen sowie Abwesenheit der GluR4-Immunreaktivität in diesen Neuronen zeigt lediglich die abwesende GluR4-UE-Expression in dieser Neuronengruppe. Schmidt und Kollegen zeigten, dass die GluR2<sub>flip</sub> mRNA in sehr vielen Zellen im CIC vertreten ist (Schmid et al. 2001). Eine deutliche GluR2/3-Immunreaktivität wurde ebenso im gesamten IC gezeigt (Petralia and Wenthold 1992, Caicedo and Eybalin 1999). Da die glutamatergen Neurone *ca.* 75% aller Neurone im IC ausmachen (Oliver et al. 1994, Malmierca et al. 2005, Ito and Oliver 2012, Mellott et al. 2014), erscheinen vor allem sie als Kandidaten für den GluR2 und 3-Phänotyp. Diese Vermutung wird außerdem indirekt dadurch unterstützt, dass (a) die GluR2- und GluR2/3-Immunreaktivität besonders bei den kleineren IC Neuronen (Caicedo and Eybalin 1999) detektiert wurde und (b) glutamaterge IC-Neurone im Vergleich zu GABAergen Neuronen kleinere Somadurchmesser aufweisen (Oliver et al. 1994, Beebe et al. 2016). Der GluR1-Rezeptor wird im IC der adulten Tieren relativ wenig exprimiert (Caicedo and Eybalin 1999, Schmid et al. 2001). Die glutamatergen IC-Neurone sind nicht nur in ihren Membraneigenschaften eine sehr heterogene Gruppe (Ono et al. 2005, Naumov et al. 2019), sondern sie erhalten exzitatorische Eingänge von unterschiedlichen Kombinationen der auditorischen Nuklei (INLL, DCN, LSO, VCN (AVCN und PVCN) (Ito and Oliver 2010, Chen et al. 2018) und sind in unterschiedliche funktionale Felder im IC organisiert (Loftus et al. 2010). Es wäre somit denkbar, dass innerhalb dieser heterogenen Neuronengruppe Subpopulationen mit unterschiedlich zusammengesetzten AMPA-Rezeptoren existieren könnten. Die mittleren Häufigkeitsdiagramme für die mEPSC-Abfallzeitkonstanten zeigen jedoch nur eine Verteilung dieses Parameters. Auch der Variationskoeffizient dieses Parameters ist gering ( $< 0,5$ ). Diese Indizien könnten auf jeweils eine Neuronenpopulation mit jeweils einer Konfiguration der GluR-Untereinheit/Isoform hindeuten. Andererseits, da (a) kleine Neuronenpopulationen dem Suchraster in der vorliegenden Arbeit entweichen könnten: Die Gesamtzahl der IC-Neurone bei Ratten wird auf 373 Tausend geschätzt (Kulesza et al. 2002) und (b) AMPA-Rezeptorformen mit langsameren als die GluR4<sub>flop</sub>-Isoform Kinetik unterschiedlich zusammengesetzt sein könnten (Mosbacher et al. 1994), erscheinen Versuche, glutamaterge Neurone mittels der AMPA-Rezeptorexpression in weitere Subpopulationen aufzutrennen, für sinnvoll.

*Ob die GABAergen Neurone anhand der Expression der AMPA-Rezeptoren in Subpopulationen unterteilt werden könnten, braucht es zusätzliche Nachweise.* Bei einer Population der GABAergen CIC-Neurone konvergieren erregende Eingänge von lokalen Neuronen, sowie erregende kommissurale, DCN-, INLL- und LSO-Projektionen *via* einer Großzahl VGluT2-

positiver somatischer Synapsen. Dies sind die sogenannten LG-Neurone (Ito et al. 2009, 2015, Ito and Oliver 2014). Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass GABAerge CIC-Neurone, die perisomatische VGluT2-positive Synapsen aufweisen, ebenfalls evozierte EPSCs mit einer schnellen Kinetik aufweisen. Somit könnte vermutet werden, dass LG-Neurone schnelle GluR4-Rezeptoren exprimieren (Abb. 25, A). Die Abfallzeitkonstanten der mEPSCs der GABAergen Neurone liegen trotz der sehr variablen Stromamplituden in einem engen Zeitintervall von 0,5-1 ms (Abb. 14, E<sub>1</sub>). Somit könnten zwar die unterschiedlichen Stromamplituden auf die Variabilität der Synapsen hindeuten (wäre für LG-Neurone zutreffend), die mEPSC-Kinetik deutet jedoch auf die Expression jeweils einer Konstellation der Untereinheit/Isoform bei den meisten GABAergen Neuronen. Ob eine weitere Population der GABAergen IC-Neurone – Neurone ohne die somatischen VGluT2-Synapsen (Ito et al. 2009, 2015, Ito and Oliver 2014) auch GluR4-UE exprimiert, lässt sich nicht eindeutig bestätigen. Diese Neurone betragen lediglich *ca.* 10% aller CIC-Neurone (siehe Berechnung auf Seite 82) und waren in der Stichprobe kaum vertreten. Dennoch zeigten sich bei einzelnen wenigen GABAergen Neuronen „Populationen“ der evozierten EPSCs mit unterschiedlicher Kinetik (Abb. 16), was auf Expression unterschiedlichen AMPA-Rezeptoren bei den jeweiligen Neuronen hindeuten könnte. Darüber hinaus zeigten einzelne wenige Neurone deutlich langsame Abfallzeitkonstanten der mEPSC bzw. evozierten EPSC als Durchschnitt ( $> 1$  ms, 2 von 15 Neuronen, 13%). Ferner konnte ein Neuron, der langsame EPSC-Abfallzeitkonstanten aufwies, mit der Population der GABAergen-Neurone ohne somatische VGluT2-positive Synapsen assoziiert werden (Abb. 24.). Diese Indizien könnten darauf deuten, dass (a) ein kleiner Anteil der GABAergen Neurone nicht-GluR4-Rezeptoren, mit langsamer Kinetik exprimiert, (b) diese Neurone keine VGluT2-positive somatische Synapsen aufweisen, (c) die Expression unterschiedlicher AMPA-Rezeptoren in GABAergen Neuronen denkbar ist. Anhand einer GluR4 / VGluT2 IHC-Färbung in dem Mausmodell der vorliegenden Arbeit und der Quantifizierung der STED-Mikroskopaufnahmen (engl. *stimulated emission depletion*) konnte untersucht werden, ob GluR4-Expression für GABAerge Neurone ohne die somatischen VGluT2-Synapsen spezifisch ist und ob GluR4 und VGluT2 Bestandteil der gleichen axo-somatischen Synapsen sind.

*Welche funktionelle Rolle spielt die schnelle Signalübertragung an inhibitorischen CIC-Neuronen, bleibt eine interessante Frage.* Die Expression der schnellen AMPA-Rezeptoren (GluR4) zeichnet im auditorischen System diejenigen Neurone aus, die in die Kodierung der zeitlichen Information während der Schalllokalisation involviert sind (Trussell 1999). Im ILD-Netzwerk verantworten überwiegend die GluR4-Rezeptoren eine schnelle und genaue Signalweiterleitung von den globularen Bushy-Neuronen des AVCN zu den primären Neuronen der MNTB über die *calyx of Held* Synapsen. Eine Abwesenheit der GluR4-Expression führt zur Störung der ABR-Antworten (engl. *auditory brainstem responses*) auf ein zeitlich schnell veränderndes Stimulus und zur Beeinträchtigung der Kurzzeit-Depression und der

Neurotransmission bei den hohen Feuerraten (Yang et al. 2011). Es wäre denkbar, dass einige der genannten GluR4-vermittelten synaptischen Effekte auch für die GABAerge IC-Neurone zutreffen und dass diese Neurone für die zeitlich präzise Verarbeitung akustischer Signale zuständig sein könnten. Andererseits sind die GABAergen IC-Neurone weniger sensitiv im Bezug auf amplituden-modulierte Töne im Vergleich zu glutamatergen Neuronen (Ono et al. 2017), sie zeigen eher eine Sensitivität für die frequenz-modulierten akustischen Stimuli (Ito 2020).

*Die  $Ca^{2+}$ -durchlässigen Rezeptoren – GluR4 (Hollmann et al. 1991) könnten in den Zusammenhang mit den  $Ca^{2+}$ -bindenden Proteinen bei GABAergen CIC-Neuronen gebracht werden.* Diese Proteine (Calretinin und Parvalbumin) wurden bereits bei den primären Neuronen der MNTB, die auch GluR4-UE exprimieren (Felmy and Schneggenburger 2004) oder in MSO-Neuronen, welche vermutlich auch GluR4 exprimieren, gezeigt (Franzen et al. 2020). Im IC weisen die GABAergen Neurone die  $Ca^{2+}$ -bindenden Proteine Parvalbumin und Calretinin auf. Wobei die Parvalbumin-Expression auch in den glutamatergen IC-Neuronen gezeigt wurde (Tamamaki et al. 2003, Fujimoto et al. 2017).

Die glutamaterge Signalweiterleitung im IC wird neben den AMPA- auch über die NMDA-Rezeptoren vermittelt (Wagner 1996, Moore et al. 1998, Zhang and Kelly 2001, Kelly and Zhang 2002, Ma et al. 2002, Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Bei Messungen der evozierten EPSC wurden keine Blocker der NMDA-Rezeptoren in die ACSF-Lösung hinzugegeben. Dafür, dass die gemessenen EPSC überwiegend über die AMPA-Rezeptoren vermittelt wurden, sprechen folgenden Indizien: Im Vergleich zu AMPA-Rezeptoren benötigen die NMDA-Rezeptoren neben dem Neurotransmitter Glutamat auch das Entfernen des spannungsabhängigen  $Mg^{+}$ -Blocks mittels der Membrandepolarisation (Monyer et al. 1992). Es ist unwahrscheinlich, dass die Membran ableitende CIC-Neurone während der kurzen (0,2 s) elektrischen Stimulation des LL, koinzident über die spontanen APs im IC depolarisiert war. Dafür spricht, dass spontane APs weder bei den GABAergen noch bei den glutamatergen IC-Neuronen in den Current-Clamp Experimenten detektiert wurden. Des Weiteren gibt es zwar Indizien, dass explizit im IC die NMDA-Rezeptoren in der Nähe des Ruhemembranpotentials und auch bei pharmakologisch blockierten AMPA-Rezeptoren aktivierbar sind (Kelly and Zhang 2002, Ma et al. 2002, Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Dennoch hätte die Aktivierung der NMDA-vermittelten Ströme die EPSC mit deutlich langsameren Abfallzeitkonstanten ( $> 10$  ms) als hier gemessen ( $< 5$  ms), hervorgebracht (Monyer et al. 1992, Ma et al. 2002, Wu et al. 2004). Und zuletzt, da eine Reduktion der synaptischen Übertragung *via* NMDA-Rezeptoren im IC während der postnatalen Entwicklung gezeigt wurde (Wenzel et al. 1996, Ma et al. 2002), könnte der Anteil der NMDAR-vermittelten Ströme in den hier verwendeten jungen adulten Tieren (P22-28) relativ gering gewesen sein.

#### 4.2.2 *Mögliche feed-forward Erregung der GABAergen und direkte Erregung der glutamatergen CIC-Neurone über Lemniscus lateralis*

Stimulation der Axonen im Lemniscus lateralis (im DNLL-Bereich) evozierte in den meisten glutamatergen CIC-Neuronen, unabhängig von der Stimulationsstärke, EPSCs und APs mit einem relativ kurzen Median der Latenz ( $< 5$  ms), was auf die direkten glutamatergen Eingänge aus dem LL hindeutet (Abb. 25, B). In GABAergen CIC-Neuronen traten interessanterweise die evozierten EPSCs mit einem deutlich längeren Median der Latenz sowie höherem Variationskoeffizient der Latenz auf. Auch der Median der AP-Latenz war bei den meisten GABAergen Neuronen fast doppelt so lang im Vergleich zu den glutamatergen Neuronen. Dies könnte darauf deuten, dass die aufsteigende über LL Erregung über mehr als eine Synapse (engl. *feed-forward* Verschaltung), also über die IC-Interneurone, an die GABAergen CIC-Neurone weitergeleitet wird (Abb. 25, A). Einzelne wenige GABAerge Neurone erhalten womöglich nur direkte oder beides: direkte und *feed-forward* Eingänge aus dem LL, denn sie weisen einen mit glutamatergen Neuronen vergleichsweise kurzen Median der EPSC- oder AP-Latenz auf. So könnte es auch *vice versa* für einige glutamaterge Neurone *feed-forward* Verschaltung gelten.

Viele Studien *in vitro* zeigen, dass eine Stimulation der Fasern des LL sowohl exzitatorische (über AMPA- und NMDA-Rezeptoren) als auch inhibitorische (über GABA<sub>A</sub>- oder Glycine-Rezeptor) postsynaptische Ströme in den CIC-Neuronen hervorruft (Wagner 1996, Moore et al. 1998, Reetz and Ehret 1999, Ma et al. 2002, Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Dabei wurde gezeigt, dass die IPSC den EPSC folgen (A), dass die Eliminierung der GABA<sub>A</sub> und Glycine-Rezeptor vermittelten Inhibition die Latenz der EPSC in CIC-Neuronen verlängert (B) und dass eine Blockade der AMPA-Rezeptoren die späten IPSC eliminiert (D) (Wagner 1996, Moore et al. 1998, Ma et al. 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stimulation des LL eine *feed-forward* Inhibition im IC aktiviert. Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit pharmakologischer Blockierung der Inhibition durchgeführt und zeigten, konsistent mit den o.g. Studien, dass AMPA-Rezeptor-EPSCs eine lange Latenz bei einem Teil der CIC-Neurone (GABAerge Neurone) aufweisen (vgl. 5-10 ms, (Moore et al. 1998)). Wagner zeigte bei 5 von 10 CIC-Neuronen, dass das Blockieren der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine deutliche Verlängerung der EPSC-Latenz zu Folge hat (Wagner 1996). Es ist somit möglich, dass die CIC-Neurone mit der Langen EPSC-Latenz aus der Studie von Wagner die GABAergen Neurone der vorliegenden Arbeit repräsentieren und dass die Neurone mit EPSC-Latenz kleiner als 5 ms den glutamatergen Neuronen entsprechen. Ferner könnte der Fund der o.g. Studien, dass die IPSC den EPSC folgen (A) als eine über mehrere Synapsen verzögerte Signalweiterleitung zu den GABAergen Neuronen interpretiert werden und somit für die *feed-forward* Erregung der GABAergen Neurone plädieren. Ferner könnte das gezeigte Phänomen in o.g. Studien: Die Verlängerung der EPSC-Latenz nach der Blockade der Inhibition (D), als indirekter Hinweis auf die mögliche *feed-forward* Erregung aus

dem LL gelten. Denn in einem IC-Netzwerk, in welchem die glutamatergen Interneurone den GABAergen Neuronen vorgeschaltet sind (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015) und ihrerseits auch eine lokale Inhibition erhalten, wäre die Verlängerung der EPSC-Latenz in GABAergen Neuronen zu erwarten, sobald die Inhibition am Gehirnschnitt blockiert ist. In der Tat wurde die *feed-forward* Inhibition aus dem DCN für bestimmte glutamaterge IC-Neurone (VIP-Neurone) bereits gezeigt (Goyer et al. 2019). Außerdem sprechen für die Plausibilität solcher Verschaltungen Ergebnisse von Sturm und Kollegen, die zeigten, dass die Balance zwischen Inhibition und Exzitation an glutamatergen Neuronen im CIC stark in Richtung von der Inhibition verschoben ist (Sturm et al. 2017).

*Der Ursprung der erregenden Eingänge an den inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen ist unterschiedlich.* Elektrophysiologische Experimente in der hier vorliegenden Arbeit geben Indizien dafür, dass erregende Eingänge an GABAergen Neuronen einen polysynaptischen Ursprung haben könnten. Die Eingänge an den exzitatorischen Neuronen sind stattdessen vermutlich eher von monosynaptischer Natur. Dafür sprechen folgende Funde: Der Variationskoeffizient der Stromamplitude der evozierten EPSCs und mEPSCs in den inhibitorischen Neuronen war deutlich höher ( $> 0,5$ ) als in den exzitatorischen Neuronen. Die mEPSCs traten bei den inhibitorischen Neuronen öfter als bei den exzitatorischen Neuronen auf. Die Standardabweichung der Latenz der evozierten EPSCs war bei den inhibitorischen Neuronen deutlich höher als bei exzitatorischen. Ferner korrelierten in GABAergen Neuronen o.g. EPSC-Parameter mit der Expression des VGluT2 in den vielen perisomatischen Synapsen. Die VGluT2-Expression gibt den Anlass die hier gezeigten GABAergen Neurone mit den gut charakterisierten LG-Neuronen im IC (engl. *large GABAergic neuron*, (Ito et al. 2009, 2015, Ito and Oliver 2014)) zu assoziieren, denn Letztere zeigen auch viele VGluT2-positive Eingänge um ihre Somata. Erkenntnisse über LG-Neurone stehen im Einklang mit der Hypothese der polysynaptischen Eingänge an GABAergen Neurone. Denn zum einen weisen LG-Neurone insgesamt deutlich mehr axo-somatische und axo-dendritische erregende Eingänge als glutamaterge oder GABAerge Neurone ohne VGluT2-positiven Synapsen auf (Ito et al. 2009, Ito 2020). Zum anderen stammen die somatischen erregenden Eingänge an LG-Neuronen sowohl von den lokalen und kontralateralen IC-Neuronen als auch von den auditorischen Nuklei, die dem IC vorgeschaltet sind (CN – überwiegend DCN; LL – überwiegend INLL; sowie SOC). Alle diese Eingänge können an einem LG-Neuron konvergieren (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Diese Indizien unterstützen auch die Annahme, dass die GABAergen CIC-Neurone *feed-forward* Erregung *via* lokaler glutamaterger Neurone aus dem LL erhalten, wobei auch eine direkte Erregung aus dem LL die CIC-Neurone erreichen kann (Abb. 25, A). Warum mögliche direkte Eingänge an diesen Neuronen kaum in Experimenten aktiviert werden konnten, wird in auf Seite 100 behandelt.



*Die glutamatergen Eingänge an den exzitatorischen IC-Neuronen sind im Vergleich zu GABAergen Neuronen viel weniger untersucht.* Der Fund der vermutlich überwiegend monosynaptischen Erregung aus dem LL an glutamatergen CIC Neuronen wird indirekt über die Studie von Sturm und Kollegen unterstützt. Sie zeigen, dass die Balance zwischen lokaler Inhibition und Exzitation bei glutamatergen CIC-Neuronen deutlich auf der Seite der Inhibition liegt (Sturm et al. 2017). Dies könnte im Umkehrschluss darauf deuten, dass die glutamatergen Neurone nicht über *feed-forward* Verschaltung (über die lokalen glutamatergen IC-Neurone), sondern direkt von den IC vorgeschalteten Kerngebieten, erregt werden. Auch die Studie von Chen und Kollegen zeigt, dass glutamaterege CIC-Neurone weniger intrinsischer Konnektivität als GABAerge Neurone aufweisen (Chen et al. 2018). Eine weitere Studie zeigt, dass Stimulation vom Brachium des IC AMPA-Rezeptor vermittelten APs im MGB mit relativ kurzer Latenz hervorruft (Hu et al. 1994). Dies könnte auf eine monosynaptische Verschaltung zwischen IC und MGB hindeuten. Der Ursprung der direkten Eingänge an glutamatergen Neuronen kann in vielen dem IC-vorgeschalteten bilateralen Kerngebieten liegen. Dies können INLL, DCN, LSO und VCN (AVCN und PVCN) sein (Ito and Oliver 2010, Chen et al. 2018). Dabei erhalten die exzitatorische CIC-Neurone (IC-core Neurone, engl.) Eingänge von unterschiedlichen Kombinationen der Nuklei, während inhibitorische CIC-Neurone die gleiche Kombination der Eingänge erhalten (Chen et al. 2018). Des Weiteren ist es nicht ausgeschlossen, dass die erregenden Eingänge an den glutamatergen Neurone einen polysynaptischen Ursprung haben könnten. Denn sollten viele Eingänge synchron aktiviert werden, würde die Standardabweichung der EPSC-Latenz gering ausfallen. Dennoch erhalten die glutamaterge Neurone deutlich weniger axo-somatische und axodendritische erregende Eingänge als GABAerge Neurone im CIC (Ito 2020). Ferner, da einige wenige glutamatergen Neurone EPSCs und APs mit langer Latenz erhalten (ähnlich zu der Mehrheit der GABAergen Neurone) könnte vermutet werden, dass eine kleine Population der glutamatergen Neurone eine *feed-forward* Erregung erhält. Aufgrund einer zu kleinen Stichprobe ist es jedoch nicht möglich diese Neurone als eine separate Gruppe zu benennen.

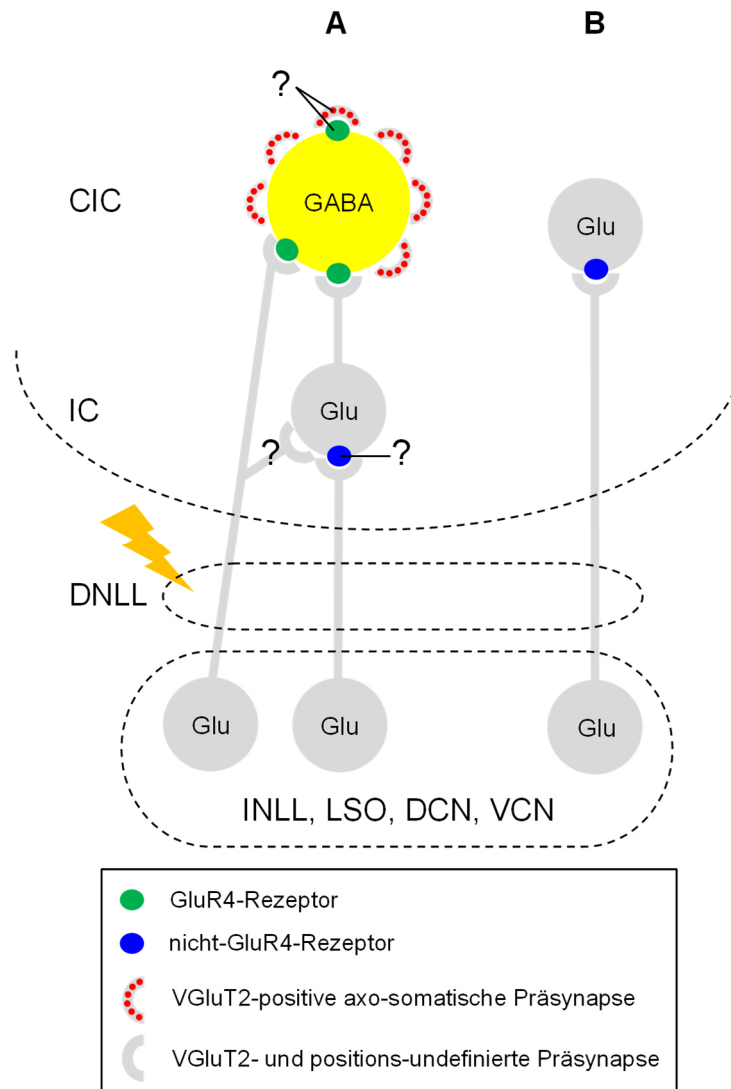


Abb. 25. Schematische Darstellung der *Literaturdaten* (*kursiv*) und Gesamtergebnisse: Expression der AMPA-Rezeptoren mit der Glutamaterezeptor 4 Untereinheit (GluR4, grün) und des vesikulären Glutamatransporters 2 (VGLuT2, rot) in GABAergen (GABA, gelb) und glutamatergen (Glu, grau) Neuronen im zentralen Nucleus des Colliculus inferior (CIC), sowie die mögliche Verschaltung der aufsteigenden glutamatergen Projektionen (grau) im IC-Netzwerk. *Direkte glutamaterge Projektionen zum IC stammen von intermediären Nuclei des Lemniscus lateralis (INLL), der lateralen superiores Olive (LSO) sowie ventralen und dorsalen cochleären Nuclei (VCN und DCN) ab. Projektionen, der lokalen Neurone, DCN, INLL, LSO konvergieren an den GABAergen Neuronen via somatischen VGLuT2-positiven Synapsen (zur Übersichtlichkeit sind nur Präsynapsen abgebildet) (Ito and Oliver 2010, 2014, Ito et al. 2015).* (A) GABAerge CIC-Neurone mit somatischen VGLuT2-positiven Synapsen (rot) exprimieren GluR4-Rezeptoren (grün). Sie werden von den aufsteigenden Projektionen sowohl über die lokalen IC-Neurone (*feed-forward* Erregung) als auch direkt erregt. Expression von GluR4-Rezeptoren in den somatischen VGLuT2-positiven Synapsen sowie ob direkte bzw. *feed-forward* Erregung aus LL über diese Synapsen erfolgt und ob gleichzeitige direkte und *feed-forward* Erregung stattfindet ist unbekannt jedoch plausibel (A, Fragezeichen). (B) Glutamaterge CIC-Neurone erhalten direkte erregende Eingänge aus dem LL, sie exprimieren AMPA-Rezeptoren ohne GluR4-Untereinheit. Die elektrische Stimulation der Fasern des LL erfolgte im Bereich des dorsalen Nucleus des Lemniscus lateralis (*DNLL ist inhibitorisch (Adams and Mugnaini 1984)*). Die „VGLuT2- und positions-undefinierten Präsynapsen“ sind nur übersichtlichshalber überall axo-somatisch dargestellt, genaue Position ist unbekannt. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

*Die Lokalisation der Neurone im CIC hat einen Einfluss auf die Latenz der EPSP bei der Stimulation des LL* (Reetz and Ehret 1999, Chandrasekaran et al. 2013, Yassin et al. 2016). Der dorso-ventrale Latenzgradient im CIC der Maus kann bis zu 4 ms betragen: ventral lokalisierten Neurone verfügen über eine kürzere Latenz als die dorsal liegenden Neurone (Reetz and Ehret 1999). Da in den o.g. Studien die Neurone unabhängig von ihrem Neurotransmitterphänotyp ausgewählt sind, könnte vermutet werden, dass die Mehrheit dieser Neurone glutamaterge Neurone waren (nur *ca.* 25% aller IC-Neurone sind GABAerg (Malmierca et al. 2005)). Somit wurden die Latenzgradienten in den o.g. Studien vermutlich überwiegend für die glutamaterge Neurone gezeigt. Dafür spricht auch, dass der Median der EPSC- und AP-Latenz der meisten GABAergen Neurone aus der hier vorliegender Arbeit in einem Bereich liegt, der über 4 ms hinausgeht. Ein dorso-ventraler Latenzgradient bei den Antworten der IC-Neurone auf die akustischen Stimuli (charakteristische Frequenz) wurde ebenfalls bereits gezeigt (Ono et al. 2017). Die Ausprägung von diesem Latenzgradienten (von 14 bis 34 ms) war zwischen den GABAergen und glutamatergen IC-Neuronen jedoch nicht unterschiedlich. Die o.g. Studie wurde ohne pharmakologische Blockade der Inhibition in einem intakten Gehirn durchgeführt. Dies könnte den Unterschied zu der vorliegenden Studie erklären, denn hier waren nur erregenden Eingänge von dem LL zum IC aktivierbar. Zumal übt Inhibition einen deutlichen Einfluss auf die Latenz der Antworten in IC-Neuronen *in vivo* aus (Park and Pollak 1993).

#### **4.2.3 GABAerge CIC-Neurone mit VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen als mögliches Ziel der feed-forward Erregung aus dem LL**

Ein weiterer interessanter Fund besteht darin, dass die GABAergen CIC-Neurone, die Expression des vesikulären Glutamatttransporters 2 (VGluT2) in perisomatischen Synapsen aufweisen, die EPSCs mit einer schnellen Stromkinetik und langer variabler Latenz zeigen, wenn der Lemniscus lateralis stimuliert wird. Dies deutet darauf hin, dass eine relativ gut charakterisierte Population der GABAergen CIC-Neurone – LG-Neurone (engl. *large GABAergic neuron*, (Ito et al. 2009, 2015, Ito and Oliver 2014) die Erregung aus dem LL (a) über mehr als eine Synapse (über *feed-forward* Verschaltung) und (b) über die schnellen GluR4-UE-beinhaltenen AMPA-Rezeptoren erhalten (Abb. 25, A).

Anhand der Expression von VGluT2 in den perisomatischen Synapsen konnten die GABAergen Neurone im CIC in Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen sind es die große GABAergen Neurone, die VGluT2-positive perisomatische Synapsen (LG-Neurone, Somadurchmesser > 16,5 µm) aufweisen, zum anderen sind es kleinere GABAerge Neurone (engl. *small GABAergic neurons*, SG-Neurone, Somadurchmesser < 10,7 µm) ohne diese Synapsen. Die GABAergen Neurone mit intermediärem Somadurchmesser haben gemischte Eigenschaften in Bezug auf die Präsenz der perisomatischen VGluT2-positiven Synapsen (Ito et al. 2009). Die LG-Neurone machen *ca.* 50% (berichtigt 73%) aller GABAergen Neurone im CIC der

Ratte aus (Ito et al. 2009, Ito and Oliver 2012), in Meeresschweinchen sind es dennoch nur 39% (Beebe et al. 2016). Eine Quantifizierung der VGluT2-Immunreaktivität im Mausstamm der vorliegenden Arbeit zeigt konsistent mit den Arbeiten von Ito und Kollegen (Ito et al. 2009, Ito and Oliver 2012), dass *ca.* 2/3 der GABAergen CIC-Neurone (unabhängig vom Somadurchmesser) perisomatische VGluT2-positive Synapsen aufweisen. Außerdem sind große Neurone (Somadurchmesser >17  $\mu\text{m}$ ) fast immer von VGluT2-positiven Synapsen umgeben. Darüber hinaus zeigten die meisten GABAergen Neurone, welche während der Ableitung mit Lucifer Yellow markiert wurden, viele somatische VGluT2-positive Eingänge. Alle diese Indizien sprechen dafür, dass die GABAergen CIC-Neurone, die in Experimenten in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, größtenteils den GABAergen Neuronen mit somatischen VGluT2-positiven Synapsen angehören.

Bei der Annahme, dass die hier gezeigten GABAerge Neurone Eigenschaften der LG-Neurone teilen könnten, erscheint die *feed-forward* Erregung an diesen Neuronen aus dem LL insofern plausibel, da die LG-Neurone Eingänge von den lokalen glutamatergen Neuronen erhalten (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Andererseits erhalten die LG-Neurone auch direkte bilaterale glutamaterge Eingänge von den IC-vorgeschalteten auditorischen Kerngebieten (DCN: überwiegend kontralateral, INLL: ipsilateral, SOC: bilateral) Dabei können diese Eingänge zusammen mit Eingängen von lokalen Neuronen an den gleichen Neuronen konvergieren (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015). Somit stellt sich folgende Frage: *Warum aktivierte die Stimulation vom LL in Experimenten kaum direkte Eingänge an den GABAergen Neuronen mit VGluT2-positiven somatischen Synapsen?* Resultate der Experimente schließen die Möglichkeit der direkten oder auch dualen: direkten und *feed-forward* Signalübertragung zwischen LL und IC-Neuronen nicht aus (Abb. 25, A). So zeigt das gewichtete PSTH für EPSC-Zeitpunkte zwei EPSC-Häufigkeitsmaxima bei den GABAergen Neuronen: im Latenzfenster von 2-4 ms und 4-8 ms (Abb. 20, C). Das erste Maximum bildet vermutlich die Aktivierung der direkten Eingänge (von DCN, INLL, SOC) ab. Warum jedoch könnte nur bei wenigen GABAergen Neuronen (1 von 11) APs mit kurzer Latenz (< 4 ms), was auf die direkten Eingänge hindeutet, hervorgerufen werden? Ein denkbarer Grund dafür könnte die unterschiedliche Stärke der direkten und indirekten Eingänge an GABAergen Neuronen sein. In der Tat variierte die Amplitude der evozierten EPSCs bei den meisten GABAergen Neuronen sehr stark (Variationskoeffizient > 0,5). So war die EPSC-Amplitude im Latenzfenster von 2-4 ms (EPSC von vermutlich direkten Eingängen) tendenziell niedriger als bei 4-8 ms (EPSC von vermutlich indirekten Eingängen). Andererseits sind die VGluT2-positiven synaptischen Endigungen von DCN, INLL, SOC an LG-Neuronen größer im Vergleich zu den lokalen IC-Endigungen (Ito et al. 2015). Demzufolge könnten überwiegend diese direkten Eingänge zum Hervorrufen eines AP beitragen. Ein anderer Faktor: Experimentelle Bedingungen, die eventuell Koinzidenz und/oder Konvergenz der erregenden Eingänge beeinträchtigen und dadurch lange und variable AP-Latenz hervorrufen. Die DCN, INLL, SOC und lokalen IC-Neurone bilden jeweils eine ungefähr gleiche und relativ kleine

Anzahl der axo-somatischen Endigungen (1-7 pro Quelle) an den Soma der LG-Neurone (Ito et al. 2015). Somit braucht es vermutlich einer starken Koinzidenz oder Aktivierung einer bestimmten Anzahl der Eingänge von unterschiedlichen Kerngebieten, um einen AP zu hervorrufen. Es lässt sich vermuten, dass an einem koronalen Schnitt, wobei einige aufsteigende Projektionen zum IC abgetrennt sind, eine solche Koinzidenz oder Konvergenz zumindest beeinträchtigt ist. Eine weitere experimentelle Bedingung ist die pharmakologisch unterbundene inhibitorische Signaltransduktion. So wurde gezeigt, dass die Latenz der Antworten der IC-Neurone auf akustische Reize durch die lokale Zugabe der Antagonisten der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bei der Hälfte der Neurone verkürzt wird (Park and Pollak 1993). Die Latenz der Antworten der GABAergen (LG und SG-Neurone) und glutamatergen Neurone auf akustische Stimuli, die ohne Einsatz der Inhibitionsblocker gemessen wurde, ist zwar sehr variabel (5-20 ms) jedoch nicht unterschiedlich zwischen beiden Neuronengruppen (Ito 2020). Diese Indizien könnten auf den maßgeblichen Einfluss der Inhibition auf den zeitlichen Verlauf der Erregungseiterleitung in einem intakten Gehirn hindeuten. Des Weiteren gibt es Indizien, dass auch der Schnittwinkel der Gehirnschnitte einen Einfluss darauf haben kann, ob direkte oder indirekte Eingänge bei der Stimulation vom LL im IC aktiviert werden. In der vorliegenden Studie repräsentieren die koronale Gehirnschnitte (116° zur Längsachse, siehe Methodik) die fibro-dendritischen Laminae über ihren Querschnitt. Sivaramakrishnan und Oliver setzen einen Schnitt in transversaler Ebene, sodass ganze fibro-dendritische (isofrequente) Lamina und viele Eingänge aus dem LL intakt im Gehirnschnitt liegen bleiben (Sivaramakrishnan and Oliver 2006). Diese Experimente zeigen, dass die Stimulation des LL in den IC-Neuronen postsynaptische Potentiale mit einer kurzen Latenz (*ca.* 5 ms) auftreten lässt, wenn die Inhibition pharmakologisch blockiert ist. Dies deutet auf die Aktivierung der direkten Eingänge im IC. Eine Wiederholung der EPSC- und AP-Latenzmessungen vorliegenden Arbeit in transversalen Schnitten würde eventuell das Verhältnis zwischen den direkten und *feed-forward* Erregung an den LG-Neuronen aufklären. Darüber hinaus wäre ein solches Experiment von Interesse, denn fibro-dendritischen Lamina stellt ein eigenes funktionelles Netzwerk innerhalb des IC dar. So zeigen Ito und Oliver, dass viele LG-Neurone (9-30), die innerhalb einer fibro-dendritischen (isofrequenten) Lamina liegen, Eingänge von einem lokalen exzitatorischen Neuron erhalten können (Ito and Oliver 2014). Überdies werden CIC-Neurone überwiegend von den lokalen inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen kontaktiert, die in der gleichen fibro-dendritischen Lamina liegen (Sturm et al. 2014).

*Die Verknüpfungen der LG-Neurone im dorsalen IC (DIC) und CIC scheinen unterschiedlich zu sein.* Im DIC konnten keine monosynaptischen Verschaltungen zwischen den benachbarten DIC-Neuronen (ohne Bestimmung des Neurotransmitterphänotyps) anhand der doppelten Ableitungen der benachbarten Neurone und akustischen Stimulation nachgewiesen werden (Geis et al. 2011). Eine weitere *in vivo* Studie zeigt, dass akustische Stimulation EPSCs und APs mit einer kurzen Latenz in LG-Neuronen im DIC hervorruft (Geis and Borst 2013). Ferner konnten IPSCs mit einer kurzen Latenz an den MGB Neuronen während der

Stimulation vom Brachium des IC registriert werden, sowie gezeigt werden, dass die EPSCs den IPSCs folgen (Peruzzi et al. 1997). Ergebnisse dieser Studien erlauben LG-Neurone im DIC als Quelle der schnellen direkten Inhibition zu MNTB zu diskutieren. Injektionen eines retrograden Tracers in den MGB zeigen, dass *ca.* 82% der markierten im CIC GABAergen Neurone VGluT2-positive perisomatische Synapsen aufweisen (Ito et al. 2009). Somit postulieren Ito und Kollegen, dass die Mehrheit der GABAergen CIC-Neurone mit VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen, ähnlich wie die DIC-Neurone direkt zu MGB projizieren und somit die Quelle der schnellen Inhibition in MGB darstellen (Ito et al. 2016). Dennoch ist es zu betonen, dass in o.g. Studie die mit dem Tracer markierten Neurone nicht in Relation zu der Gesamtpopulation der GABAergen Neurone, die VGluT2-positive perisomatischen Synapsen aufweisen gesetzt wurde. Außerdem wurden die GABAergen Neurone mit dem mittlerem Somadurchmesser (10,5-16,5  $\mu\text{M}$ ) kaum charakterisiert. Ferner wurde im Kontrast zu Arbeiten von Ito und Kollegen im IC gezeigt, dass die Mehrheit der zu MGB projizierenden GABAergen IC-Neurone keine VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen aufweisen (Beebe et al. 2018). Einige elektrophysiologische Studien zeigen, dass die Inhibition aus dem IC nicht immer vor der Exzitation in MGB eintrifft (Bartlett and Smith 1999). Diese Indizien deuten auf eine unterschiedliche Verschaltung der GABAergen Neurone im CIC und DIC hin. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Mehrheit der GABAergen CIC-Neurone mit VGluT2-positiven perisomatischen Synapsen (a) lange EPSC-Latenz und (b) mittlere bis große Somadurchmesser (13-21  $\mu\text{m}$ ) gezeigt. Dies lässt vermuten, dass erregende *feed-forward* Verschaltung dieser CIC-Neurone eine besondere Eigenschaft der CIC-Region sein könnte. Eine der letzten Studien unterstützen indirekt diese Annahme, denn CIC und DIC unterscheiden sich wesentlich in ihrem anatomischen Aufbau und der Kombination der auf- und absteigenden Projektionen: Während der Cortex vom IC (CIC) überwiegend Eingänge aus dem LL erhält, werden im IC-Shell (inklusive DIC) überwiegend die nicht-LL-Projektionen eingespeist (Chen et al. 2018).

*Verknüpfungen und Rezeptoren der GABAergen CIC-Neurone ohne VGluT2-positive Synapsen (ähnlich den SG-Neuronen (Ito et al. 2009)) sind noch unerforscht.* Wie bereits erwähnt sind diese Neurone voraussichtlich mit nur *ca.* 10% in der Stichprobe enthalten. Nur ein solcher Neuron konnte abgeleitet werden. Auf Grund auffallender Ähnlichkeit dieses einzelnen Neurons zu den glutamatergen Neuronen: langsame EPSC-Abfallzeitkonstanten und kurze und wenig variable EPSC-Latenz (Abb. 24.), lässt sich nur eine Hypothese aufstellen. Ob diese CIC-Neurone eine andere Verschaltung der erregenden Eingänge aus dem LL (direkt und monosynaptisch?) sowie anders zusammengesetzte AMPA-Rezeptoren (nicht-GluR4?) als die GABAergen Neurone mit VGluT2-positiven Synapsen aufweisen könnten? Die Unterschiede zwischen beiden Neuronengruppen könnten erwartet werden. Denn SG-Neuronen zeigen teilweise Gemeinsamkeiten mit den glutamatergen Neuronen bezüglich ihrer Antworten auf frequenz-modulierte akustische Stimuli, die Bandbreite der Tuningkurven und die Anzahl der axo-dendritischen und axo-somatischen Eingänge (Ito 2020).

### 4.3 Schnelle AMPA-Rezeptoren und langsame Ih-Ströme in inhibitorischen CIC-Neuronen mit somatischen VGluT2-positiven Eingängen

Die vorliegende Arbeit charakterisiert GABAerge CIC-Neurone über die physiologischen Merkmale, die etwas gegensätzlich erscheinen. Einerseits erhalten diese Neurone vermutlich polysynaptische Eingänge aus dem LL über schnelle AMPA-Rezeptoren (GluR4), andererseits zeichnet sie die Abwesenheit der schnellen HCN1-Kanäle und eine Präsenz der langsamen HCN4-Kanäle in ihren Membranen aus. Die GABAergen Neurone mit den VGluT2-positiven perisomatischen Eingängen stellen, wie bereits erläutert, vermutlich einen Großteil der Stichprobe der vorliegenden Arbeit dar und können die Eigenschaften der LG-Neurone (Ito et al. 2009, Ito and Oliver 2012) teilen. Deswegen lassen sich die langsame Ih-Ströme und schnelle AMPA-Rezeptoren in Zusammenhang mit dem Konvergieren erregender Eingänge von unterschiedlichen Quellen an den Somata der LG-Neurone (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015) diskutieren. An dieser Stelle ist zu betonen, dass Kopräsenz von GluR4 und VGluT2 in den perisomatischen Synapsen an den GABAergen-Neuronen (LG-Neuronen) noch nicht belegt ist (Abb. 25, A, Fragezeichen).

Da die Somata der LG-Neurone von zahlreichen VGluT2-positiven Synapsen umgeben ist (bis zu 30), wobei davon nur jeweils eine geringe Anzahl der erregenden Eingänge von einem auditorischen Krengebiet abstammen (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015) sowie insgesamt deutlich mehr axo-dendritische und axo-somatische erregende Eingänge als die glutamatergen und SG-Neurone aufweisen (Ito 2020), könnten diese Neurone vor zwei gegensätzlichen Herausforderungen stehen. Einerseits könnte es die Übererregung wegen vielen erregenden Eingängen sein und andererseits – die Integration eben dieser Eingänge. Für eine mögliche Übererregung spricht, dass GABAerge Neurone *in vivo* eine höhere Rate der spontanen APs als glutamaterge Neurone aufweisen (Ono et al. 2017). Da der AP-Schwellenwert bei den meisten GABAergen Neuronen negativer als  $-40$  mV liegt (Daten nicht gezeigt) und das Umkehrpotential des Ih-Stromes zwischen  $-35$  und  $-40$  mV liegt (Bal and Oertel 2000, Funahashi et al. 2003), wäre anzunehmen, dass großer langsamer Ih-Strom stabilisierend auf das Membranpotential der LG-Neurone wirkt.

Eine hohe Standardabweichung der EPSC-Latenz und AP-Zeitpunkte bei Wiederholung der LL-Stimulation in Experimenten der vorliegenden Arbeit spricht für die Komplexität der zeitlichen Integration der erregenden Eingänge bei LG-Neuronen. Es stellt sich die Frage, ob die Ih-Ströme in LG-Neuronen Koinzidenzdetektion der schnellen (GluR4-vermittelten) postsynaptische Ströme, die mit unterschiedlicher Latenz eintreffen, begünstigen. Die Beteiligung der Ih-Ströme wäre bei dieser Aufgabe denkbar, denn sie die zeitliche Summation der exzitatorischen (und inhibitorischen) synaptischen Eingänge herabsetzen (Koch and Grothe 2003, Nagtegaal and Borst 2010, Khurana et al. 2011). Dabei führen die großen und

schnell-aktivierenden Ih-Ströme zu einer relativ niedrigen zeitlichen Integration der synaptischen Eingänge, was eine genauere Transmission des zeitlichen Musters der akustischen Signale zu Folge hat und Koinzidenzdetektion begünstigt (Khurana et al. 2012; Oertel 1999). Ono und Kollegen konnten bei der Hälfte der GABAergen CIC-Neurone eine Sensitivität zu den interauralen Laufzeitunterschieden (ITD) zeigen (Ono et al. 2020). Deswegen und auf Grund der Konvergenz vieler axo-somatischer und axo-dendritischer Eingänge, sowie GluR4-Expression, könnten die LG-Neurone im CIC mit den Octopus-Neuronen im PVCN verglichen werden. Die Letzteren integrieren zahlreiche axo-somatische Eingänge vom auditorischen Nerv (Golding et al. 1995) und exprimieren schnelle GluR4-Rezeptoren (und kaum langsame GluR2) (Schwartz et al. 2000). Dabei tragen die schnellen HCN1-Kanäle und die bei niedrigen depolarisierenden Spannungen aktivierenden  $K^+$ -Kanäle (engl., *low voltage activated potassium channels*,  $K_v1$ ) (Bal and Oertel 2000) dazu bei, diese Eingänge auf einer feinen Zeitskala zu integrieren. Denn beide Kanäle senken den Membraneingangswiderstand, was seinerseits die Membranzeitkonstanten beschleunigt (*ca.* 200  $\mu$ s) und folglich zu einer kurzen Integrationszeit (*ca.* 1 ms) führt (Golding et al. 1995, 1999). Dennoch exprimieren die GABAergen CIC-Neurone im Gegensatz zu den Oktopus-Neuronen keine schnellen HCN1- sondern langsamere HCN4-Kanäle und zeigen folglich langsame Ih-Ströme. Ferner zeigen sie auch weder die schnellen Membranzeitkonstanten noch die niedrigen Eingangswiderstände im Vergleich zu den glutamatergen Onset-Neuronen im CIC, was auch von anderen Autoren bestätigt wird (Ono et al. 2005). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass glutamaterge Neurone im IC besser auf die mit einer hohen Frequenz amplitudenmodulierten Töne als die GABAergen Neurone folgen können (Ono et al. 2017). Deswegen scheinen die LG-Neurone, nicht die besten Kandidaten für einen möglichen Koinzidenzdetektor im IC zu sein und somit womöglich nicht den ITD-sensitiven GABAergen CIC-Neuronen aus der Studie von Ono und Kollegen anzugehören (Ono et al. 2020). Eine weitere Studie im IC unterstützt diese Schlussfolgerung. Demnach verringert Ih die zeitliche Summation der evozierten EPSP vor allem in den Neuronen mit Onset und adaptierendem Feuermuster, die den niedrigen Eingangswiderstand, das depolarisierende Ruhemembranpotential sowie die schnelle Ih-Kinetik aufweisen (Koch and Grothe 2003). GABAerge Neurone in der vorliegenden Arbeit teilen größtenteils nicht die Eigenschaften dieser Neurone. In dieser Hinsicht passen viel mehr die glutamatergen Onset-Neurone mit schnellen Ih-Strömen auf diese Rolle, zumal die glutamatergen IC-Neurone *ca.* zur Hälfte sensitiv zu den ITDs sind (Ono et al. 2020). Auch im Vergleich zu den Koinzidenzdetektoren – den primären Neuronen von MSO (Grothe et al. 2010) zeigen LG-Neurone nicht viele Ähnlichkeiten, denn die letzteren exprimieren keine HCN1-Kanäle, während die zuerst genannten HCN1 und HCN4-Kanäle bei jungen adulten Tieren ( $>P18$ ) aufweisen (Khurana et al. 2012). Dennoch könnte bei LG-Neuronen ähnlich zu den primären Neuronen der MSO Kinetik ihrer HCN4-vermittelten Ih-Ströme *via* den *second messenger* beschleunigt werden (Khurana et al. 2012) und eventuell auf solche Art und Weise die Koinzidenzdetektion begünstigen.



Andererseits ist denkbar, dass trotz des Konvergierens vieler erregender Eingänge von lokalen Neuronen und vorgeschalteten auditorischen Nuklei an den Somata der LG-Neurone (Ito and Oliver 2014, Ito et al. 2015), das Erreichen des AP-Schwellenwertes aus folgenden Gründen erschwert ist. Zum einen bilden die DCN, INLL, SOC und lokale IC-Neurone jeweils ungefähr eine gleiche und relativ kleine Anzahl an axo-somatischen Endigungen (1-7 pro Quelle) am Soma eines LG-Neurons (Ito et al. 2015). Zum anderen treten die evozierte über LL-Stimulation EPSCs mit einer sehr variablen Latenz und Amplitude ein (Experimente der vorliegenden Arbeit). Und zuletzt sind die Somata der LG-Neurone deutlich größer als die der GABAergen Neurone ohne VGLuT2-positive Synapsen und als die der glutamatergen Neurone (Ito et al. 2009, Beebe et al. 2016, Ito 2020), was zu Folge eine höhere Zellmembrankapazität im Vergleich zu glutamatergen Neuronen hat (Daten sind nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass erst bei Aktivierung eines bestimmten Kontingentes (Anzahl) der Eingänge bzw. Summation dieser zeitversetzten Eingänge die hohe Zellmembrankapazität überwunden werden kann. Im weiteren Sinne heißt es, dass nicht koinzidente, sondern eine konvergente Aktivierung mehrerer Eingänge zu einem AP-Führt. Da die langsamen Ih-Ströme zeitliche Integration (Summation) der Antworten auf sinusförmig amplitudenmodulierte Stimuli mehr als die schnellen Ih-Strömen begünstigen (Nagtegaal and Borst 2010), wäre denkbar, dass die langsame HCN4-vermittelten Ih-Ströme die Amplitude der kumulativen EPSP in LG-Neuronen erhöhen und somit die Wahrscheinlichkeit der AP-Entstehung steigern. Wobei die Genauigkeit der Transmission des zeitlichen Signalverlaufs darunter leiden würde. In der Tat sind GABAerge Neurone weniger sensitiv zu den amplitudenmodulierten Tönen als die glutamatergen Neurone (Ono et al. 2017). Dafür sind sie aber mehr sensitiv zu den frequenz-modulierten akustischen Stimuli als die glutamatergen und die SG-Neurone (Ito 2020). Somit könnte vermutet werden, dass ein langsamer Ih-Strom in LG-Neuronen umso weniger die zeitliche Koinzidenz der schnellen GluR4-vermittelten Eingänge, desto mehr die Summation dieser zeitlich versetzten Eingänge begünstigt und der Art zur Integration der akustischen Informationen beiträgt.

#### 4.4 Ausblick

Hier ist es gelungen, anhand eines optogenetischen Einsatzes in einem transgenen Mausmodell unterschiedliche physiologische und molekulare Merkmale mit dem Neurotransmitterphänotypen der IC-Neurone zu korrelieren. Dies zeigt ein großes Potential eines solchen methodischen Vorgehens. Bei der weiteren Erforschung der Verschaltungen, Synapsen und Funktionalität des IC-Netzwerks könnte die gezielte Aktivierung einzelner inhibitorischer (in VGAT-ChR2-EYFP Mausmodell (Zhao et al. 2011)) oder exzitatorischer Neurone oder Synapsen (in VGLuT2-ChR2-EYFP Mausmodell (Hägglund et al. 2010)) *via* ChR2 erwogen werden. Die vorliegende Arbeit und letzte Studien (Beebe et al. 2016, 2018, Goyer et al.

2019, Ito 2020) zeigen, dass eine Auftrennung der IC-Neurone in Gruppen anhand der molekularen Marker ein großes Potential hat. Ferner, auf der Basis solcher Marker, die eine spezifische Neuronengruppe charakterisieren, könnten Marker-spezifische transgene Mausmodelle entwickelt und eingesetzt werden (Silveira et al. 2020). Solche „Tiermodelle für spezifische Neuronenpopulationen“ könnten mittels optogenetischen Einsatzes erlauben die spezifischen Neurone hinsichtlich ihrer Funktion *in vivo* zu charakterisieren. Es wäre auch denkbar die Zellsortierungsmethoden wie FACS (engl. *fluorescence-activated cell sorter* (Guez-Barber et al. 2012) in Kombination mit solchen transgenen Tiermodellen anzuwenden. Anhand solchen Instrumentariums und Auswertung der Korrelation mehrere Merkmale (Molekularer Marker, Neurotransmitterphänotyp, Zellmorphologie (Ito 2020)) sollte angestrebt werden, den Colliculus inferior auf dem Niveau von Hippocampus oder Neocortex (Lawrence 2008, Tremblay et al. 2016) zu erschließen.

## Abkürzungsverzeichnis

Die Entschlüsselungen der aus dem Englischen stammenden Abkürzungen sind kursiv.

AC	auditorischer Cortex
ACSF	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit / <i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (Glutamatrezeptoragonist)
AP	Aktionspotential
AVCN	<i>anteroventral cochlear nucleus</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ChR2	<i>Channelrhodopsin 2</i>
CIC	zentraler Nukleus des Colliculus inferior / <i>central nucleus of inferior colliculus</i>
DCIC	dorsaler Cortex des Colliculus inferior / <i>dorsal cortex of inferior colliculus</i>
DCN	dorsaler cochleärer Nukleus / <i>dorsal cochlear nucleus</i>
DL-AP5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (NMDA-Rezeptorantagonist)
DNLL	dorsaler Nukleus des Lemniscus lateralis / <i>dorsal nucleus of the lateral lemniscus</i>
DNQX	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-Dione (AMPA- und Kainsäurerezeptorantagonist)
ECIC	externer Cortex des Colliculus inferior / <i>external cortex of inferior colliculus</i>
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom / <i>excitatory postsynaptic current</i>
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential / <i>excitatory postsynaptic potential</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure / <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i>
GAD67	Glutamat-Decarboxylase 67 kDa
Glu	Glutamat
GluR	ionotroper Glutamatrezeptor
HCN	<i>hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel</i>
IC	Colliculus inferior / <i>inferior colliculus</i>

---

Ih	hyperpolarisations-aktivierender Strom / <i>hyperpolarisation activated current (I)</i>
IHC	Immunhistochemie
IHC-Färbung	immunhistochemische Färbung
Ih-hump	über Ih aktivierender Spannungshügel / <i>hyperpolarisation current (I) activated hump</i>
Ih-sag	über Ih aktivierende Spannungseinsackung / <i>hyperpolarisation current (I) activated sag</i>
ILD	binauraler Pegelunterschied / <i>interaural level difference</i>
INLL	intermediärer Nukleus des Lemniscus lateralis / <i>intermediate nucleus of the lateral lemniscus</i>
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom / <i>inhibitory postsynaptic current</i>
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential / <i>inhibitory postsynaptic potential</i>
IR	Immunreaktivität
ITD	binaurale Laufzeitdifferenz / <i>interaural time difference</i>
KLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
LG-Neuron	großes GABAerges Neuron / <i>large GABAergic Neuron</i>
LL	Lemniscus lateralis / <i>lateral lemniscus</i>
LSO	laterale obere Olive / <i>lateral superior olive</i>
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
mEPSC	miniatur exzitatorischer postsynaptischer Strom / <i>miniature excitatory postsynaptic current</i>
MGB	medialer Kniehöcker / <i>medial geniculate body</i>
MGV	mittlere Grauwerte / <i>mean grey values</i>
MNTB	medialer Trapezkörper / <i>medial nucleus of trapezoid body</i>
MSO	mediale obere Olive / <i>medial superior olive</i>
NDS	Esenserum / <i>normal donkey serum</i>
NGS	Ziegenserum / <i>normal goat serum</i>
NLL	Nukleus des Lemniscus lateralis / <i>nucleus of lateral lemniscus</i>
NMDA	N-methyl-D-Aspartat (Glutamatrezeptoragonist)
P	postnataler Tag

PB	Phosphatpuffer / <i>phosphate buffer</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung / <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PN	Perineuronale Netze
PSTH	<i>post stimulus time histogram</i>
PVCN	<i>posteroventral cochlear nucleus</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts / <i>standard error of mean</i>
SG-Neuron	kleines GABAerges Neuron / <i>small GABAergic Neuron</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SOC	oberer Olivenkomplex / <i>superior olivary complex</i>
SPF	<i>subparafascicular thalamic nucleus</i>
SPN	<i>superior paraolivary nucleus</i>
SR95531	Gabazin (allosterischer GABA <sub>A</sub> -Rezeptorantagonist)
TRPA1	<i>ankyrin transient receptor potential channel, group 1</i>
TTX	Tetrodotoxin (Blocker der spannungsabhängigen Na <sup>+</sup> -Kanälen)
UE	Untereinheit
VCN	ventraler cochleärer Nukleus / <i>ventral cochlear nucleus</i>
VGAT	vesikulärer GABA (γ- Aminobuttersäure) Transporter
VGluT	vesikulärer Glutamatttransporter
VNLL	ventraler Nukleus des Lemniscus lateralis / <i>ventral nucleus of the lateral lemniscus</i>

---

**Literaturverzeichnis**

- Adams, J. C., and E. Mugnaini. 1984.** Dorsal nucleus of the lateral lemniscus: a nucleus of GABAergic projection neurons. *Brain Res. Bull.* 13: 585–590.
- Altomare, C., B. Terragni, C. Brioschi, R. Milanesi, C. Pagliuca, C. Viscomi, A. Moroni, M. Baruscotti, and D. DiFrancesco. 2003.** Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol.* 549: 347–359.
- Altschuler, R. A., L. Tong, A. G. Holt, and D. L. Oliver. 2008.** Immunolocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the rat inferior colliculus. *Neuroscience.* 154: 226–232.
- Andersen, R. A., P. L. Knight, and M. M. Merzenich. 1980.** The thalamocortical and corticothalamic connections of AI, AII, and the anterior auditory field (AAF) in the cat: evidence for two largely segregated systems of connections. *J. Comp. Neurol.* 194: 663–701.
- Ashida, G., J. Kretzberg, and D. J. Tollin. 2016.** Roles for Coincidence Detection in Coding Amplitude-Modulated Sounds. *PLOS Comput. Biol.* 12: e1004997.
- Aubrey, K. R., F. M. Rossi, R. Ruivo, S. Alboni, G. C. Belenchi, A. Le Goff, B. Gasnier, and S. Supplisson. 2007.** The transporters GlyT2 and VIAAT cooperate to determine the vesicular glycinergic phenotype. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27: 6273–6281.
- Bajo, V. M., M. A. Merchán, D. E. López, and E. M. Rouiller. 1993.** Neuronal morphology and efferent projections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 334: 241–262.
- Bal, R., and D. Oertel. 2000.** Hyperpolarization-Activated, Mixed-Cation Current ( $I_h$ ) in Octopus Cells of the Mammalian Cochlear Nucleus. *J. Neurophysiol.* 84: 806–817.
- Banks, M. I., R. A. Pearce, and P. H. Smith. 1993.** Hyperpolarization-activated cation current ( $I_h$ ) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J. Neurophysiol.* 70: 1420–1432.
- Barnes-Davies, M., M. C. Barker, F. Osmani, and I. D. Forsythe. 2004.** Kv1 currents mediate a gradient of principal neuron excitability across the tonotopic axis in the rat lateral superior olive. *Eur. J. Neurosci.* 19: 325–333.
- Bartlett, E. L., and P. H. Smith. 1999.** Anatomic, Intrinsic, and Synaptic Properties of Dorsal and Ventral Division Neurons in Rat Medial Geniculate Body. *J. Neurophysiol.* 81: 1999–2016.
- Baruscotti, M., A. Barbuti, and A. Bucchi. 2010.** The cardiac pacemaker current. *J. Mol. Cell. Cardiol., Special Issue: Ion Channels.* 48: 55–64.
- Baumann, V., S. Lehnert, C. Leibold, and U. Koch. 2013.** Tonotopic organization of the hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) in the mammalian medial superior olive. *Front. Neural Circuits.* 7.
- Bear, M. F., B. W. Connors, and M. A. Paradiso. 2018.** *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*, 4th ed. Springer Spektrum.

- Beaumont, V., and R. S. Zucker. 2000.** Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic Ih channels. *Nat. Neurosci.* 3: 133–141.
- Beebe, N. L., J. G. Mellott, and B. R. Schofield. 2018.** Inhibitory Projections from the Inferior Colliculus to the Medial Geniculate body Originate from Four Subtypes of GABAergic Cells. *eneuro.* 5: ENEURO.0406-18.2018.
- Beebe, N. L., J. W. Young, J. G. Mellott, and B. R. Schofield. 2016.** Extracellular Molecular Markers and Soma Size of Inhibitory Neurons: Evidence for Four Subtypes of GABAergic Cells in the Inferior Colliculus. *J. Neurosci.* 36: 3988–3999.
- von Békésy, G. 1960.** Experiments in Hearing. McGraw-Hill N. Y.
- Biel, M., C. Wahl-Schott, S. Michalakis, and X. Zong. 2009.** Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev.* 89: 847–885.
- Bochet, P., E. Audinat, B. Lambolez, F. Crépel, J. Rossier, M. Iino, K. Tsuzuki, and S. Ozawa. 1994.** Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron.* 12: 383–388.
- Brown, H. F., D. DiFrancesco, and S. J. Noble. 1979.** How does adrenaline accelerate the heart? *Nature.* 280: 235–236.
- Budinger, E., and P. O. Kanold. 2018.** Auditory Cortex Circuits, pp. 199–233. *In* Oliver, D.L., Cant, N.B., Fay, R.R., Popper, A.N. (eds.), *Mamm. Audit. Pathw. Synaptic Organ. Microcircuits*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer International Publishing, Cham.
- Buentello, D. C., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2015.** Differential Distribution of GABA and Glycine Terminals in Inferior Colliculus of Rat and Mouse. *J. Comp. Neurol.* n/a-n/a.
- Burnashev, N. 1996.** Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 311–317.
- Caicedo, A., and M. Eybalin. 1999.** Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur. J. Neurosci.* 11: 51–74.
- Caicedo, A., and H. Herbert. 1993.** Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 328: 377–392.
- Caicedo, A., M. Kungel, R. Pujol, and E. Friauf. 1998.** Glutamate-induced  $Ca^{2+}$  uptake in rat auditory brainstem neurons reveals developmental changes in  $Ca^{2+}$  permeability of glutamate receptors. *Eur. J. Neurosci.* 10: 941–954.
- Cant, N. B., and C. G. Benson. 2003.** Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Res. Bull., Functional Anatomy of Ear Connections.* 60: 457–474.
- Cant, N. B., and C. G. Benson. 2005.** An atlas of the inferior colliculus of the gerbil in three dimensions. *Hear. Res.* 206: 12–27.
- Cant, N. B., and C. G. Benson. 2007.** Multiple topographically organized projections connect the central nucleus of the inferior colliculus to the ventral division of the medial geniculate nucleus in the gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J. Comp. Neurol.* 503: 432–453.
- Cant, N. B., and D. L. Oliver. 2018.** Overview of Auditory Projection Pathways and Intrinsic Microcircuits, pp. 7–39. *In* Oliver, D.L., Cant, N.B., Fay, R.R., Popper, A.N.

- (eds.), *Mamm. Audit. Pathw. Synaptic Organ. Microcircuits*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer International Publishing, Cham.
- Caspari, F., V. J. Baumann, E. Garcia-Pino, and U. Koch. 2015.** Heterogeneity of Intrinsic and Synaptic Properties of Neurons in the Ventral and Dorsal Parts of the Ventral Nucleus of the Lateral Lemniscus. *Front. Neural Circuits*. 9.
- Ceprian, M., and D. Fulton. 2019.** Glial Cell AMPA Receptors in Nervous System Health, Injury and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Chandrasekaran, L., Y. Xiao, and S. Sivaramakrishnan. 2013.** Functional Architecture of the Inferior Colliculus Revealed with Voltage-Sensitive Dyes. *Front. Neural Circuits*. 7.
- Chaplan, S. R., H.-Q. Guo, D. H. Lee, L. Luo, C. Liu, C. Kuei, A. A. Velumian, M. P. Butler, S. M. Brown, and A. E. Dubin. 2003.** Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23: 1169–1178.
- Chaudhry, F. A., R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, N. C. Danbolt, K. K. Osen, R. H. Edwards, and J. Storm-Mathisen. 1998.** The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18: 9733–9750.
- Chen, C., M. Cheng, T. Ito, and S. Song. 2018.** Neuronal Organization in the Inferior Colliculus Revisited with Cell-Type-Dependent Monosynaptic Tracing. *J. Neurosci.* 38: 3318–3332.
- Chen, L., J. B. Kelly, and S. H. Wu. 1999.** The commissure of probst as a source of GABAergic inhibition. *Hear. Res.* 138: 106–114.
- Chernock, M. L., D. T. Larue, and J. A. Winer. 2004.** A periodic network of neurochemical modules in the inferior colliculus. *Hear. Res.* 188: 12–20.
- Coleman, J. R., and W. J. Clerici. 1987.** Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 262: 215–226.
- Conn, P. J. 2003.** Physiological Roles and Therapeutic Potential of Metabotropic Glutamate Receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003: 12–21.
- Demontis, G. C., B. Longoni, U. Barcaro, and L. Cervetto. 1999.** Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J. Physiol.* 515 ( Pt 3): 813–828.
- DiFrancesco, D. 1981.** A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* 314: 359–376.
- DiFrancesco, D. 1982.** Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J. Physiol.* 329: 485–507.
- DiFrancesco, D., and P. Tortora. 1991.** Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature.* 351: 145–147.
- Dölen, G., E. Osterweil, B. S. Shankaranarayana Rao, G. B. Smith, B. D. Auerbach, S. Chattarji, and M. F. Bear. 2007.** Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron.* 56: 955–962.
- Ehret, G. 1978.** Stiffness gradient along the basilar membrane as a basis for spatial frequency analysis within the cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.* 64: 1723–1726.



- Erecińska, M., and I. A. Silver. 1990.** Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35: 245–296.
- Farazifard, R., and S. H. Wu. 2010.** Metabotropic glutamate receptors modulate glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the central nucleus of the inferior colliculus. *Brain Res.* 1325: 28–40.
- Fathke, R. L., and M. L. Gabriele. 2009.** Patterning of multiple layered projections to the auditory midbrain prior to experience. *Hear. Res.* 249: 36–43.
- Felix, R. A., B. Gourévitch, and C. V. Portfors. 2018.** Subcortical pathways: Towards a better understanding of auditory disorders. *Hear. Res.* 362: 48–60.
- Felmy, F., and R. Schneggenburger. 2004.** Developmental expression of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins calretinin and parvalbumin at the calyx of Held of rats and mice. *Eur. J. Neurosci.* 20: 1473–1482.
- Fischl, M. J., R. M. Burger, M. Schmidt-Pauly, O. Alexandrova, J. L. Sinclair, B. Grothe, I. D. Forsythe, and C. Kopp-Scheinflug. 2016.** Physiology and anatomy of neurons in the medial superior olive of the mouse. *J. Neurophysiol.* 116: 2676–2688.
- Franzen, D. L., S. A. Gleiss, C. J. Kellner, N. Kladisios, and F. Felmy. 2020.** Activity-Dependent Calcium Signaling in Neurons of the Medial Superior Olive during Late Postnatal Development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40: 1689–1700.
- Fremeau, R. T., M. D. Troyer, I. Pahner, G. O. Nygaard, C. H. Tran, R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, D. Fortin, J. Storm-Mathisen, and R. H. Edwards. 2001.** The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron.* 31: 247–260.
- Friauf, E. 1992.** Tonotopic Order in the Adult and Developing Auditory System of the Rat as Shown by c-fos Immunocytochemistry. *Eur. J. Neurosci.* 4: 798–812.
- Friauf, E., and J. Ostwald. 1988.** Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 73: 263–284.
- Frisina, R. D., J. P. Walton, M. A. Lynch-Armour, and J. D. Byrd. 1998.** Inputs to a physiologically characterized region of the inferior colliculus of the young adult CBA mouse. *Hear. Res.* 115: 61–81.
- Fujimoto, H., K. Konno, M. Watanabe, and S. Jinno. 2017.** Late postnatal shifts of parvalbumin and nitric oxide synthase expression within the GABAergic and glutamatergic phenotypes of inferior colliculus neurons. *J. Comp. Neurol.* 525: 868–884.
- Fujiyama, F., T. Furuta, and T. Kaneko. 2001.** Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 435: 379–387.
- Funahashi, M., Y. Mitoh, A. Kohjitani, and R. Matsuo. 2003.** Role of the Hyperpolarization-Activated Cation Current (I<sub>h</sub>) in Pacemaker Activity in Area Postrema Neurons of Rat Brain Slices. *J. Physiol.* 552: 135–148.
- Gaza, W. C., and C. E. Ribak. 1997.** Immunocytochemical localization of AMPA receptors in the rat inferior colliculus. *Brain Res.* 774: 175–183.
- Geiger, J. R., T. Melcher, D. S. Koh, B. Sakmann, P. H. Seeburg, P. Jonas, and H. Monyer. 1995.** Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup>

- permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. 15: 193–204.
- Geis, H. R. A. P., and J. G. G. Borst. 2013.** Large GABAergic neurons form a distinct subclass within the mouse dorsal cortex of the inferior colliculus with respect to intrinsic properties, synaptic inputs, sound responses, and projections. *J. Comp. Neurol.* 521: 189–202.
- Geis, H.-R. A. P., M. van der Heijden, and J. G. G. Borst. 2011.** Subcortical input heterogeneity in the mouse inferior colliculus. *J. Physiol.* 589: 3955–3967.
- Glendenning, K. K., J. K. Brusno-Bechtold, G. C. Thompson, and R. B. Masterton. 1981.** Ascending auditory afferents to the nuclei of the lateral lemniscus. *J. Comp. Neurol.* 197: 673–703.
- Goldberg, J. M., and P. B. Brown. 1969.** Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J. Neurophysiol.* 32: 613–636.
- Golding, N. L., M. J. Ferragamo, and D. Oertel. 1999.** Role of Intrinsic Conductances Underlying Responses to Transients in Octopus Cells of the Cochlear Nucleus. *J. Neurosci.* 19: 2897–2905.
- Golding, N. L., D. Robertson, and D. Oertel. 1995.** Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J. Neurosci.* 15: 3138–3153.
- González-Hernández, T., B. Mantolán-Sarmiento, B. González-González, and H. Pérez-González. 1996.** Sources of GABAergic input to the inferior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 372: 309–326.
- Goyer, D., M. A. Silveira, A. P. George, N. L. Beebe, R. M. Edelbrock, P. T. Malinski, B. R. Schofield, and M. T. Roberts. 2019.** A novel class of inferior colliculus principal neurons labeled in vasoactive intestinal peptide-Cre mice. *eLife*. 8.
- Grigg, J. J., H. M. Brew, and B. L. Tempel. 2000.** Differential expression of voltage-gated potassium channel genes in auditory nuclei of the mouse brainstem. *Hear. Res.* 140: 77–90.
- Grothe, B., M. Pecka, and D. McAlpine. 2010.** Mechanisms of Sound Localization in Mammals. *Physiol. Rev.* 90: 983–1012.
- Guez-Barber, D., S. Fanous, B. K. Harvey, Y. Zhang, E. Lehrmann, K. G. Becker, M. R. Picciotto, and B. T. Hope. 2012.** FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J. Neurosci. Methods.* 203: 10–18.
- Hägglund, M., L. Borgius, K. J. Dougherty, and O. Kiehn. 2010.** Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat. Neurosci.* 13: 246–252.
- Halliwel, J. V., and P. R. Adams. 1982.** Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250: 71–92.
- Harrison, J. M., and W. B. Warr. 1962.** A study of the cochlear nuclei and ascending auditory pathways of the medulla. *J. Comp. Neurol.* 119: 341–379.
- Hassfurth, B., A. K. Magnusson, B. Grothe, and U. Koch. 2009.** Sensory deprivation regulates the development of the hyperpolarization-activated current in auditory brainstem neurons. *Eur. J. Neurosci.* 30: 1227–1238.

- Held, H. 1893.** Die centrale Bahnen des Nervus acusticus bei der Katz.
- Henkel, C. K., and K. M. Spangler. 1983.** Organization of the efferent projections of the medial superior olivary nucleus in the cat as revealed by HRP and autoradiographic tracing methods. *J. Comp. Neurol.* 221: 416–428.
- Herbert, H., A. Aschoff, and J. Ostwald. 1991.** Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 304: 103–122.
- Hille, B. 2001.** *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. 2001. ed. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Hollmann, M., M. Hartley, and S. Heinemann. 1991.** Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 252: 851–853.
- Hu, B., V. Senatorov, and D. Mooney. 1994.** Lemniscal and non-lemniscal synaptic transmission in rat auditory thalamus. *J. Physiol.* 479: 217–231.
- Hurley, L. M., J. A. Tracy, and A. Bohorquez. 2008.** Serotonin 1B receptor modulates frequency response curves and spectral integration in the inferior colliculus by reducing GABAergic inhibition. *J. Neurophysiol.* 100: 1656–1667.
- Indig, F. E., F. Diaz-Gonzalez, and M. H. Ginsberg. 1997.** Analysis of the tetraspanin CD9–integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa) complex in platelet membranes and transfected cells. *Biochem. J.* 327: 291–298.
- Ishii, T. M., M. Takano, and H. Ohmori. 2001.** Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J. Physiol.* 537: 93–100.
- Ishii, T. M., M. Takano, L. H. Xie, A. Noma, and H. Ohmori. 1999.** Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274: 12835–12839.
- Itaya, S. K., and G. W. Van Hoesen. 1982.** Retinal innervation of the inferior colliculus in rat and monkey. *Brain Res.* 233: 45–52.
- Ito, T. 2020.** Different coding strategy of sound information between GABAergic and glutamatergic neurons in the auditory midbrain. *J. Physiol.*
- Ito, T., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2009.** Two Classes of GABAergic Neurons in the Inferior Colliculus. *J. Neurosci.* 29: 13860–13869.
- Ito, T., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2011.** Expression of glutamate and inhibitory amino acid vesicular transporters in the rodent auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* 519: 316–340.
- Ito, T., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2016.** Functional organization of the local circuit in the inferior colliculus. *Anat. Sci. Int.* 91: 22–34.
- Ito, T., H. Hioki, J. Sohn, S. Okamoto, T. Kaneko, S. Iino, and D. L. Oliver. 2015.** Convergence of lemniscal and local excitatory inputs on large GABAergic tectothalamic neurons: Lemniscal Axosomatic Input on LG Neurons. *J. Comp. Neurol.* 523: 2277–2296.
- Ito, T., and M. S. Malmierca. 2018.** Neurons, Connections, and Microcircuits of the Inferior Colliculus, pp. 127–167. *In* Oliver, D.L., Cant, N.B., Fay, R.R., Popper, A.N. (eds.), *Mamm. Audit. Pathw. Synaptic Organ. Microcircuits*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer International Publishing, Cham.

- Ito, T., and D. L. Oliver. 2010.** Origins of Glutamatergic Terminals in the Inferior Colliculus Identified by Retrograde Transport and Expression of VGLUT1 and VGLUT2 Genes. *Front. Neuroanat.* 4.
- Ito, T., and D. L. Oliver. 2012.** The basic circuit of the IC: tectothalamic neurons with different patterns of synaptic organization send different messages to the thalamus. *Front. Neural Circuits.* 6.
- Ito, T., and D. L. Oliver. 2014.** Local and commissural IC neurons make axosomatic inputs on large GABAergic tectothalamic neurons. *J. Comp. Neurol.* 522: 3539–3554.
- Joshi, I., S. Shokralla, P. Titis, and L.-Y. Wang. 2004.** The role of AMPA receptor gating in the development of high-fidelity neurotransmission at the calyx of Held synapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24: 183–196.
- Jung, D. K., S. Y. Lee, D. Kim, K. M. Joo, C. I. Cha, H. S. Yang, W. B. Lee, and Y. H. Chung. 2005.** Age-related changes in the distribution of Kv1.1 and Kv3.1 in rat cochlear nuclei. *Neurol. Res.* 27: 436–440.
- Kaltenbach, J. A., and J. Lazor. 1991.** Tonotopic maps obtained from the surface of the dorsal cochlear nucleus of the hamster and rat. *Hear. Res.* 51: 149–160.
- Kelly, J. B., and H. Zhang. 2002.** Contribution of AMPA and NMDA receptors to excitatory responses in the inferior colliculus. *Hear. Res.* 168: 35–42.
- Khurana, S., Z. Liu, A. S. Lewis, K. Rosa, D. Chetkovich, and N. L. Golding. 2012.** An Essential Role for Modulation of Hyperpolarization-Activated Current in the Development of Binaural Temporal Precision. *J. Neurosci.* 32: 2814–2823.
- Khurana, S., M. W. H. Remme, J. Rinzel, and N. L. Golding. 2011.** Dynamic Interaction of Ih and IK-LVA during Trains of Synaptic Potentials in Principal Neurons of the Medial Superior Olive. *J. Neurosci.* 31: 8936–8947.
- Ko, K. W., M. N. Rasband, V. Meseguer, R. H. Kramer, and N. L. Golding. 2016.** Serotonin modulates spike probability in the axon initial segment through HCN channels. *Nat. Neurosci.* 19: 826–834.
- Koch, U., M. Braun, C. Kapfer, and B. Grothe. 2004.** Distribution of HCN1 and HCN2 in rat auditory brainstem nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 20: 79–91.
- Koch, U., and B. Grothe. 2003.** Hyperpolarization-activated current (Ih) in the inferior colliculus: distribution and contribution to temporal processing. *J. Neurophysiol.* 90: 3679–3687.
- Kratz, M. B., and P. B. Manis. 2015.** Spatial organization of excitatory synaptic inputs to layer 4 neurons in mouse primary auditory cortex. *Front. Neural Circuits.* 9.
- Kraus, K. S., and B. Canlon. 2012.** Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear. Res.* 288: 34–46.
- Kudo, M., and K. Niimi. 1978.** Ascending projections of the inferior colliculus onto the medial geniculate body in the cat studied by anterograde and retrograde tracing techniques. *Brain Res.* 155: 113–117.
- Kulesza, R. J., A. Viñuela, E. Saldaña, and A. S. Berrebi. 2002.** Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear. Res.* 168: 12–24.
- Kullmann, D. M., and K. P. Lamsa. 2007.** Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 687–699.

- Lambolez, B. 1996.** Correlation between kinetics and RNA splicing of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6.
- Lawrence, J. J. 2008.** Cholinergic control of GABA release: emerging parallels between neocortex and hippocampus. *Trends Neurosci*. 31: 317–327.
- Leao, K. E., R. N. Leao, H. Sun, R. E. W. Fyffe, and B. Walmsley. 2006.** Hyperpolarization-activated currents are differentially expressed in mice brainstem auditory nuclei. *J. Physiol*. 576: 849–864.
- Lewis, R. S., and A. J. Hudspeth. 1983.** Voltage- and ion-dependent conductances in solitary vertebrate hair cells. *Nature*. 304: 538–541.
- Lindsey, B. G. 1975.** Fine structure and distribution of axon terminals from the cochlear nucleus on neurons in the medial superior olivary nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol*. 160: 81–103.
- Loftus, W. C., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2010.** Differential Patterns of Inputs Create Functional Zones in Central Nucleus of Inferior Colliculus. *J. Neurosci*. 30: 13396–13408.
- Loftus, W. C., M. S. Malmierca, D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2008.** The cytoarchitecture of the inferior colliculus revisited: A common organization of the lateral cortex in rat and cat. *Neuroscience*. 154: 196–205.
- Lu, Y. 2014.** Metabotropic glutamate receptors in auditory processing. *Neuroscience*. 274: 429–445.
- Ludwig, A., T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wotjak, T. Munsch, X. Zong, S. Feil, R. Feil, M. Lancel, K. R. Chien, A. Konnerth, H.-C. Pape, M. Biel, and F. Hofmann. 2003.** Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J*. 22: 216–224.
- Ludwig, A., X. Zong, M. Jeglitsch, F. Hofmann, and M. Biel. 1998.** A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*. 393: 587–591.
- Ludwig, A., X. Zong, J. Stieber, R. Hullin, F. Hofmann, and M. Biel. 1999.** Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J*. 18: 2323–2329.
- Lujan, B., A. Dagostin, and H. von Gersdorff. 2019.** Presynaptic Diversity Revealed by  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeable AMPA Receptors at the Calyx of Held Synapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci*. 39: 2981–2994.
- Lupica, C. R., J. A. Bell, A. F. Hoffman, and P. L. Watson. 2001.** Contribution of the hyperpolarization-activated current ( $I(h)$ ) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *J. Neurophysiol*. 86: 261–268.
- Ma, C. L., J. B. Kelly, and S. H. Wu. 2002.** AMPA and NMDA receptors mediate synaptic excitation in the rat's inferior colliculus. *Hear. Res*. 168: 25–34.
- Maccaferri, G., M. Mangoni, A. Lazzari, and D. DiFrancesco. 1993.** Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol*. 69: 2129–2136.

- Magee, J. C. 1998.** Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18: 7613–7624.
- Magee, J. C. 1999.** Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.* 2: 508–514.
- Magee, J. C. 2000.** Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat. Rev. Neurosci.* 1: 181–190.
- Magnusson, A. K., C. Kapfer, B. Grothe, and U. Koch. 2005.** Maturation of glycinergic inhibition in the gerbil medial superior olive after hearing onset. *J. Physiol.* 568: 497–512.
- Malmierca, M. S., T. W. Blackstad, K. K. Osen, T. Karagülle, and R. L. Molowny. 1993.** The central nucleus of the inferior colliculus in rat: A Golgi and computer reconstruction study of neuronal and laminar structure. *J. Comp. Neurol.* 333: 1–27.
- Malmierca, M. S., M. A. Izquierdo, S. Cristaudo, O. Hernandez, D. Perez-Gonzalez, E. Covey, and D. L. Oliver. 2008.** A Discontinuous Tonotopic Organization in the Inferior Colliculus of the Rat. *J. Neurosci.* 28: 4767–4776.
- Malmierca, M. S., F. E. Le Beau, and A. Rees. 1996.** The topographical organization of descending projections from the central nucleus of the inferior colliculus in guinea pig. *Hear. Res.* 93: 167–180.
- Malmierca, M. S., M. A. Merchán, C. K. Henkel, and D. L. Oliver. 2002.** Direct projections from cochlear nuclear complex to auditory thalamus in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22: 10891–10897.
- Malmierca, M. S., R. L. Saint Marie, M. A. Merchan, and D. L. Oliver. 2005.** Laminar inputs from dorsal cochlear nucleus and ventral cochlear nucleus to the central nucleus of the inferior colliculus: Two patterns of convergence. *Neuroscience, Quantitative Neuroanatomy: from molecules to systems.* 136: 883–894.
- Mansour, Y., W. Altaher, and R. J. Kulesza. 2019.** Characterization of the human central nucleus of the inferior colliculus. *Hear. Res.* 377: 234–246.
- Markram, H., M. Toledo-Rodriguez, Y. Wang, A. Gupta, G. Silberberg, and C. Wu. 2004.** Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 793.
- Marsh, R. A., Z. M. Fuzessery, C. D. Grose, and J. J. Wenstrup. 2002.** Projection to the inferior colliculus from the basal nucleus of the amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22: 10449–10460.
- McCormick, D. A., and H. C. Pape. 1990.** Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol.* 431: 291–318.
- Mellott, J. G., N. L. Foster, K. T. Nakamoto, S. D. Motts, and B. R. Schofield. 2014.** Distribution of GABAergic cells in the inferior colliculus that project to the thalamus. *Front. Neuroanat.* 8.
- Merchán, M., L. A. Aguilar, E. A. Lopez-Poveda, and M. S. Malmierca. 2005.** The inferior colliculus of the rat: Quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience, Quantitative Neuroanatomy: from molecules to systems.* 136: 907–925.

- Milinkeviciute, G., M. A. Muniak, and D. K. Ryugo. 2017.** Descending projections from the inferior colliculus to the dorsal cochlear nucleus are excitatory. *J. Comp. Neurol.* 525: 773–793.
- Milligan, C. J., I. J. Edwards, and J. Deuchars. 2006.** HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res.* 1081: 79–91.
- Monteggia, L. M., A. J. Eisch, M. D. Tang, L. K. Kaczmarek, and E. J. Nestler. 2000.** Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81: 129–139.
- Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, and P. H. Seeburg. 1992.** Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science.* 256: 1217–1221.
- Moore, D. R., V. C. Kotak, and D. H. Sanes. 1998.** Commissural and lemniscal synaptic input to the gerbil inferior colliculus. *J. Neurophysiol.* 80: 2229–2236.
- Moosmang, S., M. Biel, F. Hofmann, and A. Ludwig. 1999.** Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* 380: 975–980.
- Moosmang, S., J. Stieber, X. Zong, M. Biel, F. Hofmann, and A. Ludwig. 2001.** Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* 268: 1646–1652.
- Morest, D. K. 1968.** The growth of synaptic endings in the mammalian brain: A study of the calyces of the trapezoid body. *Z. Für Anat. Entwicklungsgeschichte.* 127: 201–220.
- Mosbacher, J., R. Schoepfer, H. Monyer, N. Burnashev, P. H. Seeburg, and J. P. Ruppersberg. 1994.** A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science.* 266: 1059–1062.
- Much, B., C. Wahl-Schott, X. Zong, A. Schneider, L. Baumann, S. Moosmang, A. Ludwig, and M. Biel. 2003.** Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 278: 43781–43786.
- Mulders, W. H. a. M., and D. Robertson. 2002.** Inputs from the cochlea and the inferior colliculus converge on olivocochlear neurones. *Hear. Res.* 167: 206–213.
- Mulders, W. H., and D. Robertson. 2000.** Effects on cochlear responses of activation of descending pathways from the inferior colliculus. *Hear. Res.* 149: 11–23.
- Nagtegaal, A. P., and J. G. G. Borst. 2010.** In Vivo Dynamic Clamp Study of  $I_h$  in the Mouse Inferior Colliculus. *J. Neurophysiol.* 104: 940–948.
- Nakamoto, K. T., J. G. Mellott, J. Killius, M. E. Storey-Workley, C. S. Sowick, and B. R. Schofield. 2013.** Analysis of excitatory synapses in the guinea pig inferior colliculus: a study using electron microscopy and GABA immunocytochemistry. *Neuroscience.* 237: 170–183.
- Naumov, V., J. Heyd, F. de Arnal, and U. Koch. 2019.** Analysis of excitatory and inhibitory neuron types in the inferior colliculus based on  $I_h$  properties. *J. Neurophysiol. (Neuro- und Sinnesphysiologie)*. 2006. *Neuro- und Sinnesphysiologie*, 5., neu bearb. Aufl. ed, Springer-Lehrbuch. Springer Medizin, Heidelberg.

- (Neuroscience) . 2004. Neuroscience, 3rd ed. ed. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, Mass.
- Nevue, A. A., C. J. Elde, D. J. Perkel, and C. V. Portfors. 2016. Dopaminergic Input to the Inferior Colliculus in Mice. *Front. Neuroanat.* 9.
- Nicoletti, F., J. Bockaert, G. L. Collingridge, P. J. Conn, F. Ferraguti, D. D. Schoepp, J. T. Wroblewski, and J. P. Pin. 2011. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology.* 60: 1017–1041.
- Nishitani, A., N. Kunisawa, T. Sugimura, K. Sato, Y. Yoshida, T. Suzuki, T. Sakuma, T. Yamamoto, M. Asano, Y. Saito, Y. Ohno, and T. Kuramoto. 2019. Loss of HCN1 subunits causes absence epilepsy in rats. *Brain Res.* 1706: 209–217.
- Nobili, R., F. Mammano, and J. Ashmore. 1998. How well do we understand the cochlea? *Trends Neurosci.* 21: 159–167.
- Nolan, M. F., J. T. Dudman, P. D. Dodson, and B. Santoro. 2007. HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27: 12440–12451.
- Nolan, M. F., G. Malleret, J. T. Dudman, D. L. Buhl, B. Santoro, E. Gibbs, S. Vronskaya, G. Buzsáki, S. A. Siegelbaum, E. R. Kandel, and A. Morozov. 2004. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell.* 119: 719–732.
- Notomi, T., and R. Shigemoto. 2004. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 471: 241–276.
- Oertel, D. 1999. The role of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 497–519.
- Oertel, D., S. Shatadal, and X.-J. Cao. 2009. In the ventral cochlear nucleus Kv1.1 and HCN1 are colocalized at surfaces of neurons that have low-voltage-activated and hyperpolarization-activated conductances. 18.
- Oliver, D. L., S. Kuwada, T. C. T. Yin, L. B. Haberly, and C. K. Henkel. 1991. Dendritic and axonal morphology of HRP-injected neurons in the inferior colliculus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 303: 75–100.
- Oliver, D. L., and D. K. Morest. 1984. The central nucleus of the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 222: 237–264.
- Oliver, D. L., J. A. Winer, G. E. Beckius, and R. L. S. Marie. 1994. Morphology of GABAergic neurons in the inferior colliculus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 340: 27–42.
- Ono, M., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2016. Long-Lasting Sound-Evoked Afterdischarge in the Auditory Midbrain. *Sci. Rep.* 6: 20757.
- Ono, M., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2017. Identified GABAergic and Glutamatergic Neurons in the Mouse Inferior Colliculus Share Similar Response Properties. *J. Neurosci.* 37: 8952–8964.
- Ono, M., D. C. Bishop, and D. L. Oliver. 2020. Neuronal sensitivity to the interaural time difference of the sound envelope in the mouse inferior colliculus. *Hear. Res.* 385: 107844.



- Ono, M., Y. Yanagawa, and K. Koyano. 2005.** GABAergic neurons in inferior colliculus of the GAD67-GFP knock-in mouse: Electrophysiological and morphological properties. *Neurosci. Res.* 51: 475–492.
- Osen, K. K. 1972.** Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 144: 355–372.
- Pape, H. C. 1996.** Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 299–327.
- Park, T. J., and G. D. Pollak. 1993.** GABA shapes a topographic organization of response latency in the mustache bat's inferior colliculus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13: 5172–5187.
- Parks, T. N. 2000.** The AMPA receptors of auditory neurons. *Hear. Res.* 147: 77–91.
- Patil, S. T., L. Zhang, F. Martenyi, S. L. Lowe, K. A. Jackson, B. V. Andreev, A. S. Avedisova, L. M. Bardenstein, I. Y. Gurovich, M. A. Morozova, S. N. Mosolov, N. G. Neznanov, A. M. Reznik, A. B. Smulevich, V. A. Tochilov, B. G. Johnson, J. A. Monn, and D. D. Schoepp. 2007.** Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat. Med.* 13: 1102–1107.
- Paxinos, G., and K. B. J. Franklin. 2004.** The mouse brain in stereotaxic coordinates, Compact 2nd ed. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Peruzzi, D., E. Bartlett, P. H. Smith, and D. L. Oliver. 1997.** A Monosynaptic GABAergic Input from the Inferior Colliculus to the Medial Geniculate Body in Rat. *J. Neurosci.* 17: 3766–3777.
- Peruzzi, D., S. Sivaramakrishnan, and D. L. Oliver. 2000.** Identification of cell types in brain slices of the inferior colliculus. *Neuroscience.* 101: 403–416.
- Petralia, R. S., and R. J. Wenthold. 1992.** Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318: 329–354.
- Pickles, J. O. 2008.** An Introduction to the Physiology of Hearing, Third Edition, 3rd ed. Academic Press, London.
- Pickles, J. O., S. D. Comis, and M. P. Osborne. 1984.** Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear. Res.* 15: 103–112.
- Portfors, C. V., and D. G. Sinex. 2005.** Coding of Communication Sounds in the Inferior Colliculus, pp. 411–425. *In* Winer, J.A., Schreiner, C.E. (eds.), *Infer. Colliculus.* Springer New York, New York, NY.
- Quirk, J. C., E. R. Siuda, and E. S. Nisenbaum. 2004.** Molecular Determinants Responsible for Differences in Desensitization Kinetics of AMPA Receptor Splice Variants. *J. Neurosci.* 24: 11416–11420.
- Reetz, G., and G. Ehret. 1999.** Inputs from three brainstem sources to identified neurons of the mouse inferior colliculus slice. *Brain Res.* 816: 527–543.
- Robards, M. J. 1979.** Somatic neurons in the brainstem and neocortex projecting to the external nucleus of the inferior colliculus: an anatomical study in the opossum. *J. Comp. Neurol.* 184: 547–565.

- Rosenberger, M. H., T. Fremouw, J. H. Casseday, and E. Covey. 2003.** Expression of the Kv1.1 ion channel subunit in the auditory brainstem of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *J. Comp. Neurol.* 462: 101–120.
- Rubio, M. E. 2018.** Microcircuits of the Ventral Cochlear Nucleus, pp. 41–71. *In* Oliver, D.L., Cant, N.B., Fay, R.R., Popper, A.N. (eds.), *Mamm. Audit. Pathw. Synaptic Organ. Microcircuits*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer International Publishing, Cham.
- Rubio, M. E., K. Matsui, Y. Fukazawa, N. Kamasawa, H. Harada, M. Itakura, E. Molnár, M. Abe, K. Sakimura, and R. Shigemoto. 2017.** The number and distribution of AMPA receptor channels containing fast kinetic GluA3 and GluA4 subunits at auditory nerve synapses depend on the target cells. *Brain Struct. Funct.* 222: 3375–3393.
- Rudy, B., G. Fishell, S. Lee, and J. Hjerling-Leffler. 2011.** Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71: 45–61.
- Rusznák, Z., B. Pál, A. Kőszeghy, Y. Fu, G. Szücs, and G. Paxinos. 2013.** The hyperpolarization-activated non-specific cation current (I<sub>h</sub>) adjusts the membrane properties, excitability, and activity pattern of the giant cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 37: 876–890.
- Ryugo, D. K., and T. N. Parks. 2003.** Primary innervation of the avian and mammalian cochlear nucleus. *Brain Res. Bull.* 60: 435–456.
- Saint Marie, R. L., and R. A. Baker. 1990.** Neurotransmitter-specific uptake and retrograde transport of [3H]glycine from the inferior colliculus by ipsilateral projections of the superior olivary complex and nuclei of the lateral lemniscus. *Brain Res.* 524: 244–253.
- Saldaña, E., M.-A. Aparicio, V. Fuentes-Santamaría, and A. S. Berrebi. 2009.** Connections of the superior paraolivary nucleus of the rat: projections to the inferior colliculus. *Neuroscience.* 163: 372–387.
- Saldaña, E., M. Feliciano, and E. Mugnaini. 1996.** Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J. Comp. Neurol.* 371: 15–40.
- Saldaña, E., and M. A. Merchañ. 1992.** Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 319: 417–437.
- Sanacora, G., C. A. Zarate, J. H. Krystal, and H. K. Manji. 2008.** Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 426–437.
- Santoro, B., S. Chen, A. Lüthi, P. Pavlidis, G. P. Shumyatsky, G. R. Tibbs, and S. A. Siegelbaum. 2000.** Molecular and Functional Heterogeneity of Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels in the Mouse CNS. *J. Neurosci.* 20: 5264–5275.
- Schmid, S., A. Guthmann, J. P. Ruppertsberg, and H. Herbert. 2001.** Expression of AMPA receptor subunit flip/flop splice variants in the rat auditory brainstem and inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 430: 160–171.
- Schneider, F., C. Grimm, and P. Hegemann. 2015.** Biophysics of Channelrhodopsin. *Annu. Rev. Biophys.* 44: 167–186.

- Schofield, B. R., and N. L. Beebe. 2019.** Subtypes of GABAergic cells in the inferior colliculus. *Hear. Res., Annual Reviews 2019.* 376: 1–10.
- Schofield, B. R., S. D. Motts, J. G. Mellott, and N. L. Foster. 2014.** Projections from the dorsal and ventral cochlear nuclei to the medial geniculate body. *Front. Neuroanat.* 8: 10.
- Schwartz, I. R., A. Keh, and P. R. Eager. 2000.** Differential postsynaptic distribution of GluRs 1-4 on cartwheel and octopus cell somata in the gerbil cochlear nucleus. *Hear. Res.* 147: 70–76.
- Schweizer, H. 1981.** The connections of the inferior colliculus and the organization of the brainstem auditory system in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *J. Comp. Neurol.* 201: 25–49.
- Scott, L. L., P. J. Mathews, and N. L. Golding. 2005.** Posthearing developmental refinement of temporal processing in principal neurons of the medial superior olive. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25: 7887–7895.
- Seifert, R., A. Scholten, R. Gauss, A. Mincheva, P. Lichter, and U. B. Kaupp. 1999.** Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 9391–9396.
- Sento, S., and D. K. Ryugo. 1989.** Endbulbs of held and spherical bushy cells in cats: morphological correlates with physiological properties. *J. Comp. Neurol.* 280: 553–562.
- Shah, M. M. 2018.** Neuronal HCN channel function and plasticity. *Curr. Opin. Physiol., Ion Channels.* 2: 92–97.
- Shneiderman, A., D. L. Oliver, and C. K. Henkel. 1988.** Connections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: an inhibitory parallel pathway in the ascending auditory system? *J. Comp. Neurol.* 276: 188–208.
- Siemens, J., C. Lillo, R. A. Dumont, A. Reynolds, D. S. Williams, P. G. Gillespie, and U. Müller. 2004.** Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature.* 428: 950–955.
- Silveira, M. A., J. D. Anair, N. L. Beebe, P. Mirjalili, B. R. Schofield, and M. T. Roberts. 2020.** Neuropeptide Y Expression Defines a Novel Class of GABAergic Projection Neuron in the Inferior Colliculus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40: 4685–4699.
- Sivaramakrishnan, S., and D. L. Oliver. 2001.** Distinct K Currents Result in Physiologically Distinct Cell Types in the Inferior Colliculus of the Rat. *J. Neurosci.* 21: 2861–2877.
- Sivaramakrishnan, S., and D. L. Oliver. 2006.** Neuronal Responses to Lemniscal Stimulation in Laminar Brain Slices of the Inferior Colliculus. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 7: 1–14.
- Smith, P. H. 1995.** Structural and Functional Differences Distinguish Principal from Non-principal Cells in the Guinea Pig MSO Slice. *J. Neurophysiol.* 73: 1653–1667.
- Smith, P. H., P. X. Joris, L. H. Carney, and T. C. Yin. 1991.** Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 304: 387–407.
- Sommer, B., K. Keinänen, T. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Kohler, T. Takagi, B. Sakmann, and P. Seeburg. 1990.** Flip and flop: a cell-specific

- functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*. 249: 1580–1585.
- Spangler, K. M., W. B. Warr, and C. K. Henkel. 1985.** The projections of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body in the cat. *J. Comp. Neurol.* 238: 249–262.
- Stieber, J., G. Stöckl, S. Herrmann, B. Hassfurth, and F. Hofmann. 2005.** Functional expression of the human HCN3 channel. *J. Biol. Chem.* 280: 34635–34643.
- Sturm, J. J., Y.-X. Zhang-Hooks, H. Roos, T. Nguyen, and K. Kandler. 2017.** Noise Trauma-Induced Behavioral Gap Detection Deficits Correlate with Reorganization of Excitatory and Inhibitory Local Circuits in the Inferior Colliculus and Are Prevented by Acoustic Enrichment. *J. Neurosci.* 37: 6314–6330.
- Sturm, J., T. Nguyen, and K. Kandler. 2014.** Development of Intrinsic Connectivity in the Central Nucleus of the Mouse Inferior Colliculus. *J. Neurosci.* 34: 15032–15046.
- Takamori, S. 2006.** VGLUTs: ‘Exciting’ times for glutamatergic research? *Neurosci. Res.* 55: 343–351.
- Tamamaki, N., Y. Yanagawa, R. Tomioka, J.-I. Miyazaki, K. Obata, and T. Kaneko. 2003.** Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467: 60–79.
- Tan, M. L., H. P. Theeuwes, L. Feenstra, and J. G. G. Borst. 2007.** Membrane Properties and Firing Patterns of Inferior Colliculus Neurons: An In Vivo Patch-Clamp Study in Rodents. *J. Neurophysiol.* 98: 443–453.
- Tanaka, I., and K. Ezure. 2004.** Overall distribution of GLYT2 mRNA-containing versus GAD67 mRNA-containing neurons and colocalization of both mRNAs in midbrain, pons, and cerebellum in rats. *Neurosci. Res.* 49: 165–178.
- (The inferior colliculus) . 2005.** The inferior colliculus. Springer, New York, NY.
- (The Mammalian Auditory Pathways) . 2018.** The Mammalian Auditory Pathways, Springer Handbook of Auditory Research. Springer International Publishing.
- Thompson, A. M., and G. C. Thompson. 1993.** Relationship of descending inferior colliculus projections to olivocochlear neurons. *J. Comp. Neurol.* 335: 402–412.
- Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers, and R. Dingledine. 2010.** Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62: 405–496.
- Tremblay, R., S. Lee, and B. Rudy. 2016.** GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*. 91: 260–292.
- Trussell, L. 1998.** Control of time course of glutamatergic synaptic currents. *Prog. Brain Res.* 116: 59–69.
- Trussell, L. O. 1999.** Synaptic mechanisms for coding timing in auditory neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 477–496.
- Tsay, D., J. T. Dudman, and S. A. Siegelbaum. 2007.** HCN1 Channels Constrain Synaptically Evoked Ca<sup>2+</sup> Spikes in Distal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*. 56: 1076–1089.

- Ulrich, D. 2002.** Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 87: 2753–2759.
- Vale, C., and D. H. Sanes. 2002.** The effect of bilateral deafness on excitatory and inhibitory synaptic strength in the inferior colliculus. *Eur. J. Neurosci.* 16: 2394–2404.
- Vetter, D. E., E. Saldaña, and E. Mugnaini. 1993.** Input from the inferior colliculus to medial olivocochlear neurons in the rat: a double label study with PHA-L and cholera toxin. *Hear. Res.* 70: 173–186.
- Viscomi, C., C. Altomare, A. Burchi, E. Camatini, M. Baruscotti, A. Moroni, and D. DiFrancesco. 2001.** C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 276: 29930–29934.
- Wagner, T. 1996.** Lemniscal input to identified neurons of the central nucleus of mouse inferior colliculus: an intracellular brain slice study. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1231–1239.
- Wahl-Schott, C., and M. Biel. 2009.** HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 470.
- Walcher, J., B. Hassfurth, B. Grothe, and U. Koch. 2011.** Comparative posthearing development of inhibitory inputs to the lateral superior olive in gerbils and mice. *J. Neurophysiol.* 106: 1443–1453.
- Wang, M., B. P. Ramos, C. D. Paspalas, Y. Shu, A. Simen, A. Duque, S. Vijayraghavan, A. Brennan, A. Dudley, E. Nou, J. A. Mazer, D. A. McCormick, and A. F. T. Arnsten. 2007.** Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell.* 129: 397–410.
- Wentholt, R. J., D. Huie, R. A. Altschuler, and K. A. Reeks. 1987.** Glycine immunoreactivity localized in the cochlear nucleus and superior olivary complex. *Neuroscience.* 22: 897–912.
- Wenzel, A., M. Villa, H. Mohler, and D. Benke. 1996.** Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J. Neurochem.* 66: 1240–1248.
- Winer, J. A., M. L. Chernock, D. T. Larue, and S. W. Cheung. 2002.** Descending projections to the inferior colliculus from the posterior thalamus and the auditory cortex in rat, cat, and monkey. *Hear. Res.* 168: 181–195.
- Winer, J. A., R. L. Saint Marie, D. T. Larue, and D. L. Oliver. 1996.** GABAergic feed-forward projections from the inferior colliculus to the medial geniculate body. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8005–8010.
- Wu, S. H., C. L. Ma, and J. B. Kelly. 2004.** Contribution of AMPA, NMDA, and GABAA Receptors to Temporal Pattern of Postsynaptic Responses in the Inferior Colliculus of the Rat. *J. Neurosci.* 24: 4625–4634.
- Xie, R., and P. B. Manis. 2014.** GABAergic and glycinergic inhibitory synaptic transmission in the ventral cochlear nucleus studied in VGAT channelrhodopsin-2 mice. *Front. Neural Circuits.* 8.
- Xiong, X. R., F. Liang, B. Zingg, X. Ji, L. A. Ibrahim, H. W. Tao, and L. I. Zhang. 2015.** Auditory cortex controls sound-driven innate defense behaviour through corticofugal projections to inferior colliculus. *Nat. Commun.* 6.

- Yamada, R., H. Kuba, T. M. Ishii, and H. Ohmori. 2005.** Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels regulate auditory coincidence detection in nucleus laminaris of the chick. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25: 8867–8877.
- Yanagihara, K., and H. Irisawa. 1980.** Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch.* 385: 11–19.
- Yang, Y., J. Lee, and G. Kim. 2020.** Integration of locomotion and auditory signals in the mouse inferior colliculus. *eLife.* 9.
- Yang, Y.-M., J. Aitoubah, A. M. Lauer, M. Nuriya, K. Takamiya, Z. Jia, B. J. May, R. L. Haganir, and L.-Y. Wang. 2011.** GluA4 is indispensable for driving fast neurotransmission across a high-fidelity central synapse. *J. Physiol.* (<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.2011.208066>).
- Yassin, L., M. Pecka, J. Kajopoulos, H. Gleiss, L. Li, C. Leibold, and F. Felmy. 2016.** Differences in synaptic and intrinsic properties result in topographic heterogeneity of temporal processing of neurons within the inferior colliculus. *Hear. Res.* 341: 79–90.
- Yu, X., K.-L. Duan, C.-F. Shang, H.-G. Yu, and Z. Zhou. 2004.** Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I(h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 1051–1056.
- Zhang, H., and J. B. Kelly. 2001.** AMPA and NMDA Receptors Regulate Responses of Neurons in the Rat's Inferior Colliculus. *J. Neurophysiol.* 86: 871–880.
- Zhang, H., and J. B. Kelly. 2003.** Glutamatergic and GABAergic Regulation of Neural Responses in Inferior Colliculus to Amplitude-Modulated Sounds. *J. Neurophysiol.* 90: 477–490.
- Zhao, S., J. T. Ting, H. E. Atallah, L. Qiu, J. Tan, B. Gloss, G. J. Augustine, K. Deisseroth, M. Luo, A. M. Graybiel, and G. Feng. 2011.** Cell-type Specific Optogenetic Mice for Dissecting Neural Circuitry Function. *Nat. Methods.* 8: 745–752.

## Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen

### **Konferenzposter:**

Victor Naumov, Julia Heyd, Ursula Koch. GABAergic neurons in the auditory midbrain: fast excitatory inputs and slow hyperpolarization-activated currents. 10th FENS (Federation of European Neurosciences Societies) Forum of Neuroscience, Poster-ID: D034, 2-6 Juli 2016, Kopenhagen, Dänemark.

### **Publikation:**

Naumov V, Heyd J, de Arnal F, Koch U. Analysis of excitatory and inhibitory neuron types in the inferior colliculus based on  $I_h$  properties. J Neurophysiol, 2019. doi:10.1152/jn.00594.2018

**Beteiligungserklärung**

Folgende in der vorliegenden Dissertation mit dem Titel: „Inhibitorische und exzitatorische Neurone des Colliculus inferior der Maus: Ih-Ströme und erregende Eingänge“ dargestellten Experimente, Auswertungen und Abbildungen wurden nicht von mir, Victor Naumov, erarbeitet: Konzeption, Durchführung, Analyse und Interpretation der immunhistochemischen HCN-Färbungen (Abb. 10, Seite 51, Abb. 11, Seite 52) und der GAD67-MAP2-GluR4-Färbung (Seite 66); Quantifizierung der Anzahl der HCN4-immunreaktiven GABAergen Neurone (Seite 50). Die Quantifizierung der mittleren Grauwerte der HCN1-Immunreaktivität erfolgte teilweise unter meiner Mitwirkung (Abb. 11, Seite 52). Ende der Beteiligungserklärung.



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hierdurch versichere ich, Victor Naumov, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Inhibitorische und exzitatorische Neurone des Colliculus inferior der Maus: Ih-Ströme und erregende Eingänge“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt sowie die wörtlich und sinngemäß übernommenen Passagen aus anderen Quellen kenntlich gemacht habe. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Dissertation nicht auf meiner Masterarbeit aufbaut bzw. daraus erwachsen ist. Ich versichere, dass die elektronische und gedruckte Fassung der vorliegenden Dissertation, die ich eingereicht habe, identisch sind. Ich versichere, dass ich einen Teil der vorliegenden Dissertation im Einvernehmen mit meiner Betreuerin Prof. Dr. Ursula Koch in Journal of Neurophysiology veröffentlichte und dass ich diese Publikation der elektronischen bzw. gedruckten Fassung der vorliegenden Dissertation als PDF-Dokument bzw. als Ausdruck beigelegt habe. Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation nicht schon einmal in einem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Ursula Koch für die Chance diese spannende Doktorarbeit zu verwirklichen, bedanken. Ihr scharfsinniger wissenschaftlicher Input und ihre Expertise, ihre Fragen und Korrekturen zusammen mit Geduld, Vertrauen und Wertschätzung für eine gute zwischenmenschliche Atmosphäre im Labor brachten stete Freude am Forschen und bereicherten so meine Doktorandenzeit.

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Gary R. Lewin, der sich die Zeit und Mühe genommen hat diese Arbeit zu lesen und zu begutachten.

Ein besonderer, lieber Dank gebührt den hochprofessionellen Postdocs der AG-Koch: Veronika für die Einweihung in die Künste der Elektrophysiologie sowie Christian für den Aufbau des ultimativen Setups 2, Elisabet für die hervorragende Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbungen und das humorvolle und unterstützende Teilen der Höhen und Tiefen des Forscheralltags, Lina für die Einarbeitung in die Analysemethoden und das *out of the box* Denken, Julia für effiziente und freudige Zusammenarbeit an der HCN-Publikation und aufbauende Mensagespräche. Die unermüdlichen Elektrophysiologen: Jérémie für wissenschaftliche Diskussionen beim superleckeren Essen und Musizieren sowie Thorsten für Korrekturlesen und wissenschaftlichen Austausch beim Mittagskaffee oder Feierabend-BrewDog.

Den mittlerweile fertigen DoktorandInnen Franziska und Nikodemus gilt mein lieber Gruß, Umarmung und Dank für all den mehr und weniger wissenschaftlichen Austausch (...darunter eine lilafarbene Weltgestaltung) sowie die gegenseitige Unterstützung in unserem tollen PhD-Alltag.

Ich bedanke mich herzlich bei unseren unersetzlichen technischen Assistentinnen, Karin für die Etablierung der VGAT-Mäusekolonie und Praktikumsversuche sowie für die Hilfe bei IHC-Färbungen, Cornelia für all die unzähligen Bestellungen, die Hilfe bei den IHC-Färbungen, der Praktikumsorganisation und aufbauenden „Wie geht’s“-Nachfragen sowie Fauve für die effiziente Mitarbeit an unserer Publikation, Korrekturlesen sowie die tolle Zeit in und außerhalb des Labors.

Peter danke ich für das unermüdliche Kümmern um das Wohl der Versuchstiere und den bereichernden philosophisch-musikalischen Austausch im Reich der Mäuse.

Den virtuosen Kennerinnen des Bürowesens Waltraud, Angelika und Sabine danke ich für ihre hochprofessionelle und bürokratiezähmende Arbeitsablauforganisation.

Ich bedanke mich bei Herrn Binkowski aus der Feinmechanikwerkstatt für seine eleganten Lösungsansätze bei der Entwicklung und Fertigung der Gehirnschneidvorrichtung.

Den zuverlässigen, engagierten PraktikurstutorInnen, Hiwis und Bachelor/MasterstudentInnen: Johanna, Kristina, Nina, Susanna, Monika, Anne, Lisa, Soraja, Susanne, Julia, Mathias, Oliver, Niklas, Janek, Florian, Leon... danke ich für die beste Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt auch allen mehr und weniger fleißigen StudentInnen für die bereichernden Erfahrungen in der Lehre. Auch unsere Etage-Nachbarn die AG Sigrüst bleiben in bester Erinnerung für ihre Hilfsbereitschaft und großartigen Partys.

Ich bedanke mich herzlichst bei meinen FreundInnen für jegliche Unterstützung während der turbulenten Doktorandenzeit.

Mi amor, vielen Dank, dass du immer so liebe-, geduld- und humorvoll für mich da bist!

Meinen lieben Eltern gilt der tiefste Dank für die unermessliche Unterstützung und den Glauben an mich in all den Jahren. Спасибо вам, мои дорогие!