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

Projektionsmuster GABAerger Neurone auf Dendriten von Martinotti-Zellen im somatosensorischen Kortex

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Janis Hülsemann

aus

Göttingen

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. J. Staiger
Ko-Referent:	Prof. Dr. S. Rizzoli

Datum der mündlichen Prüfung: 04.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Projektionsmuster GABAerger Neurone auf Dendriten von Martinotti-Zellen im somatosensorischen Kortex" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 21.10.2021 ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **III**

Abkürzungsverzeichnis ..... **III**

1 Einleitung **1**

1.1 Somatosensorischer Kortex (Barrel-Kortex) 1

1.2 Inhibitorische GABAerge Interneurone 2

1.2.1 VIP-exprimierende Zellen 5

1.2.2 PV-exprimierende Zellen 6

1.3 Martinotti-Zellen 7

1.4 Verschaltungen im somatosensorischen Kortex 8

1.5 Fragestellung 12

2 Material und Methoden **14**

2.1 Versuchstiere und Präparation von Gehirnschnitten 14

2.2 Elektrophysiologie und Optogenetik 15

2.2.1 Die Patch-Clamp-Technik und sCRACM 15

2.2.2 Versuchsaufbau und -protokoll 17

2.3 Analyse elektrophysiologischer Rohdaten 22

2.4 Statistische Auswertung und grafische Aufbereitung der Daten 26

2.5 Morphologie 29

3 Ergebnisse **31**

3.1 Identifizierung der Zellen 31

3.2 Lichtinduzierte Depolarisation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen 35

3.3 Inhibitorische Projektionen von VIP- und PV- auf Martinotti-Zellen 36

3.3.1 Kinetik der optisch evozierten IPSC 39

3.3.2 Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC 43

3.3.3 Axonales Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf Martinotti-Zellen 45

3.4 Subzelluläres synaptisches Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden auf Martinotti-Zellen 51

4 Diskussion **59**

4.1 Methodische Betrachtungen 60

4.2 Diskussion der Ergebnisse 62

4.2.1 Stimulation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen 62

4.2.2 Inhibitorische Projektionen VIP- und PV-exprimierender Zellen auf Martinotti-Zellen 63

4.2.3 Eigenschaften der lichtinduzierten IPSC an MC 67

4.2.4 Axonale Projektionsverläufe und subzelluläre synaptische Projektionsmuster 69

4.3 Physiologische Relevanz 75

5 Zusammenfassung 79

6 Anhang 81

6.1 Lösungen und Pharmaka 81

6.2 Formeln 82

6.3 Tabellen 83

6.4 Ergänzende Abbildungen 85

7 Literaturverzeichnis 88

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Distinkte Subgruppen GABAerger Interneurone 4
Abb. 2: Einfluss der Laserenergie auf die Auflösung von sCRACM-Karten 21
Abb. 3: Analyse elektrophysiologischer Rohdaten 23
Abb. 4: Aufbereitung von kartierten IPSC zu farbkodierten Diagrammen 27
Abb. 5: Vergleich von Weichzeichnung und linearer Interpolation der Kartogramme 28
Abb. 6: Identifizierung abgeleiteter GIN-Zellen als Martinotti-Zellen 32
Abb. 7: Identifizierung ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen 34
Abb. 8: Quantifizierung der optisch evozierten Depolarisation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen 35
Abb. 9: Optisch evozierte IPSC an MC in LII/III und LV 37
Abb. 10: Quantifizierung der optisch evozierten IPSC an MC in LII/III und LV 38
Abb. 11: Latenzen der optisch evozierten IPSC an MC in LII/III und LV 40
Abb. 12: Anstiegs- und Abfallzeit der optisch evozierten IPSC an MC in LII/III und LV 42
Abb. 13: Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC 44
Abb. 14: Axonale Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC 46
Abb. 15: Analyse der vertikalen Orientierung axonaler Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC 49
Abb. 16: Synaptische Zielregionen VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC-Dendriten in LII/III und LV 53
Abb. 17: Quantifizierung von VIP- und PV-Eingängen auf MC-Dendriten in verschiedenen Distanzen zum MC-Soma 56
Abb. A1: AP-Latenz bei optisch evozierter überschwelliger Depolarisation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen 85
Abb. A2: Übersicht aller sCRACM-Einzelkartogramme der synaptischen Zielregionen VIP-exprimierender Zellen auf MC in LII/III und LV 86
Abb. A3: Übersicht aller sCRACM-Einzelkartogramme der synaptischen Zielregionen PV-exprimierender Zellen auf MC in LII/III und LV 87

Tabellenverzeichnis

Tab. A1: Pipettenlösungen 81
Tab. A2: Lösungen 81
Tab. A3: Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC (vgl. Abb. 13) 83
Tab. A4: Analyse der vertikalen Orientierung axonaler Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC (vgl. Abb. 15) 83
Tab. A5: Quantifizierung von VIP- und PV-Eingängen auf MC-Dendriten in verschiedenen Distanzen zum MC-Soma; mittlere normalisierte IPSC-Amplituden (vgl. Abb. 17A-A') 84
Tab. A6: Quantifizierung von VIP- und PV-Eingängen auf MC-Dendriten in verschiedenen Distanzen zum MC-Soma; relative Eingänge (vgl. Abb. 17B-B') 84

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
5HT3a-Rezeptor	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)-Rezeptor 3a
ACSF	Künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (engl. *artificial cerebrospinal fluid*)
AP	Aktionspotential
CA1	Ammonshorn Region 1 (lat. *Cornu ammonis*)
ChR2	Channelrhodopsin-2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
E	Umkehrpotential
ĒIPSC	Mittelwert der Umkehrpotentiale
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	γ-Aminobuttersäure (engl. *gamma-aminobutyric acid*)
$GABA_A$-Rezeptoren	Ionotrope GABA-Rezeptoren des Typs A
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GIN	GFP-exprimierende inhibitorische Neurone
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
L	Schicht
St.	Stimulusenergie
MC	Martinotti-Zelle (engl. *Martinotti cell*)
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
P13	13 Tage postnatal
PBS	Phosphat-gepufferter Saline
PC	Pyramidenzellen (engl. *pyramidal cells*)
PSC	Postsynaptischer Strom (engl. *postsynaptic current*)
PSP	Postsynaptisches Potential
PV	Parvalbumin
PVcre	Mauslinie, die Cre-Rekombinase in PV-Zellen exprimiert
PV-Zellen	PV-exprimierende Zellen
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit (engl. *probability value*)
RNA	Ribonukleinsäure
s.e.m	Standardfehler (engl. *standard error of the mean*)
sCRACM	subzelluläre ChR2-assistierte Schaltkreis-Kartierung (engl. *subcellular ChR2-assisted circuit mapping*)
SD	Standardabweichung (engl. *standard deviation*)
SST	Somatostatin
SST-Zellen	Somatostatin-exprimierende Zellen

St.	Stimulusenergie
TB	TRIS-Puffer (engl. *TRIS buffer*)
TBS	TRIS-gepufferte Saline (engl. *TRIS buffered saline*)
TBST	TRIS-gepufferte Saline mit Triton X-100 (engl. *tris buffered saline and Triton X-100)*
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
VIPcre	Mauslinie, die Cre-Rekombinase in VIP-Zellen exprimiert
VIP-Zellen	VIP-exprimierende Zellen

1 Einleitung

Das Leben in einer sich stetig verändernden Umgebung stellt für alle Organismen eine ständige Herausforderung dar. Die Fähigkeit, Informationen über die Umwelt aufzunehmen und zu verarbeiten, ist essenziell, um dadurch möglichst optimal auf Veränderungen reagieren zu können. Dafür werden Umweltreize von Sinnesrezeptoren detektiert und in elektrische Information umgewandelt. In dieser Form können sie über das periphere Nervensystem, welches aus Spinalnerven, Hirnnerven und peripheren Ganglien besteht, an das zentrale Nervensystem, das durch Rückenmark und das Gehirn gebildet wird, weitergeleitet werden. Einen der phylogenetisch jüngsten Anteile des Gehirns bildet der Neokortex der Säugetiere, der sich in seiner Grundstruktur deutlich von älteren Hirnteilen wie dem Archi- oder Paläokortex unterscheidet, vielleicht weil er an besonders komplexen (kognitiven) Prozessen beteiligt ist. Unter anderem werden im Neokortex der Säuger Sinnesinformationen verarbeitet und integriert, Bewegungsabläufe geplant, Erinnerungen festgehalten und vor allem kognitive Prozesse ausgeführt. Über den Thalamus eingehende Sinnesinformationen werden zunächst in kortikalen Arealen verarbeitet, die auf den jeweiligen Reiz spezialisiert sind, beispielsweise dem primären visuellen, auditiven oder somatosensorischen Kortex, und von dort auf weitere Kortexareale, wie sekundäre und tertiäre Bereiche oder Assoziationskortizes, projiziert.

1.1 Somatosensorischer Kortex (Barrel-Kortex)

Der somatosensorische Kortex ist ein Teil des Neokortex und dient der zentralen Verarbeitung somatosensorischer Empfindungen, wie Berührung, Vibration, Druck und Temperatur. Von Rezeptoren registrierte Umweltreize werden über das periphere Nervensystem zum Hirnstamm und von dort weiter in den Thalamus geleitet. Die Neurone des Thalamus projizieren in den somatosensorischen Kortex. Wie alle neokortikalen Areale, weist dieser eine strukturelle Organisation in sechs zur Oberfläche des Gehirns parallelen Schichten (engl. *layer*; L) auf. Die thalamischen Projektionen enden bevorzugt in LIV (Staiger et al. 1996; Palmer et al. 2001; Feldmeyer 2012; Bopp et al. 2017). Dort werden die peripheren rezeptiven Felder in topographischer Organisation (somatotop) repräsentiert. Besonders empfindliche Körperregionen, beim Menschen beispielsweise die Fingerkuppen, sind dabei im Verhältnis großflächiger repräsentiert als weniger empfindliche, wie etwa der Rücken. Diese Verteilung unterscheidet sich zwischen Spezies. Bei Ratten und Mäusen ist die taktile Empfindung über die Schnurrhaare (Vibrissen) besonders fein. Durch rhythmisches Vor- und Zurückbewegen der Schnurr-

haare können die Tiere damit die Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit von Objekten diskriminieren (Woolsey und van der Loos 1970; Brecht et al. 1997) und sich in ihrer Umwelt orientieren (Hutson und Masterton 1986). Die Vibrissen erreichen dabei die Empfindlichkeit der Fingerspitzen von Primaten (Carvell und Simons 1990).

Anfang der 70er Jahre entdeckten Woolsey und van der Loos (1970) im somatosensorischen Kortex der Maus ein, auch am ungefärbten Präparat sichtbares, anatomisches Korrelat der Somatotopie. Dort finden sich in LIV fassförmige Strukturen, in denen die Dichte an Nervenzellen erhöht ist. Diese Barrels (engl. *barrel* = Fass), nach denen der somatosensorische Kortex vieler Nagetiere auch Barrel-Kortex genannt wird, repräsentieren in somatotoper Anordnung jeweils einzelne Vibrissen des Tieres. Diese Zuordnung zu einer spezifischen Vibrisse ist funktionell nicht auf LIV beschränkt, sondern zieht sich durch alle Schichten des Kortex. Jedes Barrel liegt somit in einer funktionellen Säule, der Barrel-assoziierten-Kolumne (Armstrong-James et al. 1992; Staiger et al. 2002). Kortikale Kolumnen finden sich im ganzen Kortex und stellen, nach dem Konzept der Kolumne als funktioneller Grundeinheit des Neokortex (Mountcastle 1957, 1997), die basalen Verarbeitungseinheiten synaptischer Schaltkreise dar (Douglas und Martin 1991). Anhand der Barrels können die Kolumnen leicht identifiziert werden, sodass sich der Barrel-Kortex als Modellsystem zur Erforschung neuronaler Netzwerke etabliert hat. Man erhofft sich, viele der dort gewonnenen Erkenntnisse auf andere Bereiche des Neokortex und auf andere Spezies übertragen zu können (Fox 2008).

1.2 Inhibitorische GABAerge Interneurone

Nervenzellen (Neurone) bilden die strukturelle und funktionelle Grundeinheit des Nervensystems. Ein Neuron besteht typischerweise aus einem Zellkörper (Soma) und zwei Typen von sich verzweigenden Fortsätzen, Dendrit und Axon. An den Ästen des Dendriten werden afferente Signale von anderen Neuronen aufgenommen und in elektrischer Form zum Soma weitergeleitet. Dort laufen die Informationen zusammen und können in Form von Aktionspotentialen (AP) über das Axon fortgeleitet und über Synapsen an andere Neurone übertragen werden. Klassische chemische Synapsen bestehen aus einer präsynaptischen Endigung am Axon, dem interzellulären synaptischen Spalt und der Postsynapse, meist am Dendriten oder Soma eines anderen Neurons. In der präsynaptischen Endigung befinden sich spannungsabhängige Calcium-Kanäle, die durch einen ankommenden elektrischen Reiz geöffnet werden, wodurch sich die Calcium-Konzentration in der Präsynapse erhöht. Das führt zur Ausschüttung chemischer Botenstoffe aus den präsynaptischen Vesikeln in den interzellulären synaptischen Spalt. An der Postsynapse befinden sich spezifische Rezeptoren, die durch Anlagerung der Boten-

stoffe aktiviert werden. Meist handelt es sich dabei um spezifische Ionenkanäle, die sich durch die Aktivierung öffnen. Aufgrund unterschiedlicher intra- und extrazellulärer Ionenkonzentrationen kommt es zu einem Ionenfluss, dem postsynaptischen Strom (engl. *postsynaptic current*; PSC), der zur Änderung des postsynaptischen Membranpotentials (PSP) führt. Eine Potentialänderung kann erregend, also exzitatorisch (EPSP), oder hemmend, also inhibitorisch (IPSP), auf die postsynaptische Zelle wirken. Depolarisierende Ströme werden als exzitatorische PSC (EPSC) und hyperpolarisierende Ströme als inhibitorische PSC (IPSC) bezeichnet. Mithilfe elektrophysiologischer Methoden können sowohl EPSP/IPSP als auch EPSC/IPSC gemessen und somit die neuronale Aktivität untersucht werden (Molleman 2003; Bear et al. 2007).

Die meisten neokortikalen Neurone sind exzitatorische Zellen. Sie werden in Pyramidenzellen (engl. *pyramidal cells*; PC), die etwa 70-80% aller kortikalen Neurone ausmachen, und nicht-Pyramidenzellen unterschieden, zu denen Sternpyramiden- (engl. *star pyramidal cells*) und bedornte Sternzellen (engl. *spiny stellate cells*) zählen (DeFelipe und Farinas 1992; Feldmeyer et al. 1999; Staiger et al. 2004a). Letztere werden als exzitatorische Interneurone angesehen, während Pyramidenzellen mit ihren Axonkollateralen Schaltkreise für lokale Informationsverarbeitung bilden und weitreichende Projektionen in andere kortikale und subkortikale Areale senden können (Douglas und Martin 2004; Feldmeyer 2012).

Die verbleibenden 15-20% bildet die Gruppe der inhibitorischen Interneurone, die γ-Aminobuttersäure (engl. *gamma-aminobutyric acid*; GABA) als inhibitorischen Neurotransmitter exprimieren (Gabbott und Somogyi 1986; DeFelipe und Farinas 1992; Markram et al. 2004). Sie sind weitaus heterogener als die exzitatorischen Zellen. Trotz ihrer geringeren Anzahl wird ihnen eine Vielzahl wichtiger Aufgaben zugeschrieben (McGarry et al. 2010). Sie sind essenziell für das Gleichgewicht kortikaler Erregung, indem sie auf dynamische Änderungen kortikaler Exzitation reagieren und unkontrollierte Erregung verhindern. Sie kontrollieren das zeitliche Feuermuster von Pyramidenzellen und synchronisieren kortikale Aktivität (McBain und Fisahn 2001; Pouille und Scanziani 2001; Markram et al. 2004; Klausberger und Somogyi 2008; McGarry et al. 2010). Mit diesen Aufgaben einhergehend werden Beeinträchtigungen der Funktion GABAerger Interneurone Bedeutung bei verschiedenen neurologischen und neuropsychiatrischen Erkrankungen beigemessen (McGarry et al. 2010), darunter Epilepsie (Cossart et al. 2001; Cobos et al. 2005; Trevelyan et al. 2006; Freund und Katona 2007; Trevelyan et al. 2007; Bohannon und Hablitz 2018), Rett-Syndrom (Dani et al. 2005), Angststörungen (Powell et al. 2003; Freund und Katona 2007), Tourette-Syndrom (Kalanithi et al. 2005) und Schizophrenie (Lewis et al. 2005; Gonzalez-Burgos und Lewis 2008). Obwohl inhibitorischen Interneuronen eine Vielzahl essenzieller Funktionen zugeschrieben werden, ist der spezifische Beitrag der einzelnen Zelltypen bislang unklar (Isaacson und Scanziani 2011).

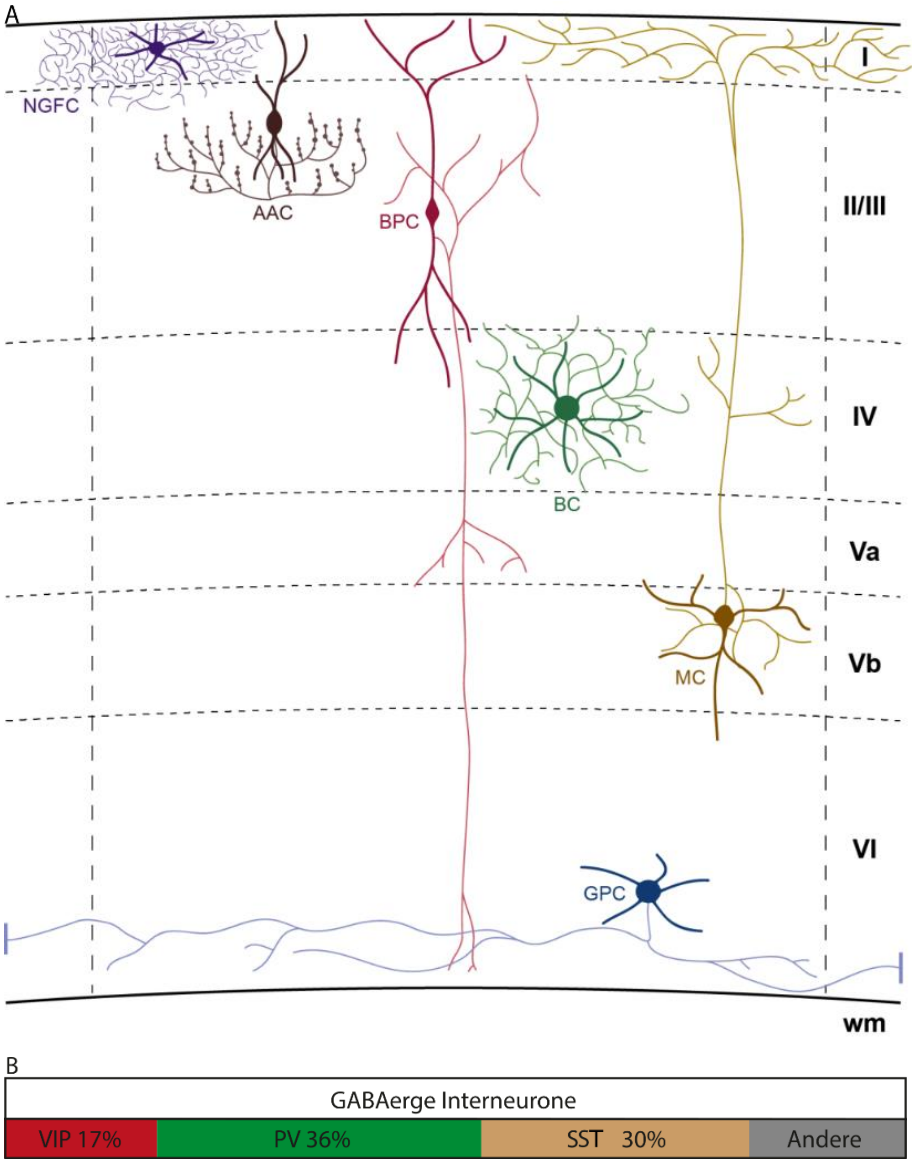

Abb. 1: Distinkte Subgruppen GABAerger Interneurone
(A) Derzeitige Autorenmeinung (Staiger et al. 2015a) zu klar abzugrenzenden GABAergen Interneuronenklassen, hier beispielhaft im primären somatosensorischen (Barrel-)Kortex. Horizontale gestrichelte Linien markieren Grenzen kortikaler Schichten, römische Zahlen bezeichnen die Schichten, *wm* die weiße Substanz. Verschiedene Neuronentypen sind farbkodiert dargestellt mit dunklerem Farbton für somatodendritische und hellerem Farbton für axonale Anteile.
Martinotti-Zellen (MC, gelb) sind durch ihre zur LI aufsteigenden und sich dort breit verzweigenden Axone eindeutig morphologisch charakterisiert. Sie weisen ein adaptierendes Feuermuster auf und exprimieren SST. Korbzellen (engl. *basket cells*; BC, grün) bilden Axone aus, die überwiegend horizontal und intralaminär verlaufen und korbartige Geflechte um ihre Zielzellen formen. Sie weisen ein schnelles Feuermuster auf und exprimieren PV. Die Interneuronenklasse der VIP-exprimierenden Zellen ist besonders heterogen, weist aber meist eine bipolare (engl. *bipolar cells*; BPC, rot) oder doppelt gebüschelte (engl. *bitufted*) somatodendritische Konfiguration und ein unregelmäßiges Feuermuster auf. Weitere Zelltypen sind axo-axonale Zellen (engl. *axo-axonic cells*; AAC, braun), neurogliaforme Zellen (engl. *neurogliaform cells*; NGFC, violett) und GABAerge Projektionsneurone (engl. *GABAergic projection neuron-cell type*; GPC, blau). Abb. modifiziert nach Staiger et al. 2015a.
(B) Neurochemische Unterscheidung GABAerger Interneurone anhand der Expression von vasoaktivem intestinalem Polypeptid (VIP), Parvalbumin (PV) und Somatostatin (SST). Mittels dieser Marker lassen sich drei große nichtüberlappende Subpopulationen GABAerger Interneurone unterscheiden, die in der Maus circa 80% der kortikalen GABAergen Interneurone ausmachen. 5HT3a-Rezeptor exprimierende, VIP-negative Zellen bilden die anderen ca. 20% (Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013).

Anhand ihrer morphologischen, molekularen und elektrophysiologischen Merkmale lassen sich inhibitorische Interneurone beschreiben und voneinander unterscheiden (Markram et al. 2004; Ascoli et al. 2008). Ihre Heterogenität zeigt sich eindrücklich in der distinkten Morphologie ihrer Dendritenbäume und besonders ihrer Axone, über die einzelne Interneuronenklassen identifizieren werden (Abb. 1A). Bestimmte molekulare Merkmale korrelieren gut mit den morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Zellen und bieten sich zu deren eindeutigen Unterscheidung an (Ascoli et al. 2008; Xu et al. 2010). So können im Kortex drei große, nichtüberlappende Subpopulationen GABAerger inhibitorischer Interneurone unterschieden werden, welche jeweils selektiv entweder vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), Parvalbumin (PV) oder Somatostatin (SST) exprimieren (Kawaguchi und Kubota 1997; Xu et al. 2010; Rudy et al. 2011; Pfeffer et al. 2013; Prönneke et al. 2015). Im primären sensorischen Kortex der Maus machen diese Gruppen gut zwei Drittel (61-76%) der gesamten GABAergen Interneurone aus (Xu et al. 2010; Hioki et al. 2013), im visuellen Kortex circa 80% (Pfeffer et al. 2013) (Abb. 1B).

1.2.1 VIP-exprimierende Zellen

VIP-exprimierende Zellen (VIP-Zellen) gehören neurochemisch zu den Serotonin-Rezeptor 3a (5HT3a-Rezeptor) exprimierenden Interneuronen, die kein SST oder PV besitzen (Kawaguchi und Kubota 1997; Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011). Allerdings sind sie sowohl bezüglich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften, als auch der Morphologie eine besonders heterogene Gruppe (Prönneke et al. 2015). Allen gemeinsam ist, dass sie das als Neurotransmitter und -modulator wirkende Peptidhormon VIP exprimieren. Sie machen etwa 10-17% der neokortikalen GABAergen Interneurone bei der Maus aus (Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Prönneke et al. 2015). Anhand ihrer somatodendritischen Konfiguration wurden VIP-exprimierende Zellen oft auch als Bipolarzellen (engl. *bipolar cells*) oder doppelt gebüschelte Zellen (engl. *bitufted cells*) bezeichnet (Cauli et al. 1997; Lee et al. 2010; Prönneke et al. 2015) (Abb. 1).

Elektrophysiologisch zeichnen sie sich durch einen besonders hohen Eingangswiderstand und eine dadurch bedingte leichte Erregbarkeit aus. Die meisten VIP-exprimierenden Zellen zeigen während einer langen depolarisierenden Strominjektion ein kontinuierlich adaptierendes (engl. *continuous adapting*) oder berstendes (engl. *bursting*) AP-Feuermuster oder generieren in Nähe der Feuerschwelle in unregelmäßigen zeitlichen Abständen AP (engl. *irregular spiking*) (Kawaguchi und Kubota 1996; Cauli et al. 1997; Karagiannis et al. 2009; Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011; Prönneke et al. 2015).

Sie kommen mit circa 60% besonders häufig in LII/III vor, finden sich aber in allen neokortikalen Schichten. VIP-exprimierende Zellen in LII/III unterscheiden sich in ihrer Morphologie von denen der tieferen Schichten. Ihr Dendritenbaum ist auf LI-II/III beschränkt, während sie Axonkollateralen radiär durch alle Schichten bis LVI entsenden. Die Dendritenbäume der VIP-exprimierenden Zellen in LIV-VI hingegen dehnen sich in alle Schichten aus, während ihre Axone sich weitgehend auf LV-VI beschränken (Connor und Peters 1984; Kawaguchi und Kubota 1997; Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013; Prönneke et al. 2015; Almási et al. 2019). Diese Morphologie legt nahe, dass VIP-exprimierende Zellen nicht nur verschiedene Eingänge über alle kortikalen Schichten integrieren können, sondern auch an *feedback*- oder *feedforward*-Inhibition in all diesen Schichten beteiligt sind. Ihnen wird eine wichtige Funktion in kortikalen Kolumnen oder sogenannten Mikrokolumnen zugeschrieben, da sie zumeist in disinhibitorische Schaltkreise eingebunden sind (Bayraktar et al. 2000; Staiger 2015).

1.2.2 PV-exprimierende Zellen

Die größte Subpopulation der neokortikalen GABAergen Interneurone bilden mit circa 36-44% die PV-exprimierenden Zellen (PV-Zellen), die das Calcium-bindende Protein Parvalbumin exprimieren und in der neurologischen Grundlagenforschung wie auch in der klinischen Forschung besondere Aufmerksamkeit erhalten haben (Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013; Pfeffer et al. 2013). Sie kommen in allen neokortikalen Schichten von LII bis LVI vor, besonders häufig in LIV (Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013; Almási et al. 2019).

Nahezu alle PV-exprimierenden Zellen sind schnell feuernde (engl. *fast spiking*) Neurone (Cauli et al. 1997; Kawaguchi und Kubota 1997; Ascoli et al. 2008; Rudy et al. 2011). Sie haben den niedrigsten Eingangswiderstand und die schnellste Membranzeitkonstante aller Interneurone. Sie können anhaltend hochfrequente Folgen kurzer AP feuern, die von ausgeprägten schnellen Nachhyperpolarisationen gefolgt werden (Connors und Gutnick 1990; Cauli et al. 1997; Markram et al. 2004). Dank dieser Eigenschaften können sie eine schnelle, zeitlich präzise und starke Inhibition ihrer Zielzellen bewirken (Rudy et al. 2011).

Morphologisch entsprechen die PV-exprimierenden Zellen zwei Interneuronenklassen, den Korb- (engl. *basket cells*) und den Kronleuchterzellen (engl. *chandelier cells*) (Kawaguchi und Kubota 1997; Ascoli et al. 2008) (Abb. 1). Korbzellen haben charakteristische Axone, die überwiegend intralaminär und horizontal zur Pia verlaufen, und korbartige Geflechte um die Somata ihrer Zielzellen bilden (Kawaguchi und Kubota 1993; Kisvárday et al. 1993; Hioki et al. 2013). Kronleuchterzellen hingegen bilden ihre Synapsen ausschließlich auf die axonalen Initialsegmente von Pyramidenzellen (Somogyi 1977).

Während die Funktion der Kronleuchterzellen noch schlecht verstanden und umstritten ist, werden den schnell feuernden Korbzellen eine dominante Rolle und zahlreiche Aufgaben im Rahmen der kortikalen Inhibition zugeschrieben, beispielsweise bei der Erzeugung und Aufrechterhaltung schneller kortikaler Rhythmen in der Gamma-Frequenz (Whittington et al. 1995; Traub et al. 2004; Bartos et al. 2007) und bei der Balance von Exzitation und Inhibition (Hasenstaub et al. 2005; Haider und McCormick 2009; Rudy et al. 2011). Ihnen wird Bedeutung beigemessen bei der Bewegungskontrolle (Isomura et al. 2009), Gehirnfunktionen höherer Ordnung, wie Gedächtnis (Letzkus et al. 2011), und psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie (Lewis et al. 2005; Lewis et al. 2012). Die genaue Struktur der Verschaltungen von PV-exprimierenden Zellen zu erforschen, ist deshalb von besonderer Wichtigkeit (Bartos et al. 2007; Hioki et al. 2013).

1.3 Martinotti-Zellen

Martinotti-Zellen (engl. *Martinotti cells*; MC) wurden erstmals 1889 von Carlo Martinotti beschrieben und ihre Beteiligung an kortikaler sensomotorischer Informationsverarbeitung bereits 1899 von Santiago Ramon y Cajal vermutet. Sie kommen ubiquitär in allen Arealen des Neokortex und in einer Vielzahl von Spezies vor (Wang et al. 2004), beispielsweise im primären somatosensorischen (McGarry et al. 2010; Rudy et al. 2011; Lee et al. 2013), visuellen (Valverde 1976; Pfeffer et al. 2013), auditorischen (Pi et al. 2013) und frontalen Kortex der Maus (McGarry et al. 2010), im visuellen und frontalen Kortex der Ratte (Ruiz-Marcos und Valverde 1970; Kawaguchi und Kubota 1997), in mehreren neokortikalen Arealen von Erdmaus, Hamster, Igel, Fledermaus, Hund, Kuh und Schaf (Ferrer et al. 1986a, 1986b), dem präfrontalen Kortex von Affen (Gabbott und Bacon 1996) und ebenso beim Menschen im somatosensorischen, motorischen und visuellen Kortex (Ramon y Cajal 1899; Marin-Padilla 1970; Luth et al. 1994). Sie scheinen somit ein verbreiteter und wichtiger Bestandteil kortikaler Schaltkreise zu sein.

In der Tat werden funktionelle Beeinträchtigungen von MC bzw. SST-exprimierenden Zellen speziell mit Epilepsie (Sloviter 1987, 1991; Bohannon und Hablitz 2018), traumatischen Verletzungen des Gehirns (Lowenstein et al. 1992) und der Alzheimer-Krankheit (Davies et al. 1980; Armstrong et al. 1985; Roberts et al. 1985; Grouselle et al. 1998) in Verbindung gebracht. Den funktionellen Beitrag und die Konnektivität der MC zu verstehen, ist daher von besonderer Bedeutung (Oliva et al. 2000; Zhou et al. 2020).

Alle MC exprimieren den inhibitorischen Kotransmitter SST, der auch von X94-Zellen, einer selteneren Interneuronenklasse (von wahrscheinlich Nicht-Martinotti-Zellen), exprimiert wird

(Kawaguchi und Kubota 1998; Wang et al. 2004; Ma et al. 2006; McGarry et al. 2010). MC exprimieren weder VIP noch PV (Xu et al. 2010; Hioki et al. 2013; Pfeffer et al. 2013). Insgesamt machen die SST-exprimierenden Neurone etwa 30% der GABAergen Interneurone im primären somatosensorischen Kortex der Maus aus (Rudy et al. 2011). Anhand von morphologischen und elektrophysiologischen Kriterien können MC leicht von der kleineren Subgruppe der X94-Zellen unterschieden werden (Ma et al. 2006). Zudem kommen X94-Zellen (als vermutliche Korbzellvariante) überwiegend in LIV vor, während MC sich in allen neokortikalen Schichten von LII bis LVI finden (Kawaguchi und Kubota 1997; Wang et al. 2004; Ma et al. 2006; Hioki et al. 2013).

Aufgrund ihres relativ hohen Eingangswiderstands und einer niedrigen Rheobase, sind MC auch als Interneurone mit niedriger Feuerschwelle (engl. *low-threshold-spiking*) bekannt (Kawaguchi 1995). Des Weiteren zeigen die meisten MC in der elektrophysiologischen Analyse während einer langen depolarisierenden Strominjektion ein kontinuierlich adaptierendes AP-Feuermuster. Die AP weisen eine komplexe Nachhyperpolarisation auf, welche aus einer ersten und einer zweiten Nachhyperpolarisation besteht, getrennt durch eine angedeutete Nachdepolarisation. Auf Applizierung eines hyperpolarisierenden Stroms zeigen MC eine deutliche Senke (engl. *sag*) (Wang et al. 2004; Ascoli et al. 2008; Karagiannis et al. 2009).

MC haben meist ein ovales Soma, von dessen entgegengesetzten Polen insgesamt zwei bis vier vertikal orientierte Dendriten, einer doppelt gebüschelten (engl. *bitufted*) bis multipolaren dendritischen Morphologie entsprechend, entspringen. Diese verzweigen sich mehrfach, beschränken sich aber mit einer horizontalen Ausdehnung von etwa 300 µm in der Regel auf ihre assoziierte Kolumne. In den meisten Fällen entspringt an der ersten oder zweiten Verzweigung eines Dendriten das Axon (Zhou et al. 2020). Durch dessen ausgeprägte, zur LI aufsteigende Kollateralen sind MC klar morphologisch charakterisiert (Abb. 1). Dort breiten sich die Äste horizontal, bis über die benachbarten Kolumnen hinweg, aus (Wang et al. 2004; McGarry et al. 2010).

1.4 Verschaltungen im somatosensorischen Kortex

Durch Verschaltung der verschiedenen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronenklassen mit- und untereinander, ergeben sich komplexe neuronale Schaltkreise. Dabei stellen kortikale Kolumnen, laut dem derzeit favorisierten Konzept zur Erklärung kortikaler Informationsverarbeitung, die basalen Verarbeitungseinheiten dieser Schaltkreise im Kortex dar (Douglas und Martin 1991; Mountcastle 1997). Die Verbindungen exzitatorischer Neurone wurden bereits eingehend untersucht und ein kanonisches Modell des kortikalen Informationskreislaufes ent-

lang dieser Zellen gilt heute als allgemein akzeptiert (Staiger et al. 2000; Douglas und Martin 2004; Lefort et al. 2009; Hooks et al. 2011). Dieser vereinfachte Schaltkreis beginnt in LIV, in der ein Großteil der sensorischen Informationen über den Thalamus eingehen (Staiger et al. 1996; Palmer et al. 2001; Feldmeyer 2012; Bopp et al. 2017). Exzitatorische Zellen aus LIV projizieren in die supragranuläre LII/III (Staiger et al. 2004a). Bislang wurde in Nagern keine eindeutige Grenze zwischen den Schichten II und III identifiziert, sodass diese hier als LII/III bezeichnet wird. Projektionen von dort enden auf Neuronen der infragranulären Schichten V und VI (Douglas und Martin 1991; Kampa et al. 2006; Schubert et al. 2007; Staiger et al. 2015b).

Durch inhibitorische GABAerge Interneurone werden die Neurone dieser exzitatorischen Schleife beeinflusst. Ihre Verschaltungen sind nicht zufällig, vielmehr projizieren sie in bestimmten Schaltmustern jeweils bevorzugt auf spezifische Zielzellen (Isaacson und Scanziani 2011). Es gibt verschiedene inhibitorische Schaltmuster, darunter vorwärtskoppelnde (engl. *feedforward*), rückwärtskoppelnde (engl. *feedback*) und laterale Inhibition (Roux und Buzsaki 2015; Staiger et al. 2015a). MC sind zentral an solchen Verschaltungen beteiligt, beispielsweise vermitteln sie in einer disynaptischen Verschaltung zwischen benachbarten Pyramidenzellen eine starke laterale oder *feedback*-Inhibition und regulieren damit vermutlich effektiv die kortikale Aktivität (Silberberg und Markram 2007).

Die neueste Entdeckung dieser inhibitorischen Schaltmuster ist die disynaptische Disinhibition, bei der ein GABAerges Interneuron ein zweites GABAerges Interneuron inhibiert, welches wiederum auf ein exzitatorisches Neuron projiziert. Infolge dieser Verschaltung werden die inhibitorischen Eingänge des zweiten GABAergen Interneurons auf das exzitatorische Neuron aufgehoben. Aus einer Vernetzung GABAerger Interneurone untereinander resultiert somit das Phänomen der Disinhibition, mittels dessen die inhibitorischen Interneurone Einfluss auf die kortikale Aktivität und Informationsverarbeitung nehmen (Gibson et al. 1999; Pfeffer et al. 2013; Staiger et al. 2015a; Walker et al. 2016).

Dabei fällt eine Spezifität der einzelnen Interneuronenklassen nicht nur für die Art der Zielzellen, sondern auch für deren bestimmte subzelluläre Kompartimente auf (Isaacson und Scanziani 2011). Jeder Typ GABAerger Interneurone projiziert auf seine postsynaptischen Neurone in spezifischen bevorzugten subzellulären synaptischen Lokalisationen. Dabei können vier generelle Muster unterschieden werden: Inhibition des axonalen Initialsegments, der somatischen und perisomatischen Region, des Dendriten oder des distalen Dendriten (DeFelipe 1997; Thomson und Deuchars 1997; Somogyi et al. 1998). Der Effekt der Inhibition ist abhängig von den Lokalisationen der Synapsen. Die Inhibition von axonalen Initialsegmenten

ermöglicht es, die Generierung und die zeitliche Koordinierung von AP und somit die Ausgänge der Zelle zu beeinflussen (Somogyi 1977). Durch Innervation der somatischen und perisomatischen Region kann die Verstärkung von summierten Potentialen und somit das Feuern von AP kontrolliert werden (Buhl et al. 1995; Miles et al. 1996; Wang et al. 2002). Interneurone mit diesem Inhibitionsmuster sind an der Abstimmung und der Synchronisierung neuronaler Aktivität beteiligt (Cobb et al. 1995; Pouille und Scanziani 2001). Durch bevorzugte Innervation des Dendriten kann die dort stattfindende Verarbeitung und Integration synaptischer Eingänge (Markram et al. 2004), die Generierung und Weiterleitung dendritischer Kalzium-Spikes (Larkum et al. 1999) und die synaptische Plastizität, lokal oder durch Interaktion mit sich rückwärts ausbreitenden AP (Magee und Johnston 1997), beeinflusst werden. Die Inhibition distaler dendritischer Bereiche hingegen könnte dem jeweiligen Interneuron erlauben, speziell die lokale dendritische Integration dortiger synaptischer Eingänge zu beeinflussen (Markram et al. 2004).

Ein prominentes Beispiel für die gezielte Innervation distaler dendritischer Büschel sind MC. Durch ihre charakteristischen aufsteigenden Axone inhibieren sie bevorzugt in LI die distalen Dendriten von Pyramidenzellen aller Schichten, die dort zusammenlaufen (Kawaguchi und Kubota 1997; Wang et al. 2004; Silberberg und Markram 2007; McGarry et al. 2010; Staiger 2015; Zhou et al. 2020). Kürzlich wurde dieses Muster für SST-exprimierende O-LM-Zellen (*Oriens-lacunosum-moleculare*-Zellen) im Hippocampus, die MC ähneln, bestätigt (Bloss et al. 2016). Ebenfalls bilden die meisten VIP-exprimierenden Zellen Synapsen auf kleine und mittelgroße Dendriten sowohl von GABAergen Interneuronen als auch von Pyramidenzellen (Hajos et al. 1988; Peters 1990; Kawaguchi und Kubota 1996, 1997; Hioki et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Zhou et al. 2017). Aber auch ein seltenerer Typ VIP-exprimierender Korbzellen (engl. *basket cells*) mit perisomatischen Synapsen auf andere Zellen wurde beschrieben (Acsady et al. 1996; Kawaguchi und Kubota 1996; Wang et al. 2002). Dagegen bevorzugen PV-exprimierende Zellen die (peri-)somatische Region und proximale Dendriten von Pyramidenzellen (Kawaguchi und Kubota 1996; Tamas et al. 1997; Thomson und Deuchars 1997; Kubota et al. 2015) und sollen sich bevorzugt gegenseitig inhibieren (Hioki et al. 2013; Pfeffer et al. 2013). Eine Ausnahme stellt der Subtyp der Kronleuchterzellen dar, deren Axone ausschließlich auf das Initialsegment der Axone von Pyramidenzellen abzielen (Somogyi 1977; Ascoli et al. 2008). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass PV-exprimierende Zellen auch auf MC projizieren. Diese Inhibition von MC durch PV-exprimierende Zellen stellt ein neues Konzept der inhibitorischen Schaltkreise dar und ist bisher nur im Barrel-Kortex und im primären visuellen Kortex beobachtet worden (Jiang et al. 2015; Karnani et al. 2016b; Walker et al. 2016). Auch für SST-exprimierende Zellen in der Amygdala wurde eine Inhibition durch PV-exprimierende

Zellen beschrieben. Diese Inhibition erfolgt nach akustischer Stimulation und führt zur Disinhibition exzitatorischer Hauptzellen (Wolff et al. 2014).

Diverse Studien weisen auf eine physiologische Relevanz der Inhibition von MC hin. So konnte gezeigt werden, dass VIP-exprimierende Zellen durch Eingänge aus dem primären motorischen Kortex erregt werden und dies zu Inhibition SST-exprimierender Zellen und infolge dessen zur Disinhibition von Pyramidenzellen führt (Lee et al. 2013; Fu et al. 2014). Eine solche Beeinflussung der Informationsverarbeitung durch Eingänge von kortikalen Arealen höherer Ordnung wird auch als *top-down*-Verschaltung (engl. *top-down pathway*) bezeichnet. Zudem entdeckten Gentet et al. 2012, dass bei wachen Mäusen infolge von Berührung einer Vibrisse in der entsprechenden Kolumne im Barrel-Kortex ausschließlich SST-exprimierende Zellen hyperpolarisieren und demzufolge inhibiert werden. Alle anderen umgebenden Zellen hingegen, sowohl inhibitorische als auch exzitatorische, zeigen eine Depolarisation infolge einer Vibrissenstimulation. Da sensorische Eingänge nur über exzitatorische Verbindungen in den Kortex übertragen werden, muss eine intrakortikale inhibitorische Interneuronenklasse, die nicht identifiziert wurde, Eingänge aus dem Thalamus erhalten und die Inhibition der MC vermitteln (Gentet et al. 2012). Solche Verschaltungen sensorischer Eingänge werden auch als *bottom-up*-Verschaltungen (engl. *bottom-up-pathway*) bezeichnet. Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass PV-exprimierende Zellen die Quelle dieser Inhibition sein könnten (Walker et al. 2016).

Durch Inhibition von MC werden deren postsynaptischen Ziele, also insbesondere die Dendriten von Pyramidenzellen in LI, disinhibiert (Gentet et al. 2012; Lee et al. 2013). Des Weiteren inhibieren MC sowohl VIP- als auch PV-exprimierende Zellen, (Wang et al. 2004), jedoch keine anderen MC (Pfeffer et al. 2013). Damit können sie selbst Einfluss auf die Quelle ihrer eigenen Inhibition nehmen und die inhibitorische Wirkung von VIP- und PV-exprimierenden Neuronen einschränken.

Während VIP- und PV-exprimierende Zellen als Ursprung der Inhibition von MC identifiziert sind, bleibt die subzelluläre Lokalisation der Synapsen, die entscheidend für den Effekt der Inhibition ist, bislang unbekannt. Im Dendriten findet schon eine wesentliche Verarbeitung von Informationen statt, bevor diese das Soma erreichen. Um kortikale Schaltkreise und deren Funktion verstehen zu können, ist es deshalb erforderlich, über das Wissen um die bloße Existenz von Verbindungen hinaus, auch Kenntnis der dendritischen Lokalisationen dieser Synapsen zu haben (London und Häusser 2005; Hu und Vervaeke 2018).

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen Eigenschaften inhibitorischer Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V im primären somatosensorischen Kortex der Maus untersucht werden, insbesondere die subzelluläre dendritische Lokalisation der Synapsen. Folgende Fragestellungen waren Ausgangspunkt dieser Arbeit:

1. Werden Martinotti-Zellen im primären somatosensorischen Kortex der Maus neben VIP- auch von PV-exprimierenden Zellen zuverlässig inhibiert?
2. Wie unterscheiden sich die elektrophysiologischen Charakteristika der synaptischen Projektionen dieser beiden Interneuronenklassen auf Martinotti-Zellen?
3. Welchen Verlauf weisen die Axone der präsynaptischen Zellen im Verhältnis zu den postsynaptischen Martinotti-Zellen auf?
4. Für ein Verständnis der Funktion dieser Verschaltungen stellt sich insbesondere die Frage nach der subzellulären dendritischen Lokalisation dieser Synapsen.
   Unterscheiden sich die Lokalisationen der Synapsen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf Martinotti-Zellen voneinander? Ähnelt sich das Muster der subzellulären Verteilung dieser Synapsen dem beschriebenen Muster auf andere postsynaptische Interneurone oder Pyramidenzellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden bereits erhobene Daten aus kombinierten optogenetischen und elektrophysiologischen Versuchen ausgewertet. Mit lichtabhängigen Ionenkanälen transduzierte VIP- und PV-exprimierende Zellen wurden *in vitro* selektiv per Laser stimuliert und deren inhibitorische Projektionen auf Martinotti-Zellen mit Hilfe der *Patch-clamp*-Technik (siehe Abschnitt 2.2.1) detektiert. So konnten funktionelle Verschaltungen zelltypspezifisch untersucht werden. Durch gitterförmiges Scannen des fokussierten Laserstrahls über die Umgebung einer abgeleiteten Martinotti-Zelle, konnte der Verlauf der darauf projizierenden transduzierten Axone untersucht werden. Abschließend wurden, mittels pharmakologischer Blockade von Aktionspotentialen, selektiv Präsynapsen von VIP- oder PV-exprimierenden Zellen im Bereich des Dendritenbaums der abgeleiteten Martinotti-Zelle in einem gitterförmigen Muster zu synaptischer Übertragung angeregt. Die postsynaptisch aufgezeichneten elektrophysiologischen Messkurven wurden für jedes stimulierte Gitterfeld analysiert und in einzelne Pixel-Werte umgewandelt. Durch Überlagerung der Pixel-Werte mit dem rekonstruierten Dendritenbaum der Martinotti-Zelle wurden Kartogramme der subzellulären Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf Martinotti-Zellen erstellt. Die Untersuchung dieser inhibitorischen Projektionen, ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und

der distinkten dendritischen Lokalisationen ihrer Synapsen sollen das Verständnis der komplexen Interaktionen GABAerger Interneurone erweitern.

2 Material und Methoden

Die elektrophysiologischen *in-vitro*-Experimente an akuten Gehirnschnitten von transgenen Mäusen, die in *Patch-clamp*-Ableitungen in Kombination mit optogenetischen Verfahren bestanden, wurden von Herrn Dr. Mirko Witte aus der Abteilung Neuroanatomie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die dabei gewonnenen elektrophysiologischen Rohdaten wurden vom Autor der vorliegenden Dissertation ausgewertet, analysiert und grafisch aufgearbeitet. Alle tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten unter strenger Einhaltung des im Jahre 2013 modifizierten deutschen Tierschutzgesetzes von 2010.

2.1 Versuchstiere und Präparation von Gehirnschnitten

Für die Experimente wurden die Cre-Rekombinase-exprimierenden Mauslinien VIPcre ($VIP^{tm1(cre)Zjh}$/J) und PVcre ($Pvalb^{tm1(cre)Arbr}$/J) mit der GIN-Mauslinie (FVB-Tg(GadGFP)45704Swn) gekreuzt (Oliva et al. 2000; Hippenmeyer et al. 2005; Taniguchi et al. 2011). In GIN-Mäusen wird das Fluoreszenzprotein eGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*) in sogenannten GIN-Zellen (GFP-exprimierende inhibitorische Neurone), einer Subpopulation SST-positiver Zellen exprimiert (Oliva et al. 2000; Fischer 2018). Diese Gruppe der SST-positiven Neurone wird vor allem durch MC gebildet; sie sollen etwa 80% der GFP-exprimierenden Neurone in GIN-Mäusen ausmachen (Ma et al. 2006; Fanselow et al. 2008; McGarry et al. 2010).

Die gekreuzten, zweifach transgenen Mäuse der Linien VIPcre/GIN (n = 10) und PVcre/GIN (n = 11) waren beiderlei Geschlechts und wurden an der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet und gehalten. Alle Mauslinien wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

Im Alter zwischen 13 und 39 Tagen postnatal (P13-39) wurde den Mäusen in einem stereotaktischen Verfahren (Cetin et al. 2006; Harris et al. 2012) ein Cre-abhängiger adeno-assoziierter Virus (AAV6.EF1.DIO.hChR2(H134R)-mCherry) injiziert. Der Virus wurde von Dr. Sebastian Kügler hergestellt, freundlicherweise durch Prof. Dr. Swen Hülsmann zur Verfügung gestellt und in einem stereotaktischen Verfahren von Dr. Julien Guy in den Barrel-Kortex der Mäuse injiziert. Mittels des viralen Vektors wurden spezifisch in VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen lichtabhängige Ionenkanäle (Channelrhodopsin-2; ChR2) und das Fluoreszenzprotein mCherry exprimiert (Atasoy et al. 2008). Die Injektion des in steriler PBS

(Phosphat-gepufferter Saline) gelösten Virus erfolgte unter Analgesie (Lidocain subkutan und Metamizol peroral) und konstanter Anästhesie (ca. 3% Isofluran), in das Barrel-Feld des primären sensorischen Kortex. Dabei wurde 200 nl Virus pro Injektionsstelle, sechs bis neun je Hemisphäre, in 200-800 µm Tiefe injiziert. Die Mäuse wurden für mindestens zwei weitere Wochen am Leben gehalten, um eine ausreichende Expression des ChR2 zu gewährleisten.

Zwei bis fünf Wochen nach der Injektion (P31-61) wurden die Versuchstiere mit Isofluran betäubt und durch Dekapitation getötet. Nach der Eröffnung des Schädels wurde das Gehirn herauspräpariert und in eiskalte, mit Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2) gesättigte Präparationslösung (Tab. A2 im Anhang), überführt. Von beiden Hemisphären wurden auf Höhe des Barrel-Kortex je fünf bis sechs thalamokortikale Schnitte (300 µm) mit dem Vibratom (Leica VT 1200S, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die Hirnschnitte wurden für mindestens 30 Minuten in Carbogen-gesättigter, künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (engl. *artificial cerebrospinal fluid*; ACSF) (Tab. A2 im Anhang) bei 32°C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur gehalten. Für die Experimente wurden einzelne Schnitte in eine Ableitkammer überführt.

2.2 Elektrophysiologie und Optogenetik

2.2.1 Die Patch-Clamp-Technik und sCRACM

Eine der wichtigsten neurophysiologischen Messmethoden ist die *Patch-clamp*-Technik, mit der sich unter anderem der Strom, der durch einzelne membranständige Ionenkanäle fließt, oder auch alle Ströme über die gesamte Membran einer Zelle, messen lassen. Sie wurde 1976 von Neher und Sakmann entwickelt und 1981 von Hamill et al. zur sogenannten *tight-seal*-Variante modifiziert. Dabei wird eine mit Elektrolytlösung gefüllte feine Glaspipette mit einem Durchmesser von etwa 2 µm, die als Messelektrode dient, an eine Zelle herangeführt und auf die Membran aufgesetzt. Durch vorsichtiges Ansaugen der Membran wird die elektrische Isolation eines Membranstücks (engl. *patch*) gegenüber der restlichen Membranoberfläche mit einem hochohmigen elektrischen Widerstand von mehr als 1 GΩ (engl. *giga-seal*) erreicht. Aus dieser sogenannten *Cell-attached*-Konfiguration kann durch einen weiteren kurzen Saugimpuls der *patch* aufgerissen und damit eine direkte, elektrisch leitende Verbindung zwischen Pipettenlösung und Zytoplasma hergestellt werden, die *Whole-cell*-Konfiguration. Diese ermöglicht die Ableitung des Intrazellulärraums gegenüber dem Extrazellulärraum, dabei werden die Ströme aller Ionenkanäle in der Zellmembran gemessen. Nach dem Aufreißen des Patches erfolgt eine Vermischung der Pipettenlösung mit dem Zytoplasma, die sich zur Kontrolle der intrazellulä-

ren Ionenkonzentrationen, der gezielten Blockade von Ionenkanälen und dem Einbringen von Biocytin für die spätere Färbung der Zelle nutzen lässt.

Während der Messung der Ströme, kann die Zelle auf ein vom Experimentator festgelegtes Membranpotential geklemmt werden (engl. *voltage-clamp*; Spannungsklemme). Dabei wird von der Messelektronik stetig das Membranpotential gemessen und Abweichungen von dem eingestellten Haltepotential sofort durch eine kompensatorische Strominjektion ausgeglichen. Dieser injizierte Strom entspricht im Betrag den Strömen über die Zellmembran und ist ein Maß für die Aktivierung von Ionenkanälen (Molleman 2003). In dieser Arbeit wurden alle Messungen von lichtinduzierten postsynaptischen Strömen an MC, auch unter pharmakologischen Bedingungen, in der *Voltage-clamp*-Konfiguration vorgenommen.

Im Gegensatz dazu wird in der *Current-clamp*-Konfiguration kein Membranpotential geklemmt, sondern die Zelle bei ihrem Ruhemembranpotential belassen. Diese Konfiguration eignet sich gut für die elektrophysiologische Charakterisierung von Neuronen. Durch definierte Strominjektionen, deren Stromstärke durch den Experimentator variiert werden kann, werden die Ionenströme über die Membran beeinflusst. Die resultierenden Membranpotentialänderungen werden aufgezeichnet. Durch Überschreiten der Feuerschwelle der Zelle können AP induziert werden (Molleman 2003). In dieser Arbeit wurden alle Messungen zur Charakterisierung der Neurone, sowie Messungen lichtinduzierter Depolarisation der ChR2-transduzierten VIP- oder PV-exprimierenden Zellen, in der *Current-clamp*-Konfiguration durchgeführt.

Seit der ersten direkten Stimulation eines Nervs vor über 200 Jahren wurden für die Stimulation von Neuronen meist Elektroden benutzt. Damit lässt sich eine zeitlich präzise und wiederholbare Aktivität induzieren, allerdings entweder nur von einer einzelnen Zelle oder aber unspezifisch von allen neuronalen Strukturen in Umgebung der Elektrode. Neuerdings ermöglichen optogenetische Verfahren eine hohe zeitliche, örtliche und vor allem genetische Spezifität der Stimulation (Scanziani und Häusser 2009). Die Kombination optogenetischer Methoden mit der *Patch-clamp*-Technik ermöglicht die kontrollierte Stimulation einer spezifischen ChR2-transduzierten neuronalen Population und die Messung der Eingänge von dieser gesamten Population auf eine definierte postsynaptische, nicht transduzierte Zelle.

Dabei werden die lichtabhänigigen ChR2-Ionenkanäle selektiv in einer spezifischen neuronalen Population exprimiert. Bei Stimulation mit Licht, dessen Wellenlänge dem Absorptionsmaximum des Channelrhodopsins entspricht, wird der Transmembrankanal für Kationen, insbesondere Natrium-Ionen, permeabel und führt so bei typischen intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen zur Depolarisation der Neurone. Bei ausreichender Expression der

Kanäle kann es zur überschwelligen Depolarisation kommen und somit das Feuern von AP induziert werden (Boyden et al. 2005; Knöpfel und Boyden 2012).

In einer Modifikation der Methode wird, durch Blockade spannungsaktivierter Natriumkanäle mittels Einwaschens von Tetrodotoxin (TTX), die Generation von AP verhindert. Somit erfolgt die Depolarisation von Kompartimenten ChR2-transduzierter Zellen ausschließlich im Bereich eines fein skalierbaren Laserstrahls, ohne aktiv fortgeleitet zu werden. Selektiv an stimulierten Präsynapsen kommt es bei ausreichend großer Depolarisation zur Ausschüttung von Neurotransmittern. Um eine durch repolarisierende Kaliumkanäle bedingte Abschwächung der lichtinduzierten präsynaptischen Depolarisation zu verringern, wird zusätzlich der Kalium-Kanal-Blocker 4-Aminopyridin (4-AP) in die Extrazellularlösung eingewaschen (Shu et al. 2007; Petreanu et al. 2009).

Die resultierende synaptische Übertragung löst an der postsynaptischen Zelle einen PSC aus, die mittels der *Whole-cell-patch-clamp*-Technik gemessen werden können. Lichtinduzierte synaptische Übertragung von der präsynaptischen (ChR2-transduzierten) Zellpopulation auf die abgeleitete Zelle findet nur dann statt, wenn sich im Bereich des Laserstrahls Synapsen von Axonen ChR2-positiver Zellen auf den Dendriten der abgeleiteten Zelle befinden. Aufgrund der Wirkung von TTX ist eine aktive Weiterleitung der Depolarisation entlang der Axone der ChR2-transduzierten Zellen, oder die Möglichkeit polysynaptischer Eingänge, ausgeschlossen. Durch Skalierung des Laserstrahls auf eine kleine Fläche (50x50 µm) und gitterförmiges, schrittweises Abfahren der gesamten Umgebung der abgeleiteten Zelle mit jeweiliger kurzer Stimulation (1 ms) lassen sich somit die spezifischen synaptischen Eingänge am gesamten Dendritenbaum der postsynaptischen Zelle aufzeichnen und kartieren. Diese „subzelluläre ChR2-assistierte Schaltkreis-Kartierung“ (engl. *subcellular ChR2-assisted circuit mapping*; sCRACM) genannte Methode, mit der die Lokalisationen der synaptischen Eingänge am Dendritenbaum der abgeleiteten Zelle identifizierbar sind, wurde im Jahr 2009 von Petreanu et al. veröffentlicht.

2.2.2 Versuchsaufbau und -protokoll

Für die Experimente wurde jeweils ein einzelner Hirnschnitt in die Ableitkammer auf dem Objekttisch eines aufrechten Durchlichtmikroskops (Zeiss Axio Examiner, Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) überführt. Dort wurde er durch einen mit Nylonfäden bespannten Platinring fixiert und bei 32°C kontinuierlich mit Carbogen-gesättigter ACSF umspült. Über den regulierbaren Zu- und Ablauf (1-3ml/min) konnten Pharmaka (TTX und 4-AP) kontrolliert eingewaschen werden.

Zum Auffinden der zu untersuchenden Neurone wurden die ChR2-transduzierten, mCherry-exprimierenden VIP- und PV-exprimierenden Zellen, bzw. die GFP-exprimierenden MC mit einer Quecksilber-Bogenlampe zum Fluoreszieren angeregt. Nur fluoreszierende Zellen in LII/III oder LV wurden für die elektrophysiologischen Ableitungen gewählt.

Eine Patchpipette aus Borosilikatglas wurde mit Pipettenlösung (kalium- oder cäsiumbasiert, siehe Tab. A1) befüllt, der kurz zuvor Biocytin (0,3-0,5%) für eine spätere morphologische Rekonstruktion hinzugefügt worden war. Die Patchpipette wurde in einen Elektrodenhalter eingespannt und mit Hilfe eines Mikromanipulators präzise an die ausgewählte fluoreszierende Zelle herangeführt und auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch einen leichten Unterdruck wurde die *Cell-attached*-Konfiguration mit einem stabilen Kontakt bei Werten für die Verbindungsdichte von 2-6 GΩ hergestellt. Mittels eines kurzen Saugimpulses wurde daraufhin der Membranpatch unter der Pipette durchbrochen und so die *Whole-cell*-Konfiguration erreicht, in der die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt wurden. Die Ableitungen wurden mit einem diskontinuierlichen *Patch-clamp*-Verstärker (NPI SEC-05X, NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland) durchgeführt und mit dem Datenerfassungs- und Analyseprogramm CED Signal 5.09 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, England) aufgezeichnet. In *Whole-cell*-Konfiguration wurde eine Kapazitätskompensation durchgeführt. Ausschließlich Zellen mit einem Zugangswiderstand <25 MΩ wurden in der Auswertung berücksichtigt. Die Messungen wurden nicht auf das Diffusionspotential (engl. *liquid junction potential*) korrigiert, das rechnerisch circa +17 mV beträgt.

Abhängig vom Experiment kamen zwei verschiedene Pipettenlösungen zum Einsatz. Die ChR2-transduzierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen, sowie sieben MC, wurden mit einer kaliumbasierten Lösung abgeleitet, welche der Intrazellularlösung weitgehend ähnelt und eine eingehende elektrophysiologische Charakterisierung ermöglicht. *Patch-clamp*-Ableitungen von MC im Rahmen optogenetischer Versuchsteile wurden hingegen stets mit cäsiumbasierter Pipettenlösung durchgeführt. Cäsium-Ionen blockieren Kalium-Kanäle, dies verhindert eine normale elektrophysiologische Charakterisierung der abgeleiteten Neurone, ermöglicht aber das somatische Ableiten von Potentialänderungen auch der distalen Dendriten (Adelman und Senft 1966). Denn eine wichtige Limitation der *Patch-clamp*-Technik ist der sogenannte *space-clamp*-Fehler. Dieser besagt zum einen, dass ein Haltepotential, auf das ein Neuron am Soma experimentell geklemmt ist, in zunehmender Distanz schwächer wirken kann. Zum anderen werden distale Potentialänderungen bei ihrer elektrotonischen dendritischen Weiterleitung zum Soma abgeschwächt, sodass sie dort gegebenenfalls nicht messbar sind (Bar-Yehuda und Korngreen 2008; Williams und Mitchell 2008). Die Blockade von Kaliumkanälen durch Cäsium bewirkt einen erhöhten Membranwiderstand und somit eine reduzierte Abschwächung der

synaptischen Eingänge bei ihrer Fortleitung am Dendritenbaum (Stuart und Spruston 1998). In Vorversuchen wurde mittels Photolyse von *caged*-GABA experimentell ermittelt, dass nur unter dieser Bedingung distale dendritische Eingänge per *Patch-clamp*-Ableitung am Soma der MC messbar sind (Walker 2016).

Zur Erfassung der elektrophysiologischen Charakteristika der abgeleiteten Zellen unter Verwendung der kaliumbasierten Pipettenlösung, wurden unmittelbar nach Erreichen der *Whole-cell*-Konfiguration *Current-clamp*-Messungen durchgeführt. Zur Bestimmung passiver Eigenschaften, wie des Ruhemembranpotentials, Eingangswiderstands und der Membranzeitkonstante, wurden zehnmal Stromimpulse von -10 pA und -50 pA für je eine Sekunde appliziert. Um aktive Eigenschaften des Neurons zu ermitteln, wie die Strom-Spannungs-Beziehung, Feuerschwelle, Aktionspotentialform und das Feuermuster, wurden positive Strominjektionen in aufsteigender Reihe (10 pA bis min. 100 pA oberhalb der Feuerschwelle) durchgeführt.

2.2.2.1 Lichtinduzierte Depolarisation von ChR2-transduzierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung synaptischer Eingänge von VIP- oder PV-exprimierenden Zellen an dendritischen Kompartimenten von MC mittels optogenetischer Stimulation der präsynaptischen Zellpopulationen und elektrophysiologischer Messung der Eingänge an postsynaptischen MC. Für die optische Stimulation der ChR2-transduzierten Zellen wurde ein Diodenlaser (DL-473, Rapp OptoElectronic, Hamburg, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 473 nm verwendet. Der Durchmesser des Laserstrahls betrug ca. 95 µm, für Kartierungs-Versuchsteile wurde er mittels einer quadratischen Blende auf 50x50 µm eingestellt. Stimuli hatten eine Länge von 1 ms und wurden für jede Laserenergie-Stufe bzw. in Kartierungs-Experimenten für jedes Feld je dreimal wiederholt. Bei Ableitung der präsynaptischen Zellen wurde die Laserenergie von unter 0,002 bis 1,86 µJ gesteigert. Die Ableitbedingungen blieben nicht bei allen Zellen über die gesamte Dauer des elektrophysiologischen Experimentes stabil, sodass den Auswertungen der Messungen bei höheren Stimulusenergien sowie der Kartierung der Eingänge teilweise geringere Versuchszahlen zugrunde lagen als für die initialen Messungen.

Um zu untersuchen, ob die ChR2-transduzierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen durch Lichtstimulation depolarisieren, welche Laserenergien dafür notwendig sind und ob diese Depolarisierung des Membranpotentials ausreicht, um AP auszulösen, wurden diese Interneurone mit kaliumbasierter Pipettenlösung abgeleitet. Mittels kurzer Lichtimpulse (1 ms) des auf das Soma der abgeleiteten Zelle zentrierten Laserstrahls, wurden die ChR2 in der Zellmembran aktiviert. Die dadurch induzierte Depolarisation des Membranpotentials wurde im *Cur-*

rent-clamp-Modus aufgezeichnet. Die Laserenergie wurde ausgehend von unter 0,002 µJ in mehreren Schritten erhöht, bis die lichtinduzierte Depolarisation ausreichte, um das Feuern eines Aktionspotentials auszulösen. Nach Erreichen dieser individuellen Feuerschwelle wurde die Laserintensität nochmals um das drei- und neunfache erhöht.

2.2.2.2 Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf Martinotti-Zellen

Um zu untersuchen, ob synaptische Eingänge der ChR2-transduzierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC bestehen und welche Eigenschaften diese IPSC aufweisen, wurden MC in *Whole-cell*-Konfiguration abgeleitet. Mittels eines Haltepotentials der MC von +10 mV wurde zum einen der elektrochemische Gradient für den Einstrom von Chlorid-Ionen, deren Umkehrpotential rechnerisch bei ca. -84,2 mV liegt, maximiert. Zum anderen wurde die Triebkraft für etwaige störende exzitatorische Eingänge, die ein Umkehrpotential von ca. 0 mV haben, minimiert. Dafür wurde stets eine cäsiumbasierte Pipettenlösung eingesetzt, um auch distale dendritische Eingänge am Soma detektieren zu können.

Durch Laserstimulation wurden die die ChR2-transduzierten präsynaptischen Zellen im Umfeld des abgeleiteten MC-Somas depolarisiert. Nach initialer Kontrollmessung ohne Stimulation, wurde in einer Messreihe mit steigender Laserenergie stimuliert (1 ms, drei Wiederholungen je Stufe). Nach erstmaliger Beobachtung eines lichtinduzierten IPSC, wurden weitere Messungen bei einer, vom individuellen IPSC-Schwellenwert ausgehend, nochmals ca. drei- und neunfach erhöhten Laserenergie durchgeführt.

Anschließend wurde das räumliche Muster, mit dem VIP- und PV-exprimierende Zellen auf MC projizieren, untersucht. Lichtinduzierte Depolarisationen mittels ChR2 werden an allen im Bereich des Laserstrahls liegenden Kompartimenten ChR2-transduzierten Zellen ausgelöst, an den Somata ebenso wie an Axonkollateralen und Präsynapsen. Überschwellige Depolarisationen werden durch AP aktiv weitergeleitet. An Synapsen, die im weiteren Verlauf des Axons liegen, kann der Stimulus als IPSC auf postsynaptische MC übertragen werden, auch fernab des Stimulationsortes. Die Amplitude der in MC gemessenen lichtinduzierten IPSC ist abhängig von der Dichte ChR2-positiver Axone, dem Anteil der Axone, die Synapsen auf die abgeleitete MC haben, der Stärke dieser Synapsen und deren elektrotonischer Entfernung vom MC-Soma (Williams und Mitchell 2008).

Zur Kartierung der axonalen Projektionen wurde der Laserstrahl auf eine quadratische Stimulationsfläche von 50x50 µm skaliert. Mit Hilfe der Software Morgentau M1 (Morgentau Solution, München, Deutschland) wurde am Computer auf dem mikroskopischen Videobild des Schnittes ein zweidimensionales Koordinatengitter mit 7x7 Feldern von jeweils 50x50 µm

Größe erstellt, parallel zur Pia-Oberfläche und mit der abgeleiteten Zelle im zentralen Feld lokalisiert. Dieses Koordinatengitter diente als Vorgabe für die gezielte Photostimulation distinkter Felder. Jedes dieser Felder wurde einzeln stimuliert, mit je drei Wiederholungen und zehn Sekunden Interstimulus-Pause, und induzierte IPSC an der MC gemessen. Da eine Korrelation der Amplitude der gemessenen IPSC mit der Stärke der Projektionen der im stimulierten Feld verlaufenden ChR2-transduzierten Axone auf die abgeleitete MC anzunehmen ist, konnte anhand dieser Daten eine Karte erstellt werden, die den vermuteten Verlauf der Axone (der ChR2-transduzierten VIP- bzw. PV-Zellen), die auf die MC projizieren, abbildet.

Nachdem so der Verlauf der Axone untersucht wurde, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Kartierung der synaptischen Eingänge an den verschiedenen dendritischen Kompartimenten der MC mittels der sCRACM-Methode. Dafür war die Blockade von AP erforderlich, um somit ausschließlich bei direkter Stimulation von Präsynapsen der transduzierten Neurone die Ausschüttung synaptischer Botenstoffe auszulösen. Zu diesem Zweck wurden über einen Zeitraum von mindestens zehn Minuten 100 µM 4-AP und 0,5 µM TTX in das den Schnitt umspülende ACSF eingewaschen. Während des Einwaschens wurde alle 30 s mit einem Laserstimulus die Wirkung der Pharmaka kontrolliert.

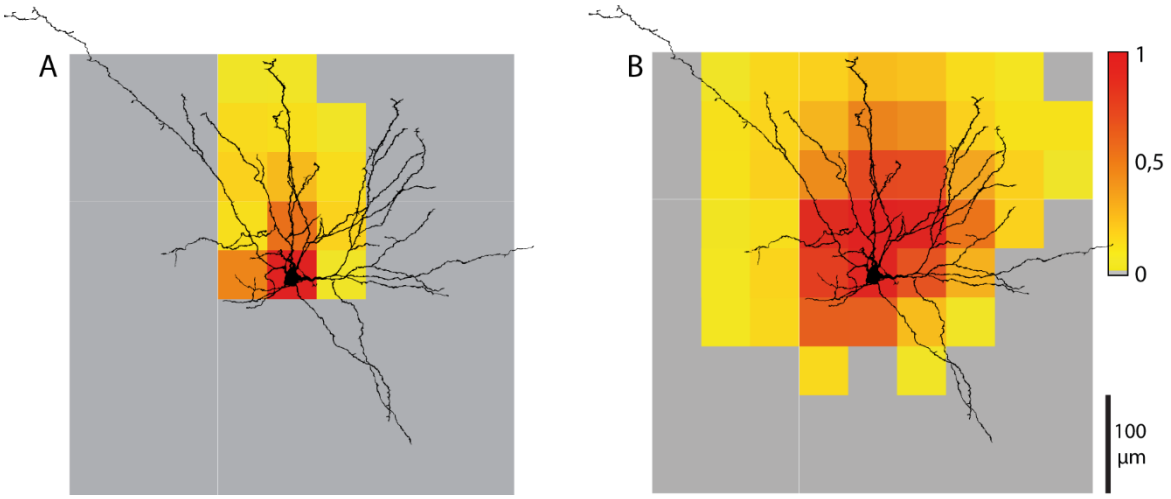

Abb. 2: Einfluss der Laserenergie auf die Auflösung von sCRACM-Karten
(A, B) Farbkodiertes Kartogramm der IPSC am Dendritenbaum einer MC (schwarz). Messung der IPSC nach Stimulation mit Laserenergien von 0,29 µJ (A) und 3,24 µJ (B). Aufgrund passiver, elektrotonischer Fortleitung in Axonen der präsynaptischen Zellen sinkt die Auflösung bei übermäßiger Stimulation. Bei überhöhter Laserenergie werden IPSC in zusätzlichen Feldern gemessen, darunter Felder, in denen kein Dendrit der MC verläuft. In B wurden, bei 11,2x stärkerer Stimulation als in A, in einzelnen Feldern mit über 40 µm Distanz vom nächsten dendritischen Ast falsch-positive Eingänge registriert.
Da das Expressionslevel der ChR2 und somit die benötigten Laserenergie zwischen den Experimenten schwankte, musste diese für sCRACM jeweils neu kalibriert werden. Dazu wurde am MC-Soma die IPSC-Schwelle detektiert und der Laser auf eine mittlere Intensität eingestellt. Seitlich des Somas wurden am potenziellen Dendritenbaum der MC entlang bis zu einer Distanz von maximal 250 µm Laserstimuli abgegeben und der Laser auf eine Intensität eingestellt, die ausreichte, um in einzelnen, aber nicht allen Gitterfeldern IPSC auszulösen.

Wegen schwankender Expressionslevel der ChR2 zwischen den Tieren, sowie zwischen verschiedenen Schnitten, musste die Laserenergie für sCRACM-Experimente jeweils neu kalibriert werden. Dafür wurde die Schwelle für lichtinduzierte IPSC durch Stimulation am Soma der MC detektiert und der Laser auf eine mittlere Intensität eingestellt. Am potenziellen MC-Dendritenbaum lateral des Somas wurden in davon ausgehenden variierenden Intensitäten Laserstimuli abgegeben. Für die sCRACM-Kartierung wurde der Laser auf eine Energie eingestellt, die in dieser Kalibrierung ausreichte, um in einzelnen, aber nicht allen Gitterfeldern lichtinduzierte IPSC auszulösen (Abb. 2).

Mit der so ermittelten Laserenergie wurde anschließend eine Kartierung synaptischer Eingänge am Dendritenbaum der abgeleiteten MC nach der Methode sCRACM durchgeführt. Die Einstellungen dafür waren analog zu der vor dem Pharmaka-Einwaschen aufgenommenen Karte, nur wurde hier ein größeres Gitter mit 9x9 oder 11x11 Feldern vom Laser abgerastert, um eine komplette Abdeckung des Dendritenbaums in der Karte sicherzustellen.

2.3 Analyse elektrophysiologischer Rohdaten

Die experimentell gewonnenen elektrophysiologischen Rohdaten wurden mit dem Programm CED Signal 5.09 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, England) unter Nutzung von Herrn Dr. Martin Möck geschriebener Skripte ausgewertet.

Die passiven Zelleigenschaften Ruhemembranpotential [mV], Membranzeitkonstante [ms], Eingangswiderstand [MΩ] und Membrankapazität [pF] wurden aus zehn gemittelten Messungen bestimmt, bei denen jeweils für die Dauer einer Sekunde ein Strom von -10 pA injiziert wurde. Das Ruhemembranpotential entspricht dem mittleren Membranpotential vor der Strominjektion, die Membranzeitkonstante der Zeit von Beginn der Strominjektion bis zu 63% der maximalen Auslenkung des Membranpotentials. Aus der maximalen Potentialauslenkung während der Strominjektion wurde mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes ($R = U/I$) der Eingangswiderstand berechnet. Die Division der Membranzeitkonstante durch den Eingangswiderstand ergab die Membrankapazität ($C = \tau/R$).

Nach erfolgter elektrophysiologischer Charakterisierung der ChR2-transduzierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen wurden die in *Current-clamp*-Konfiguration gemessenen lichtinduzierten Depolarisationen dieser Zellen ausgewertet (Abb. 3). Die drei Wiederholungen pro Stimulusenergie wurden gemittelt. Einzelne Messungen, in denen vor Stimulusbeginn eine starke Kontamination durch spontane synaptische Eingänge vorlag, wurden davon nach visueller Kontrolle ausgenommen. Von der gemittelten Messung wurden automatisiert aus den 150 ms vor Stimulusbeginn (Prä-Stimulus-Intervall) Mittelwert und Standardabweichung be-

rechnet. Der Mittelwert wurde als Nulllinie und die dreifache Standardabweichung als Detektionsschwelle für diese Messung verwendet. Beide wurden manuell auf Plausibilität überprüft und gegebenenfalls anhand eines manuell gewählten Zeitfensters neu berechnet. Bei weiterhin unzureichendem Resultat wurden Nulllinie und Detektionsschwelle von Hand gesetzt.

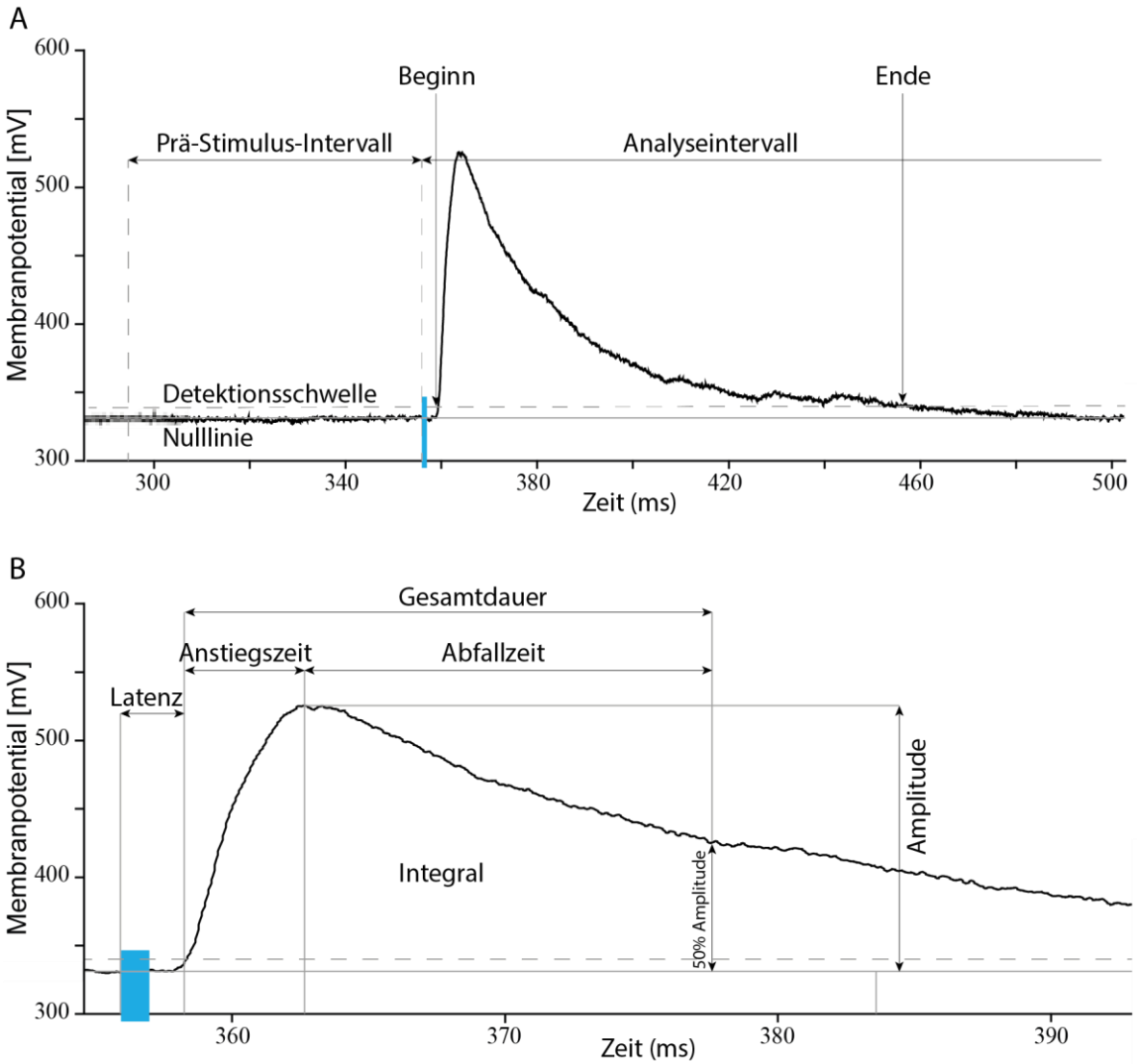

Abb. 3: Analyse elektrophysiologischer Rohdaten
Exemplarische elektrophysiologische Messkurve einer mittels Laserstimulation (1 ms, blauer Balken) induzierten Depolarisation des Membranpotentials eines ChR2-transduzierten Interneurons.
(A) Setzen der Detektionsgrenzen. Drei wiederholte Messungen wurden nach manuellem Ausschluss kontaminierter Messkurven gemittelt. Im Prä-Stimulus-Intervall (150 ms) wurden MW (Nulllinie) und SD der Messkurve bestimmt. Die dreifache SD wurde als Detektionsschwelle für lichtinduzierte Depolarisationen im Analyseintervall gesetzt.
(B) Exemplarische Bestimmung quantitativer Parameter (Vergrößerung der Messkurve aus A). Die Differenz des Maximums der Depolarisation und der Nulllinie ergibt die Amplitude [mV]. Die Fläche unter der Messkurve und oberhalb der Nulllinie entspricht dem Integral [mV*s]. Die Latenz [ms] bemisst sich von Stimulusbeginn bis zum Überschreiten der Detektionsschwelle. Von dort bis zum Depolarisations-Maximum ist die Anstiegszeit [ms], vom Maximum bis zum Unterschreiten von 50% der Amplitude die Abfallzeit [ms] definiert. Addition von Anstiegs- und Abfallzeit ergibt die Gesamtdauer der Depolarisation [ms].
Postsynaptisch gemessene lichtinduzierte IPSC wurden analog dazu ausgewertet.

Nur wenn innerhalb des Analyseintervalls nach dem Laserstimulus die Detektionsschwelle überschritten wurde, wurde dies als lichtinduzierter Strom gewertet und folgende Parameter bestimmt: Der größte Messwert innerhalb des Analyseintervalls wurde als Maximum detektiert. Aus der Differenz dieses Wertes und der Nulllinie berechnet sich die Amplitude [mV]. Die Latenz [ms] bemisst sich aus der Zeit zwischen Stimulusbeginn und dem Zeitpunkt, zu dem die Messkurve danach die Detektionsschwelle erstmals überschreitet, dem Depolarisationsbeginn. Vom Depolarisationsbeginn bis zum Maximum berechnet sich die Anstiegs- und von dort bis zum Zeitpunkt, an dem die Messkurve 50% der Amplitude wieder unterschreitet, die Abfallzeit [ms]. Beides addiert ergibt die Gesamtdauer [ms] der Depolarisation. Für die Anstiegsphase der Depolarisation wurde die durchschnittliche und die maximale Steigung [mV/ms] berechnet. Die von Messkurve und Nulllinie eingeschlossene Fläche, von Beginn bis Ende der lichtinduzierten Depolarisation, ergibt das Integral [mV*s].

Durch die von Messung zu Messung gesteigerte Laserenergie wurden die Zellen zunehmend stärker depolarisiert. Alle Depolarisationen wurden wie oben ausgewertet. Nur beim Auftreten eines AP wurden die oben beschriebenen Parameter nicht bestimmt, da es sich hierbei um einen aktiven Prozess der Zelle handelt, der die durch ChR2 bewirkte Depolarisation überlagert. Stattdessen wurde ausschließlich die Zeit vom Stimulusbeginn bis zur AP-Spitze [ms] bestimmt und die Amplitude nicht-numerisch als „AP“ gewertet.

Für die an MC in *Voltage-clamp*-Konfiguration gemessenen lichtinduzierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme wurden in der Auswertung die gleichen Parameter erhoben. Lediglich die Einheiten sind dabei von denen der präsynaptischen Messungen verschieden, da dort das Membranpotential [V], hier hingegen Ströme [A] aufgezeichnet wurden. Aufgrund der inhibitorischen Natur der Eingänge wurden an MC keine AP ausgelöst, sodass Messungen aller Stimulationsstärken auf die gleichen Parameter hin ausgewertet werden konnten.

Im Folgenden wurde diese (für jedes Experiment individuelle) minimale Stimulusenergie (min. St.), bei der erstmals IPSC induziert wurden, als Referenzwert für das jeweilige Experiment gesetzt. Alle Messungen der jeweils davon ausgehend nochmals etwa drei- bzw. neunfach erhöhten Stimulusenergie wurden gruppiert und fortan als mittlere (mtl. St.) bzw. maximale Stimulusenergie (max. St.) bezeichnet.

Für die Kartierungs-Experimente der Eingänge am Dendritenbaum wurden die Messdaten für jedes Gitterfeld, das per Laser gezielt stimuliert wurde, separat analysiert. Die Stimulusenergie war stets für alle Felder eines Kartogramms identisch. Als Bedingung für die Detektion eines IPSC wurde im Voraus festgelegt, dass in mindestens zwei der drei Messungen pro Feld innerhalb von 20 ms nach Stimulusbeginn die Detektionsschwelle überschritten werden muss.

Die Latenzen des IPSC-Beginnes durften zwischen den drei Wiederholungen nicht mehr als 5 ms untereinander variieren. So wurde zwischen lichtinduzierten IPSC und spontanen synaptischen Übertragungen unterschieden. Bei Nichterfüllung dieser Bedingungen wurde auf „kein Eingang“ in diesem Feld entschieden. Die lichtinduzierten IPSC der wiederholten Messungen für jedes Feld wurden zunächst einzeln ausgewertet und anschließend gemittelt. Es wurden - wie bereits beschrieben - Latenz [ms], Steigung [pA/ms], Amplitude [pA] und Integral [pA*s] der IPSC bestimmt.

Einzelne Messungen waren durch spontane synaptische Übertragungen kontaminiert. Dies hätte zur Verzerrung der Messwerte führen können oder in einigen Fällen eine Auswertung nach den zuvor genannten Kriterien unmöglich gemacht. Um für jedes einzelne Feld der Kartierung möglichst exakte Werte zu erhalten, wurden derartig überlagerte Messungen vor der Auswertung halbmanuell korrigiert. Kontaminationen, die vor dem induzierten IPSC beginnen, verhindern eine korrekte Detektion des Beginns eines induzierten IPSCs. Dadurch verfälschen sie die Berechnung von Latenz, Steigung und Integral, selbst bei manuell korrigierter Nulllinie und Detektionsschwelle. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurde eine exponentielle Regression ersten Grades für den absteigenden Anteil der Kontamination berechnet, indem manuell der Beginn und das geschätzte Ende der Kontamination, die Stelle der Überschneidung mit dem induzierten IPSC, sowie ein Bereich der Kontamination als Grundlage zur Berechnung markiert wurden. Durch diese Regression konnte der weitere theoretische isolierte Verlauf der Kontamination ab der Überschneidung mit dem IPSC geschätzt werden. Anschließend wurde die Fläche unter der Kontamination bzw. unter der Regressionskurve berechnet und von der gesamten Messung subtrahiert. Diese Korrektur ermöglichte daraufhin eine korrektere Bestimmung der vorher verfälschten Parameter Latenz, Steigung und Integral.

Mit Kontaminationen, die nach dem Beginn des induzierten IPSC lagen, wurde analog dazu verfahren. Hier wurde die Regression für den absteigenden Anteil des IPSCs berechnet. Dazu wurden manuell der Beginn der Kontamination und die vermutete Schnittstelle des induzierten IPSC mit der Nulllinie markiert, sowie ein Bereich des induzierten IPSCs zur Berechnung der exponentiellen Regression gewählt. Ab Beginn der Kontamination bis zur Kreuzung der Regressionskurve mit der Nulllinie wurde die Messkurve durch die Regression ersetzt. Dadurch konnte die Auswertung des Integrals, und in einzelnen Fällen der Amplitude und der Steigung, korrigiert werden. Wenn die exponentielle Regression die zu vermutende Form der Kontamination bzw. des induzierten IPSC nicht gut abbildete, wurde sie verworfen und stattdessen der Kurvenverlauf linear von der Überschneidung bis zur vermuteten Schnittstelle mit der Nulllinie modelliert.

Messungen, in denen Kontaminationen kurz vor dem induzierten IPSC begannen und sich bei der Überschneidung noch in ihrer aufsteigenden Flanke befanden, oder Kontaminationen die im aufsteigenden Teil des induzierten IPSCs begannen, konnten nicht durch Berechnung von Regressionen korrigiert werden und wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

2.4 Statistische Auswertung und grafische Aufbereitung der Daten

Die mithilfe des Programms CED Signal aus den experimentellen Rohdaten gewonnenen Datensätze wurden mit der Tabellenkalkulations-Software Microsoft Excel 2010 (Version 14.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwaltet und ausgewertet. Nach der kortikalen Schicht und der präsynaptischen Interneuronenklasse wurden die Daten in vier Gruppen separiert: (1) VIP-Zellen → LII/III MC und (2) PV-Zellen → LII/III MC sowie (3) VIP-Zellen → LV MC und (4) PV-Zellen → LV MC.

Zum statistischen Vergleich wurden diese Gruppen im Datenanalyse-Programm SigmaPlot (Version 13.0, Systat Software, San Jose, CA, USA) mittels Shapiro-Wilk-Test und Brown-Forsythe-Test auf die für einen t-Test erforderlichen Bedingungen einer Normalverteilung und Gleichheit der Varianz untersucht. Da eine Normalverteilung der Stichproben in diesen Tests meist nicht gegeben war, wurden alle Daten mit dem Wilcoxon-Rangsummentest, der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt, getestet. Die statistischen Ergebnisse werden als p-Werte angegeben, das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0{,}05$ festgelegt. Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SD) angegeben, falls nicht anders vermerkt.

Eine grafische Darstellung der Ergebnisse als Boxplot-Diagramme wurde mit der Software Origin (Version 8.5, Microcal Software, Northhampton, MA, USA) erstellt. Die Enden der Box entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen, die Antennen den 10%- und 90%-Quartilen. Die horizontale Linie innerhalb der Box kennzeichnet den Median und das Kreuz den Mittelwert. Für einzelne Gruppen mit Versuchszahlen von $n \leq 3$ wurden stattdessen die einzelnen Datenpunkte als Kreise dargestellt. Mit dem Grafikprogramm Adobe Illustrator (Version CS6, Adobe, San Jose, CA, USA) wurden die Diagramme für eine einheitliche und übersichtliche Darstellung überarbeitet. Signifikante Unterschiede wurden darin mit einem Stern (*), nicht signifikante Unterschiede mit der Abkürzung n.s. markiert.

Kartierte Eingänge an MC wurden für eine grafische Darstellung als Kartogramme aufgearbeitet. Die - wie oben beschrieben - ausgewerteten Datensätze der einzelnen Versuche wurden in Origin importiert und in einem Koordinaten-Gitter ihrem Stimulationsort zugeordnet (Abb. 4A). Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Experimente untereinander wur-

den alle an einer MC gemessenen Amplituden auf die jeweils größte Amplitude normalisiert, sodass Werte zwischen 0 (kein IPSC) und 1 (maximales IPSC) resultierten. Diese Werte wurden als farbkodierte Pixel in Kartogramme eingetragen. Über die Farbskala wurde die relative Amplitude visualisiert, sodass die Skalierung von grau (0) für keinen gemessenen Eingang über blau für den kleinsten gemessenen Eingang bis dunkelrot (1) für die maximal gemessene IPSC-Amplitude reicht. So wurde für jede MC ein Kartogramm der an ihr gemessenen lichtinduzierten IPSC erstellt (Abb. 4B).

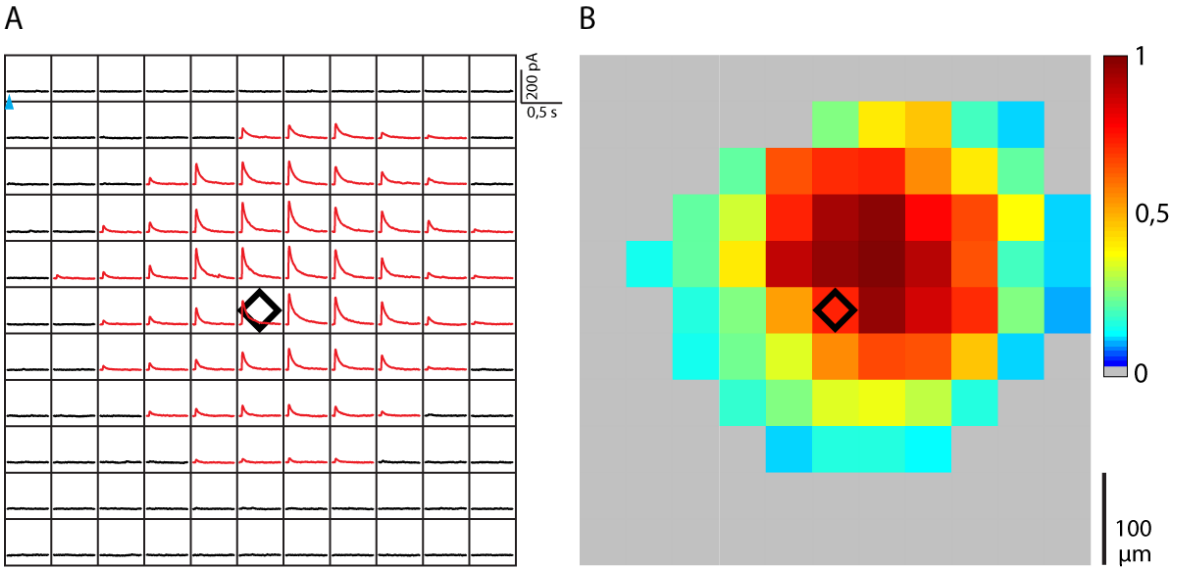

Abb. 4: Aufbereitung von kartierten IPSC zu farbkodierten Diagrammen
(A) In Umgebung eines abgeleiteten MC-Somas (zentrale, schwarze Raute) aufgezeichnete IPSC, induziert durch Laserstimulation (1 ms, beispielhaft blaues Dreieck oben links), in Gitterfeldern (50x50 µm). In Feldern mit synaptischen Eingängen von stimulierten ChR2-transduzierten VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen auf MC wurden lichtinduzierte IPSC gemessen (rote Messkurven) und u.a. bezüglich ihrer Amplituden ausgewertet. In anderen Feldern wurden keine IPSC registriert (schwarze Messkurven).
(B) Farbkodierte Darstellung der Amplituden der IPSC aus A. Positionen der Felder und des MC-Somas entsprechen denen in A. Felder ohne IPSC sind grau (Amplitude = 0), das Feld mit der größten IPSC-Amplitude (als 1 gesetzt) dunkelrot. Kleinere Amplituden wurden relativ zur größten Amplitude auf Werte zwischen 0 und 1 normalisiert und sind in den jeweiligen Feldern farbkodiert (von blau für minimale, über gelb für mittlere, bis dunkelrot für maximale Amplituden) dargestellt.

Abschließend wurden die Einzelkartogramme mit somatodendritischen Rekonstruktionen (siehe Abschnitt 2.5) der zugehörigen MC überlagert. Dafür wurden sie zusammen mit den intraexperimentellen und postexperimentellen mikroskopischen Aufnahmen in Adobe Illustrator importiert. Anhand der Artefakte durch die intraexperimentell den Hirnschnitt fixierenden Nylon-Fäden, der Pia-Kontur und der Position von mCherry- und GFP-fluoreszierenden Somata, wurden diese Aufnahmen miteinander und mit den Martinotti-Zell-Rekonstruktionen aligniert. Schrumpfungsartefakte wurden durch Streckung entlang der X- und Y-Achsen korrigiert. Abschließend wurden die Kartogramme auf das Soma der abgeleiteten MC und das in

der intraexperimentellen Aufnahme eingezeichnete Laserstimulations-Gitterfeld ausgerichtet und die mikroskopischen Aufnahmen zur Übersichtlichkeit für die Abbildungen ausgeblendet. So wurde eine korrekte Überlagerung der Rekonstruktionen mit den Kartogrammen sichergestellt.

Von allen Kartogrammen einer Gruppe, also der jeweiligen Schicht und präsynaptischen Interneuronenklasse, wurde zudem ein Durchschnittskartogramm erstellt. Dafür wurden sie auf die Somata der MC aligniert und für jedes Gitterfeld das arithmetische Mittel der zuvor normalisierten Amplituden berechnet. Die resultierenden Werte reichten von 0 bis maximal 1 und wurden wie zuvor farbkodiert dargestellt, wobei der maximale Wert von 1 nur erreicht wurde, wenn in allen Einzelkartogrammen der maximale induzierte IPSC im gleichen Feld lokalisiert war.

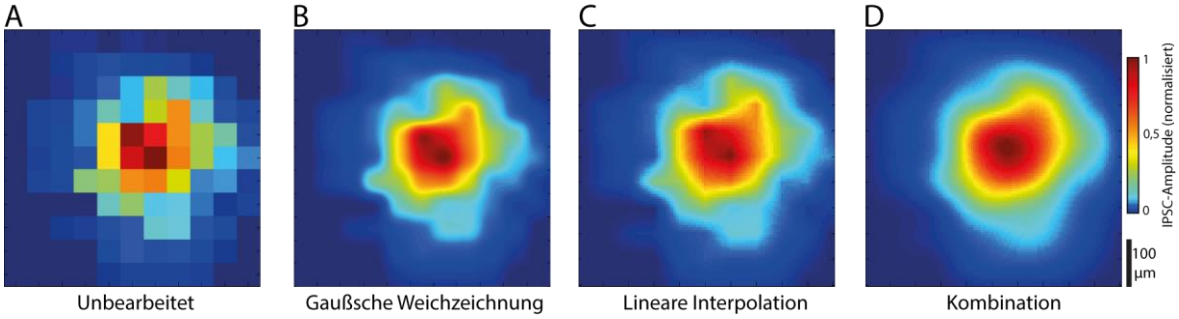

Abb. 5: Vergleich von Weichzeichnung und linearer Interpolation der Kartogramme
(A) Farbkodiertes Kartogramm von IPSC an Dendritenbäumen von MC. Für eine zusätzliche, kontinuierliche Darstellung können Kartogramme mittels Weichzeichnung oder Interpolation bearbeitet werden (B-D).
(B) Glättung des Kartogramms mittels Gaußscher Weichzeichnung.
(C) Alternative Bearbeitung des Kartogramms mittels linearer Interpolation. Für diese Berechnung wird ein linearer Zusammenhang der Messdaten angenommen, um die Auflösung zu erhöhen. Diese Annahme ist für die vorliegenden Messdaten nicht gegeben.
(D) Kombination von Gaußscher Weichzeichnung und linearer Interpolation führt zu starkem Detailverlust.
Die Gaußsche Weichzeichnung (B) ergibt ein gutes visuelles Ergebnis, ohne einen linearen Zusammenhang der Daten vorauszusetzen, sodass diese Bearbeitung im Folgenden bevorzugt wurde.

Im Mathematik- und Grafik-Programm Matlab (Version R2015b, The MathWorks, Natick, MA, USA) wurden die Durchschnittskartogramme ergänzend zu Darstellungszwecken per Gaußscher Weichzeichnung geglättet. Eine Bearbeitung der Kartogramme mittels linearer Interpolation wurde ebenfalls vorgenommen. Für diese Berechnung wird ein linearer Zusammenhang der Messdaten angenommen um die Auflösung zu erhöhen. Diese Annahme ist für die vorliegenden Messdaten nicht gegeben. Zudem ergab das Ergebnis der Interpolation keinen entscheidenden visuellen Unterschied zur Weichzeichnung, sodass die weichgezeichneten Kartogramme in den folgenden Abbildungen bevorzugt wurden (Abb. 5).

2.5 Morphologie

Die MC wurden während der elektrophysiologischen Ableitung mit Biocytin gefüllt und anschließend gefärbt und rekonstruiert. Die Färbungen wurden von der technischen Assistentin der AG Neuroanatomie Frau Patricia Sprysch durchgeführt. Die genauen Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen sind im Anhang (6.1) aufgeführt. In allen elektrophysiologischen Experimenten waren in der Pipettenlösung 2-5 mg/ml Biocytin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelöst, um in der *Whole-cell-patch-clamp*-Konfiguration in das abgeleitete Neuron zu diffundieren. Der neuronale Tracer Biocytin verteilt sich über Diffusion und aktiven Transport im gesamten Neuron, inklusive dessen Axon und Dendriten (McDonald 1992; Köbbert et al. 2000), wofür stets mindestens 30 Minuten Zeit gelassen wurde. Es verändert nicht die elektrophysiologischen Eigenschaften der abgeleiteten Neurone (Horikawa und Armstrong 1988). Die Patchpipette wurde unter visueller Kontrolle vorsichtig von der abgeleiteten Zelle entfernt und der Schnitt über Nacht mit 4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure fixiert. Am nächsten Tag wurde das Paraformaldehyd durch mehrfache Spülung mit Phosphat-Puffer ausgespült.

Die Schnitte einer Woche wurden gesammelt und anschließend gefärbt. Sie wurden mit TRIS-Puffer (TB; TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) und TRIS-gepufferter Saline (TBS) inkubiert und mit TBS mit 0,3% Triton X-100 (TBST) permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden in bovinem Serumalbumin blockiert und die Schnitte mit den primären Antikörpern *rabbit* aRFP (engl. *anti red fluorescent protein antibody*; Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA) mit Verdünnung 1:500 und *goat* aGFP (engl. *anti green fluorescent protein antibody*; Abcam, Cambridge, Großbritannien) in Verdünnung 1:2000 für 48-72 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Ausspülen erfolgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern, „Donkey anti goat AF 488“ (1:500), „Donkey anti rabbit AF 546“ (1:500) und „Streptavidin AF 633“ (1:300) (alle von Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für vier Stunden und erneutes Spülen. Zuletzt erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für fünf Minuten mit anschließender Spülung und Lagerung über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Aqua Poly Mount (Polysciences GmbH, Eppelheim, Deutschland) eingedeckelt.

Aufnahmen der gefärbten Schnitte wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM Leica SP2, Wetzlar, Deutschland) oder am ApoTome (Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt. Mithilfe der Software Neurolucida (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) wurden die MC somatodendritisch und einzelne Zellen zusätzlich axonal rekonstruiert.

Bei Fixierung von Gehirnschnitten kann es zur Schrumpfungen kommen (Staiger et al. 2004a). Diese wurden für jeden Schnitt durch Abgleichen der mikroskopischen Aufnahmen vor und nach dem Färbeprozess bestimmt und die Rekonstruktionen einzeln durch Streckung im Grafikprogramm Adobe Illustrator (Version CS6, Adobe, San Jose, CA, USA) auf die Originalgröße korrigiert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Projektionsmuster GABAerger inhibitorischer Interneurone (speziell VIP- und PV-exprimierender Zellen) auf den Dendritenbaum von MC in LII/III und LV im primären somatosensorischen Kortex der Maus zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dafür wurden elektrophysiologische Messungen von optisch stimulierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen und den inhibitorischen postsynaptischen Strömen ihrer Projektionen auf MC ausgewertet, analysiert und grafisch aufgearbeitet.

3.1 Identifizierung der Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Messdaten aus *Patch-clamp*-Messungen von MC, VIP- und PV-exprimierenden Interneuronen ausgewertet. Mittels der transgenen GIN-Mauslinie und den charakteristischen elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften von MC konnten die MC gegenüber anderen Neuronen abgegrenzt werden. Bei den verwendeten Versuchstieren (VIPcre/GIN- und PVcre/GIN-Mäuse) war eine Subpopulation SST-exprimierender inhibitorischer Interneurone mit dem Fluoreszenzprotein GFP markiert, welches bei Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 450-490 nm grün fluoresziert. Ausschließlich GIN-Zellen wurden zur elektrophysiologischen Ableitung ausgewählt und bei erreichter *Whole-cell*-Konfiguration erneut auf ihre spezifische Fluoreszenz überprüft. Dabei ließ sich durch das Vermischen des Zytoplasmas mit der Pipettenlösung eine Fluoreszenz in der Pipettenspitze erkennen (Abb. 6C'). Für eine eindeutige morphologische Charakterisierung wurden die Zellen während der Ableitungen mit Biocytin gefüllt. Nach anschließender Färbung wurde die Morphologie aller abgeleiteten GFP-positiver Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Insgesamt wurden 54 MC untersucht (n = 54) und bei allen konnten die charakteristischen morphologischen Merkmale von MC nachgewiesen werden. Alle abgeleiteten MC besitzen zur LI aufsteigende und sich dort breit verzweigende Axonkollaterale sowie einen meist ovalen Zellkörper mit multipolar abgehenden Dendriten (Abb. 6A). Von 22 MC, an denen sCRACM-Kartierungen der Eingänge durchgeführt wurden, konnten 17 somatodendritisch rekonstruiert werden (siehe Abb. A2 und A3 im Anhang). Von einzelnen MC wurde exemplarisch eine axonale Rekonstruktion durchgeführt.

Eine elektrophysiologische Charakterisierung der GFP-positiven Zellen erfolgte in der *Current-clamp*-Konfiguration mittels injizierter Strompulse. Bei sieben MC wurde eine kaliumbasierte Pipettenlösung verwendet, die eine vollständige Charakterisierung erlaubt. Die abgeleiteten

Neurone weisen leicht depolarisierte Ruhemembranpotentiale von -63,40 ± 3,41 mV auf und zeigen auf eine Injektion stark hyperpolarisierender Ströme eine deutliche Senke am Anfang der Potentialantwort (Abb. 6B mittlere Spur). Die Zellen besitzen eine niedrige Feuerschwelle von -37,85 ± 3,14 mV, bei der einzelne AP, gefolgt von einer schnellen und einer langsameren Nachhyperpolarisation, ausgelöst werden (Abb. 6B obere Spur). Stark depolarisierende Ströme lösen das Feuern einer AP-Serie mit ausgeprägter Adaptation der Frequenz aus (Abb. 6B untere Spur).

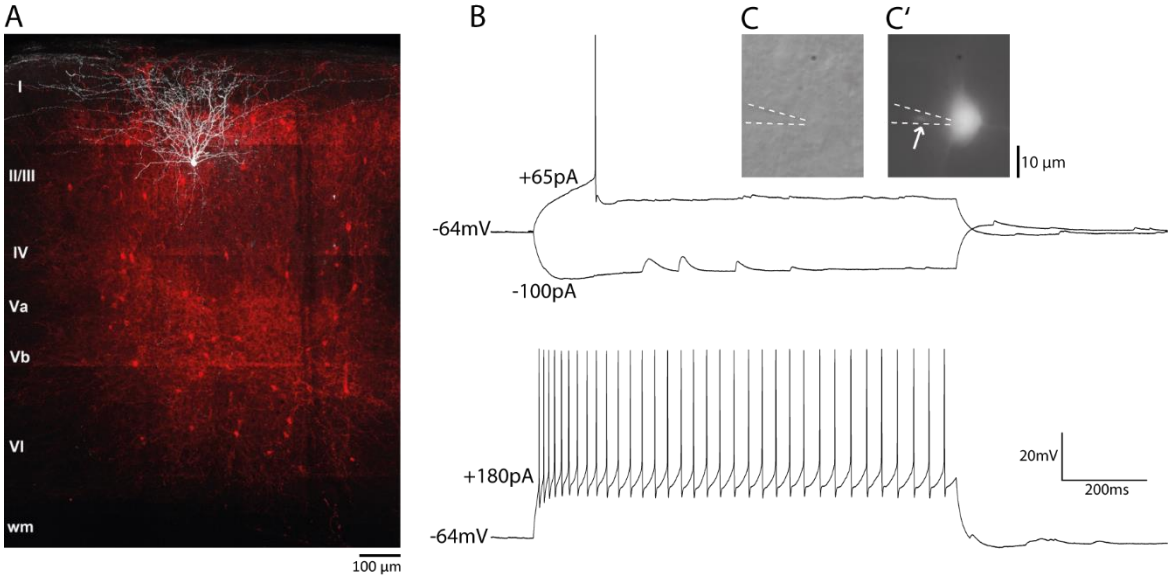

Abb. 6: Identifizierung abgeleiteter GIN-Zellen als Martinotti-Zellen
(A) Fluoreszenzaufnahme eines 300 µm dicken thalamokortikalen Schnittes des Barrel-Kortex. Eine abgeleitete MC der LII/III mit ihren Fortsätzen wurde mit Biocytin gefüllt und gefärbt (Falschfarbendarstellung in weiß). PV-exprimierende Zellen exprimieren an das Fluoreszenzprotein mCherry gekoppelte ChR2 (rot). Römische Zahlen (I-VI) bezeichnen die kortikalen Schichten, wm (engl. *white matter*) den Beginn der weißen Substanz. Charakteristisch für MC sind die zur LI aufsteigenden und sich dort weit verbreitenden Axonkollateralen. Alle in dieser Arbeit untersuchten GIN-Zellen zeigen dieses eindeutige morphologische Merkmal.
(B) Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der MC wurden einzelne Zellen mit kaliumbasierter Pipettenlösung abgeleitet und in *Whole-cell-current-clamp*-Konfiguration untersucht. Durch Injektion von Strompulsen (hier: -100 pA, +65 pA und +180 pA) wurden Spannungsantworten ausgelöst und aufgezeichnet. Die Messkurven zeigen eine niedrige Feuerschwelle (65 pA; obere Spur), bei der ein AP, gefolgt von einer schnellen und einer langsameren Nachhyperpolarisation, ausgelöst wird. Bei Injektion hyperpolarisierender Ströme (-100 pA; mittlere Spur) zeigt sich eine deutliche Senke am Anfang der Potentialantwort. Stark depolarisierende Strominjektionen (+180 pA; untere Spur) lösen AP mit ausgeprägter Frequenz-Adaptation aus. Diese Charakteristika sind typisch für MC.
(C) Lichtmikroskopische Aufnahme einer in *Whole-cell*-Konfiguration abgeleiteten MC mit ovalem Soma. Gestrichelte Linien zeigen die Umrisse der Patchpipette.
(C') Lichtmikroskopische Aufnahme derselben MC wie in C unter GFP-Fluoreszenzanregung. Durch den Patchvorgang haben sich das Zytoplasma und die Pipettenlösung vermischt, sodass in der Pipettenspitze die GFP-Fluoreszenz des Zytoplasmas zu beobachten ist (weißer Pfeil). Es wurden ausschließlich GFP-exprimierende Zellen für das Patchen ausgewählt und nach Erreichen der *Whole-cell*-Konfiguration erneut auf ihre Fluoreszenz überprüft.
Anhand ihrer charakteristischen morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften wurden alle GIN-Zellen sicher als MC identifiziert.

Für die Messung distaler dendritischer Eingänge in den folgenden Versuchsteilen musste eine cäsiumbasierte Pipettenlösung eingesetzt werden, welche durch Blockade von Kaliumkanälen die elektrophysiologischen Eigenschaften der MC verändert. Um den Einfluss der Cäsium-Ionen auf diese Eigenschaften durch eine kurze Diffusionszeit zu minimieren, wurden sie direkt nach Erreichen der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Das Ruhemembranpotential beträgt bei den so untersuchten MC initial -64,69 ± 2,26 mV und die charakteristische Senke bei Applikation eines hyperpolarisierenden Stroms ist weiterhin zu beobachten. Unter zunehmender Diffusion des Cäsiums wird das Ruhemembranpotential langsam positiver und die AP-Dauer verlängert sich, wobei keine Auswirkung auf die Adaptation der AP-Frequenz zu erkennen ist. Anhand des GFP-Signals der abgeleiteten Zellen in der GIN-Maus, der typischen Morphologie mit in LI aufsteigenden Axonkollateralen und des adaptierenden Aktionspotentialmusters in der elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die abgeleiteten Zellen in dieser Arbeit eindeutig als MC identifiziert. Ableitungen von Zellen mit abweichenden Eigenschaften wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Identifizierung der VIP- und PV-exprimierenden Zellen wurde durch deren selektives Exprimieren des roten Fluoreszenzproteins mCherry sowie des lichtgesteuerten Ionenkanals ChR2, nach Injektion eines Cre-abhängigen Virus (AAV6.EF1.DIO.hChR2(H134R)-mCherry) in den Barrel-Kortex der transgenen Versuchstiere (VIPcre/GIN- oder PVcre/GIN-Mäuse), ermöglicht. Zur Validierung einer Transduktion der richtigen Zellen durch das Virus wurden fünf VIP- und acht PV-exprimierende Zellen abgeleitet, elektrophysiologisch charakterisiert, mit Biocytin gefüllt, gefärbt und ihre Morphologie unter dem Mikroskop beurteilt. Zudem wurde eine Kalibrierung der benötigten Laserenergie zur Depolarisation der ChR2-transduzierten-Zellen durchgeführt und der Nachweis einer optischen Induzierbarkeit von AP erbracht (siehe Abschnitt 3.2).

Für *Patch-clamp*-Ableitungen der VIP- und PV-exprimierenden Zellen wurden somit die bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 525-575 nm rot fluoreszierenden Zellen ausgewählt. In *Whole-cell*-Konfiguration wurde erneut die mCherry-Fluoreszenz bestätigt und deren Ausbreitung in die Pipettenspitze beobachtet (Abb. 7B-B‘ und D-D‘). Alle elektrophysiologischen Messungen an diesen Zellen erfolgten mit kaliumbasierter Pipettenlösung. In *Current-clamp*-Konfiguration wurde eine Charakterisierung vorgenommen, um anhand der intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften der Neurone ihre Identität als VIP- bzw. PV-exprimierende Zellen zu bestätigen.

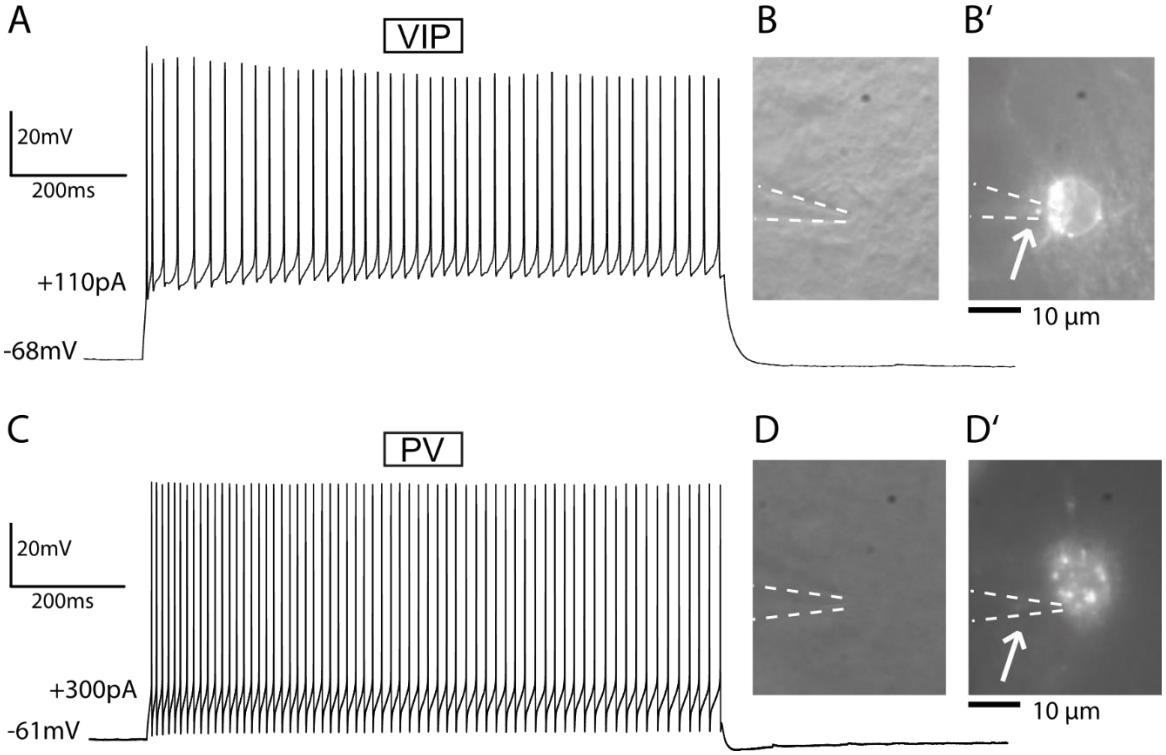

Abb. 7: Identifizierung ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen
(A, C) Elektrophysiologische Charakterisierung VIP- und PV-exprimierender Zellen in *Whole-cell-current-clamp*-Konfiguration. Ruhemembranpotential -68 bzw. -61 mV. Auf stark depolarisierende Strominjektionen (Rheobase +110 bzw. +300 pA) reagieren VIP-exprimierende Zellen mit einem kontinuierlich adaptierenden (oder irregulären), PV-exprimierende Zellen mit einem typischen schnellen Feuermuster.
(B, D) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Somata von in *Whole-cell*-Konfiguration abgeleiteten VIP-exprimierenden (B) und PV-exprimierenden Zellen (D). Gestrichelte Linien zeigen die Umrisse der Patchpipette.
(B', D') Lichtmikroskopische Aufnahme unter Fluoreszenzanregung von mCherry derselben Zellen wie in B und D. Durch den Patchvorgang sind das Zytoplasma und die Pipettenlösung vermischt, in der Pipettenspitze ist die mCherry-Fluoreszenz des Zytoplasmas zu beobachten (weißer Pfeil).
Alle abgeleiteten mCherry-exprimierenden Zellen zeigen typische morphologische und elektrophysiologische Charakteristika von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen und sprechen somit für eine ausreichend spezifische Virus-Transduktion in den Cre-Mauslinien.

Alle abgeleiteten VIP- und PV-exprimierenden Zellen weisen die für ihre Interneuronenklasse spezifischen Feuermuster und Morphologie auf. Die VIP-exprimierenden Zellen zeigen eine doppelt gebüschelte oder bipolare Morphologie oder eine leichte Modifikation dieser Formen. Zudem weisen sie meist vertikal absteigende Axone und ein kontinuierlich adaptierendes oder irreguläres Feuermuster auf (Abb. 7A). Die PV-exprimierenden Zellen hingegen haben eine multipolare Erscheinung mit einem großen runden Zellkörper, eine hohe Rheobase und ein anhaltend schnelles Feuermuster (Abb. 7C).

3.2 Lichtinduzierte Depolarisation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen

Nach der erfolgreichen Identifikation der VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen wurde untersucht, wie diese ChR2-transduzierten Neurone auf Stimulation der lichtgesteuerten Ionenkanäle reagieren, um die erforderliche Laserenergie zu kalibrieren und den Nachweis zu erbringen, dass sich in ihnen durch optische Stimulation zuverlässig AP auslösen lassen. Dafür wurden die abgeleiteten VIP- und PV-exprimierenden Zellen wiederholt mit Laserpulsen (1 ms) steigender Energien (<0,002-1,86 µJ) stimuliert und die resultierenden Spannungsänderungen im *Current-clamp*-Modus aufgezeichnet und analysiert (Abb. 8).

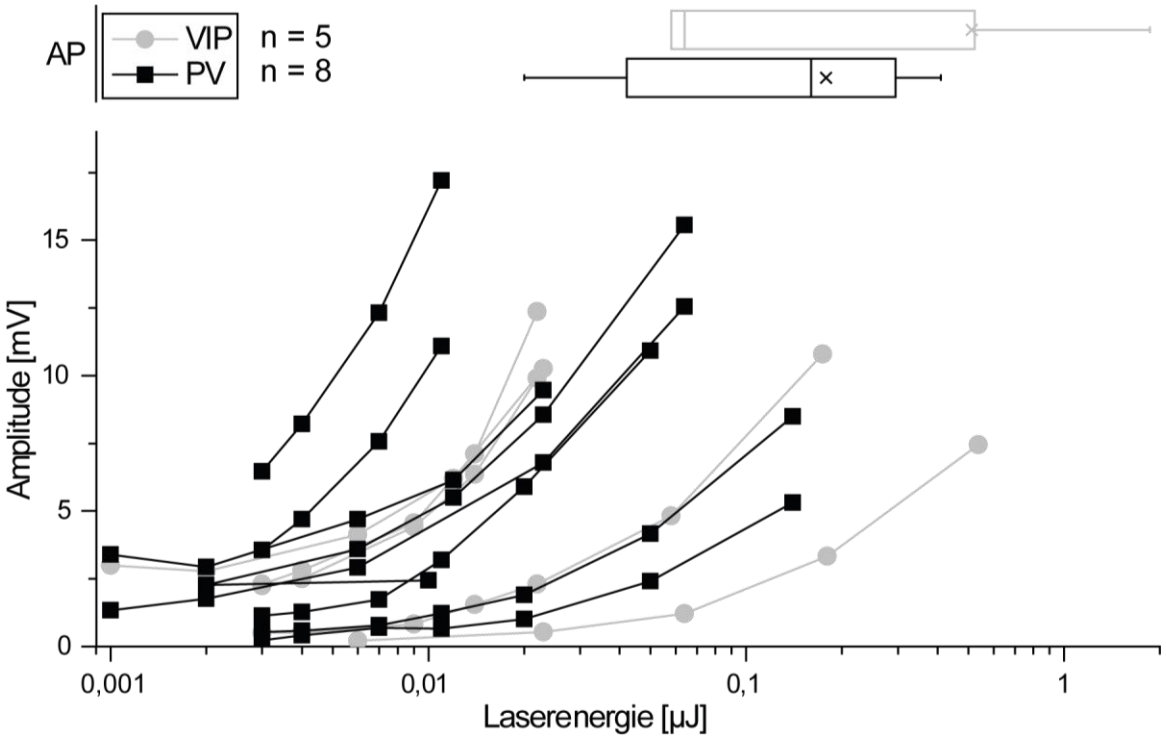

Abb. 8: Quantifizierung der optisch evozierten Depolarisation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen
Durch eine kurze (1 ms) Laserstimulation der ChR2-transduzierten VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen am Soma mit steigenden Energien (<0,002-1,86 µJ) wurden Spannungsänderungen ausgelöst und in *Current-clamp*-Konfiguration aufgezeichnet. Die Amplitude der Spannungsänderungen ist gegen die logarithmisch skalierte Laserenergie aufgetragen. Linien verbinden die Messwerte einer Zelle bei verschiedenen Laserenergien, in grau für VIP- (n = 5) und in schwarz für PV-exprimierende Zellen (n = 8). In allen Zellen kann eine ChR2-vermittelte Depolarisation ausgelöst werden, wobei steigende Laserenergien mit größeren Amplituden korrelieren. Die Amplituden unterscheiden sich deutlich zwischen einzelnen Neuronen ohne Abhängigkeit vom Zelltyp (VIP- oder PV-exprimierende Zellen).
Ausreichend starke Laserstimulation löst in allen Zellen AP aus. Die Energieschwellen der AP für ChR2-transduzierte VIP- und PV-exprimierende Zellen sind als Boxplot-Diagramme mit 25-75% Quantilen angegeben. VIP- und PV-exprimierende Zellen benötigen eine vergleichbare Energie (VIP: Median: 0,064 µJ, 25% Quantile: 0,058 µJ, 75% Quantile: 0,523 µJ; PV: Median: 0,16 µJ, 25% Quantile: 0,042 µJ, 75% Quantile: 0,295 µJ) für die Induktion eines AP.

In allen der fünf VIP- und acht PV-exprimierenden Zellen, die untersucht wurden, kann durch Laserstimulation eine Depolarisation des Membranpotentials ausgelöst werden. Höhere Stimulusenergien bewirken größere Spannungsänderungen. Bei einer ausreichend starken Laserstimulation können alle Zellen über die Feuerschwelle depolarisiert werden, sodass AP ausgelöst werden. Dabei unterscheiden sich die Depolarisationsamplituden bei gleichen Laserenergien von Zelle zu Zelle, sodass stets verschieden hohe Energien zum Auslösen von AP notwendig sind. Diese Schwankungen weisen keine signifikante Abhängigkeit vom Zelltyp auf ($p=0{,}724$) und liegen bei VIP-Zellen im Median bei 0,064 µJ (25% Quantile: 0,058 µJ, 75% Quantile: 0,523 µJ) und bei PV-Zellen bei 0,16 µJ (25% Quantile: 0,042 µJ, 75% Quantile: 0,295 µJ) (Abb. 8).

Die induzierten AP (siehe Abb. A1 im Anhang) weisen für VIP-exprimierende Zellen ($n = 5$) im Median eine Latenz von 3,79 ms (25% Quantile: 2,50 ms, 75% Quantile: 4,46 ms) und für PV-exprimierende Zellen ($n = 8$) von 3,05 ms (25% Quantile: 2,71 ms, 75% Quantile: 3,33 ms) auf. Gemessen wurde die Zeit vom Stimulusbeginn bis zum Maximalwert der AP. Diese Latenzen beziehen sich auf die Schwelle der Laserenergie, bei der erstmals ein Aktionspotential induziert wurde. Bei weiterer Steigerung der Laserenergie verkürzen sich die Latenzen für VIP-exprimierende Zellen bei dreifacher Erhöhung auf 1,94 ms (25% Quantile: 1,71 ms, 75% Quantile: 2,49 ms) und bei der neunfachen Laserenergie in Bezug zur Schwelle auf 1,82 ms (hier $n = 1$). Für PV-exprimierende Zellen reduziert sich die Latenz entsprechend auf 1,96 ms (25% Quantile: 1,69 ms, 75% Quantile: 2,09 ms) bzw. auf 1,75 ms (25% Quantile: 1,28 ms, 75% Quantile: 1,94 ms). Die Latenzen der optisch evozierten AP unterscheiden sich bei allen untersuchten Stimulusenergien nicht signifikant zwischen VIP- und PV-exprimierenden Zellen. Zudem wird bei einer Stimulationsdauer von 1 ms bei beiden Interneuronenklassen stets nur ein AP ausgelöst.

3.3 Inhibitorische Projektionen von VIP- und PV- auf Martinotti-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich ChR2-transduzierte VIP- bzw. PV-exprimierende Zellen zuverlässig durch Laserstimulation depolarisieren lassen, wurden deren Projektionen auf MC in den Schichten II/III und V des Barrel-Kortex untersucht. Dafür wurden 47 MC mit cäsiumbasierter Pipettenlösung in *Whole-cell*-Konfiguration abgeleitet und deren Membranströme im *Voltage-clamp*-Modus aufgezeichnet.

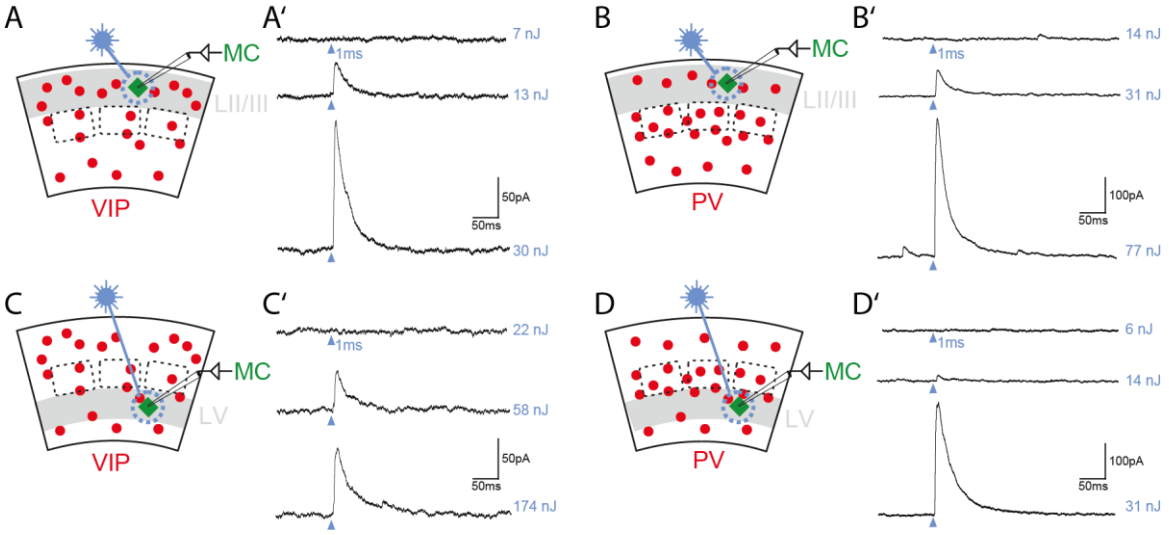

Abb. 9: Optisch evozierte IPSC an MC in LII/III und LV
(A-D) Schema der Versuchskonstellation. MC in LII/III (A, B) und LV (C, D) (Schichten: graue Balken) wurden in *Voltage-clamp*-Konfiguration bei +10 mV gehalten. Nach Laserstimulation (473 nm, 1 ms) ChR2-transduzierter VIP- (A, C) bzw. PV-exprimierender Zellen (B, D) (rote Punkte) im Umkreis von 95 µm (blaue gestrichelte Kreise) um die MC-Somata (grüne Rauten) wurden IPSC an den MC aufgezeichnet. Schemazeichnungen modifiziert nach Walker et al. 2016.
(A'-D') Beispielhafte IPSC-Messkurven zu den in A-D skizzierten Versuchen bei verschiedenen Laserenergien (Werte rechts neben den Ableitungen). Blaue Dreiecke markieren den Zeitpunkt der Laserstimulation. Bei unterschwelliger Stimulation werden keine IPSC registriert (jeweils obere Messkurve). Durch Steigerung der Laserenergie können sowohl bei Stimulation von VIP- (A', C') als auch von PV-Zellen (B', D') in MC der LII/III (A', B') und LV (C', D') lichtinduzierte IPSC ausgelöst werden (mittlere Messkurven), deren Amplitude bei weiterer Steigerung der Laserenergie zunimmt (untere Messkurven).

Da ausschließlich die Eingänge von inhibitorischen GABAergen Interneuronen gemessen werden sollten, wurden die MC auf ein Haltepotential von +10 mV geklemmt und somit die elektrochemische Triebkraft inhibitorischer Eingänge maximiert und exzitatorischer Eingänge reduziert. Zur Stimulation der präsynaptischen VIP- und PV-exprimierenden Zellen wurde der Laser auf das Umfeld der abgeleiteten MC fokussiert und, wie in den Kalibrierungs-Experimenten zuvor, wiederholte Stimulationen der ChR2-transduzierten Zellen mit steigenden Laserenergien durchgeführt (Schemata der Versuchskonstellation siehe Abb. 9A bis D).

Sowohl in LII/III als auch in LV können, bei Stimulation von VIP- oder PV-exprimierenden Zellen mit ausreichender Laserenergie, an MC lichtinduzierte IPSC gemessen werden (Abb. 9A' bis D'). Ausgehend von dem (individuell verschiedenen) minimalen IPSC-induzierenden Stimulus wurde die Laserenergie je nochmals ca. drei- und neunfach erhöht und die Messungen in der Auswertung in diese drei Stimulus-Stufen gruppiert.

Insgesamt wurden 47 MC abgeleitet und auf ihre inhibitorischen synaptischen Eingänge untersucht. Sie wurden hinsichtlich ihrer Schicht und der stimulierten präsynaptischen Zellpopulation in vier Gruppen eingeteilt: (1) VIP-Zellen → LII/III MC und (2) PV-Zellen → LII/III MC sowie (3) VIP-Zellen → LV MC und (4) PV-Zellen → LV MC.

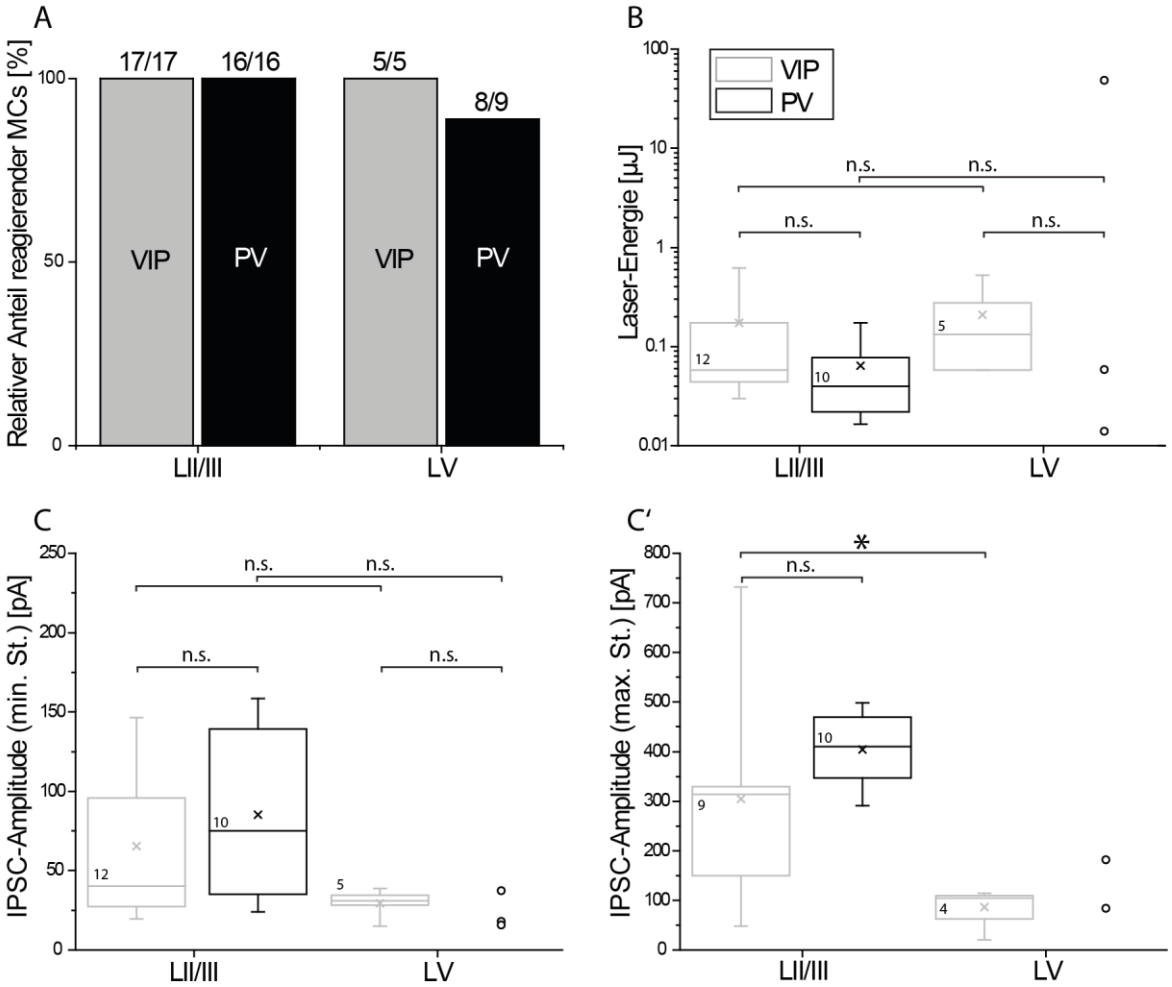

Abb. 10: Quantifizierung der optisch evozierten IPSC an MC in LII/III und LV

Optisch evozierte IPSC wurden nach Laserstimulation ChR2-transduzierter VIP- bzw. PV-exprimierender Zellen an MC in LII/III und LV abgeleitet und analysiert (vgl. Abb. 9). Box Plots zeigen Median (Querlinie), Mittelwert (Kreuz), 25-75% Quantile (Box), 10-90% Perzentile (Antennen) und Zellzahlen (Ziffer in der Box). PV-Eingänge auf LV MC sind bei $n \leq 3$ mit einzelnen Datenpunkten (schwarze Kreise) dargestellt. Statistischer Vergleich bezüglich der präsynaptischen Zellen und der Schichten mittels Whitney-Man-Rangsummentest (n.s. = nicht signifikant; * < 0,05); nur getestet wenn $n \geq 3$.

(A) Balkendiagramm des relativen Anteils der MC in LII/III und LV, bei denen nach Stimulation der präsynaptischen VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen lichtinduzierte IPSC gemessen wurden (MC mit lichtinduzierten IPSC/ alle abgeleitete MC dieser Gruppe). Fast alle MC erhalten inhibitorische Eingänge von VIP- und von PV-exprimierenden Zellen.

(B) Minimale Laserenergien, bei denen erstmals lichtinduzierte IPSC detektiert wurden, variieren zwischen den Experimenten sowohl bei Eingängen von VIP- (25-75%-Bereich: LII/III: 0,044-0,174 µJ; LV: 0,058-0,276 µJ), als auch von PV-exprimierenden Zellen (25-75%-Bereich: LII/III: 0,022-0,077 µJ; LV: 0,014-48,04 µJ). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der benötigten Laserenergie zur optischen Induktion von IPSC zwischen VIP- und PV-Zellen.

(C) Amplituden der lichtinduzierten IPSC bei minimaler Stimulusenergie (min. St.) auf MC in LII/III (MW ± SD: VIP: 65,49 ± 51,61 pA & PV: 85,27 ± 53,81 pA) und LV (VIP: 29,48 ± 8,95 pA & PV: 23,38 ± 12,07 pA).

(C') IPSC-Amplituden der maximal untersuchten, ausgehend vom minimalen IPSC-induzierenden Stimulus neunfach erhöhten, Stimulusenergie (max. St.) auf MC in LII/III (VIP: 304,23 ± 214,61 pA & PV: 404,05 ± 79,62 pA) und LV (VIP: 86,09 ± 43,98 pA & PV: 132,28 ± 69,24 pA). Höhere Laserenergie korreliert mit größeren Amplituden.

In VIPcre/GIN-Mäusen wurden 17 MC in LII/III und fünf MC in LV abgeleitet, die alle Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen erhalten (100%). In PVcre/GIN-Mäusen wurden 16 MC in LII/III und neun MC in LV abgeleitet, alle 16 MC in LII/III (100%) und acht der neun MC in LV (89%) erhalten Eingänge von PV-Zellen (Abb. 10A).

Die Analyse der optisch evozierten IPSC ergibt, dass die benötigte Laserenergie für minimale lichtinduzierte Eingänge von den präsynaptischen Zellen auf MC zwischen den Experimenten stark schwankt. Das gilt für Eingänge von VIP-exprimierenden (25-75%-Bereich: LII/III: 0,044-0,174 µJ; LV: 0,058-0,276 µJ), und von PV-exprimierenden Zellen (25-75%-Bereich: LII/III: 0,022-0,077 µJ; LV: 0,014-48,04 µJ) (Abb. 10B). Dies ist vereinbar mit der Beobachtung, dass für die Auslösung von AP in den ChR2-transduzierten Zellen bei variierender ChR2-Expression stets verschiedene Stimulusenergien nötig sind (siehe Abschnitt 3.2). Es gibt keine signifikante Korrelation der benötigten Stimulusenergien mit den präsynaptischen Zellpopulationen oder den kortikalen Schichten.

Höhere Stimulusenergien führen zu größeren IPSC-Amplituden (Abb. 10C und C'). Bei minimaler IPSC-induzierender Energie betragen die Amplituden (MW ± SD) in LII/III 65,49 ± 51,61 pA für Projektionen von VIP- bzw. 85,27 ± 53,81 pA von PV-exprimierenden Zellen.

In LV sind die Werte mit 29,48 ± 8,95 pA für VIP- und 23,38 ± 12,07 pA für PV-Projektionen ähnlich, sodass bei minimaler IPSC-induzierender Energie keine signifikanten Unterschiede zwischen den präsynaptischen Zellen oder den Schichten bestehen (Abb. 10C). Bei neunfacher Stimulusenergie ist die Amplitude der IPSC von VIP-Zellen auf LII/III MC mit 304,23 ± 214,61 pA signifikant höher als auf LV MC mit 86,09 ± 43,98 pA ($p=0,037$). PV-Zellen induzieren ähnlich große IPSC-Amplituden in LII/III MC (404,05 ± 79,62 pA). Für die Gruppe der LV MC, die Projektionen von PV-Zellen erhielten (132,28 ± 69,24 pA), wurden bei neunfacher Stimulusenergie keine statistischen Tests durchgeführt ($n = 2$) (Abb. 10C').

3.3.1 Kinetik der optisch evozierten IPSC

Weiterhin wurden kinetische Parameter der lichtinduzierten IPSC analysiert, darunter deren Latenz (Abb. 11), Anstiegszeit und Abfallzeit (Abb. 12).

Die Latenz wurde berechnet als Zeit vom Einsatz des Laserstimulus bis zum Überschreiten der Detektionsschwelle durch den induzierten IPSC. Bei höheren Laserenergien verkürzte sich die Latenz im Mittel aller Zellen von 4,08 ± 0,97 ms bei niedriger (min. St.), auf

3,14 ± 0,63 ms bei mittlerer (mtl. St.), bis zu 2,51 ± 0,41 ms bei hoher Stimulusenergie (max. St.) (Abb. 11A bis C).

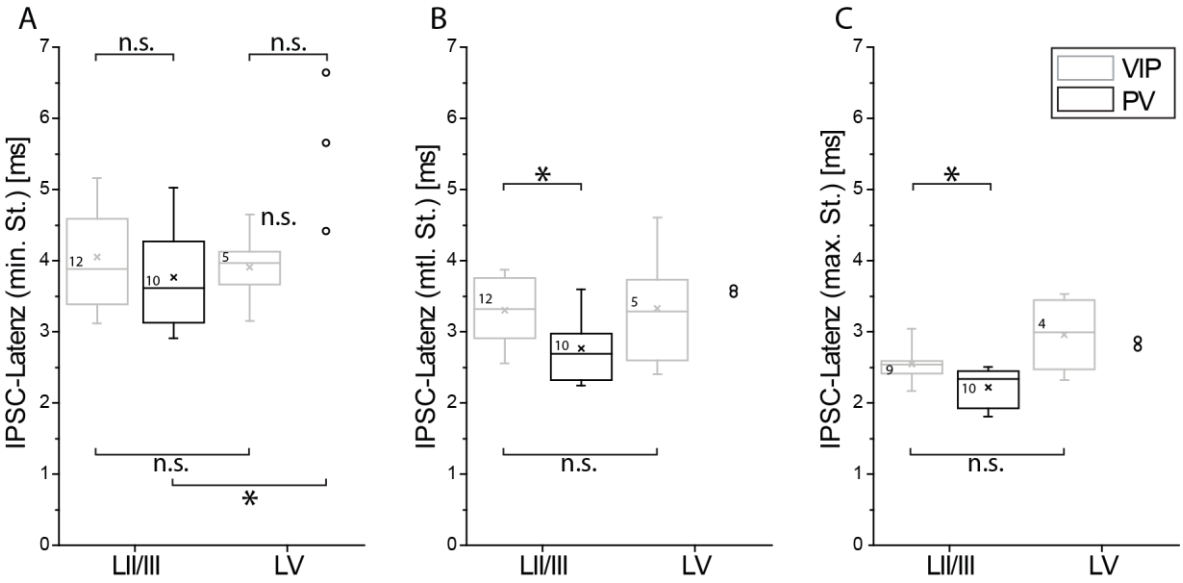

Abb. 11: Latenzen der optisch evozierten IPSC an MC in LII/III und LV
(A-C) Latenz des IPSC-Beginns nach Laserstimulation VIP- und PV-exprimierender Zellen (vgl. Abb. 9 und 10) bei der (im jeweiligen Experiment) minimalen IPSC-induzierenden Stimulusenergie (A), sowie bei der davon ausgehend jeweils etwa dreifachen (B) und neunfachen Energie (C). Mit zunehmender Stimulusenergie verkürzt sich die Latenz. Eingänge von PV-exprimierenden Zellen auf LII/III MC weisen bei mittlerer und hoher Stimulusenergie eine signifikant kürzere Latenz auf als Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen.

Im Vergleich der präsynaptischen Zellen zeigt sich ein signifikant schnellerer Eingang von PV- gegenüber VIP-exprimierenden Zellen auf LII/III MC bei mittlerer (VIP: 3,30 ± 0,51 ms; PV: 2,76 ± 0,57 ms; p=0,038) und bei hoher Stimulusenergie (VIP: 2,55 ± 0,24 ms; PV: 2,22 ± 0,29 ms; p=0,013). Bei minimaler Stimulusenergie tritt kein signifikanter Unterschied auf (VIP: 4,05 ± 0,92 ms; PV: 3,77 ± 0,83 ms).

Die Eingänge auf LV MC unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Latenz bei niedriger Laserintensität (VIP: 3,91 ± 0,55 ms; PV: 5,57 ± 1,12 ms). Bei mittlerer (VIP: 3,33 ± 0,89 ms; PV: 3,56 ± 0,05 ms) und hoher (VIP: 2,96 ± 0,58 ms; PV: 2,83 ± 0,08 ms) Laserintensität wurde keine statistische Testung durchgeführt (n = 2). Im Vergleich der Schichten zeigt sich eine signifikant kürzere Latenz der Eingänge von PV-exprimierenden Zellen auf LII/III MC als auf LV MC (p=0,035) bei niedriger Laserintensität. Die Projektionen VIP-exprimierender Zellen auf MC hingegen zeigen, unabhängig von der Laserenergie, keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Schichten.

Somit resultiert eine Erhöhung der Stimulusenergie in allen Fällen in einer deutlichen Verkürzung der Latenz, bei beiden präsynaptischen Zellpopulationen und in beiden untersuchten Schichten. IPSC von PV-exprimierenden Zellen haben eine bei allen Stimulusenergien kürzere

Latenz als von VIP-exprimierenden Zellen, bei mittlerer und hoher Stimulusenergie ist dieser Unterschied signifikant.

Die Anstiegszeit der IPSC, gemessen an deren aufsteigender Flanke als die Zeit von der Detektionsschwelle bis zum Maximum, und die Abfallzeit von dort bis zum Unterschreiten von 50% der Amplitude wurden bei minimaler und neunfacher (maximaler) Stimulusenergie untersucht (Abb. 12). Höhere IPSC-Amplituden bei stärkeren Stimulusenergien gehen mit steileren IPSC-Steigungen einher, sodass die Anstiegszeit sich nicht wesentlich verlängert (Abb. 12A und A').

Die mittlere Anstiegszeit der nach Stimulation von VIP-exprimierenden Zellen gemessenen IPSC beträgt in LII/III bei minimaler Stimulusenergie 6,91 ± 1,82 ms und ist signifikant länger als die von PV-exprimierenden Zellen mit 4,47 ± 1,37 (p=0,002). Dieser Unterschied ist als Trend auch bei maximaler Stimulusenergie zu erkennen (VIP: 8,40 ± 3,58 ms; PV: 5,49 ± 0,82 ms), aber dort nicht signifikant (p=0,094). In LV hingegen unterscheidet sich die Anstiegszeit mit 5,41 ± 1,89 (VIP) bzw. 4,11 ± 0,11 (PV) bei niedriger Stimulusenergie und 4,96 ± 0,59 ms (VIP) bzw. 7,73 ± 4,22 ms (PV) bei hoher Stimulusenergie nicht relevant. Der Vergleich der oben genannten Anstiegszeiten bezüglich der Schichten II/III und V ergibt für beide präsynaptischen Zellpopulationen und unabhängig von der Stimulusenergie keinen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend ändert sich die Anstiegszeit nicht relevant in Abhängigkeit von der Stimulusenergie. IPSC von VIP- zeigen aber eine längere Anstiegszeit als die von PV-exprimierenden Zellen, ein Unterschied, der in LII/III bei niedriger Stimulusintensität signifikant ist.

Die durchschnittliche Abfallzeit der IPSC unterscheidet sich deutlicher zwischen minimaler und maximaler Stimulusenergie als die Anstiegszeit. Sie ist im Mittel aller Zellen bei niedriger Stimulusenergie mit 12,81 ± 5,32 ms kürzer als bei hoher mit 16,19 ± 5,46 ms (Abb. 12B und B').

Die Abfallzeit der IPSC unterscheidet sich nicht signifikant in Abhängigkeit von der präsynaptischen Zellpopulation. Für von VIP-exprimierenden Zellen stammende IPSC beträgt sie in LII/III (bei minimaler Stimulusenergie) 14,44 ± 5,76 ms und für IPSC von PV-exprimierenden Zellen 12,13 ± 5,06 ms. Auch in LV sind die Abfallzeiten mit 10,32 ± 4,87 ms (VIP) und 12,67 ± 5,66 ms (PV) ähnlich. Bei hoher Stimulusintensität zeigt sich in LII/III ein nicht signifikanter Trend längerer Abfallzeiten für Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen (18,77 ± 5,45 ms) als von PV-exprimierender Zellen (14,33 ± 2,06 ms), während wegen gerin-

ger Versuchszahlen für Eingänge PV-exprimierender Zellen die Werte für LV mit 11,35 ± 1,71 ms (VIP) bzw. 26,51 ± 6,06 ms (PV) nicht statistisch auszuwerten waren.

Ein Vergleich dieser Werte in Bezug auf die Schichten II/III und V ergibt nur für IPSC von VIP-exprimierenden Zellen und bei hoher Stimulusintensität einen signifikanten Unterschied (LII/III: 18,77 ± 5,45 ms; LV: 11,35 ± 1,71 ms; p=0,025). Abgesehen davon lassen sich bei den Anstiegs- und Abfallzeiten der IPSC keine signifikanten Unterschiede bezüglich der präsynaptischen Zellpopulationen oder der Schichten II/III und V feststellen.

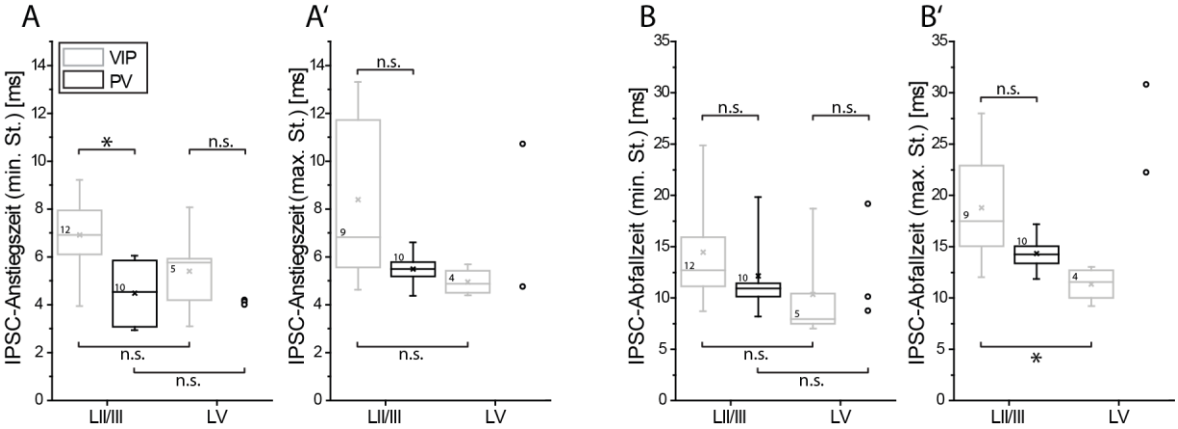

Abb. 12: Anstiegs- und Abfallzeit der optisch evozierten IPSC an MC in LII/III und LV
Nach Laserstimulation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen an MC abgeleitete lichtinduzierte IPSC (vgl. Abb. 9 bis 11) wurden auf ihre Kinetik untersucht.
(A, A') Anstiegszeit (von Detektionsschwelle bis zum Maximum) optisch evozierter IPSC bei jeweils minimaler IPSC-induzierender Stimulusenergie (A), sowie bei maximalem (ca. 9x) Stimulus (A'). Höhere Laserenergie beeinflusst kaum die Anstiegszeit (MW ± SD aller Zellen bei min. St.: 5,57 ± 1,93 ms; bei max. St.: 6,63 ± 2,75 ms). Bei minimaler Stimulusenergie ist die Anstiegszeit signifikant länger für IPSC von VIP- (6,91 ± 1,82) als von PV-exprimierenden Zellen (4,47 ± 1,37; p=0,002).
(B, B') Abfallzeit (Maximum bis 50% der Amplitude) optisch evozierter IPSC bei minimaler (B) und maximaler (B') Stimulusenergie. Höhere Laserenergie korrelliert mit längerer Abfallzeit. Die Werte der präsynaptischen Zellpopulationen sind ähnlich. Für MC in LII/III ist die Abfallzeit der VIP-Eingänge bei max. Stimulusenergie signifikant länger als in LV (p=0,025).

Somit fällt bei der Abfallzeit als Parameter der IPSC-Kinetik eine Abhängigkeit von der Stimulusenergie auf. Höhere Stimulusenergien führen zu einem längeren Abfall der IPSC. Signifikante Unterschiede bezüglich der präsynaptischen Zellpopulation zeigen sich nicht. Es besteht lediglich ein Unterschied zwischen den Eingängen von VIP-exprimierenden Zellen bezüglich der Schicht der postsynaptischen MC.

Zusammenfassend zeigen die untersuchten Parameter der IPSC-Kinetik geringe Unterschiede bezüglich der präsynaptischen Zellpopulation auf. Eine kürzere Latenz und tendenziell kürzere Anstiegszeit der IPSC von PV-exprimierenden Zellen gegenüber denen von VIP-exprimierenden Zellen fällt auf, bei vergleichbarer Abfallzeit. Signifikante Unterschiede zwi-

schen den Schichten II/III und V bestehen nur unter starker Stimulation in der Abfallzeit von IPSC VIP-exprimierender Zellen. Unabhängig von der präsynaptischen Zellpopulation sowie von der Schicht ergibt sich bei einer Erhöhung der Stimulusenergie eine verkürzte Latenz und eine verlängerte Abfallzeit der IPSC, während die Anstiegszeit keine direkte Abhängigkeit von der Stimulusenergie aufweist.

3.3.2 Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC

Vermittelt werden die postsynaptischen Ströme der Eingänge von VIP- und PV-exprimierenden Zellen vermutlich durch Aktivierung von ionotropen GABA-Rezeptoren des Typs A ($GABA_A$-Rezeptoren), die für Chlorid- und in geringerem Maße für Bicarbonat-Ionen durchlässig sind (Bormann et al. 1987; Kaila 1994; Delchmann 2018; Glöckner 2018).

Die Richtung und Stärke der durch die geöffneten Kanäle fließenden Ionenströme sind vom Membranpotential der Zelle und dem elektrochemischen Gleichgewicht der Ionen abhängig. Dieses kann mithilfe der Nernst-Gleichung (siehe Anhang Abschnitt 6.2) aus den intra- und extrazellulären Konzentrationen der Ionen berechnet werden. Bei den hier verwendeten Lösungen (intrazellulär cäsiumbasierte Pipettenlösung; extrazellulär ACSF; siehe Tab. A1 und A2 im Anhang) beträgt die Chlorid-Ionen-Konzentration intrazellulär 5 mM und extrazellulär 132,5 mM. Damit liegt das Gleichgewichtspotential von Chlorid-Ionen bei -84,2 mV. Die Konzentration der Bicarbonat-Ionen beträgt intrazellulär ca. 16 mM (Kaila 1994) und extrazellulär 26 mM, und somit das Gleichgewichtspotential von Bicarbonat-Ionen -12,5 mV.

In 13 MC der VIPcre/GIN- und 14 MC der PVcre/GIN-Mäuse wurde das Umkehrpotential der lichtinduzierten synaptischen Eingänge bestimmt. Das Umkehrpotential bezeichnet das Membranpotential, bei dem der Nettostrom über die Zellmembran 0 pA beträgt. Es hängt von den Gleichgewichtspotentialen und der Permeabilität der $GABA_A$-Ionenkanäle für die beteiligten Ionen ab. Zu dessen Bestimmung wurden die MC in *Voltage-clamp*-Konfiguration auf verschiedenen Membranpotentialen gehalten und wie zuvor die präsynaptischen Zellen per Laser stimuliert. In 5 mV-Schritten wurden sie auf wechselnden Potentialen zwischen -80 und -50 mV gehalten und lichtinduzierte IPSC gemessen (Abb. 13A und B).

Bei Stimulation der VIP-exprimierenden Zellen kann bei Haltepotentialen der MC von -60 mV und -65 mV ein positiver Strom, sprich ein Einstrom von Anionen, beobachtet werden. Dagegen wird bei -70 mV und -75 mV ein negativer Strom registriert (Abb. 13A). Bei Stimulation von PV-exprimierenden Zellen erfolgt der Wechsel zwischen Ein- und Ausstrom von Anionen bereits zwischen -60 mV und -65 mV (Abb. 13B). Die induzierten IPSC wurden einzeln ausgewertet und ihre Amplituden gegen die Haltepotentiale aufgetragen (Abb. 13A‘

und B‘). Durch Annahme einer lineare Regression konnte für jede MC das Umkehrpotential der lichtinduzierten IPSC bestimmt werden (für alle Daten siehe Tab. A3 im Anhang).

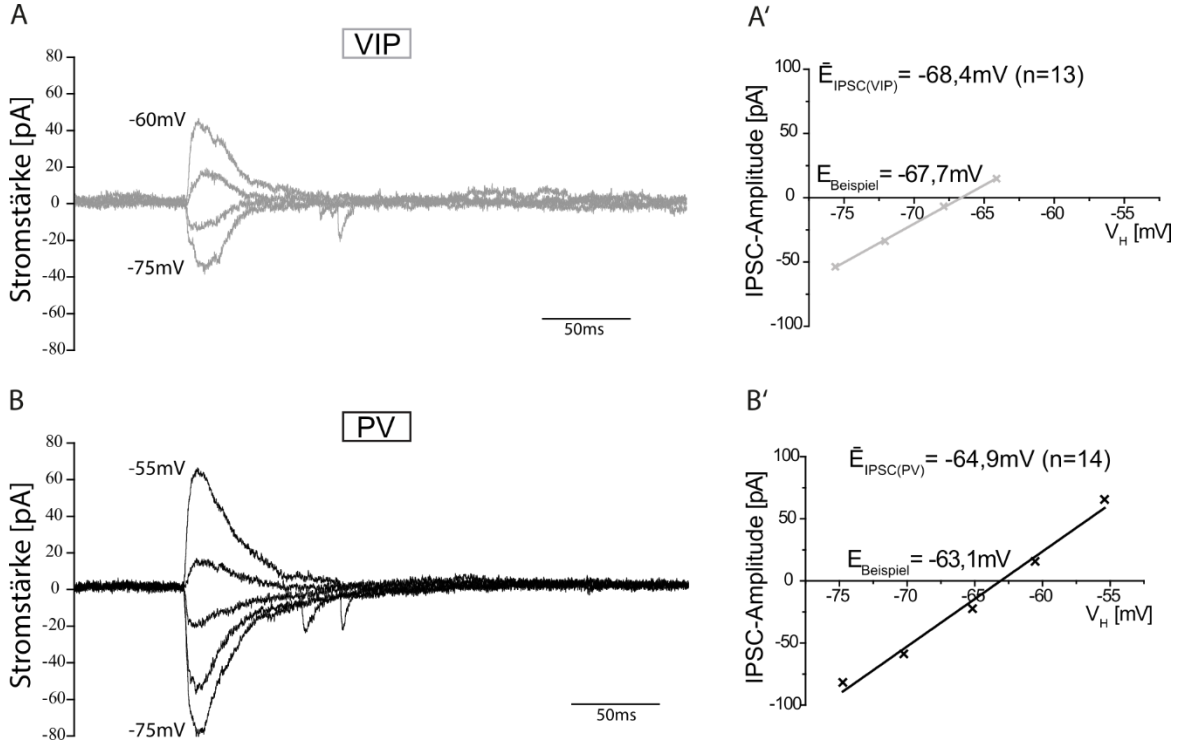

Abb. 13: Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC
(A) IPSC-Messkurven an einer MC bei verschiedenen Haltepotentialen nach Stimulation ChR2-transduzierter VIP-exprimierender Zellen. Die MC wurde auf Haltepotentiale von -60 bis -75 mV (5 mV-Schritte) geklemmt. In (A‘) sind die Amplituden der IPSC aus A gegen die Haltepotentiale aufgetragen. Das Umkehrpotential der Ströme wurde durch lineare Regression bestimmt ($E_{Beispiel}$ = -67,7 mV). Der Mittelwert aller Umkehrpotentiale ($\bar{E}_{IPSC(VIP)}$; n = 13) beträgt -68,37 ± 2,48 mV. Für alle Daten siehe Tab. A3 im Anhang.
(B) Nach Stimulation ChR2-transduzierter PV-exprimierender Zellen, analog zu der Darstellung in A, aufgetragene IPSC-Messkurven an einer MC bei Haltepotentialen von -55 bis -75 mV. In (B‘) sind die Amplituden der IPSC aus B gegen die Haltepotentiale aufgetragen, das Umkehrpotential beträgt -63,1 mV für die beispielhafte Messung, der Mittelwert aller Umkehrpotentiale ($\bar{E}_{IPSC(PV)}$; n = 14) beträgt -64,87 ± 6,19 mV.
Die Umkehrpotentiale der IPSC an MC sowohl bei Eingängen von VIP- als auch von PV-exprimierenden Zellen liegen im Bereich des Gleichgewichtspotentials von Chlorid-Ionen (-84,2 mV nach Nernst-Gleichung) minus des Diffusionspotentials (17 mV). Zwischen den beiden präsynaptischen Interneuronenklassen unterscheiden sich die Umkehrpotentiale signifikant (p=0,002).

Der Mittelwert der Umkehrpotentiale der IPSC beträgt für die Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen -68,37 ± 2,48 mV und für die PV-exprimierenden Zellen -64,87 ± 6,19 mV. Abzüglich des Diffusionspotentials (17 mV) liegen die Umkehrpotentiale im Bereich des Gleichgewichtspotentials von Chlorid-Ionen (-84,2 mV). Dabei ist das mittleren Umkehrpotential der Eingänge von VIP- signifikant negativer als das der Eingänge von PV-exprimierenden Zellen (p=0,002).

3.3.3 Axonales Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf Martinotti-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten lag der Fokus darauf, ob synaptische Eingänge von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC bestehen und welche Eigenschaften die IPSC aufweisen. Dabei wurden Somata, Axone und Präsynapsen der ChR2-transduzierten Zellen nichtselektiv in der perisomatischen Region der MC stimuliert. Der folgende Abschnitt handelt von der Untersuchung des räumlichen Musters, mit dem die VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC projizieren.

Es erfolgte eine Kartierung der Projektionen. Dafür wurde der Laserstrahl auf eine kleine, quadratische Fläche (50x50 µm) skaliert, schrittweise die Umgebung der abgeleiteten MC in einem gitterförmigen Muster stimuliert und induzierte IPSC an der MC abgeleitet. Stimulation von Feldern, in denen ChR2-positive Axone liegen, führt zur Depolarisation (AP-Generierung) und zur axonalen Fortleitung der AP sowie bei einer vorhanden synaptischen Projektion auf die abgeleitete MC zu IPSC. Da die Amplitude der gemessenen lichtinduzierten IPSC mit der Stärke der Projektionen der im stimulierten Feld verlaufenden Axone auf die abgeleitete MC korreliert, konnte anhand dieser Daten ein zweidimensionales Kartogramm erstellt werden, das den Verlauf und die vermutete Anzahl der Axone (der ChR2-transduzierten VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen), die auf die MC projizieren, abbildet.

Aufgrund von Unterschieden in der ChR2-Expression zwischen den Hirnschnitten schwanken die maximalen Amplituden der IPSC in den Experimenten von 10,88 bis 502,84 pA. Für jede MC wurden alle Werte auf die jeweils größte Amplitude normalisiert, sodass Werte zwischen 0 (kein IPSC) und 1 (IPSC maximaler Amplitude für die individuelle MC) resultieren. Diese Werte wurden farbkodiert in Kartogramme eingetragen (beispielhafte Einzelkartogramme siehe Abb. 14A bis A“). Die Ergebnisse sind, dem vorangegangenen Schema entsprechend, nach den präsynaptischen Zellen und der Schicht in vier Gruppen gegliedert. Für jede Gruppe wurde eine gemittelte Karte erstellt, indem alle Einzelkartogramme auf die Somata der MC aligniert wurden und der Mittelwert der normalisierten Amplituden für jedes Feld berechnet wurde (Abb. 14B bis B“). Zu Darstellungszwecken wurden diese Kartogramme zudem weichgezeichnet (Abb. 14C bis C“).

Die Kartogramme zeigen distinkte Projektionsmuster der präsynaptischen Interneuronenklassen. Im beispielhaften Kartogramm der Projektionen von VIP-exprimierenden Zellen auf eine MC (Abb. 14A) sind die höchsten Werte (dunkelrot) 150 µm oberhalb des MC-Somas lokalisiert. IPSC-Amplituden mit relativen Werten über 0,5 liegen fast gänzlich oberhalb und oberhalb-lateral des Somas, während lateral niedrigere Amplituden und insbesondere unterhalb des

Somas in Richtung der tieferen Schichten nur minimale Werte gemessen wurden. Am Soma wurde eine IPSC-Amplitude von 95,5 pA gemessen, normalisiert auf die maximale Amplitude dieses Kartogramms von 256,7 pA demnach ein relativer Wert von 0,37.

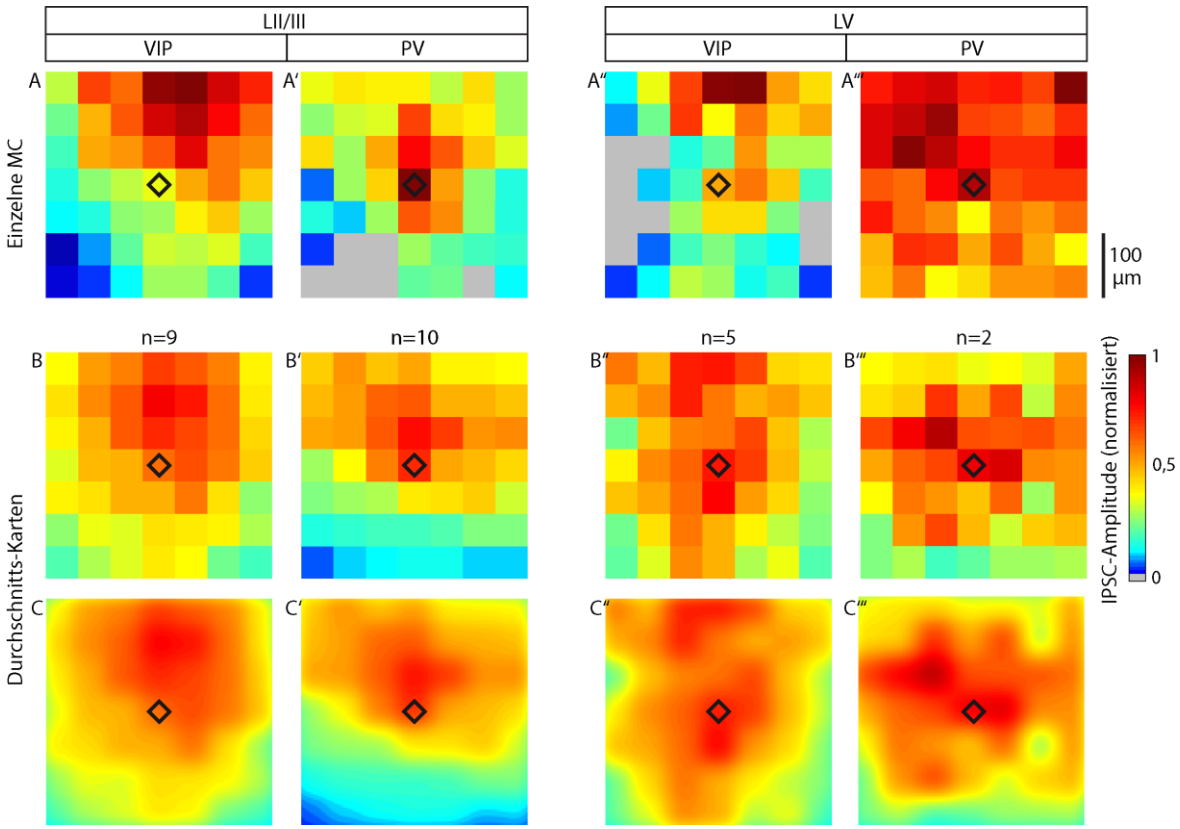

Abb. 14: Axonale Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC
ChR2-transduzierte inhibitorische Neuronenpopulationen (entweder VIP- oder PV-exprimierende Zellen) wurden mit einem 473 nm Laser in einem Raster (7x7 Felder; 50x50 µm Feldgröße) stimuliert. Die Amplituden der postsynaptisch an MC zur jeweiligen Stimulation abgeleiteten lichtinduzierten IPSC sind farbkodiert von blau über gelb bis rot in den zugehörigen Feldern dargestellt. Felder ohne Eingang sind in grau. Die Amplituden der gemessenen IPSC korrelieren mit der Stärke der Projektionen der im stimulierten Feld verlaufenden Axone auf die abgeleitete MC, sodass die Karten den Verlauf und die Stärke der Axone (der ChR2-transduzierten VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen), die auf die MC projizieren abbilden.
In den beiden linken Spalten sind die Eingänge auf LII/III MC von VIP- (A-C) bzw. PV-exprimierenden Zellen (A'-C'), in den rechten Spalten die Eingänge auf LV MC von VIP- (A''-C'') bzw. PV-exprimierenden Zellen (A'''-C''') gezeigt. Schwarze Rauten entsprechen der Position der MC-Somata.
(A-A''') Beispielhafte Einzelkartogramme der lichtinduzierten IPSC an MC. Innerhalb jedes Kartogramms wurden die IPSC-Amplituden auf die jeweils größte Amplitude normalisiert. Die axonalen Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC unterscheiden sich voneinander.
(B-B''') Durchschnitt aller Kartogramme der jeweiligen Schicht und präsynaptischen Zellpopulation. Für jedes Feld wurde der Mittelwert der entsprechenden Felder aller (zuvor normalisierten) Kartogramme berechnet und farbkodiert dargestellt. Alle Kartogramme sind auf die Somata der MC aligniert. Zellzahlen sind über den Durchschnittskartogrammen angegeben. VIP-exprimierende Zellen projizieren verstärkt in einer vertikalen, translaminären Orientierung, PV-exprimierende Zellen in einer horizontalen, intralaminären Orientierung auf MC sowohl der LII/III als auch LV.
(C-C''') Gaußsche Weichzeichnung der Durchschnittskartogramme aus (B-B''') für eine kontinuierliche visuelle Darstellung.

In der Mittelung aller Einzelkartogramme der axonalen Projektionen VIP-exprimierender Zellen auf MC in LII/III (Abb. 14B, n = 9) stellt sich das Projektionsmuster ähnlich wie im zuvor beschriebenen Beispiel dar. Die gemittelten IPSC haben die höchste Amplitude bei Stimulation oberhalb der MC-Somata, mit dem größten Wert 100 µm vertikal oberhalb des Somas. Schwächer sind VIP-Eingänge am und lateral des MC-Somas und am schwächsten unterhalb davon.

Die IPSC der axonalen Projektionen PV-exprimierender Zellen auf eine exemplarische MC in LII/III hingegen haben die höchste normalisierte Amplitude von 1,0 (hier 303,8 pA entsprechend) bei direkt somatischer Stimulation (Abb. 14B). Mittlere bis hohe Werte (0,29 bis 0,76) bestehen zudem in allen perisomatischen Feldern, während die abgeleitete MC von weiter unterhalb des Somas kaum axonale Projektion erhält (0 bis 0,28). Oberhalb und lateral des MC-Somas zeigt das Einzelkartogramm niedrige bis mittlere (0,08 bis 0,46) mit vereinzelten hohen Werten. Im gemittelten Kartogramm aller untersuchten MC der LII/III (n = 10) zeigen die axonalen Projektionsmuster von PV-exprimierenden Zellen die höchsten Werte im direkt (peri-)somatischen Bereich. Dabei zeichnet sich ein Muster mit stärkeren axonalen Projektionen von lateral ab, mit etwas niedrigeren Werten in der distalsten kartierten Reihe oberhalb und sehr geringen Werten insbesondere unterhalb des MC-Somas in Richtung der tieferen Schichten.

Im Gesamtbild der Durchschnittskartogramme in LII/III zeigt sich eine horizontale Orientierung der PV-Projektionen. Demgegenüber kommen die stärksten axonalen Projektionen von VIP-exprimierenden Zellen von oberhalb der MC-Somata und weisen eine mehr vertikale Orientierung auf. MC erhalten von beiden präsynaptischen Interneuronenklassen kaum Projektionen von unterhalb ihrer Somata aus Richtung der tieferen Schichten. Diese Verteilungen der axonalen Projektionsmuster stellen sich auch in einer ergänzenden Darstellung nach Gaußscher Weichzeichnung der Pixelstruktur der Kartogramme visuell eindrücklich dar (Abb. 14C und C').

Für MC der LV und ihren axonalen Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen lassen sich analoge Beobachtungen und ähnliche Schlussfolgerungen treffen. Die in Abb. 14A" dargestellten VIP-Eingänge auf eine MC der LV zeigen maximale Werte 150 µm oberhalb des MC-Somas (0,99 und 1,0; zwei dunkelrote Felder). Mittlere Werte von ca. 0,4 bis 0,6 zeigen die Eingänge am Soma und in einzelnen Feldern oberhalb davon. Unterhalb des MC-Somas in Richtung der weißen Substanz sind die Eingänge schwach (ca. 0,2 bis 0,4). Sehr schwach bis nicht messbar sind die Eingänge beidseits lateral ab Entfernungen von 100-150 µm. Die Mittelung der kartierten VIP-Eingänge in LV ergibt die stärksten Eingänge bei

Stimulationen in Feldern oberhalb des MC-Somas in Entfernung von 100-150 µm sowie direkt somatisch und perisomatisch. Hohe Werte von überwiegend 0,5 bis 0,8 finden sich mittig und beidseits bis zu 50 µm lateral oberhalb und unterhalb des Somas (entsprechend den drei mittleren Spalten dieses Durchschnittskartogramms), wobei innerhalb dieser Spalten die Eingänge in Richtung von LVI im Vergleich schwächer sind als die in Richtung der oberen Schichten. Weiter lateral sind beidseits die VIP-Eingänge mit ca. 0,3 bis 0,5 (grün bis gelb-orange) schwächer (Abb. 14B“ und C“). Dies entspricht einem relativ vertikal ausgerichteten Projektionsmuster der VIP-exprimierenden Zellen auf MC in LV.

Das beispielhafte Einzelkartogramm von PV-Eingängen auf eine LV MC (Abb. 14A“‘), zeigt in den meisten Feldern mittlere bis starke Eingänge mit besonders hohen Werten von 0,59 bis 1,0 auf horizontaler Höhe des MC-Somas und in allen Zeilen oberhalb des Somas. Unterhalb des Somas sind die Werte mit 0,41 bis 0,79 etwas schwächer. Die maximalen Amplituden sind bei Stimulation direkt (peri-)somatisch, sowie in einzelnen Feldern beidseits lateral oberhalb des MC-Somas auslösbar. Für das Durchschnittskartogramm der PV-Eingänge auf MC in LV standen nur Daten für zwei MC zur Verfügung, sodass die Aussagekraft hier geringer ist als für die anderen Zellpopulationen oder Schichten. Die stärksten Eingänge finden sich (peri-)somatisch ca. 50 µm lateral und lateral oberhalb des Somas, sowie am Soma selbst. Besonders schwach mit Werten von ca. 0,2 bis 0,4 (grün bis gelb) sind die durchschnittlichen PV-Eingänge sowohl 150 µm oberhalb als auch unterhalb des MC-Somas in Richtung supragranulärer Schichten bzw. Schicht VI. Lateral des Somas und direkt oberhalb davon sind die Eingänge beidseits mit ca. 0,5 bis 0,7 bis an den 150 µm vom Soma entfernten Rand des Kartogramms hoch. Das in LII/III beobachtete Muster der vermehrt horizontalen Orientierung der axonalen PV-Eingänge auf MC scheint ebenfalls für LV MC zuzutreffen (Abb. 14B“‘ und C“‘).

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass sich die axonalen Projektionsmustern von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC unterscheiden. VIP-exprimierende Zellen projizieren auf LII/III MC überwiegend von oberhalb der MC-Somata und auf LV MC in einer vertikalen, d.h. translaminären Orientierung. Axone von PV-exprimierenden Zellen projizieren hingegen in einer horizontalen, d.h. intralaminären Orientierung auf MC sowohl in der LII/III als auch LV.

Zur Quantifizierung der visuellen Ergebnisse der Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC der Schichten II/III und V wurde eine numerische Analyse der vertikalen Orientierung der axonalen Projektionen durchgeführt. Dafür wurden für jedes Durchschnittskartogramm (Abb. 14B bis B“‘) jeweils alle Eingänge (normalisierte IPSC-

Amplituden) aus einer horizontal, parallel zur Pia orientierten Reihe (50 µm Höhe, 350 µm Breite) summiert und gemittelt. Die so bestimmten Werte wurden im Vergleich der VIP- bzw. PV-Eingänge und getrennt für die Schichten II/III bzw. V, gegen ihre vertikale Distanz ober- bzw. unterhalb des MC-Somas aufgetragen und auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den VIP- und PV-Eingängen untersucht (Abb. 15A und B). Für alle numerischen Werte siehe Tab. A4 im Anhang.

Die horizontal gemittelten axonalen VIP-Eingänge auf LII/III MC zeigen die höchsten Werte oberhalb des MC-Somas mit einem Maximum von 0,93 in einer vertikalen Distanz von 100 µm. Auf der Ebene des MC-Somas (0-25 µm vertikale Distanz) sind die Eingänge schwächer, aber mit einem Wert von 0,80 immer noch hoch. Unterhalb davon, in Richtung der weißen Substanz, nehmen die VIP-Eingänge mit zunehmender vertikaler Distanz zum MC-Soma ab, mit einem minimalen Wert von 0,45 in einer Distanz von 150 µm.

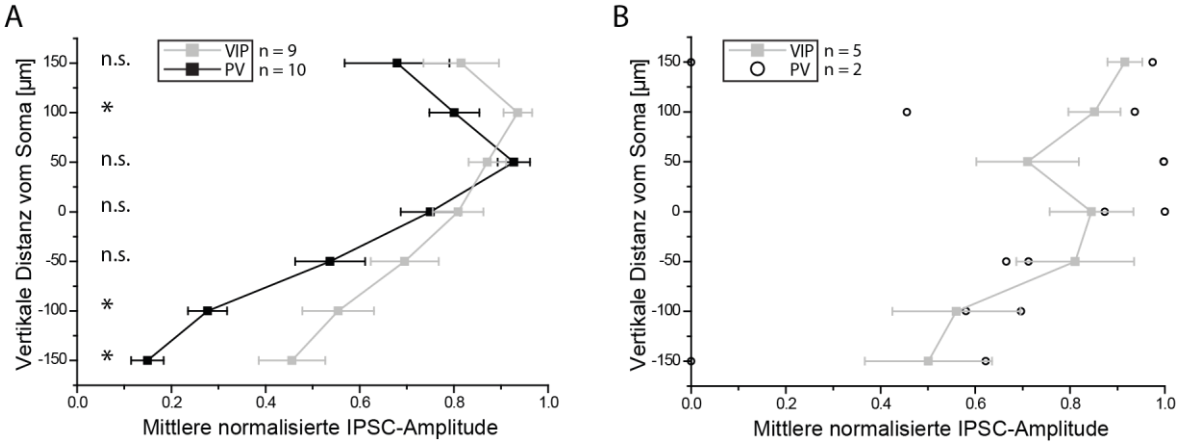

Abb. 15: Analyse der vertikalen Orientierung axonaler Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC

Die Eingänge (normalisierte IPSC-Amplituden) jeder horizontal kartierten, parallel zur Pia orientierten Reihe (50 µm Höhe, 350 µm Breite) eines Durchschnittskartogramms (Abb. 14B bis B“) wurden aufsummiert und gemittelt, um die Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC der Schichten II/III und V zu quantifizieren. Diese mittleren normalisierten Amplituden der VIP- (grau) bzw. PV-Eingänge (schwarz) wurden gegen ihre vertikale Distanz ober- bzw. unterhalb des MC-Somas (-150 bis +150 µm) aufgetragen (MW ± Standardfehler). Statistischer Vergleich der VIP- und PV-Eingänge bei n > 3. Für alle numerischen Werte siehe Tab. A4 im Anhang.

(A) Vertikales axonales Projektionsmuster auf MC der LII/III. Die normalisierten VIP-Eingänge sind in vertikaler Distanz von 100 µm oberhalb sowie -100 und -150 µm unterhalb des MC-Somas signifikant stärker als PV-Eingänge.

(B) Vertikales axonales Projektionsmuster auf MC der LV. Einzelnen Datenpunkte (schwarze Kreise) für Projektionen PV-exprimierender Zellen bei n = 2.

Die normalisierten Eingänge PV-exprimierender Zellen sind auf Höhe der MC-Somata am stärksten, und in vertikaler Distanz vom Soma signifikant (LII/III; (A)) bzw. im Trend (LV; (B)) schwächer als die von VIP-exprimierenden Zellen. Dies quantifiziert die in Durchschnittskartogrammen (Abb. 14B bis B“) zu beobachtende, vertikale und translaminäre Orientierung der axonalen VIP-, gegenüber einer horizontalen, intralaminären Orientierung der axonalen PV-Projektionsmuster.

Die axonalen PV-Eingänge auf MC der LII/III betragen auf Höhe des MC-Somas 0,75. Am stärksten sind die horizontal gemittelten PV-Eingänge mit 0,92 direkt 50 µm oberhalb des MC-Somas. In größerer vertikaler Distanz vom Soma in Richtung der Pia fallen die Werte bis auf 0,67 in 150 µm Entfernung. Stärker fallen die PV-Eingänge unterhalb des Somas mit zunehmender Distanz ab, bis zum minimalen Wert von 0,14 150 µm unterhalb des Somas.

Somit unterscheiden sich die VIP- und PV-Eingänge auf LII/III MC in verschiedenen vertikalen Distanzen vom MC-Soma voneinander. Der stärkste PV-Eingang erfolgt bei Stimulation 50 µm und der stärkste VIP-Eingang 100 µm oberhalb des Somas. In Höhe der maximalen axonalen VIP-Eingänge sind die PV-Eingänge signifikant geringer (VIP: 0,93; PV: 0,80; p=0,019). Unterhalb des MC-Somas sind für beide präsynaptischen Zellpopulationen die Eingänge geringer, je weiter entfernt vom Soma stimuliert wird. Für PV-Eingänge ist dieses Muster stärker ausgeprägt, sie sind unterhalb des Somas in Distanzen von 100 µm (VIP 0,55; PV 0,27; p=0,010) und 150 µm (VIP 0,45; PV 0,14; p=0,003) signifikant schwächer als die VIP-Eingänge.

Damit zeigen die PV-Eingänge eine signifikant stärkere Abhängigkeit von der vertikalen Distanz vom MC-Soma im Vergleich zu den VIP-Eingängen. Dieser Befund bekräftigt die Beobachtung aus Abb. 14 einer vermehrt horizontalen Orientierung der PV-Eingänge und einer stärker ausgeprägten vertikalen Orientierung der VIP-Eingänge. Für MC der LV und ihre VIP- und PV-Eingänge in vertikaler Orientierung lassen sich analoge Beobachtungen und ähnliche Schlussfolgerungen treffen (Abb. 15B). VIP-Eingänge variieren in ihrer vertikalen Distanz vom MC-Soma von minimal 0,50 (bei -150 µm) bis maximal 0,91 (bei +150 µm). Auf Höhe des MC Somas betragen die Eingänge 0,84. Die Abhängigkeit von der vertikalen Distanz ist damit vergleichbar oder sogar noch geringer als für VIP-Eingänge auf LII/III MC.

Für eine statistische Beurteilung der PV-Eingänge in LV sind keine ausreichenden Daten verfügbar. Der Trend zeigt im Vergleich zu VIP-Eingängen, analog zu LII/III, sehr hohe Werte auf Höhe des Somas (0,93) und direkt darüber (bei +50 µm: VIP: 0,71; PV: 0,99) und sehr niedrige Werte in großer vertikaler Distanz vom Soma sowohl in Richtung der Pia (bei +150 µm: VIP: 0,91; PV: 0,48) als auch in Richtung der weißen Substanz (bei -150 µm: VIP: 0,50; PV: 0,31). Damit liegt eine tendenziell vertikale Ausrichtung der axonalen Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen gegenüber einer horizontalen Ausrichtung dieser Eingänge von PV-exprimierenden Zellen, analog zu den Beobachtungen in Abb. 14, auch in LV vor.

Die in den Kartierungen der axonalen Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC schon qualitativ ersichtlichen distinkten Muster (siehe Abb. 14) sind somit quantitativ bestätigt. Die axonalen VIP-Projektionen sind vertikal zum MC-Soma und der Pia-

Oberfläche orientiert, während die axonalen PV-Projektionen eine horizontale Ausrichtung haben und somit in zunehmender vertikaler Distanz vom MC-Soma signifikant (LII/III) bzw. im Trend (LV) schwächer sind. Dies spricht für einen vertikalen, translaminären Verlauf der Mehrzahl der Axone von VIP-exprimierenden Zellen, die auf MC projizieren, und einen horizontalen, intralaminären Verlauf der Axone von PV-exprimierenden Zellen mit Projektionen auf MC.

3.4 Subzelluläres synaptisches Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden auf Martinotti-Zellen

In den bisherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass ChR2-transduzierte VIP- und PV-exprimierende Zellen sich durch Laserstimulation überschwellig depolarisieren lassen und Zellpopulationen MC der Schichten II/III und V inhibieren. Die IPSC werden an den Postsynapsen durch Ionenströme, deren Umkehrpotential im Bereich des Gleichgewichtspotentials von Chlorid-Ionen liegt, ausgelöst. Sie sind in ihren kinetischen Parametern teils schneller bei Projektionen von PV-exprimierenden Zellen, zeigen aber in den meisten kinetischen Eigenschaften keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dabei scheinen die auf MC projizierenden VIP-Axone eine vertikale, d.h. translaminäre, und die PV-Axone eine horizontale, d.h. intralaminäre, Orientierung aufzuweisen. Um die Funktion der Inhibition von MC durch VIP- und PV-exprimierende Zellen zu verstehen, ist aber nicht nur das Wissen um deren grundsätzliche Verbindung wichtig. Entscheidend für ein mechanistisches Verständnis der kortikalen Schaltkreise ist die Zielregion, d.h. die subzelluläre Region, auf der die Axone terminieren.

Um eine Kartierung der synaptischen Projektionsmuster zu erstellen, wurden nach der sCRACM-Methode (Petreanu et al. 2007; Petreanu et al. 2009) selektiv Präsynapsen ChR2-transduzierter VIP- oder PV-exprimierender Zellen stimuliert und die induzierten IPSC an den postsynaptischen MC gemessen. Durch die Blockade spannungsabhängiger Natrium-Kanäle mittels TTX wurde eine aktive Weiterleitung der AP entlang des Axons verhindert. Im Unterschied zu den vorangegangenen Experimenten ohne TTX (siehe Abschnitt 3.3) sollte lediglich eine Laserstimulation im Bereich einer ChR2-transduzierten Präsynapse zu synaptischer Übertragung führen, nicht aber Stimulation der Somata oder Axone der transduzierten Zellen. Unter diesen Bedingungen wurde die Umgebung der abgeleiteten MC wie zuvor mit dem Laser abgefahren (11x11 Felder, 50x50 µm Feldgröße) und zu jedem Feld die optisch evozierten IPSC mit cäsiumbasierter Pipettenlösung im *Voltage-clamp*-Modus aufgezeichnet.

Die Auswertung der gemessenen IPSC erfolgte analog zu der Auswertung der Kartierungen ohne TTX (siehe Abschnitt 3.3). Die IPSC jedes Feldes wurden einzeln bezüglich kinetischer

Parameter ausgewertet. Die Amplituden der IPSC wurden in Form eines zweidimensionalen Kartogramms in Relation zum Soma der abgeleiteten MC in ihrer räumlichen Verteilung dargestellt. Um die Ergebnisse der einzelnen Experimente vergleichen zu können, wurden wie zuvor in jedem Kartogramm alle Amplituden auf die jeweils größte Amplitude normalisiert. So resultierten Werte zwischen 0 (kein IPSC) und 1 (IPSC maximaler Amplitude), die farbkodiert in den Kartogrammen dargestellt wurden (Beispiele: Abb. 16A bis A'''; Alle Karten mit Rekonstruktionen der MC: Abb. A2 und A3 im Anhang).

Es wurden hierfür Daten von 22 MC ausgewertet, die nach Einwaschen der Pharmaka bis zum Abschluss aller elektrophysiologischen Ableitungen stabil geblieben waren, davon 16 in LII/III und sechs in LV. Alle abgeleiteten MC erhalten in mehreren kartographierten Feldern synaptische Eingänge von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen (Abb. A2 und A3 im Anhang). Es lassen sich bei beiden präsynaptischen Zellpopulationen verschiedene Verteilungsmuster ihrer synaptischen Projektionen auf die subzellulären Regionen der MC beobachten.

Das Einzelkartogramm des Projektionsmusters von VIP-exprimierenden Zellen auf eine MC der LII/III (Abb. 16A) zeigt eine breite Verteilung der inhibitorischen synaptischen Eingänge über alle Regionen. Die synaptischen Eingänge mit den größten Amplituden (max. 192,7 pA; normalisiert ca. 0,9 bis 1; dunkelrot) liegen in Feldern direkt 50 bis 100 µm oberhalb und lateral des MC-Somas. Direkt am Soma beträgt die IPSC-Amplitude 140,6 pA und ist somit relativ zum größten IPSC mit 0,73 mittelstark. IPSC werden in allen Distanzen, sowohl in den somatischen und perisomatischen Bereichen als auch in weiter distalen Regionen, teils bis zu einer Entfernung von 250 µm vom Soma ausgelöst.

Das gemittelte Kartogramm (Abb. 16B) der VIP-Eingänge auf alle untersuchten MC der LII/III (n = 8) ergibt ein ähnliches Projektionsmuster wie das beispielhafte Einzelkartogramm. Am Soma ist die Amplitude der synaptischen Eingänge mittelhoch (0,67), während der stärkste Eingang sich auf direkt 50 µm oberhalb des MC-Somas konzentriert. Auffällig sind die mittelstarken Eingänge auf periphere Regionen in bis zu 200 µm Distanz vom Soma. Schwache Eingänge (blau) sind selbst in Distanzen von bis zu 250 µm vorhanden. In einer Weichzeichnung des gemittelten Kartogramms (Abb. 16C) lässt sich das weitverteilte Projektionsmuster der VIP-exprimierenden Zellen auf die MC der LII/III eindrucksvoll ablesen.

Das beispielhafte synaptische Projektionsmuster PV-exprimierender Zellen auf eine LII/III MC zeigt die stärksten Eingänge direkt am MC-Soma (27,4 pA; normalisiert 0,96) sowie in Feldern direkt 50-100 µm darüber (0,95-1,0). Mittelstarke Eingänge von ca. 0,3-0,7 werden in den Zeilen oberhalb des Somas in Distanzen bis zu 150 µm gemessen, lateral bis zu 100 µm und unterhalb des Somas nur in bis zu 50 µm Distanz. In den distalen Feldern, in denen sich

potenzielle dendritische Kompartimente dieser MC befinden, lassen sich keine PV-Eingänge (grau) nachweisen (Abb. 16A‘).

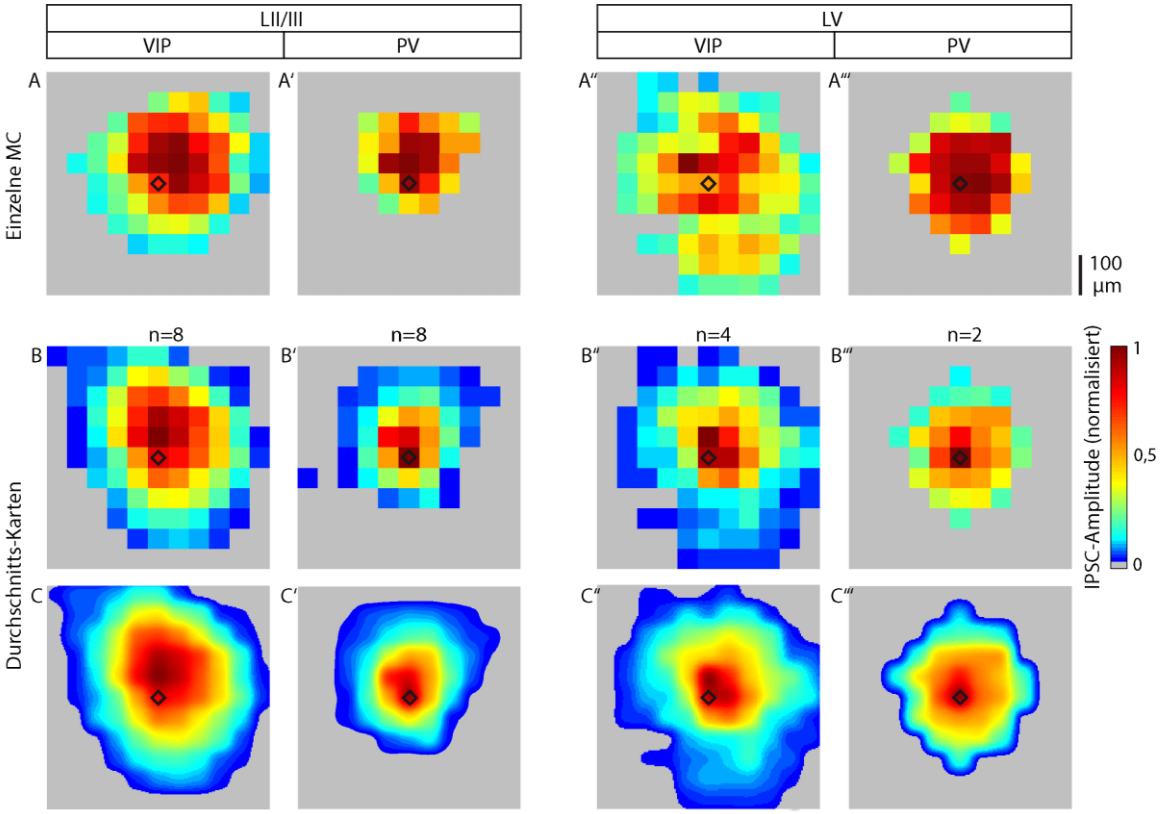

Abb. 16: Synaptische Zielregionen VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC-Dendriten in LII/III und LV

Präsynapsen ChR2-transduzierter inhibitorischer Neuronenpopulationen (entweder VIP- oder PV-exprimierender Zellen) wurden mittels der sCRACM-Methode (473 nm Laser, 11x11 Felder; 50x50 µm Feldgröße) im Umfeld einer abgeleiteten MC stimuliert. An der in *Whole-cell*-Konfiguration gepatchten MC wurden lichtinduzierte synaptische Eingänge abgeleitet. Normalisierte IPSC-Amplituden sind farbkodiert von blau über gelb bis rot in den zugehörigen Feldern dargestellt. Felder ohne Eingang sind grau.

In den linken beiden Spalten sind die Eingänge auf LII/III MC von VIP- (A-C) bzw. PV-exprimierenden Zellen (A‘-C‘), in den rechten Spalten die Eingänge auf LV MC von VIP- (A“-C“) bzw. PV-exprimierenden Zellen (A“‘-C“‘) gezeigt. Schwarze Rauten entsprechen der Position der MC-Somata.

(A-A´´´) Beispielhafte sCRACM-Kartogramme der synaptischen Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf einzelne MC. Innerhalb jedes Kartogramms wurden die IPSC-Amplituden auf die jeweils größte Amplitude normalisiert. VIP- und PV-exprimierende Zellen haben distinkte Projektionsmuster auf MC. Für alle Einzelkarten mit Rekonstruktion der MC siehe Abb. A2 und A3 im Anhang.

(B-B“‘) Durchschnittskartogramme aller Einzelkarten der jeweiligen Schicht und präsynaptischen Zellpopulation. Für jedes Feld wurde der Mittelwert aller (zuvor normalisierten) Kartogramme gebildet und farbkodiert dargestellt. Alle Kartogramme sind auf die MC-Somata aligniert. Zellzahlen sind über den Durchschnittskartogrammen angegeben. VIP-Projektionen enden in allen subzellulären Regionen, inklusive der distalen Bereiche in bis zu 250 µm Entfernung vom MC-Soma, während PV-Projektionen sich auf somatische, perisomatische und proximale subzelluläre Regionen konzentrieren.

(C-C“‘) Gaußsche Weichzeichnung der Durchschnittskartogramme aus (B-B“‘) für eine kontinuierliche Darstellung der Übergänge.

Das gemittelte Kartogramm von acht MC (Abb. 16B‘) zeigt ein konzentriertes Projektionsmuster von PV-exprimierenden Zellen auf MC der LII/III im Vergleich zu den VIP-Eingängen. Der stärkste Eingang (0,86) konzentriert sich direkt am Soma (0-25 µm), mit dem zweitgrößten Wert von 0,74 direkt oberhalb davon. An den perisomatischen und proximalen Regionen enden mittelstarke bis schwache Eingänge. Die distalen Bereiche erhalten keine (0; grau), oder vereinzelt minimale Eingänge (bis 0,1). Eine Weichzeichnung dieses Kartogramms (Abb. 16C‘) verdeutlicht visuell die Konzentration der starken Eingänge auf die somatische und perisomatische Region der MC.

Somit können distinkte synaptische Projektionsmuster auf die Dendritenbäume von MC der LII/III durch VIP- und PV-exprimierende Zellen angenommen werden. Die maximalen PV-Eingänge erfolgen im Bereich des MC-Somas (in bis zu 25 µm Distanz), die stärksten VIP-Eingänge hingegen auf proximale Bereiche oberhalb des Somas. PV-exprimierende Zellen projizieren bevorzugt auf die somatische und perisomatische Region und in geringerem Ausmaß auf die Bereiche in mittlerer Distanz, während sie im Gegensatz zu VIP-exprimierenden Zellen nicht auf die distalen Regionen projizieren. Synaptische VIP-Projektionen erfolgen auf alle Regionen inklusive der peripheren Bereiche und somit potenziell auf alle dendritischen Abschnitte.

In LV zeigen sich grundsätzlich ähnliche synaptische Projektionsmuster der VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen auf MC. Jedoch können die Projektionsmuster in LII/III nur begrenzt mit denen in LV verglichen werden, da die dendritische Morphologie der MC sich zwischen diesen Schichten unterscheidet. Zudem lagen in LV deutlich geringere Zellzahlen vor (VIP→MC: n = 4; PV→MC: n = 2) die eine fundierte Analyse und Aussage erschweren.

Die beispielhafte Kartierung der synaptischen Projektionen VIP-exprimierender Zellen auf eine MC der LV in Abb. 16A“ zeigt Projektionen in fast allen untersuchten Feldern. Eingänge im Feld links oberhalb des MC-Somas (50 µm Distanz) erzeugen die größte IPSC-Amplitude von 1,0 (91,2 pA). Die weiteren perisomatischen Felder und einzelne proximale Regionen erhalten starke Eingänge von ca. 0,7-0,9 und auch in distalen (200-250 µm entfernten) Bereichen enden Projektionen mittlerer Stärke von ca. 0,3-0,5 (grün bis gelb-orange).

Das Durchschnittskartogramm (Abb. 16B“; n = 4) spiegelt die Projektionen der VIP-exprimierenden Zellen auf alle potenzielle dendritische Abschnitte der LV MC wider. Die IPSC-Amplitude ist in der Mittelung aller Kartogramme am stärksten (0,85) direkt 50 µm oberhalb des MC-Somas, mit mittleren bis hohen Werten (ca. 0,4-0,7) perisomatisch und in den proximalen Regionen oberhalb des Somas in Richtung der Pia. Die Eingänge in distalen Bereichen sind im Mittel, insbesondere unterhalb des MC-Somas, vorhanden aber schwach

(ca. 0,1; blau). Diese Beobachtungen finden sich ebenso in dem weichgezeichneten Durchschnittskartogramm (Abb. 16C“).

Die beispielhafte Darstellung der synaptischen PV-Projektionen auf eine LV MC zeigt eine deutliche Konzentration auf die (peri-)somatischen Regionen (Abb. 16A“‘). Die Eingänge sind direkt am Soma (337,8 pA; bzw. 0,98 normalisiert), sowie perisomatisch in Distanzen bis 100 µm, bzw. oberhalb des Somas bis zu 150 µm, ubiquitär sehr groß (ca. 0,8-1,0). Dagegen sind die Amplituden in Feldern mit mittlerer Distanz klein (0,20-0,35) und ab 150-200 µm Entfernung lassen sich keine PV-Projektionen nachweisen (0; grau). Die zweite LV MC (Abb. A3 im Anhang) zeigt ebenfalls eine Präferenz ihrer PV-Projektionen auf die (peri-)somatische Region. In der Mittelung dieser zwei kartierten MC in LV zeigt sich eine Konzentration des stärksten PV-Eingangs direkt am Soma (0,99), wobei die Eingänge nach distal stark abnehmen (Abb. 16B“‘). Insbesondere in der weichgezeichneten Darstellung wird der abrupte Abfall der perisomatisch vorhandenen starken Eingänge ab Distanzen von über 100 µm deutlich (Abb. 16C“‘). Auf Soma-ferne Bereiche ließen sich keine PV-Projektionen nachweisen.

Somit scheinen VIP- und PV-exprimierende Zellen distinkte synaptische Projektionsmuster auf die subzellulären Regionen von MC zu haben. Dieses Muster ist besonders ausgeprägt für Projektionen auf MC der LII/III, aber auch in LV ansatzweise vorhanden. Den stärksten VIP-Eingang erhalten MC beider Schichten ca. 50 µm oberhalb ihrer Somata, den stärksten PV-Eingang direkt (peri-)somatisch in bis zu 25 µm Distanz. VIP-Projektionen wurden in allen Distanzen bis zu maximal 250 µm vom Soma kartiert, und enden somit auf allen potenziellen dendritischen Abschnitten, inklusive der distalen dendritischen Bereiche, während PV-Projektionen sich auf somatische bzw. perisomatische und proximale Bereiche konzentrieren. Im Vergleich der (normalisierten) Stärke der Eingänge sind die PV-Eingänge stark in Distanzen vom MC-Soma bis zu 100 µm, VIP-Eingänge hingegen bis zu Distanzen von 200 µm.

Zur Quantifizierung und statistischen Bewertung dieser distinkten Projektionsmuster wurden die Eingänge bezüglich ihrer Distanzen vom MC-Soma gruppiert (Soma, sowie 25-75, 75-125, 125-175, 175-225 und 225-275 µm Distanz vom Soma; zur Illustration siehe Abb. 17 Einsatz oben rechts). Alle normalisierten IPSC-Amplituden in Feldern gleicher Distanz wurden gemittelt, sodass für die mittleren VIP- bzw. PV-Eingänge jeder Distanz vom MC-Soma ein normalisierter Wert von 0 bis 1 resultiert. Diese Werte wurden in einem Balkendiagramm gegen ihre Distanz zum MC-Soma aufgetragen (Abb. 17A und A‘). Die Standardabweichung sowie der Standardfehler des Mittelwerts resultieren aus der Varianz zwischen den einzelnen sCRACM-Kartogrammen (für alle Kartogramme siehe Abb. A2 und A3 im Anhang). Diese Analyse wurde für jede Gruppe getrennt durchgeführt und die VIP- mit den PV-Eingängen derselben

Schicht statistisch verglichen. Für eine bessere Lesbarkeit sind die Daten mit Standardabweichung bzw. -fehler in Tab. A5 im Anhang aufgeführt.

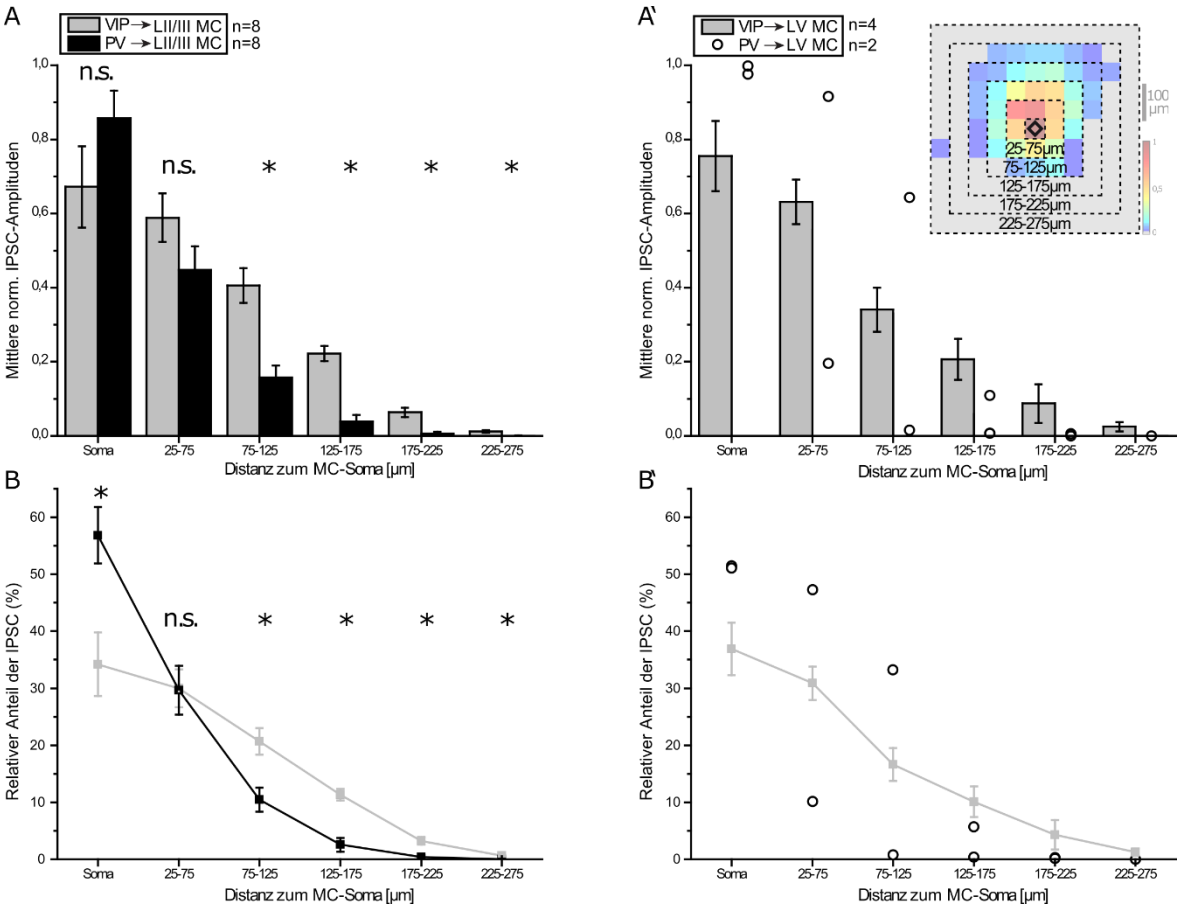

Abb. 17: Quantifizierung von VIP- und PV-Eingängen auf MC-Dendriten in verschiedenen Distanzen zum MC-Soma

(A) Balkendiagramm der mittleren normalisierten IPSC-Amplituden in einzelnen subzellulären Regionen. Synaptische VIP- und PV-Eingänge auf LII/III MC wurden bezüglich ihrer radialen Distanzen vom MC-Soma gruppiert (Soma, sowie 25-75, 75-125, 125-175, 175-225 und 225-275 µm Distanz vom Soma; zur Illustration siehe farbigen Einsatz oben rechts). Berechnungsgrundlage stellen die Daten aus Abb. 16 dar. Alle normalisierten IPSC-Amplituden in Feldern gleicher Distanz wurden gemittelt, sodass für die mittleren VIP- bzw. PV-Eingänge jeder Distanz vom MC-Soma ein normalisierter Wert von 0 bis 1 resultiert, der im Balkendiagramm gegen die Distanz aufgetragen wurde. Der Standardfehler (Antennen) resultiert aus der Varianz zwischen den einzelnen sCRACM-Kartogrammen. In allen Distanzen von mehr als 75 µm zum MC-Soma, sind die mittleren normalisierten Eingänge an LII/III MC von VIP- signifikant stärker als die von PV-exprimierenden Zellen.

(A') Für Eingänge auf LV MC wurde analog verfahren. PV-Eingänge sind bei n = 2 als einzelne Datenpunkte gezeigt (schwarze Kreise). Im Trend sind am MC-Soma mittlere normalisierte Eingänge von PV-, ab einer Distanz von 125 µm von VIP-exprimierenden Zellen größer.

(B) Kurvendiagramm des relativen Anteils einzelner subzellulärer Regionen an den Gesamteingängen von einer präsynaptischen Interneuronenklasse. Aus den Werten von A wurde die prozentuale Verteilung der Eingänge auf die Abschnitte in verschiedenen Distanzen vom MC-Soma berechnet. Der Standardfehler (Antennen) resultiert aus der Varianz zwischen den einzelnen sCRACM-Kartogrammen. Am Soma sind die relativen VIP- signifikant schwächer als die PV-Eingänge. In allen Distanzen von mehr als 75 µm zum MC-Soma sind die relativen VIP-Eingänge hingegen signifikant stärker.

(B') Eingänge auf LV MC wurden analog dazu analysiert. Im Trend sind am Soma die relativen PV-Eingänge, ab Distanzen von 125 µm hingegen die relativen VIP-Eingänge stärker.

Somit sind Projektionen PV-exprimierender Zellen auf die perisomatische Region von MC konzentriert. In mittleren und großen Distanzen vom MC-Soma von mehr als 75 µm in LII/III bzw. 125 µm in LV, ist der relative Anteil der VIP-Eingänge hingegen größer.

Für MC in LII/III weisen die Werte der VIP- und PV-Projektionen am Soma (0-25 µm Distanz; VIP: 0,67; PV: 0,86) und perisomatisch in 25-75 µm Distanz (VIP: 0,59; PV: 0,45) keine signifikanten Unterschiede auf. Betrachtet man die Distanzen ab 75 µm, so sind die mittleren normalisierten Eingänge von VIP- deutlich stärker als die von PV-exprimierenden Zellen; 75-125 µm (VIP: 0,41; PV: 0,16; $p<0{,}001$), 125-175 µm (VIP: 0,22; PV: 0,03; $p<0{,}001$), 175-225 µm (VIP: 0,06; PV: 0,01; $p=0{,}003$) und 225-275 µm (VIP: 0,01; PV: 0,00; $p=0{,}018$).

Für synaptische Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC in LV sind die PV-Eingänge tendenziell am Soma stärker (VIP: 0,76; PV: 0,99), aber perisomatisch (25-75 µm: VIP: 0,63; PV: 0,56) sowie in proximalen subzellulären Regionen (75-125 µm: VIP: 0,34; PV: 0,33) ähnlich stark wie VIP-Eingänge. In Entfernungen von 125-175 µm (VIP: 0,21; PV: 0,06), 175-225 µm (VIP: 0,09; PV: 0,00) und in den entferntesten Bereichen (225-275 µm: VIP: 0,02; PV: 0,00) sind, analog zu den Ergebnissen in LII/III, die PV-Eingänge tendenziell schwächer als VIP-Eingänge.

Damit bestätigt sich quantitativ die Beobachtung aus den gemittelten sCRACM-Kartogrammen (Abb. 16B bis B‘‘‘), dass VIP-exprimierende Zellen auf alle subzellulären Regionen von MC projizieren, während PV-exprimierende Zellen annähernd keine Projektionen auf distale Bereiche (175-225 µm) haben und im Vergleich auf Regionen mittlerer Distanz von den MC-Somata (75-175 µm) signifikant schwächere Projektionen besitzen.

Nachdem nun die Stärke der VIP- und der PV-Eingänge in verschiedenen Distanzen vom MC-Soma miteinander verglichen wurde, soll in einer abschließenden Fragestellung für die Projektionen von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen geklärt werden, welchen Anteil die Eingänge in den einzelnen Entfernungen vom Soma relativ zu den Gesamteingängen der jeweiligen Interneuronenklasse haben. Dafür wurden die einzelnen subzellulären Distanzen zum Soma in Relation zu den Gesamteingängen einer Gruppe betrachtet.

Die Berechnung erfolgte ausgehend von den normalisierten absoluten Werten (Abb. 17A und A‘). Der Eingang jeder Distanz wurde durch die Gesamteingänge dividiert und erneut gegen die Distanzen zum Soma aufgetragen. So ergeben alle resultierenden Werte in Summe 100%, während jeder einzelne Wert aussagt, welcher relative Anteil der Gesamteingänge von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen in welcher Distanz von den MC-Somata eingeht (Abb. 17B und B‘). Standardabweichung und -fehler resultieren aus der Varianz zwischen den einzelnen sCRACM-Kartogrammen. Diese Analyse wurde wie zuvor für jede Gruppe getrennt durchgeführt und die resultierenden relativen VIP- und PV-Eingänge derselben Schicht statistisch verglichen. Für alle Werte siehe Tab. A6 im Anhang.

In LII/III wurden Eingänge auf 16 MC (VIP→MC n = 8; PV→MC n = 8) analysiert. Am Soma konzentrieren sich 57% der PV-Gesamteingänge, signifikant mehr (p=0,015) als der Anteil der VIP-Gesamteingänge von 34%. Die Betrachtung der relativen Anteile der PV- bzw. VIP-Gesamteingänge zeigt hier einen Unterschied der Projektionsmuster auf, der bei alleiniger Berücksichtigung der absoluten normalisierten Werte (vgl. Abb. 17A) nicht signifikant ist. In 25-75 µm Distanz ist der relative Anteil der Eingänge beider Zellpopulationen identisch (VIP: 30%; PV: 30%), während in allen größeren Distanzen die relativen Eingänge VIP-exprimierender Zellen stärker sind. So betragen die relativen PV-Eingänge 10% (75-125 µm), 3% (125-175 µm) und in Distanzen über 175 µm 0%. Sie sind signifikant geringer als VIP-Eingänge in diesen Distanzen vom Soma mit 21% (p= 0,01; 75-125 µm), 11% (p= 0,001; 125-175 µm), 3 % (p= 0,007; 175-225 µm) und 1% (p= 0,018; 225-275 µm) (Abb. 17B).

Für Projektionen auf MC der LV (VIP→MC n = 4; PV→MC n = 2) zeichnen sich folgende Tendenzen ab: Der relative Anteil der Eingänge PV-exprimierender Zellen ist am Soma (0-25 µm) mit 51% größer als der VIP-exprimierender Zellen mit 37%. Perisomatisch (VIP: 31%; PV: 29%) und in 75-125 µm Entfernung vom Soma (VIP: 17%, PV: 17%) sind die relativen Eingänge beider Zellpopulationen ähnlich groß. In allen Distanzen größer als 125 µm ist hingegen für VIP-Eingänge der relative Anteil an den Gesamteingängen höher als für PV-Eingänge. Für VIP-exprimierende Zellen beträgt er 10% in mittleren, 4% in distalen und 1% in den entferntesten Regionen, während nur 3% des Anteils der PV-Eingänge auf mittlere Distanzen entfällt und 0% auf Distanzen größer als 125 µm vom MC-Soma (Abb. 17B').

Somit kann eine distinkte Verteilung der synaptischen Projektionen auf die Dendritenbäume von MC durch VIP- und PV-exprimierende Zellen angenommen werden. Projektionen PV-exprimierender Zellen sind stärker als die VIP-exprimierender Zellen auf die (peri-)somatische Region von MC konzentriert. In allen subzellulären Regionen mit einer Distanz von mehr als 75 µm in LII/III bzw. von mehr als 125 µm in LV ist der relative Anteil der VIP-Eingänge hingegen größer. In LII/III sind diese Unterschiede der Projektionsmuster signifikant.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Projektionen inhibitorischer Interneurone auf Martinotti-Zellen der Schichten II/III und V des Barrel-Kortex zu untersuchen. Dabei wurde der Fokus auf die Eingänge von VIP- und PV-exprimierenden Zellen gelegt. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, auf welche subzellulären Kompartimente die synaptischen Eingänge dieser beiden Interneuronenklassen bevorzugt lokalisiert sind. Dazu wurden Messungen der synaptischen Eingänge von beiden Zelltypen am Dendritenbaum von MC kartiert. Die ausgewerteten Daten stammen von mittels der *Patch-clamp*-Methode abgeleiteten Zellen, die direkt oder deren Eingänge nach optogenetischer Transduktion mit einem Laser stimuliert wurden. Für die subzellulären Kartierungen wurde die sCRACM-Methode angewendet, die eine Lokalisierung von ChR2-transduzierten Präsynapsen von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen ermöglicht.

Für Martinotti-Zellen in Schicht II/III und V des Barrel-Kortex der Maus können folgende Hauptaussagen getroffen werden:

1. Martinotti-Zellen werden zuverlässig durch VIP- und PV-exprimierende Zellen inhibiert. Von den untersuchten Martinotti-Zellen erhalten 100% Eingänge von VIP- und 96% Eingänge von PV-exprimierenden Zellen.
2. Durch PV-exprimierende Zellen ausgelöste IPSC haben eine signifikant kürzere Latenz sowie tendenziell größere Amplituden und eine schnellere Kinetik.
3. Die Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC liegen im Bereich des Gleichgewichtspotentials für Chlorid-Ionen.
4. Die axonalen VIP- und PV-Projektionen auf die postsynaptischen Martinotti-Zellen weisen distinkte Verlaufsmuster auf. Während die Axone der PV-Zellen eher horizontal intralaminär verlaufen, zeigen die Axone der VIP-Zellen eine eher vertikale translaminäre Ausrichtung, insbesondere in LV.
5. Projektionen PV-exprimierender Zellen terminieren bevorzugt auf die somatischen und perisomatischen Kompartimente von Martinotti-Zellen, wohingegen VIP-exprimierende Zellen auf den gesamten Dendritenbaum inklusive der distalen Dendriten projizieren.

4.1 Methodische Betrachtungen

Ob MC Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen erhalten, wurde mittels optischer Stimulation der ChR2-transduzierten präsynaptischen Zellen und simultaner elektrophysiologischer Ableitung der induzierten IPSC an MC untersucht. Die IPSC wurden des Weiteren in ihrer Latenz, Amplitude und Kinetik analysiert und verglichen.

Eine gezielte Stimulation der genetisch definierten Neuronenklassen wurde mittels Cre-abhängiger ChR2-Expression in transgenen Mäusen ermöglicht. Cre-Mauslinien werden als sehr spezifische und sensitive Modelle angesehen (Taniguchi et al. 2011; Walker et al. 2016). So sind VIPcre-Mäuse hochsensitiv und spezifisch für die gesamte Population VIP-exprimierender Zellen (Prönneke et al. 2015). Die Spezifität der ChR2-Expression in PVcre-Mäusen ist möglicherweise geringer, so wurde neben der Expression der Cre-Rekombinase in PV-Zellen (Hippenmeyer et al. 2005; Pfeffer et al. 2013) eine vereinzelte Expression auch in Pyramidenzellen der LV vermutet (Witte und Staiger 2018) und kürzlich nachgewiesen (Hafner et al. 2019). Alle in dieser Arbeit abgeleiteten ChR2- und mCherry-exprimierenden PV- und VIP-Zellen wurden anhand ihrer elektrophysiologischen Charakteristika und ihrer Morphologie in ihrer Identität bestätigt (siehe Abschnitt 4.2.1). Für postsynaptische Messungen der Eingänge auf MC wurden diese im *Voltage-clamp*-Modus auf +10 mV geklemmt. Somit wurde die Triebkraft für mögliche exzitatorische Eingänge von Pyramidenzellen in PVcre-Mäusen minimiert, da diese ein Umkehrpotential von ca. 0 mV haben, der elektrochemische Gradient für inhibitorische Eingänge durch den Einstrom von Chlorid-Ionen (Umkehrpotential ca. -84,2 mV) jedoch maximiert. Des Weiteren ist die Latenz der lichtinduzierten IPSC bei der PV-transduzierten Zellpopulation stets schneller als die der reinen VIP-Population und liegt zudem in einem Bereich von 2,2 bis 3,8 ms, so dass eine disynaptische Transmission ausgeschlossen werden kann.

Die Nutzung optogenetischer Methoden für die Stimulation der präsynaptischen Zellen ermöglicht insbesondere eine genetische sowie eine hohe zeitliche und örtliche Spezifität der Stimulation im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren mit Elektroden (Scanziani und Häusser 2009). In der Literatur finden sich konträre Aussagen, inwieweit diese Methode zur quantitativen Analyse synaptischer Eigenschaften geeignet ist (Petreanu et al. 2007; Knöpfel und Boyden 2012). Transduktion der präsynaptischen Zellen mittels eines Cre-abhängigen Virus führt zu unterschiedlichen Expressionsraten der ChR2 zwischen den Tieren und zwischen einzelnen Zellen. Dies bedingt eine hohe Varianz der lichtinduzierten Depolarisationen und kann quantitative Analysen synaptischer Eigenschaften erschweren.

Im Gegensatz zu Paarableitungen kann optische Stimulation Axone mehrerer Zellen simultan aktivieren und synaptische Übertragungen sowohl direkt durch lichtinduzierte Depolarisation einer Präsynapse als auch sekundär durch Generierung von AP im Soma oder in anderen axonalen Abschnitten auslösen (Petreanu et al. 2009). Verschiedene Latenzen der induzierten synaptischen Übertragungen können zu einer Überlagerung mehrerer Komponenten im postsynaptischen IPSC führen, und somit distinkte IPSC-Eigenschaften maskieren. Zudem verfügen ChR2 über eine eigene Kinetik, die sich in Messungen mit der IPSC-Kinetik überlagern kann (Knöpfel und Boyden 2012). Auch kann die ChR2-vermittelte Depolarisation von Neuronen sich abhängig vom Zelltyp unterscheiden (Herman et al. 2014). Während optogenetische Methoden hervorragend dafür geeignet sind, die Existenz von Verbindungen zwischen Zellpopulationen nachzuweisen, sind sie demnach für die Evaluation der Kinetik postsynaptischer Ströme deutlich weniger exakt als Paarableitungen.

Durch gezielte räumliche Skalierung der optischen Stimulation der ChR2-transduzierten Zellen wurden in dieser Arbeit mittels der sCRACM-Methode nach Petreanu et al. die Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf dendritische Kompartimente von MC in subzellulärer Auflösung kartiert. Nicht in allen nach dieser Methode kartierten Feldern, in denen ein optisch evozierter IPSC gemessen wurde, liegt ein Ast des gefüllten und rekonstruierten Dendritenbaums der abgeleiteten MC. Solche falsch positiven Messungen liegen in einigen Kartogrammen in Distanzen bis zu 100 µm entfernt vom nächstgelegenen dendritischen Ast vor. Dies deckt sich mit Messungen von Petreanu et al., die in ihren sCRACM Experimenten ebenfalls falsch positive Felder in einer Entfernung bis zu 60 µm vom Dendriten der postsynaptischen Zelle nachweisen konnten. In einem Kartogramm für MC der L5 lag für VIP-Projektionen eine höhere Abweichung vor (200 µm). Insgesamt konnte für 5 von 22 abgeleiteten MC keine Rekonstruktion des Dendritenbaumes erhoben werden. Die Daten dieser Zellen wurden jedoch für die Analysen berücksichtigt, da die Kartogramme sich nicht eindeutig von denen mit Rekonstruktion unterschieden.

Für eine optimale Auflösung dürfen die ChR2-transduzierten präsynaptischen Axone nur im Bereich des Laserstrahls überschwellig depolarisieren und synaptische Vesikel freisetzen. Eine Depolarisation kann in Axonen aktiv und passiv weitergeleitet werden (Purves et al. 2001). Die aktive Fortleitung wurde effizient mittels TTX blockiert, sodass die Auflösung von der passiven axonalen Fortleitung abhängt, welche im Gegensatz zur aktiven Weiterleitung nicht blockiert werden kann. Während der passiven Fortleitung wird die Depolarisation stark abgeschwächt, dennoch können gegebenenfalls Synapsen außerhalb des Laserstrahls aktiviert werden. Die maximale Distanz vom Stimulationsort hängt von der axonalen Membranlängskonstante und dem Ausmaß der Depolarisation ab, welche wiederum vom ChR2-Expressionsgrad

und der Laserenergie abhängt (Purves et al. 2001; Williams und Mitchell 2008; Petreanu et al. 2009).

Zwischen Hirnschnitten und zwischen einzelnen Zellen innerhalb eines Schnittes variiert das Ausmaß der Depolarisation bei identischer Laserenergie stark und zeigt keine statistische Abhängigkeit vom Zelltyp. Dieses Phänomen erklärt sich durch variierende ChR2-Expressionslevel und ist für ChR2-Expression mittels viraler Transduktion bekannt (Atasoy et al. 2008; Petreanu et al. 2009). Typischerweise ist die Expression im Zentrum der Injektion am höchsten und nimmt mit der Entfernung ab (Nathanson et al. 2009). Dies macht eine individuelle Kalibrierung der Laserenergie und eine Normalisierung der Messwerte in jedem Experiment notwendig. Für die Kalibrierung fehlt ein einheitlicher Maßstab, sodass in einzelnen Experimenten eine überhöhte Laserenergie und somit eine übermäßige präsynaptische Depolarisation nicht ausgeschlossen werden kann. Durch Normalisierung der gemessenen IPSC auf die jeweils größte gemessene Amplitude eines Kartogramms ist dies für den Vergleich der relativen Werte nicht relevant, beeinflusst aber die Auflösung negativ. In zukünftigen Experimenten könnte durch *in-utero*-Elektroporation eine gleichmäßigere ChR2-Expression erreicht werden (Knöpfel und Boyden 2012), um die Bestimmung einer konstanten optimalen Laserenergie zu ermöglichen. Eine andere Möglichkeit bestünde in der Detektion des Dendritenbaumes im Experiment selbst, um die Laserenergie daran zu kalibrieren. Aufgrund des heterogenen Dendritenbaumes von MC ist eine Vorhersage im akuten Hirnschnitt, wie sie für *spiny stellate cells* in der Schicht IV des Barrel-Kortex getroffen werden kann (Guy et al. 2017), nicht möglich. Eventuell könnte eine Applikation von Farbstoffen (Alexa Fluorophore) in die intrazelluläre Pipettenlösung kombiniert mit einem hochauflösenden 2-Photonenmikroskop den Dendritenbaum direkt während des Experimentes darstellen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Stimulation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen

Mittels optischer Stimulation wurden in dieser Arbeit Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität der Virus-Transduktion, wurden die mCherry-positiven, ChR2-exprimierenden VIP- und PV-Zellen elektrophysiologisch charakterisiert, mit Biocytin gefüllt, gefärbt und unter dem Mikroskop morphologisch beurteilt.

Alle in VIPcre-Mäusen untersuchten ChR2-transduzierten Zellen zeigen ein kontinuierlich adaptierendes oder irreguläres Feuermuster sowie eine doppelt gebüschelte oder bipolare so-

matodendritische Morphologie, übereinstimmend mit Beschreibungen der heterogenen VIP-Zellpopulation in der Literatur (Kawaguchi und Kubota 1996; Cauli et al. 1997; Lee et al. 2010; Rudy et al. 2011; Prönneke et al. 2015). Die abgeleiteten Virus-transduzierten Zellen in PVcre-Mäusen weisen alle ein schnelles Feuermuster und eine multipolare Konfiguration mit meist großem, runden Zellkörper auf. Diese Merkmale sind charakteristisch für PV-exprimierende Zellen (Cauli et al. 1997; Kawaguchi und Kubota 1997; Ascoli et al. 2008; Rudy et al. 2011). Somit wurden die abgeleiteten Zellen sicher als VIP- bzw. PV-exprimierende Zellen identifiziert und eine ausreichende Spezifität der ChR2-Transduktion gesichert.

Um auf ausreichend hohe ChR2-Expressionslevel zu testen, wurden die abgeleiteten ChR2-transduzierten Zellen per Laser stimuliert und die lichtinduzierte Depolarisation aufgezeichnet. Alle Neurone ließen sich durch adäquate Stimuli bis zur Feuerschwelle depolarisieren. Da ChR2 verteilt in der gesamten Zellmembran, inklusive der neuronalen Fortsätze, eingebaut werden, ist davon auszugehen, dass sich mit ausreichend hoher Laserenergie auch bei Stimulation einzelner Präsynapsen zuverlässig synaptische Übertragungen auslösen lassen (Atasoy et al. 2008; Petreanu et al. 2009; Knöpfel und Boyden 2012).

4.2.2 Inhibitorische Projektionen VIP- und PV-exprimierender Zellen auf Martinotti-Zellen

Um MC sicher gegenüber anderen Neuronen abzugrenzen, wurden GIN-Mäuse sowie elektrophysiologische und morphologische Charakteristika von MC verwendet. Die GIN-Maus ist eine gut charakterisierte transgene Mauslinie, bei der eine Subpopulation SST-exprimierender GABAerger Interneurone mit GFP fluoreszenzmarkiert ist (Oliva et al. 2000; Fischer 2018). MC sind die größte Subpopulation SST-exprimierender Interneurone und sollen ca. 80% der GFP-exprimierenden Neurone in GIN-Mäusen ausmachen, sodass dieses Mausmodell gut für die Untersuchung von MC geeignet ist (Ma et al. 2006; Fanselow et al. 2008; McGarry et al. 2010). Anhand ihrer GFP-Fluoreszenz wurden ausschließlich diese Zellen zur elektrophysiologischen Ableitung ausgewählt und für eine eindeutige morphologische Charakterisierung mit Biocytin gefüllt und gefärbt. Für alle in dieser Arbeit berücksichtigten MC stimmen die charakteristischen morphologischen Merkmale, insbesondere ihre zur LI aufsteigenden und sich dort breit verzweigenden Axonkollateralen sowie meist ovale Zellkörper mit multipolar abgehenden Dendritenästen, mit der Literatur überein (Wang et al. 2004; Markram et al. 2004). Mittels in *Current-clamp*-Konfiguration injizierter Strompulse wurden die GFP-positiven Zellen zu Beginn der Ableitungen elektrophysiologisch charakterisiert. Für die Messung distaler dendritischer Eingänge in den folgenden Versuchsteilen musste eine cäsiumbasierte Pipettenlösung eingesetzt werden. Über die Blockade von Kaliumkanälen verändert Cäsium die elekt-

rophysiologischen Eigenschaften der abgeleiteten Zellen (Adelman und Senft 1966). Als Kontrolle wurden einzelne MC mit kaliumbasierter Pipettenlösung abgeleitet und unter anderem das typische leicht depolarisierte Ruhemembranpotential (-63,40 ± 3,41 mV) sowie eine niedrigen Feuerschwelle (-37,85 ± 3,14 mV) bestimmt. Bei Verwendung von Cäsium wurden kurze charakterisierende Messungen direkt nach Erreichen der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt, um den Einfluss des Cäsiums zu verringern, sodass das Ruhemembranpotential initial mit -64,69 ± 2,26 mV bestimmt werden konnte. Damit liegt es auf dem Niveau der Ableitungen ohne Cäsium und wurde erst unter zunehmender Diffusion langsam positiver. Typisch für MC ist des Weiteren das stets beobachtete adaptierende Feuermuster. Diese Werte sind vereinbar mit den in der Literatur beschriebenen Messwerten für MC in GIN-Mäusen und Ratten (Ruhemembranpotential -67 bis -55 mV; Feuerschwelle -47 bis -36 mV) (Wang et al. 2004; Ma et al. 2006; McGarry et al. 2010).

Letztlich wurden die abgeleiteten Zellen anhand dieser drei Parameter sicher als MC identifiziert: (1) Der GFP-Fluoreszenz der abgeleiteten Zellen in der GIN-Maus, bei der weitestgehend MC mit GFP markiert sind. (2) Der morphologischen Charakterisierung, anhand des in LI aufsteigenden und sich dort weit verzweigenden Axons. (3) Des adaptierenden Aktionspotentialmusters in den elektrophysiologischen Ableitungen.

Anschließend wurden ihre inhibitorischen Eingänge untersucht. GABAerge inhibitorische Interneurone projizieren nicht nur auf exzitatorische Zellen, sondern auch auf andere inhibitorische Interneurone. So erhalten MC starke inhibitorische Projektionen. PV- und VIP-exprimierende Zellen sind neben MC die größten nicht-überlappenden inhibitorischen Zellpopulationen. Zusammen mit MC machen sie ca. 61-80% der Interneurone aus (Xu et al. 2010; Hioki et al. 2013; Pfeffer et al. 2013), sodass sie wahrscheinlich Ursprünge der Inhibition von MC darstellen. In der Tat wurden Projektionen von VIP-exprimierenden Zellen auf MC in vielen kortikalen Arealen bestätigt (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013; Jiang et al. 2015; Karnani et al. 2016a; Karnani et al. 2016b). Für Projektionen PV-exprimierender Zellen auf MC gibt es zunehmende Evidenz, teils aber konträre Aussagen (Pfeffer et al. 2013; Jiang et al. 2015; Karnani et al. 2016b).

Für den primären somatosensorischen Barrel-Kortex der Maus konnte in dieser Arbeit, mittels optogenetischer Stimulation VIP- und PV-exprimierender Zellen und elektrophysiologischer Ableitung an MC, gezeigt werden, dass MC zuverlässig Eingänge sowohl von PV- als auch von VIP-exprimierenden Zellen erhalten. In LII/III erhalten 100% der MC Eingänge beider Zellpopulationen, MC in LV erhalten in dieser Arbeit zu 89% PV- und in 100% VIP-Eingänge. In weiteren Versuchen unseres Labors wurden neben optogenetischen Methoden

elektrophysiologische Paarableitungen von PV-exprimierenden Zellen auf MC durchgeführt und diese Verschaltung eingehend untersucht (Walker et al. 2016). So zeigte sich in Paarableitungen, dass Projektionen einer abgeleiteten PV-exprimierenden Zelle auf eine MC in LII/III des Barrel-Kortex mit einer Wahrscheinlichkeit von 58% bestehen (Walker et al. 2016). Diese geringere Verbindungswahrscheinlichkeit erklärt sich dadurch, dass bei optogenetischer Stimulation eine PV-Zell-Population aktiviert wird, bei einer Paarableitung hingegen nur eine einzelne Zelle.

Zuvor fanden sich in der Literatur in nur wenigen Studien mögliche Hinweise auf dieses Schaltmuster, darunter Studien, in denen beide beteiligten Neurone nach ihren elektrophysiologischen Charakteristika eingeteilt wurden. So projizieren in LIV und LVI des Barrel-Kortex der Ratte in Paarableitungen schnell feuernde Zellen auf inhibitorische Interneurone mit einer niedrigen Feuerschwelle (Gibson et al. 1999). Zudem wurden in Paarableitungen inhibitorische Eingänge schnell feuernder Zellen auf SST-exprimierende Zellen der LIV im somatosensorischen Kortex der Maus beschrieben (Hu et al. 2011; Ma et al. 2012). In den Studien könnte es sich um Projektionen von PV-exprimierenden Zellen auf MC handeln, allerdings sind über 40% der SST-exprimierenden Zellen in LIV nicht Martinotti-, sondern X94-Zellen (Ma et al. 2006). Diese Studien geben Hinweise für eine mögliche Verschaltung von PV-exprimierenden Zellen auf MC. Sie sind aber wegen der Klassifikationsunterschiede nicht eindeutig, da sich nicht mit Sicherheit darauf schließen lässt, ob es sich bei den untersuchten SST-exprimierenden Zellen in LIV bzw. den Zellen mit niedriger Feuerschwelle um MC handelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen in Ergänzung zu den Paarableitungen von Walker et al. somit eine Erweiterung des bisherigen Konzepts der Verschaltung GABAerger Interneurone dar.

Für den primären visuellen Kortex gab es zunächst widersprüchliche Daten. Eine Studie berichtete, dass es keine Verbindung von PV- auf SST-exprimierende Zellen gäbe (Pfeffer et al. 2013). Die Differenz zu dieser Arbeit könnte auf Unterschieden zwischen verschiedenen kortikalen Regionen basieren (Scala et al. 2019). Allerdings wurden in der Studie von Pfeffer et al. die Eingänge auf Zellen untersucht, die nachträglich mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion auf RNA-Ebene als SST-exprimierende Zellen identifiziert wurden. Dies schließt Zellen mit ein, die SST zwar auf mRNA-, nicht aber auf Protein-Ebene exprimieren (Rudy et al. 2011). Zudem sind MC nur eine Subpopulation aller SST-exprimierenden Zellen neben X94-Zellen, die sich von MC unter anderem in ihren elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften unterscheiden (Ma et al. 2006; McGarry et al. 2010). In dieser Arbeit wurden GFP-exprimierende Zellen der GIN-Maus untersucht, die elektrophysiologisch und morphologisch sicher als MC identifiziert wurden. Gleichzeitig

umfassen die GFP-exprimierenden Zellen der GIN-Maus nicht alle SST-exprimierenden Zellen des somatosensorischen Kortex (Oliva et al. 2000; Ma et al. 2006). So könnte sich die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Pfeffer et al. dadurch erklären, dass diese nicht die gleiche Zellpopulation untersucht haben, sondern statt MC alle Interneurone, die auf RNA-Ebene SST exprimieren. Zudem wurden in der Studie von Pfeffer die Stärken der Verbindungen normalisiert zu den Eingängen der präsynaptischen Zellen auf Pyramidenzellen, was eine zusätzliche Maskierung von Projektionen PV-exprimierender Zellen auf MC zur Folge haben könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden Daten für Mäuse im Alter von P31-60 ausgewertet, während Pfeffer et al. Mäuse im Alter von P18-30 für ihre Experimente verwendet haben. Neuere Studien beweisen nun auch für den visuellen Kortex Projektionen von Korbzellen (Jiang et al. 2015) bzw. von PV-exprimierenden Zellen (Karnani et al. 2016b; Walker et al. 2016) auf MC mit einer Verbindungswahrscheinlichkeit von 16-35% in Paarableitungen. Diese Studien wurden alle an Mäusen im Alter von über P27 durchgeführt. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass Projektionen von PV-exprimierenden Zellen auf MC erst im reifen, nicht aber im sich entwickelnden Neokortex bestehen, oder sich über eine bestimmte elektrophysiologische Nachweisgrenze verstärken.

Projektionen VIP-exprimierender Zellen auf MC wurden hingegen schon vielfach beschrieben und auch in älteren Studien gab es bereits Hinweise auf diese Verschaltung. In einer anatomischen Studie mit korrelierter Licht- und Elektronenmikroskopie wurden im Barrel-Kortex der Ratte bereits Synapsen von VIP- auf Calbindin-positive Zellen beschrieben (Staiger et al. 2004b), zu denen MC gehören. Calbindin wird aber unter anderem auch von doppelten Bouquet-Zellen (engl. *double bouquet cells)* und neurogliaformen Zellen exprimiert (Gabbott und Bacon 1996; Wang et al. 2002; Wang et al. 2004; Yavorska und Wehr 2016). In den letzten Jahren wurde die Verschaltung von VIP-exprimierenden Zellen auf MC auch bei Mäusen in verschiedenen kortikalen Regionen bestätigt. Im primären visuellen Kortex sind in optogenetischen Versuchen SST-exprimierende Zellen das Haupt-Ziel der Projektionen VIP-exprimierender Zellen (Pfeffer et al. 2013). MC sind nur eine Subpopulation der SST-exprimierenden Zellen. Aber auch GIN-Zellen, deren größter Anteil MC sind, erhalten im visuellen Kortex in Paarableitungen mit 20% Verbindungswahrscheinlichkeit Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen (Karnani et al. 2016a; Karnani et al. 2016b). Im auditorischen und im medialen präfrontalen Kortex projizieren optogenetisch stimulierte VIP-exprimierende Zellen ebenfalls zuverlässig auf GIN-Zellen (Pi et al. 2013).

Für den primären somatosensorischen Barrel-Kortex, der in dieser Arbeit untersucht wurde, finden sich in der Literatur übereinstimmende Beobachtungen. Optogenetisch stimulierte VIP- üben dort starke Inhibition vor allem auf SST-exprimierende Zellen in der GIN-Maus

aus (Lee et al. 2013). Bei optogenetischer Stimulation erhalten 100% der MC in LII/III des Barrel-Kortex Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen, mit einer Verbindungswahrscheinlichkeit von 35-40% in Paarableitungen (Karnani et al. 2016b; Walker et al. 2016).

4.2.3 Eigenschaften der lichtinduzierten IPSC an MC

Um auf die an der inhibitorischen synaptischen Transmission beteiligten Ionen und Rezeptoren zu rückzuschließen, wurden ihre Umkehrpotentiale bestimmt. Abzüglich des Diffusionspotentials von ca. 17 mV sind die Umkehrpotentiale der Eingänge sowohl von VIP- (-68,37 ± 2,48 mV) als auch PV-exprimierenden Zellen (-64,87 ± 6,19 mV) im Bereich des Gleichgewichtspotentials von Chlorid-Ionen (-84,2 mV). Die postsynaptische Wirkung der Projektionen von diesen Interneuronen beruht vermutlich auf der Aktivierung von ionotropen $GABA_A$-Rezeptoren, die bereits für LII/III MC im Barrel-Kortex beschrieben werden konnten (Delchmann 2018). In einer kürzlich durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe konnten auch für LV MC postsynaptische $GABA_A$-Rezeptoren nachgewiesen werden (Glöckner 2018). In beiden Studien wurde mittels Druckapplikation von GABA, sowie Agonisten und Antagonisten, sowie mittels elektrischer Stimulation inhibitorischer präsynaptischer Fasern der physiologische Nachweis über die ausschließliche Beteiligung von $GABA_A$-Rezeptoren bei der inhibitorischen Transmission an den MC erbracht. $GABA_A$-Rezeptoren sind hauptsächlich für Chlorid- und in geringerem Maße für Bicarbonat-Ionen durchlässig (Bormann et al. 1987; Kaila 1994; Delchmann 2018). Die geringe Differenz der Umkehrpotentiale zum Chlorid-Gleichgewichtspotential lässt sich auf die zusätzlichen Leitfähigkeit für Bicarbonat-Ionen mit einem Gleichgewichtspotential von -12,5 mV zurückführen. Die lichtinduzierten IPSC der inhibitorischen Eingänge von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC lassen sich somit weitestgehend durch einen Fluss von Chlorid-Ionen durch $GABA_A$-Ionenkanäle erklären.

In PVcre-Mäusen wurden signifikant positivere Umkehrpotentiale gemessen (-64,9 mV) als in VIPcre-Mäusen (-68,4 mV). Eine mögliche Erklärung könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten der postsynaptischen $GABA_A$-Rezeptoren sein, wie sie für zwei verschiedenen inhibitorische Interneurone in der LV im somatosensorischen Kortex beschrieben werden konnte (Bacci et al. 2003). Im Hippocampus konnte gezeigt werden, dass $GABA_A$-Rezeptoren an Pyramidenzellen der Ammonshorn-Region 1 (CA1) aus unterschiedlichen Untereinheiten bestehen, die abhängig vom präsynaptischen inhibitorischen Interneuronen sind (Nguyen und Nicoll 2018). Aber auch verschiedene subzelluläre Lokalisationen der Synapsen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen am MC-Dendritenbaum könnte aufgrund des sogenannten *space-clamp*-Fehlers diese Differenz erklären, da ein am Soma der Zelle in *Vol-*

tage-clamp-Konfiguration angelegtes Haltepotential mit zunehmender dendritischer Distanz schwächer wirkt (Bar-Yehuda und Korngreen 2008; Williams und Mitchell 2008).

Bei der weiteren Analyse der IPSC-Eigenschaften fallen einzelne signifikante Unterschiede in der Latenz und der Kinetik der IPSC bezüglich des präsynaptischen Zelltyps auf. Dagegen zeigen die Amplituden der lichtinduzierten IPSC sowie die mindestens benötigte Laserenergie zur Induktion synaptischer Übertragung keine signifikanten Unterschiede bezüglich des präsynaptischen Zelltyps. Jedoch lassen sich tendenziell größere Amplituden bei Stimulation PV-exprimierender Zellen beobachten. Eine ähnliche Laserenergieschwelle und vergleichbare IPSC-Amplituden deuten auf eine ähnliche Stärke der Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC hin. Da für die Verschaltung von VIP-exprimierenden Zellen auf MC unter *in vivo* Bedingungen eine physiologische Relevanz nachnachgewiesen werden konnte (Lee et al. 2013; Pi et al. 2013; Fu et al. 2014), ist naheliegend, dass auch die PV-exprimierenden Zellen eine essentielle Funktion im Schaltkreis des Barrel-Kortex haben. Allerdings gibt es derzeit keine darauf verweisenden Studien. Auf Einzelzellebene, d.h. in Paarableitungen von PV-exprimierenden Zellen und MC im Hirnschnitt haben die IPSC sogar die vierfache Amplitude im Vergleich zu präsynaptischen VIP-exprimierenden Zellen (Walker et al. 2016). Es ist anzunehmen, dass in den optogenetischen Populationsstimulationen die signifikant größeren Amplituden der PV-Eingänge maskiert werden. Die Bedeutung und die physiologische Relevanz der PV-vermittelte Inhibition an den MC wird in weiteren *in vivo* Studien nachzuweisen sein, da unter anderem aufgrund starker Schwankungen der ChR2-Exprimierung ein quantitativer Vergleich der Stärke der Projektionen nur sehr eingeschränkt möglich ist.

Die durch PV-exprimierende Zellen ausgelösten IPSC weisen in dieser Arbeit kürzere Latenzen und Anstiegszeiten im Vergleich zu VIP-vermittelten IPSC bei unterschiedlichen Laserenergien auf. Die weiteren kinetischen Charakteristika der IPSC von beiden präsynaptischen Zelltypen ähneln sich, mit einer Tendenz für eine kürzere Anstiegs- und Abfallzeit bei PV-Eingängen. Diese IPSC-Eigenschaften decken sich mit Messungen aus Paarableitungen von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen und MC, in denen die PV-Eingänge signifikant kürzere Latenzen und Anstiegszeiten besitzen (Walker et al. 2016). Dass in Paarableitungen zusätzliche Signifikanzen auftreten, kann dadurch erklärt werden, dass optische Stimulation einen unphysiologischen Stimulus darstellt und im Vergleich zu reinen *Patch-clamp*-Paarableitungen nur eingeschränkt für die Untersuchung der IPSC-Kinetik geeignet ist (vgl. Abschnitt 4.1). Die Unterschiede in Latenz und Kinetik können auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. So könnten die Synapsen von VIP- im Vergleich mit denen von PV-exprimierenden Zellen auf MC verschiedene biophysikalische Eigenschaften der Präsynapsen oder eine unterschiedliche

Zusammensetzung der $GABA_A$-Rezeptoren an der Postsynapse aufweisen (Klausberger et al. 2002; Bacci et al. 2003). Für synaptische Übertragungen zwischen Interneuronen wurde beobachtet, dass die Anstiegszeit vom präsynaptischen und die Abfallzeit vom postsynaptischen Neuron abhängt (Ma et al. 2012). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass bei der IPSC-Anstiegszeit bei einigen Laserintensitäten signifikante Unterschiede bezüglich der präsynaptischen Zelltypen bestehen, bei den Abfallzeiten jedoch nicht. Eine andere Ursache könnte sein, dass VIP- und PV-exprimierende Zellen auf verschiedene subzelluläre dendritische Regionen projizieren. Infolge der elektrotonischen Fortleitung im Dendriten werden weiter distale Eingänge abgeschwächt und verlangsamt (Spruston et al. 1994). So können die IPSC aufgrund verschiedener Distanzen der Synapsen bei Messung am MC-Soma unterschiedlich erscheinen. Dieser Effekt des *space-clamp*-Fehlers wird durch die Verwendung von cäsiumbasierter Pipettenlösung verringert, aber nicht ausgeschaltet (Williams und Mitchell 2008). Die größere Latenz und längere Anstiegszeit der Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen können ein Hinweis auf Synapsen an weiter distalen dendritischen Kompartimenten sein, bei eher proximalen Synapsen von PV-exprimierenden Zellen auf MC. Auch die tendenziell geringere Amplitude und längere Abfallzeit der VIP-Eingänge sind mit den Auswirkungen einer längeren elektrotonischen Fortleitung vereinbar.

4.2.4 Axonale Projektionsverläufe und subzelluläre synaptische Projektionsmuster

4.2.4.1 Axonale Projektionsverläufe

Subtypen inhibitorischer GABAerger Interneurone haben eine distinkte axonale Morphologie und spezifische Zielzellen ihrer axonalen Projektionen (Markram et al. 2004; Ascoli et al. 2008; Staiger et al. 2015a). Folglich wurden in dieser Arbeit die axonalen Verlaufsmuster der VIP- und PV-Projektionen im Verhältnis zu den postsynaptischen MC untersucht. Dafür wurden Axone von ChR2-transduzierten VIP- und PV-exprimierenden Zellen schrittweise in der Umgebung von abgeleiteten MC stimuliert. Aus den Amplituden der optisch evozierten IPSC wurden Kartogramme erstellt, die den Verlauf und die Stärke der Axone (der VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen), die auf die MC projizieren, abbildet (siehe Abb. 14). Diese axonalen VIP- und PV-Projektionen auf MC weisen distinkte Verlaufsmuster auf. Während die Axone der PV-Zellen eher horizontal intralaminär verlaufen, zeigen die Axone der VIP-Zellen eine eher vertikale translaminäre Ausrichtung, insbesondere in LV.

Diese Beobachtungen lassen sich gut mit der axonalen Morphologie von PV- und VIP-exprimierenden Zellen vereinbaren. PV-exprimierende Zellen entsprechen morphologisch Korbzellen und Kronleuchterzellen (Kawaguchi und Kubota 1997; Ascoli et al. 2008). Sie sind

in den neokortikalen Schichten II bis VI etwa gleichmäßig verteilt (Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013). Kronleuchterzellen bilden ausschließlich Synapsen auf Pyramidenzellen, kommen also als Quelle der Inhibition von MC nicht in Frage (Somogyi 1977). Die Axone von PV-exprimierenden Korbzellen, die auf Pyramidenzellen und inhibitorische Interneurone projizieren, weisen überwiegend einen waagerechten Verlauf innerhalb ihrer eigenen kortikalen Schicht auf (Kawaguchi und Kubota 1993; Kisvárday et al. 1993; Hioki et al. 2013). Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass MC in PV-Eingänge überwiegend horizontal aus ihrer eigenen Schicht erhalten, ist demnach gut mit der axonalen Morphologie PV-exprimierender Korbzellen vereinbar.

Die Ausrichtung der axonalen VIP-Eingänge, auf LII/III MC überwiegend von oberhalb der MC-Somata und auf LV MC ausgeprägt vertikal und translaminär orientiert, ist ebenfalls gut mit der Morphologie und der Lokalisation VIP-exprimierender Zellen vereinbar. Ca. 59% der VIP-exprimierenden Zellen im Barrel-Kortex liegen in LII/III, mit der größten Dichte im oberen Bereich dieser Schicht (Connor und Peters 1984; Lee et al. 2010; Prönneke et al. 2015; Almási et al. 2019). Ihre Axone verzweigen sich zum einen dort lokal, zum anderen entsenden sie typischerweise starke Axonkollateralen radiär in tiefere Schichten, die bis in LVI reichen (Rudy et al. 2011; Prönneke et al. 2015; Karnani et al. 2016a). Die Axone von LIV-LVI VIP-Zellen reichen hingegen nicht bis in die supragranulären Schichten und beschränken sich fast ausschließlich auf LV-LVI (Prönneke et al. 2015). LII/III MC erhalten demnach ihre Eingänge von VIP-exprimierenden Zellen aus LII/III und möglicherweise zu einem minimalen Anteil aus LI, in der nur 2% aller VIP-exprimierenden Zellen liegen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit, dass axonale Eingänge auf LV MC streng vertikal orientiert sind, in Zusammenschau mit der axonalen Morphologie VIP-exprimierender Zellen, ist zu vermuten, dass MC in LV den Großteil ihrer VIP-Eingänge von Zellen aus LII/III erhalten. Von horizontal innerhalb der eigenen kortikalen Schicht scheinen vergleichsweise wenige Projektionen von VIP-Zellen, die nur zu etwa 10% in LV lokalisiert sind (Prönneke et al. 2015), zu kommen. So beträgt in Paarableitungen von Walker die Verbindungswahrscheinlichkeit von LV VIP-Zellen auf LV MC nur ca. 17% im Vergleich zu 35% für VIP-exprimierende Zellen und MC in LII/III. Projektionen von VIP-exprimierenden Zellen in LII/III auf LV MC wurden bereits in einzelnen Paarableitungen bestätigt, allerdings ohne dass bislang eine Quantifizierung der Verbindungswahrscheinlichkeit möglich war (Walker 2016). Die Verteilung axonaler Boutons, die als Orte präsynaptischer Spezialisierung bekannt sind, von LII/III VIP-Zellen konzentriert sich zu 43% auf LII/III und 35% auf LV (Prönneke et al. 2015). Dies ist vereinbar mit starken Projektionen von VIP-exprimierenden Zellen der LII/III auf MC sowohl in LII/III als auch LV. Welcher prozentuale Anteil der VIP-Eingänge

aus LII/III und welcher Anteil aus der eigenen Schicht kommt, bleibt für MC der LV zu untersuchen.

In Studien mit fokaler Photolyse von *caged*-Glutamat fand sich eine Lokalisierung der Somata von präsynaptischen Neuronen, die LII/III MC inhibieren (ohne in die einzelnen Interneuronenklassen zu differenzieren), überwiegend in LII/III (76%) und in geringerem Ausmaß in LI (22%), nicht aber in tieferen Schichten (2%) (Walker 2016). Dies lässt sich ebenfalls gut mit einer Inhibition der LII/III MC durch VIP- und PV-exprimierende Zellen derselben Schicht vereinbaren. Zudem ist es ein Hinweis darauf, dass es Projektionen weiterer Interneuronenklassen auf MC gibt, da in LI kaum PV- oder VIP-exprimierende Zellen lokalisiert sind (Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013; Prönneke et al. 2015; Almási et al. 2019), sondern überwiegend neurogliaforme Zellen und weitere 5HT3a-positive Interneurone (Hestrin und Armstrong 1996; Miyoshi et al. 2010; Rudy et al. 2011).

Bemerkenswert ist zudem, dass in der vorliegenden Arbeit aus Richtung von LIV kaum PV-Eingänge auf MC nachgewiesen wurden, obwohl in dieser Schicht PV-exprimierende Zellen mit ca. 55% die häufigsten inhibitorischen GABAergen Interneurone sind (Rudy et al. 2011; Hioki et al. 2013). Diese Beobachtung ist ebenfalls vereinbar mit der beschriebenen Lokalisation der Somata von Neuronen, die MC inhibieren. Mit 2% (LII/III) bzw. 8% (LV) erhalten MC beider Schichten kaum inhibitorische Eingänge von Neuronen aus LIV (Walker 2016). Eine ältere Studie, die ebenfalls mittels fokaler Photolyse von *caged*-Glutamat durchgeführt wurde, widerspricht dieser Lokalisation. Demnach erhalten MC in LII/III inhibitorische Eingänge überwiegend von Zellen aus LII/III, LV und zu ca. 26% aus LIV (Xu und Callaway 2009). Da Xu und Callaway im Gegensatz zu Walker inhibitorische Eingänge an MC nicht nur in einem Zeitfenster von 10 ms, sondern bis zu 150 ms nach dem Stimulus berücksichtigt haben, ist zu vermuten, dass ihre Messungen disynaptische inhibitorische Eingänge nach Stimulation von Pyramidenzellen enthalten, und somit nicht zuverlässig auf die Lokalisation der inhibitorischen Zellen geschlossen werden kann. Zwischen den inhibierenden Interneuronenklassen wurde dabei nicht differenziert, aber das Fehlen von Eingängen aus LIV deckt sich mit den hier beobachteten horizontalen Verläufen der axonalen PV-Projektionen auf MC in LII/III und LV.

Neurone, die MC der LV inhibieren, sind mit ihren Somata zu 20% in LII/III und zu 67% in LV lokalisiert (Walker 2016). Unter Berücksichtigung der typischen axonalen Morphologie VIP- und PV-exprimierender Zellen, der Verteilung axonaler Boutons und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass inhibitorische Projektionen auf LV MC aus LII/III fast ausschließlich von deszendierenden Fasern von VIP-exprimierenden Zellen

stammen, Projektionen aus LV hingegen überwiegend von PV- und einem geringeren Anteil VIP-exprimierender Zellen.

4.2.4.2 Subzelluläre Projektionsmuster

Nachdem PV- und VIP-exprimierende Zellen als Ursprung der Inhibition von MC identifiziert wurden, blieb die subzelluläre Lokalisation ihrer Synapsen bislang unbekannt. Da im Dendriten bereits eine wesentliche Verarbeitung der Information stattfindet, bevor diese das Soma erreicht, ist die Kenntnis dieser subzellulären Projektionsmuster essenziell für das Verständnis der Funktion kortikaler Schaltkreise (London und Häusser 2005; Hu und Vervaeke 2018). Nachdem zuvor in dieser Arbeit Verlaufsmuster der auf MC projizierenden Axone untersucht wurden, wurde abschließend durch Stimulation der Präsynapsen, unter Blockade aktiver Fortleitung mittels TTX nach der sCRACM-Methode, die subzelluläre Lokalisation der Synapsen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen an den Dendritenbäumen der MC untersucht.

In den Kartogrammen unter sCRACM-Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Axone von VIP- und PV-exprimierende Zellen in unterschiedlicher Art und Weise auf MC terminieren. Sowohl in LII/III als auch in LV terminieren PV-exprimierende Zellen bevorzugt am Soma bzw. an somanah gelegenen Feldern, wohingegen VIP-Axone einen viel weitreichenderen Bereich um das Soma abdecken. Überlagert man gedanklich diese Terminationsfelder von PV- und VIP-exprimierenden Neuronen mit dem mehr oder weniger gleichartigen Dendritenbaum von MC der jeweiligen Schichten (Wang et al. 2004; Xu et al. 2013; Walker 2016; Nigro et al. 2018), so lassen sich die Ergebnisse wie folgt interpretieren. Dabei wurden die Felder anhand der Distanzen vom Soma mittels den Kriterien der Petilla-Terminologie in perisomatische Region, proximale und distale Dendritenabschnitte eingeteilt (Ascoli et al. 2008). Demnach kann postuliert werden, dass PV-exprimierende Zellen sowohl in LII/III als auch in LV auf somatische und perisomatische MC-Kompartimente projizieren. VIP-exprimierende Zellen hingegen verteilen ihre Synapsen über den gesamten Dendritenbaum, vom Soma bis zu den distalen Dendritenabschnitten der MC. Auf einen direkten Vergleich der Projektionsmuster in LII/III mit denen in LV wurde verzichtet, da die dendritische Morphologie der MC sich zwischen diesen Schichten unterscheidet (Wang et al. 2004).

Dass inhibitorische GABAerge Interneurone Synapsen auf ihre Zielzellen in spezifischen und distinkten subzellulären Lokalisationen bilden, ist bekannt. Dabei wird grundsätzlich eine Inhibition der somatischen und perisomatischen Region unterschieden von Inhibition des proximalen oder distalen Dendriten (Thomson und Deuchars 1997; Somogyi et al. 1998; Ascoli et al. 2008; Staiger 2015). Mit der axonalen Morphologie von VIP- und PV-exprimierenden Zel-

len lässt sich deren Projektionsmuster auf MC gut vereinbaren. PV-exprimierende Zellen entsprechen zwei morphologischen Interneuronenklassen, den Korbzellen und den Kronleuchterzellen, wobei erstere weiter unterschieden werden können in kleine, große und Nest-Korbzellen (Kawaguchi und Kubota 1997; Ascoli et al. 2008; Staiger et al. 2015a). Kronleuchterzellen zielen auf das axonale Initialsegment von Pyramidenzellen ab und kommen als Ursprung der Inhibition von MC nicht in Frage (Somogyi 1977), sodass PV-Projektionen auf MC von PV-exprimierenden Korbzellen stammen müssen. Deren Axone bilden korbartige Geflechte um die Somata ihrer Zielzellen und bilden dort somatische und perisomatische Synapsen (Kawaguchi und Kubota 1993; Kisvárday et al. 1993). VIP-exprimierende Zellen stellen hingegen eine heterogene Gruppe GABAerger Interneurone dar, auch bezüglich ihrer Morphologie. Die meisten projizieren auf Dendriten (Hajos et al. 1988; Peters 1990; Kawaguchi und Kubota 1996, 1997), Soma-nahe Synapsen sind vermutlich vor allem auf eine Subgruppe VIP-exprimierender kleiner Korbzellen zurückzuführen (Acsady et al. 1996; Wang et al. 2002). Es liegt nahe, dass die Abdeckung des gesamten MC-Dendritenbaums durch sich ergänzende Projektionen verschiedener morphologischer VIP-Zell-Subtypen erreicht wird. Inwieweit die Subtypen funktionell verschiedene Aufgaben haben, ist bislang nicht bekannt.

Im Vergleich mit Projektionen VIP- und PV-exprimierender Zellen auf Pyramidenzellen ist eine ähnliche distinkte subzelluläre Lokalisation der Synapsen beschrieben. In Paarableitungen mit Zellrekonstruktionen sowie in licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen schnellfeuernde Korbzellen Synapsen auf Somata, die perisomatische Region und dicke proximale Dendriten von Pyramidenzellen (Kawaguchi und Kubota 1996; Tamas et al. 1997; Thomson und Deuchars 1997; Kubota et al. 2015). Im Hippocampus befinden sich Synapsen von PV-exprimierenden auf Pyramidenzellen überwiegend perisomatisch und an proximalen Dendriten, nicht aber an distalen dendritischen Büscheln. Dabei korreliert das Vorkommen von Synapsen negativ mit der Distanz vom Soma (Bloss et al. 2016).

VIP-exprimierende Zellen sind darauf spezialisiert, andere inhibitorische Interneurone zu inhibieren, projizieren aber in geringerem Ausmaß auch auf Pyramidenzellen (Connor und Peters 1984; Peters und Harriman 1988; Pfeffer et al. 2013). Ihre Synapsen finden sich in licht- und elektronenmikroskopischen Studien vor allem an kleinen und mittelgroßen Dendriten. Auf Somata von Pyramidenzellen wurden einzelne Synapsen beobachtet (Hajos et al. 1988; Peters 1990; Kawaguchi und Kubota 1996, 1997). Außer in einzelnen Paarableitungen konnte in diesen Studien meist nicht differenziert werden, zu welcher Neuronenklasse die postsynaptischen Dendriten gehören. Eine neuere Studie zeigte mittels Elektronenmikroskopie und immunhistochemischer Färbung GABAerger Strukturen, dass VIP-exprimierende Zellen auf

nicht-GABAerge und auf inhibitorische GABAerge Neurone überwiegend Synapsen an den Dendriten bilden sowie zu ca. 14% bzw. 10% an deren Somata (Zhou et al. 2017).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Lokalisation synaptischer Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC folgen somit dem gleichen grundlegenden subzellulären Muster, wie ihre Projektionen auf Pyramidenzellen. Darauf, dass dieses Muster universell für Synapsen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf inhibitorische Interneurone bestehen könnte, deuten weitere Untersuchungen hin. In Paarableitungen sowie licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen im visuellen Kortex der Ratte bilden Korbzellen Synapsen perisomatisch (Tamas et al. 1998), VIP-exprimierende Zellen hingegen auf Dendriten und Somata anderer Interneurone (Hajos et al. 1988). In keiner dieser Studien wurde eine weitere Differenzierung der Zielzellen in verschiedene Interneuronenklassen durchgeführt. Diesem scheinbar unabhängig von der postsynaptischen Zelle gültigen Projektionsmuster widersprechen Beobachtungen einer lichtmikroskopischen Studie über das Verteilungsmuster der Synapsen auf postsynaptische PV-exprimierende Zellen. Demnach projizieren VIP- bevorzugt auf die Somata und PV-exprimierende Zellen fast ausschließlich auf die Dendriten anderer PV-exprimierender Zellen (Hioki et al. 2013). In dieser Studie wurden im somatosensorischen Kortex der Maus prä- und postsynaptische Kompartimente fluoreszenzmarkiert und bei lichtmikroskopisch festgestellter Nähe als Synapsen registriert. Die Dendriten von PV-exprimierenden Zellen in Mäusen erstrecken sich oft in Entfernungen von über 250 µm zum Soma (Kameda et al. 2012; Runyan und Sur 2013), wobei Hioki et al. lediglich Dendriten bis zu einer Distanz von 140 µm untersucht haben, sodass distale Synapsen nicht ausreichend berücksichtigt wurden. Dennoch ist dies, in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit, ein möglicher Hinweis auf unterschiedliche Projektionsmuster GABAerger Interneurone abhängig von der postsynaptischen Interneuronenklasse. Für den somatosensorischen Kortex der Ratte hingegen wurden in korrelierter Licht- u. Elektronenmikroskopie Synapsen von VIP-exprimierenden Zellen auf PV-Zell-Somata und -Dendriten beobachtet (David et al. 2007). Auch für doppelt gebüschelte Zellen (eine typische morphologische Beschreibung VIP-exprimierender Zellen) wurden Synapsen auf Dendriten, für Korbzellen hingegen auf die Somata PV-exprimierender Zellen beschrieben (Staiger et al. 2009). In einer neuen Studie, in der Synapsen auf VIP-exprimierende Zellen untersucht wurden, findet sich nur eine geringe Zahl von VIP-Synapsen auf VIP-exprimierende Zellen, die aber gleichmäßig über den gesamten Dendritenbaum verteilt sind, während PV-Synapsen klar auf die somatische und perisomatische Region konzentriert sind (Sohn et al. 2016). Bereits in älteren Studien finden sich Hinweise auf die subzelluläre Verteilung der Synapsen an Dendriten möglicher MC. Im Hippocampus und im Barrel-Kortex gibt es vielzählige Synapsen von VIP-exprimierenden Zellen auf

Calbindin-positive Zellen, zu denen unter anderem MC gehören, an proximalen und distalen dendritischen Segmenten (Acsady et al. 1996; Staiger et al. 2004b). Allerdings wird Calbindin nicht nur von MC, sondern beispielsweise auch von doppelten Bouquet-Zellen (engl. *double bouquet cells)* und neurogliaformen Zellen exprimiert (Gabbott und Bacon 1996; Wang et al. 2002; Wang et al. 2004; Yavorska und Wehr 2016). In Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist dies als früher Hinweis nicht nur auf die Verbindung von VIP-exprimierenden Zellen auf MC im Barrel-Kortex der Ratte, sondern auch auf ein subzelluläres Projektionsmuster wie hier aufgezeigt zu werten. Die typischen subzellulären Projektionsmuster von PV-exprimierenden Zellen auf die somatischen und perisomatischen sowie von VIP-exprimierenden Zellen auf den ganzen Dendritenbaum bis zu den distalen Dendriten ihrer Zielzellen sind somit weitgehend unabhängig vom Typ der postsynaptischen Neurone. Nur für Projektionen auf postsynaptische PV-exprimierende Zellen finden sich derzeit widersprüchliche Beobachtungen. Der Nachweis dieser distinkten subzellulären Projektionsmuster von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf MC hat interessante Implikationen für die Informationsverarbeitung in deren somatodendritischen Kompartimenten (siehe Abschnitt 4.3).

4.3 Physiologische Relevanz

MC sind zentraler Bestandteil verschiedener neuronaler Schaltkreise. Es stellt sich die Frage, zu welchem Zweck sie durch VIP- und PV-exprimierende Zellen inhibiert werden. Aufgrund distinkter physiologischer oder morphologischer Zelleigenschaften, wie der subzellulären Lokalisation ihrer Synapsen auf MC, kann sich der Effekt der Inhibition durch die beiden Interneuronenklassen unterscheiden.

PV-exprimierende Zellen bilden inhibitorische Synapsen auf die somatische und perisomatische Region von MC. In dieser Lokalisation können effektiv IPSP in den Somata der Zielzellen erzeugt werden (Kameda et al. 2012) und örtlich gruppierte Synapsen sind darin effektiver als örtlich verteilte Synapsen (Polsky et al. 2004). So kann die Verstärkung von summierten Potentialen und damit die Generierung von AP kontrolliert werden (Buhl et al. 1995; Miles et al. 1996; Wang et al. 2002). Folglich können PV-exprimierende Zellen effizient die Ausgänge von MC kontrollieren. Ihnen werden zentrale Funktionen in der Abstimmung und der Synchronisierung neuronaler Aktivität (Cobb et al. 1995; Pouille und Scanziani 2001) und bei der Erzeugung schneller kortikaler Rhythmen in der Gamma-Frequenz zugeschrieben (Whittington et al. 1995; Traub et al. 2004; Bartos et al. 2007). Diese Prozesse können eine breite Kontrolle nicht nur exzitatorischer, sondern auch inhibitorischer Neurone erfordern, die durch eine perisomatische Inhibition von MC effektiv und mit zeitlicher Präzision möglich ist.

VIP-exprimierende Zellen hingegen projizieren auf den gesamten Dendritenbaum von MC. Die bevorzugte Inhibition proximaler und insbesondere distaler Dendriten kann speziell die lokale dendritische Integration dortiger exzitatorischer Eingänge beeinflussen (Markram et al. 2004). MC erhalten exzitatorische Eingänge vor allem von lokalen Neuronen und aus distalen kortikalen Regionen, weniger aus subkortikalen Gebieten (Silberberg und Markram 2007; Pfeffer et al. 2013; Jiang et al. 2015; Urban-Ciecko und Barth 2016). Somit sind die VIP-Projektionen optimal positioniert für eine Modulation dieser exzitatorischen Eingänge an MC-Dendriten.

Einer der Mikro-Schaltkreise, in die MC involviert sind, ist der disinhibitorische Schaltkreis, für den wiederholt eine physiologische Relevanz nachgewiesen wurde (Letzkus et al. 2011; Pi et al. 2013; Fu et al. 2014). Neben Beeinflussung der lokalen dendritischen Integration auf subzellulärer Ebene scheinen VIP-exprimierende Zellen auch auf der Ebene von Schaltkreisen, wie in diesem relativ neuen Konzept der Disinhibition, die Ausgänge von MC effektiv kontrollieren zu können (Lee et al. 2013; Pfeffer et al. 2013; Pi et al. 2013). MC projizieren, neben Verschaltungen mit anderen inhibitorischen Interneuronen, vor allem auf Pyramidenzellen, vermutlich insbesondere auf deren apikale dendritische Büschel (engl. *dendritic tufts*) in LI (Wang et al. 2004; Silberberg und Markram 2007; Pfeffer et al. 2013). Inhibition von MC durch PV- oder VIP-exprimierende Zellen führt folglich zu einer Disinhibition der Pyramidenzellen.

Die kürzliche Entdeckung, dass MC im primären somatosensorischen Kortex nicht nur durch VIP-, sondern auch durch PV-exprimierende Zellen inhibiert werden (Jiang et al. 2015; Karnani et al. 2016b; Walker et al. 2016), erweitert damit das Konzept der Disinhibition, dabei waren für Walker et al. die hier erhobenen Daten der Ausgangspunkt. Die Regulation kortikaler Informationsverarbeitung mittels Disinhibition ist somit komplexer als zunächst vermutet. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei funktionell um eine Verstärkung ein und derselben Art von Inhibition handelt, oder ob VIP- und PV-exprimierende Zellen einen unterschiedlichen Effekt durch die Inhibition von MC bewirken.

Sensorische Stimuli scheinen insbesondere eine über PV-exprimierende Zellen vermittelte Disinhibition zu induzieren, im Sinne einer *bottom-up*-Verschaltung. So erhalten PV-exprimierende Zellen exzitatorische Eingänge aus dem Thalamus im Rahmen von *feedforward*-Inhibition (Staiger et al. 1996; Porter et al. 2001; Hafner et al. 2019). Die Inhibition von MC im primären somatosensorischen Kortex infolge sensibler Rezeption über die Schnurrhaare (Gentet et al. 2012) könnte somit auf PV-exprimierende Zellen zurückzuführen sein. Eine ähnliche Verschaltung wurde für die Amygdala beschrieben. Dort disinhibieren PV-

exprimierende Zellen exzitatorische Hauptzellen durch Inhibition SST-exprimierender Neurone, die MC ähneln, in Reaktion auf akustische Stimuli und kontrollieren damit assoziative Lernprozesse (Wolff et al. 2014).

Eine weitere Funktion kann in der Koordination der Projektionen von PV-exprimierenden Zellen und MC auf gemeinsame Zielzellen liegen, da beide über starke Projektionen auf Pyramidenzellen in ihrer Nähe verfügen (Fino und Yuste 2011; Packer und Yuste 2011). PV-exprimierende Zellen bilden dort Synapsen auf die somatischen und perisomatischen Kompartimente (Kawaguchi und Kubota 1996; Tamas et al. 1997; Thomson und Deuchars 1997; Kubota et al. 2015), MC hingegen bevorzugt auf die Dendriten bis zu den apikalen dendritischen Büscheln (Wang et al. 2004; McGarry et al. 2010). Inhibition von MC durch PV-exprimierende Zellen kann somit die Disinhibition dieser apikalen Dendriten bewirken und verschiebt die Inhibition zum Soma. Dieser Prozess funktioniert auch umgekehrt, denn MC inhibieren ihrerseits ebenfalls PV-exprimierende Zellen (Pfeffer et al. 2013). So können aktive MC mittels Disinhibition die perisomatische Inhibition der Pyramidenzellen durch PV-exprimierende Zellen aufheben und somit die Inhibition wiederum zu den distalen Dendriten verschieben. Eine effektive Kontrolle der MC-Ausgänge durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen perisomatische Synapsen PV-exprimierender Zellen impliziert, dass die Inhibition von Pyramidenzellen durch diese beiden Interneuronenklassen nicht zeitgleich aktiv und komplementär ist, sondern verschiedenen Funktionen dient.

Eine durch VIP-exprimierende Zellen vermittelte Disinhibition ist bereits in verschiedenen kortikalen Regionen bekannt, darunter dem somatosensorischen (Lee et al. 2013), visuellen (Pfeffer et al. 2013) auditorischen und medialen präfrontalen Kortex (Pi et al. 2013). Als überwiegend in den supragranulären Schichten gelegene Zellen erhalten sie vor allem assoziative Eingänge aus anderen kortikalen Regionen, wie dem primären motorischen Kortex (Lee et al. 2013; Fu et al. 2014). Die durch VIP-exprimierende Zellen vermittelte Inhibition von MC hebt deren Inhibition von Pyramidenzell-Dendriten in LI auf, einer Schicht in der eine Vielzahl von Axonen aus dem primären motorischen Kortex und kortikalen Regionen höherer Ordnung enden (Coogan und Burkhalter 1993; Cauller 1995; Petreanu et al. 2009). Diese disinhibitorische Verschaltung könnte somit eine *top-down*-Kontrolle bei der Integration sensomotorischer Informationen in Dendriten von Pyramidenzellen vermitteln (Petersen 2007; Larkum et al. 2009; Xu et al. 2012; Lee et al. 2013). Da LII/III VIP-Zellen, mit ihren typischen starken Axonkollateralen vertikal in Richtung der tieferen Schichten, sowohl MC in LII/III als auch in LV inhibieren, sind sie in der Lage MC in verschiedenen kortikalen Schichten synchronisiert zu inhibieren. Somit besteht die Möglichkeit, dass VIP-exprimierende Zel-

len die Aktivität von Pyramidenzellen in vertikalen Kolumnen mittels Disinhibition über MC verschiedener Schichten kontrollieren können.

Projektionen auf dendritische Bereiche der postsynaptischen Zelle sind jedoch besonders gut für die dortige lokale dendritische Integration geeignet, weniger dafür IPSP im Soma zu erzeugen (Kameda et al. 2012). Somit ist fraglich, ob eine undifferenzierte Inhibition der MC-Ausgänge im Rahmen dieser disinhibitorische Aufgabe die alleinige Funktion der Projektionen von VIP-exprimierenden Zellen auf MC darstellt. Für ein tiefergehendes Verständnis des Effektes der lokalen dendritischen Integration von VIP-Eingängen an MC-Dendriten auf Einzelzellebene, ist bislang letztlich zu wenig über die komplexe Integration an Dendriten von MC bekannt (Goldberg und Yuste 2005). Der Einfluss inhibitorischer Synapsen auf die dendritische Integration scheint selbst auf Ebene einzelner dendritischer Äste abhängig von der exakten Lokalisation der Synapsen stark zu variieren (Stokes et al. 2014; Bloss et al. 2016). Für ein eingehendes Verständnis der Implikationen des in dieser Arbeit aufgezeigten Verteilungsmusters der VIP-Projektionen am gesamten MC-Dendritenbaum wird in Zukunft eine Lokalisierung der Synapsen in noch höherer Auflösung, idealerweise mit Erfassung der örtlichen Relation der inhibitorischen und exzitatorischen Eingänge zueinander, notwendig sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Wissen über die Inhibition von MC. Sie werden im primären somatosensorischen Kortex sowohl von VIP- als auch von PV-exprimierenden Zellen inhibiert. MC werden in ihren Schaltkreisen durch *bottom-up*-Kontrolle mittels PV- und durch *top-down*-Verschaltungen mittels VIP-exprimierender Zellen beeinflusst. Die Eingänge von diesen Interneuronenklassen auf MC unterscheiden sich in elektrophysiologischen Parametern und der Herkunft aus verschiedenen kortikalen Schichten. Diese Studie zeigt eine subzelluläre Kompartimentierung der inhibitorischen Eingänge an Dendritenbäumen von MC auf: PV-exprimierende Zellen bilden bevorzugt Synapsen auf die somatische und perisomatische Region, VIP-exprimierende Zellen hingegen projizieren auf den gesamten Dendritenbaum vom Soma bis zu den distalen Dendriten. Somit sind PV-exprimierende Zellen in der Lage effektiv die Ausgänge von MC zu kontrollieren, während VIP-exprimierende Zellen mittels dendritischer Inhibition selektiv die Integration exzitatorischer Eingänge auf MC beeinflussen können. Zu welchem Zeitpunkt und in welcher Situation der Informationsverarbeitung diese beiden inhibitorischen Verschaltungen aktiv sind, bleibt spekulativ und sollte der Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

Kortikale Informationsverarbeitung wird entscheidend durch GABAerge inhibitorische Interneurone beeinflusst, obwohl diese nur 15-20% der kortikalen Neurone ausmachen. Anhand molekularer Marker können drei große Subpopulationen unterschieden werden: VIP-, PV- und SST-exprimierende Zellen, von denen letztere überwiegend aus Martinotti-Zellen besteht. Neben diversen Verschaltungen mit exzitatorischen Neuronen können GABAerge Interneurone sich selbst untereinander inhibieren und damit eine Disinhibition nachgeschalteter Zellen bewirken.

Das Ziel dieser Arbeit war es, inhibitorische Projektionen von VIP- und PV-exprimierenden Zellen auf Martinotti-Zellen im somatosensorischen Kortex der Maus zu untersuchen. Dafür wurden die präsynaptischen Zellen *in vitro* mittels optogenetischer Methoden gezielt stimuliert und postsynaptische Ströme per *Patch-clamp*-Technik an Martinotti-Zellen aufgezeichnet. Durch Fokussierung des Laserstrahls auf ein kleines Feld und schrittweises Stimulieren der Martinotti-Zell-Umgebung in einzelnen Feldern, konnte das axonale Verlaufsmuster der VIP- und PV-Projektionen auf Martinotti-Zellen kartiert werden. Nach Blockade von Aktionspotentialen mittels Tetrodotoxin und erneuter fokussierter Laserstimulation in einem gitterförmigen Muster konnten gezielt Präsynapsen von VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen stimuliert werden, um ein Kartogramm der subzellulären Lokalisation ihrer Synapsen am Dendritenbaum von Martinotti-Zellen zu erstellen.

Martinotti-Zellen in den Schichten II/III und V des somatosensorischen Kortex der Maus erhalten zuverlässig inhibitorische Eingänge von VIP- und PV-exprimierenden Zellen. Während die axonalen Verläufe der PV-Projektionen eher horizontal und intralaminär verlaufen, zeigen die Axone VIP-exprimierender Zellen eine eher vertikale und translaminäre Ausrichtung im Verhältnis zu den postsynaptischen Martinotti-Zellen auf, insbesondere in Schicht V. Die inhibitorischen Eingänge unterscheiden sich in der Latenz und der Anstiegszeit, was sich durch verschiedene subzelluläre Lokalisationen der Synapsen erklären lässt. PV-exprimierende Zellen projizieren bevorzugt auf die somatische und perisomatische Region, VIP-exprimierende Zellen verteilen ihre Synapsen hingegen über den gesamten Dendritenbaum der Martinotti-Zellen.

Die in dieser Arbeit bestätigte Inhibition von Martinotti-Zellen nicht nur durch VIP-, sondern auch durch PV-exprimierende Zellen, erweitert das Konzept der Disinhibition. Aufgrund der distinkten subzellulären Lokalisation ihrer Synapsen können PV-exprimierende Zellen effektiv

die Ausgänge von Martinotti-Zellen kontrollieren, während VIP-exprimierende Zellen in der Position sind, die Integration exzitatorischer Eingänge an den proximalen bis distalen Dendriten von Martinotti-Zellen zu beeinflussen.

6 Anhang

6.1 Lösungen und Pharmaka

Tab. A1: Pipettenlösungen

	Kaliumbasierte Pipettenlösung	Cäsiumbasierte Pipettenlösung
K-Glukonat	135 mM	-
KCl	5 mM	-
$CsMeSO_4$	-	135 mM
CsCl	-	5 mM
MgATP	4 mM	4 mM
EGTA	0,5 mM	0,5 mM
HEPES	10 mM	10 mM
NaGTP	0,3 mM	0,3 mM
Na-Phospokreatinphosphat	10 mM	10 mM
Biocytin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)	5 mg/ml	5 mg/ml

Tab. A2: Lösungen

	Präparations-lösung	ACSF
NaCl	87 mM	125 mM
NaH_2PO_4	1,25 mM	1,25 mM
KCl	2,5 mM	2,5 mM
Glukose	10 mM	25 mM
Saccharose	75 mM	-
$CaCl_2$	0,5 mM	2 mM
$MgCl_2$	7 mM	1 mM
$NaHCO_3$	26 mM	26 mM

Experimentabhängige Zusätze:

- TTX (Tetrodotoxin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,5 µM
- 4-AP (4-Aminopyridin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 µM

Puffer:

- Phosphat-Puffer (engl. *phosphate buffer*; PB)
  - 14,42 g Na_2HPO_4 und 2,62 g NaH_2PO_4 pro 1 l destilliertes Wasser
  - 0,1 M; pH = 7,4
- TRIS-Puffer (engl. *tris buffer*; TB)
  - 6,06 g TRIS HCl und 1,39 g TRIS Base pro 1 l destilliertes Wasser; pH mit HCl eingestellt
  - 0,05 M, pH = 7,6
- TRIS-gepufferte Saline (engl. *tris buffered saline*; TBS)
  - 1 l TB + 9 g NaCl
- TRIS-gepufferte Saline mit Triton X-100 (engl. *tris buffered saline and Triton X-100*; TBST)
  - TBS + 0,3 % Triton X-100

6.2 Formeln

Nernst-Gleichung: $E_X = (R \cdot T) \div (F \cdot z_X) \cdot \ln (c[X]_{außen} \div c[X]_{innen})$

E_X = Gleichgewichtspotenzial des Ions X

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur

F = Faraday-Konstante

z_X = Ladungszahl des Ions X

$c[X]_{außen}$ = effektive Konzentration des Ions X extrazellulär

$c[X]_{innen}$ = effektive Konzentration des Ions X intrazellulär

(R*T)/(z*F) = 59,16 mV (bei Raumtemperatur)

6.3 Tabellen

Tab. A3: Umkehrpotentiale der optisch evozierten IPSC (vgl. Abb. 13)

Zelle	Umkehrpotentiale [mV]	
	VIP	PV
1	-66,77	-63,52
2	-68,17	-61,19
3	-66,84	-62,09
4	-72,01	-85,46
5	-66,64	-63,17
6	-72,94	-68,14
7	-64,57	-67,19
8	-67,87	-62,39
9	-67,66	-64,70
10	-72,06	-63,65
11	-67,93	-66,73
12	-66,80	-60,36
13	-68,62	-63,12
14		-61,12
15		-60,26

Tab. A4: Analyse der vertikalen Orientierung axonaler Projektionsmuster VIP- und PV-exprimierender Zellen auf MC (vgl. Abb. 15)

Distanz vertikal [µm]	Mittlere normalisierte Amplitude der IPSC				
	VIP→ LII/III MC	PV→ LII/III MC	Statistik LII/III	VIP→ LV MC	PV→ LV MC
150	0,81	0,67	p = 0.560	0,91	0,48
100	0,93	0,80	p = 0.019	0,85	0,69
50	0,87	0,92	p = 0.219	0,71	0,99
0	0,80	0,75	p = 0.653	0,84	0,93
-50	0,69	0,53	p = 0.206	0,81	0,68
-100	0,55	0,27	p = 0.010	0,56	0,63
-150	0,45	0,14	p = 0.003	0,50	0,31

Tab. A5: Quantifizierung von VIP- und PV-Eingängen auf MC-Dendriten in verschiedenen Distanzen zum MC-Soma; mittlere normalisierte IPSC-Amplituden (vgl. Abb. 17A-A‘)

Distanz [µm]	VIP→LII/III MC			PV→LII/III MC			VIP→LV MC			PV→LV MC		
	MW	SD	s.e.m.	MW	SD	s.e.m.	MW	SD	s.e.m.	MW	SD	s.e.m.
Soma	0,67	0,31	0,11	0,86	0,21	0,08	0,76	0,19	0,09	0,99	0,02	0,01
25-75	0,59	0,18	0,07	0,45	0,18	0,06	0,63	0,12	0,06	0,56	0,51	0,36
75-125	0,41	0,13	0,05	0,16	0,09	0,03	0,34	0,12	0,06	0,33	0,44	0,31
125-175	0,22	0,06	0,02	0,04	0,05	0,02	0,21	0,11	0,05	0,06	0,07	0,05
175-225	0,06	0,04	0,01	0,01	0,01	0,00	0,09	0,09	0,05	0,00	0,00	0,00
225-275	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01	0,00	--	--

Tab. A6: Quantifizierung von VIP- und PV-Eingängen auf MC-Dendriten in verschiedenen Distanzen zum MC-Soma; relative Eingänge (vgl. Abb. 17B-B‘)

Distanz [µm]	VIP→LII/III MC			PV→LII/III MC			VIP→LV MC			PV→LV MC		
	MW	SD	s.e.m.	MW	SD	s.e.m.	MW	SD	s.e.m.	MW	SD	s.e.m.
Soma	0,34	0,16	0,06	0,57	0,14	0,05	0,37	0,09	0,05	0,51	0,01	0,01
25-75	0,30	0,09	0,03	0,30	0,12	0,04	0,31	0,06	0,03	0,29	0,26	0,19
75-125	0,21	0,07	0,02	0,10	0,06	0,02	0,17	0,06	0,03	0,17	0,23	0,16
125-175	0,11	0,03	0,01	0,03	0,03	0,01	0,10	0,05	0,03	0,03	0,04	0,03
175-225	0,03	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,04	0,04	0,03	0,00	0,00	0,00
225-275	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	--	--

6.4 Ergänzende Abbildungen

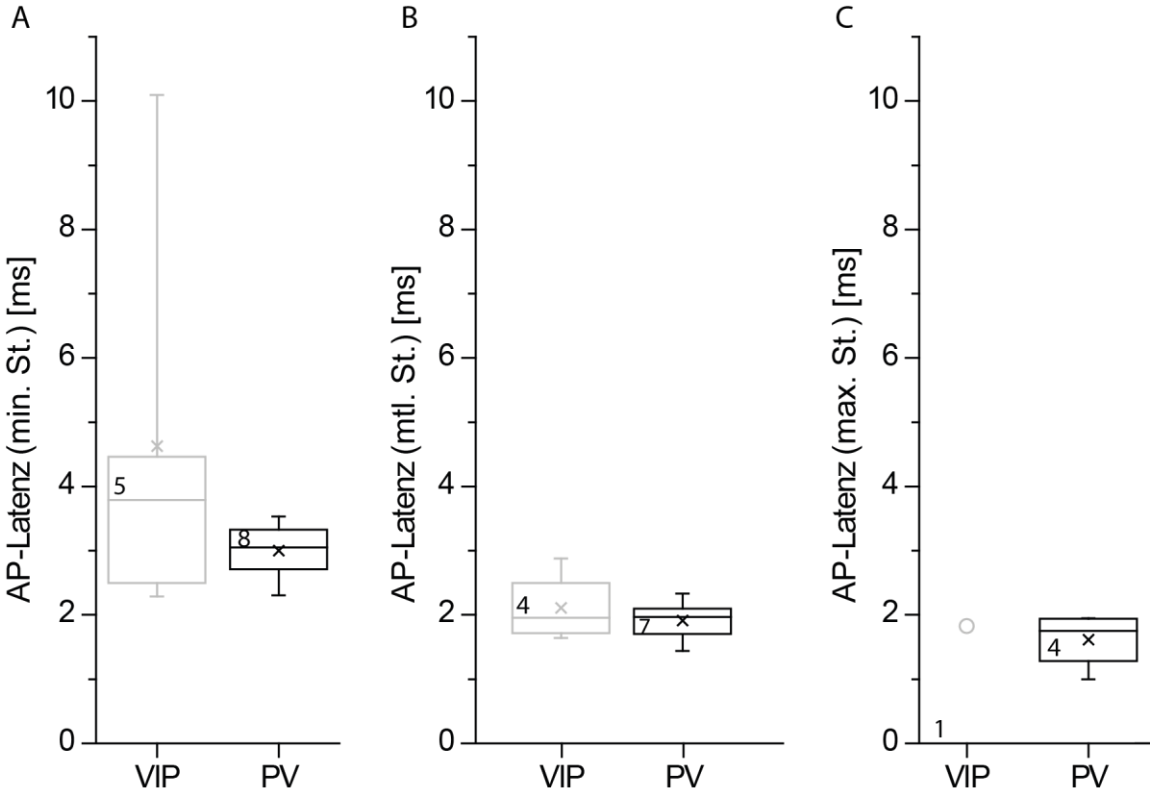

Abb. A1: AP-Latenz bei optisch evozierter überschwelliger Depolarisation ChR2-transduzierter VIP- und PV-exprimierender Zellen

ChR2-transduzierte VIP- bzw. PV-exprimierenden Zellen wurden am Soma mit steigenden Laserenergien überschwellig stimuliert. Die induzierten AP wurden in *Current-clamp*-Konfiguration aufgezeichnet und die Latenz von Stimulusbeginn bis zur AP-Spitze bestimmt. Box Plots zeigen Median (Querlinie), Mittelwert (Kreuz), 25-75% Quantile (Box), 10-90% Perzentile (Antennen) und Zellzahlen (Ziffer in der Box).

(A) Bei der minimalen AP-induzierende Stimulusenergie (min. St.) beträgt die AP-Latenz im Median 3,79 ms für VIP- (25% Quantile: 2,50 ms, 75% Quantile: 4,46 ms) und 3,05 ms für PV-exprimierende Zellen (25% Quantile: 2,71 ms, 75% Quantile: 3,33 ms).

(B) Eine ca. dreifach erhöhte Laserenergie verkürzt die AP-Latenz auf 1,94 ms für VIP- (25% Quantile: 1,71 ms, 75% Quantile: 2,49 ms) und 1,96 ms für PV-exprimierende Zellen (25% Quantile: 1,69 ms, 75% Quantile: 2,09 ms).

(C) Bei der maximalen experimentell untersuchten Laserenergie beträgt die Latenz der AP in VIP-Zellen 1,82 ms (n = 1) und in PV-Zellen 1,75 ms (25% Quantile: 1,28 ms, 75% Quantile: 1,94 ms).

Höhere Laserenergie korreliert mit kürzeren Latenzen bei beiden Zelltypen. Bei allen untersuchten Laserenergien besteht kein signifikanter Unterschied der AP-Latenz zwischen VIP- und PV-exprimierenden Zellen.

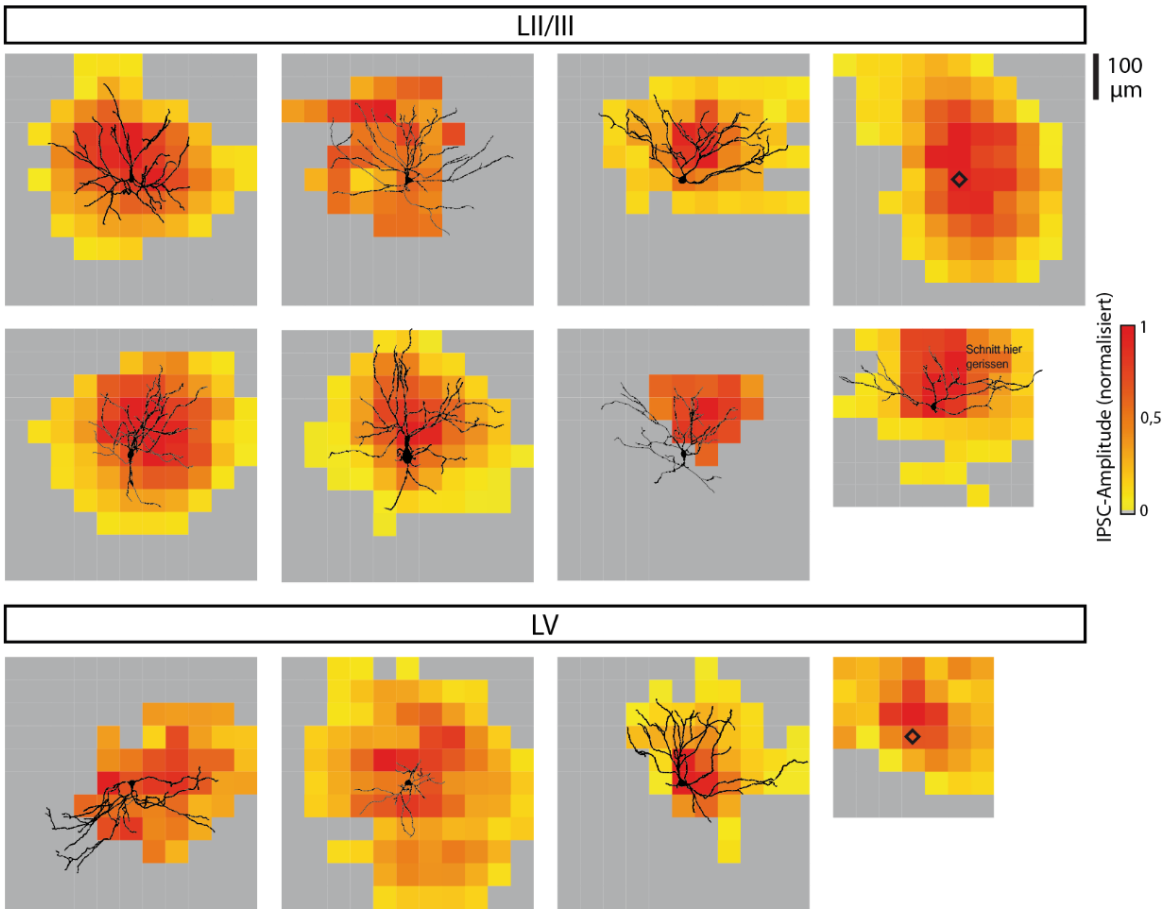

Abb. A2: Übersicht aller sCRACM-Einzelkartogramme der synaptischen Zielregionen VIP-exprimierender Zellen auf MC in LII/III und LV (vgl. Abb. 16)
Mittels der sCRACM-Methode wurden Präsynapsen ChR2-transduzierter VIP-exprimierender Zellen im Umfeld einer abgeleiteten MC stimuliert und lichtinduzierte synaptische Eingänge an der MC abgeleitet. Normalisierte IPSC-Amplituden sind farbkodiert von gelb bis rot in den zugehörigen Feldern dargestellt. Felder ohne Eingang sind grau. Kartogramme für MC in LII/III oben (n = 8) und für MC in LV unten (n = 4). In schwarz sind die Kartogramme mit somatodendritischen Rekonstruktionen der abgeleiteten MC überlagert. Zwei MC konnten nicht rekonstruiert werden.
Fast alle untersuchten MC erhalten alle dendritischen Abschnitte, inklusive der distalen dendritischen Bereiche, Projektionen VIP-exprimierender Zellen. Eine passive elektrotonische Fortleitung in den Axonen der präsynaptischen Zellen begrenzt die Auflösung der sCRACM-Methode, sodass in Distanzen vom Dendriten abhängig von Laserenergie und ChR2-Expressionsgrad falsch positiv Messungen auftreten.

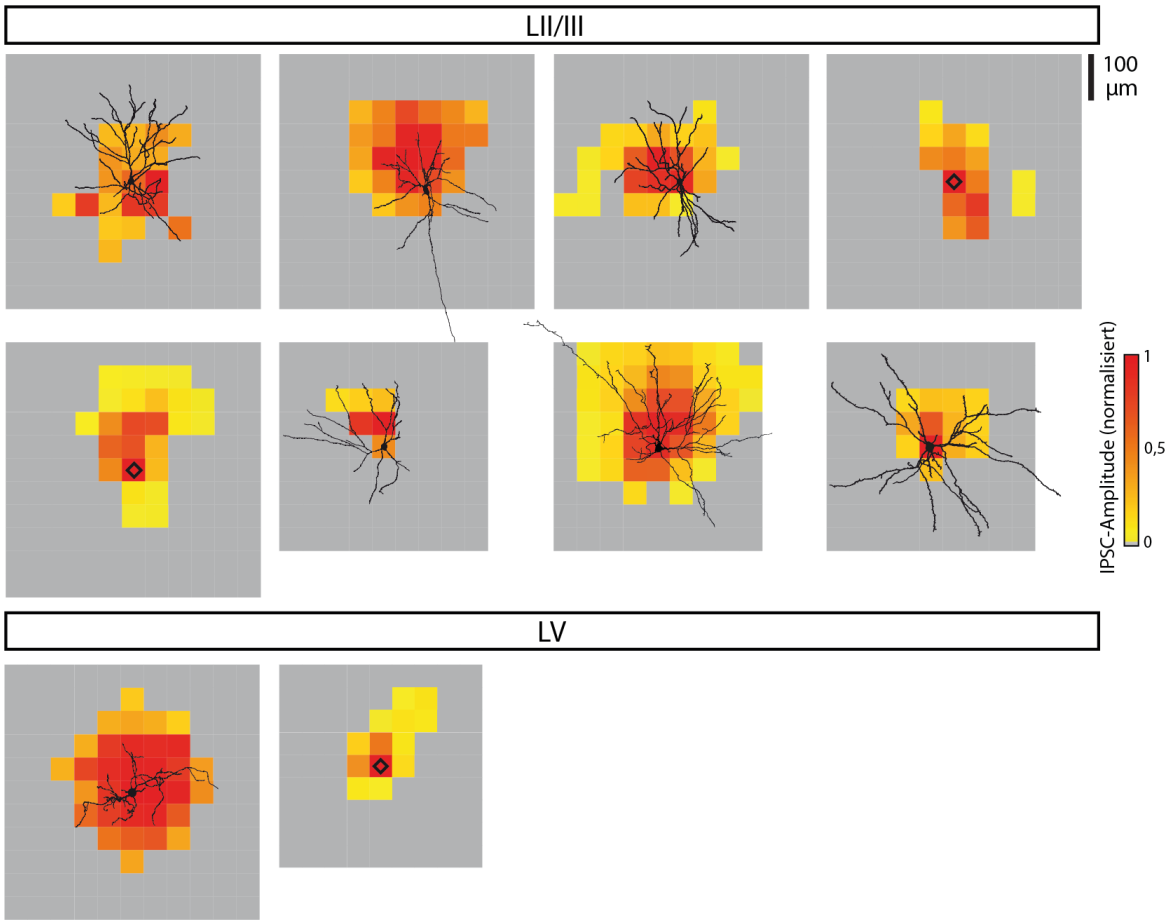

Abb. A3: Übersicht aller sCRACM-Einzelkartogramme der synaptischen Zielregionen PV-exprimierender Zellen auf MC in LII/III und LV (vgl. Abb. 16)
Analog zu Abb. A2 wurden Präsynapsen ChR2-transduzierter PV-exprimierender Zellen mittels der sCRACM-Methode stimuliert und lichtinduzierte synaptische Eingänge an MC in LII/III (n = 8) und LV (n = 2) abgeleitet. In schwarz sind die Kartogramme mit somatodendritischen Rekonstruktionen der abgeleiteten MC überlagert. Drei MC konnten nicht rekonstruiert werden.
Die synaptischen Projektionen PV-exprimierender Zellen konzentrieren sich insbesondere auf die perisomatische dendritische Region von MC und enden nur vereinzelt an distalen dendritischen Abschnitten. Auch hier ist die Auflösung durch passive elektrotonische Fortleitung in den Axonen der präsynaptischen Zellen limitiert.

7 Literaturverzeichnis

Acsady L, Gorcs TJ, Freund TF (1996): Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. Neuroscience 73, 317–334

Adelman WJ, Senft JP (1966): Voltage clamp studies on the effect of internal cesium ion on sodium and potassium currents in the squid giant axon. J Gen Physiol 50, 279–293

Almási Z, Dávid C, Witte M, Staiger JF (2019): Distribution Patterns of Three Molecularly Defined Classes of GABAergic Neurons Across Columnar Compartments in Mouse Barrel Cortex. Front Neuroanat 13, 45

Armstrong DM, LeRoy S, Shields D, Terry RD (1985): Somatostatin-like immunoreactivity within neuritic plaques. Brain Res 338, 71–79

Armstrong-James M, Fox K, Das-Gupta A (1992): Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. J Neurophysiol 68, 1345–1358

Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairen A (2008): Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 9, 557–568

Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM (2008): A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. J Neurosci 28, 7025–7030

Bacci A, Rudolph U, Huguenard JR, Prince DA (2003): Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneuron subclasses. J Neurosci 23, 9664–9674

Bartos M, Vida I, Jonas P (2007): Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. Nat Rev Neurosci 8, 45

Bar-Yehuda D, Korngreen A (2008): Space-clamp problems when voltage clamping neurons expressing voltage-gated conductances. J Neurophysiol 99, 1127–1136

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

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA: Neuroscience: Exploring the brain; Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2007

Bloss EB, Cembrowski MS, Karsh B, Colonell J, Fetter RD, Spruston N (2016): Structured Dendritic Inhibition Supports Branch-Selective Integration in CA1 Pyramidal Cells. Neuron 89, 1016–1030

Bohannon AS, Hablitz JJ (2018): Optogenetic dissection of roles of specific cortical interneuron subtypes in GABAergic network synchronization. J Physiol 596, 901–919

Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KAC, Schuhknecht GFP (2017): An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. J Neurosci 37, 2435–2448

Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987): Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. J Physiol 385, 243–286

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005): Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci 8, 1263–1268

Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM (1997): Functional architecture of the mystacial vibrissae. Behav Brain Res 84, 81–97

Buhl EH, Cobb SR, Halasy K, Somogyi P (1995): Properties of unitary IPSPs evoked by anatomically identified basket cells in the rat hippocampus. Eur J Neurosci 7, 1989–2004

Carvell GE, Simons DJ (1990): Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. J Neurosci 10, 2638–2648

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

Cauller L (1995): Layer I of primary sensory neocortex: where top-down converges upon bottom-up. Behav Brain Res 71, 163–170

Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P (2006): Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. Nat Protoc 1, 3166–3173

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995): Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. Nature 378, 75

Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, Rubenstein JL (2005): Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. Nat Neurosci 8, 1059–1068

Connor JR, Peters A (1984): Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in rat visual cortex. Neuroscience 12, 1027–1044

Connors BW, Gutnick MJ (1990): Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. Trends Neurosci 13, 99–104

Coogan TA, Burkhalter A (1993): Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. J Neurosci 13, 3749–3772

Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, de Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2001): Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. Nat Neurosci 4, 52–62

Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB (2005): Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 12560–12565

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

Davies P, Katzman R, Terry RD (1980): Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementa. Nature 288, 279–280

DeFelipe J, Farinas I (1992): The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. Prog Neurobiol 39, 563–607

DeFelipe J (1997): Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. J Chem Neuroanat 14, 1–19

Delchmann J: Elektrophysiologische Charakterisierung GABA-Rezeptoren vermittelter Inhibition an Martinotti-Zellen im somatosensorischen Kortex. Med. Diss. Göttingen 2018

Douglas RJ, Martin KAC (1991): A functional microcircuit for cat visual cortex. J Physiol 440, 735–769

Douglas RJ, Martin KAC (2004): Neuronal circuits of the neocortex. Annu Rev Neurosci 27, 419–451

Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW (2008): Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. J Neurophysiol 100, 2640–2652

Feldmeyer D (2012): Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. Front Neuroanat 6, 24

Feldmeyer D, Egger V, Lübke J, Sakmann B (1999): Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex. J Physiol 521, 169–190

Ferrer I, Fabregues I, Condom E (1986a): A Golgi study of the sixth layer of the cerebral cortex. I. The lissencephalic brain of Rodentia, Lagomorpha, Insectivora and Chiroptera. J Anat 145, 217–234

Ferrer I, Fabregues I, Condom E (1986b): A Golgi study of the sixth layer of the cerebral cortex. II. The gyrencephalic brain of Carnivora, Artiodactyla and Primates. J Anat 146, 87–104

Fino E, Yuste R (2011): Dense inhibitory connectivity in neocortex. Neuron 69, 1188–1203

Fischer T: Schichtenspezifische Charakterisierung Somatostatin-exprimierender Interneurone in der GIN- und SOMcre/tdTomato-Maus mittels neurochemischer Marker im primären somatosensorischen Barrel-Kortex. Med. Diss. Göttingen 2018

Fox K: Barrel cortex; Cambridge University Press, Cambridge 2008

Freund TF, Katona I (2007): Perisomatic inhibition. Neuron 56, 33–42

Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP (2014): A cortical circuit for gain control by behavioral state. Cell 156, 1139–1152

Gabbott PL, Somogyi P (1986): Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the visual cortex (area 17) of the cat. Exp Brain Res 61, 323–331

Gabbott PL, Bacon SJ (1996): Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. J Comp Neurol 364, 567–608

Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen, Carl C H (2012): Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. Nat Neurosci 15, 607–612

Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999): Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. Nature 402, 75–79

Glöckner K: Electrophysiological Characterisation of Postsynaptic and Presynaptic GABA-Receptors on Martinotti-Cells in Layer 5. AG Meeting Institut für Neuroanatomie, Göttingen 26.10.2018

Goldberg JH, Yuste R (2005): Space matters: local and global dendritic Ca2+ compartmentalization in cortical interneurons. Trends Neurosci 28, 158–167

Gonzalez-Burgos G, Lewis DA (2008): GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. Schizophr Bull 34, 944–961

Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David JP, Delacourte A, Dournaud P, Epelbaum J (1998): Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. Neurosci Lett 255, 21–24

Guy J, Sachkova A, Mock M, Witte M, Wagener RJ, Staiger JF (2017): Intracortical Network Effects Preserve Thalamocortical Input Efficacy in a Cortex Without Layers. Cereb Cortex 27, 4851–4866

Hafner G, Witte M, Guy J, Subhashini N, Fenno LE, Ramakrishnan C, Kim YS, Deisseroth K, Callaway EM, Oberhuber M et al. (2019): Mapping Brain-Wide Afferent Inputs of Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Barrel Cortex Reveals Local and Long-Range Circuit Motifs. Cell Rep 28, 3450-3461

Haider B, McCormick DA (2009): Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. Neuron 62, 171–189

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

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 391, 85–100

Harris JA, Oh SW, Zeng H (2012): Adeno-associated viral vectors for anterograde axonal tracing with fluorescent proteins in nontransgenic and cre driver mice. Curr Protoc Neurosci 59, 1.20.1-1.20.18

Hasenstaub A, Shu Y, Haider B, Kraushaar U, Duque A, McCormick DA (2005): Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. Neuron 47, 423–435

Herman AM, Huang L, Murphey DK, Garcia I, Arenkiel BR (2014): Cell type-specific and time-dependent light exposure contribute to silencing in neurons expressing Channelrhodopsin-2. Elife 3, e01481

Hestrin S, Armstrong WE (1996): Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. J Neurosci 16, 5290–5300

Hioki H, Okamoto S, Konno M, Kameda H, Sohn J, Kuramoto E, Fujiyama F, Kaneko T (2013): Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. J Neurosci 33, 544–555

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005): A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS Biol 3, e159

Hooks BM, Hires SA, Zhang Y-X, Huber D, Petreanu L, Svoboda K, Shepherd GMG (2011): Laminar analysis of excitatory local circuits in vibrissal motor and sensory cortical areas. PLoS Biol 9, e1000572

Horikawa K, Armstrong WE (1988): A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. J Neurosci Methods 25, 1–11

Hu H, Ma Y, Agmon A (2011): Submillisecond firing synchrony between different subtypes of cortical interneurons connected chemically but not electrically. J Neurosci 31, 3351–3361

Hu H, Vervaeke K (2018): Synaptic Integration in Cortical Inhibitory Neuron Dendrites. Neuroscience 368, 115–131

Hutson KA, Masterton RB (1986): The sensory contribution of a single vibrissa's cortical barrel. J Neurophysiol 56, 1196–1223

Isaacson JS, Scanziani M (2011): How inhibition shapes cortical activity. Neuron 72, 231–243

Isomura Y, Harukuni R, Takekawa T, Aizawa H, Fukai T (2009): Microcircuitry coordination of cortical motor information in self-initiation of voluntary movements. Nat Neurosci 12, 1586–1593

Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS (2015): Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. Science 350, aac9462

Kaila K (1994): Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. Prog Neurobiol 42, 489–537

Kalanithi PSA, Zheng W, Kataoka Y, DiFiglia M, Grantz H, Saper CB, Schwartz ML, Leckman JF, Vaccarino FM (2005): Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 13307–13312

Kameda H, Hioki H, Tanaka YH, Tanaka T, Sohn J, Sonomura T, Furuta T, Fujiyama F, Kaneko T (2012): Parvalbumin-producing cortical interneurons receive inhibitory inputs on proximal portions and cortical excitatory inputs on distal dendrites. Eur J Neurosci 35, 838–854

Kampa BM, Letzkus JJ, Stuart GJ (2006): Cortical feed-forward networks for binding different streams of sensory information. Nat Neurosci 9, 1472–1473

Karagiannis A, Gallopin T, Dávid C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman, Elizabeth M C, Staiger JF, Cauli B (2009): Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. J Neurosci 29, 3642–3659

Karnani MM, Jackson J, Ayzenshtat I, Hamzehei Sichani A, Manoocheri K, Kim S, Yuste R (2016a): Opening Holes in the Blanket of Inhibition: Localized Lateral Disinhibition by VIP Interneurons. J Neurosci 36, 3471–3480

Karnani MM, Jackson J, Ayzenshtat I, Tucciarone J, Manoocheri K, Snider WG, Yuste R (2016b): Cooperative Subnetworks of Molecularly Similar Interneurons in Mouse Neocortex. Neuron 90, 86–100

Kawaguchi Y (1995): Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. J Neurosci 15, 2638–2655

Kawaguchi Y, Kubota Y (1993): Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. J Neurophysiol 70, 387–396

Kawaguchi Y, Kubota Y (1996): Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. J Neurosci 16, 2701–2715

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997): GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. Cereb Cortex 7, 476–486

Kawaguchi Y, Kubota Y (1998): Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. Neuroscience 85, 677–701

Kisvárday ZF, Beaulieu C, Eysel UT (1993): Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): Implication for lateral disinhibition. J Comp Neurol 327, 398–415

Klausberger T, Somogyi P (2008): Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. Science 321, 53–57

Klausberger T, Roberts JDB, Somogyi P (2002): Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA(A) receptors in the hippocampus. J Neurosci 22, 2513–2521

Knöpfel T, Boyden ES: Optogenetics: Tools for Controlling and Monitoring Neuronal Activity; Elsevier, Amsterdam 2012

Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000): Current concepts in neuroanatomical tracing. Prog Neurobiol 62, 327–351

Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F, Lubke J, Kawaguchi Y (2015): Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. Elife 4, e07919

Larkum ME, Kaiser KM, Sakmann B (1999): Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 14600–14604

Larkum ME, Nevian T, Sandler M, Polsky A, Schiller J (2009): Synaptic integration in tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a new unifying principle. Science 325, 756–760

Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B (2010): The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. J Neurosci 30, 16796–16808

Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B (2013): A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. Nat Neurosci 16, 1662–1670

Lefort S, Tomm C, Floyd Sarria J, Petersen CCH (2009): The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. Neuron 61, 301–316

Letzkus JJ, Wolff SBE, Meyer EMM, Tovote P, Courtin J, Herry C, Luthi A (2011): A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. Nature 480, 331–335

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005): Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. Nat Rev Neurosci 6, 312–324

Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW (2012): Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. Trends Neurosci 35, 57–67

London M, Häusser M (2005): Dendritic computation. Annu Rev Neurosci 28, 503–532

Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK (1992): Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. J Neurosci 12, 4846–4853

Luth HJ, Hedlich A, Hilbig H, Winkelmann E, Mayer B (1994): Morphological analyses of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase positive structures in human visual cortex. J Neurocytol 23, 770–782

Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A (2006): Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. J Neurosci 26, 5069–5082

Ma Y, Hu H, Agmon A (2012): Short-term plasticity of unitary inhibitory-to-inhibitory synapses depends on the presynaptic interneuron subtype. J Neurosci 32, 983–988

Magee JC, Johnston D (1997): A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. Science 275, 209–213

Marin-Padilla M (1970): Prenatal and early postnatal ontogenesis of the human motor cortex: a golgi study. I. The sequential development of the cortical layers. Brain Res 23, 167–183

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004): Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 5, 793–807

Martinotti C (1889): Contributo allo studio della corteccia cerebrale, ed all'origine centrale dei nervi. Ann Freniatr Sci Affini 1, 14–381

McBain CJ, Fisahn A (2001): Interneurons unbound. Nat Rev Neurosci 2, 11–23

McDonald AJ (1992): Neuroanatomical labeling with biocytin: a review. Neuroreport 3, 821–827

McGarry LM, Packer AM, Fino E, Nikolenko V, Sippy T, Yuste R (2010): Quantitative classification of somatostatin-positive neocortical interneurons identifies three interneuron subtypes. Front Neural Circuits 4, 1–19

Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996): Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. Neuron 16, 815–823

Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJB, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G (2010): Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. J Neurosci 30, 1582–1594

Molleman A: Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology; Wiley, Chichester 2003

Mountcastle VB (1957): Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. J Neurophysiol 20, 408–434

Mountcastle VB (1997): The columnar organization of the neocortex. Brain 120, 701–722

Nathanson JL, Yanagawa Y, Obata K, Callaway EM (2009): Preferential labeling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropism of adeno-associated virus and lentivirus vectors. Neuroscience 161, 441–450

Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260, 799–802

Nguyen Q-A, Nicoll RA (2018): The GABAA Receptor beta Subunit Is Required for Inhibitory Transmission. Neuron 98, 718-725.e3

Nigro MJ, Hashikawa-Yamasaki Y, Rudy B (2018): Diversity and Connectivity of Layer 5 Somatostatin-Expressing Interneurons in the Mouse Barrel Cortex. J Neurosci 38, 1622–1633

Oliva AA, Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW (2000): Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. J Neurosci 20, 3354–3368

Packer AM, Yuste R (2011): Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? J Neurosci 31, 13260–13271

Palmer SL, Noctor SC, Jablonska B, Juliano SL (2001): Laminar specific alterations of thalamocortical projections in organotypic cultures following layer 4 disruption in ferret somatosensory cortex. Eur J Neurosci 13, 1559–1571

Peters A (1990): The axon terminals of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing bipolar cells in rat visual cortex. J Neurocytol 19, 672–685

Peters A, Harriman KM (1988): Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. J Comp Neurol 267, 409–432

Petersen CCH (2007): The functional organization of the barrel cortex. Neuron 56, 339–355

Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K (2007): Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. Nat Neurosci 10, 663–668

Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K (2009): The subcellular organization of neocortical excitatory connections. Nature 457, 1142–1145

Pfeffer CK, Xue M, He M, Huang ZJ, Scanziani M (2013): Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. Nat Neurosci 16, 1068–1076

Pi H-J, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A (2013): Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. Nature 503, 521–524

Polsky A, Mel BW, Schiller J (2004): Computational subunits in thin dendrites of pyramidal cells. Nat Neurosci 7, 621–627

Porter JT, Johnson CK, Agmon A (2001): Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. J Neurosci 21, 2699–2710

Pouille F, Scanziani M (2001): Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. Science 293, 1159–1163

Powell EM, Campbell DB, Stanwood GD, Davis C, Noebels JL, Levitt P (2003): Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioral dysfunction. J Neurosci 23, 622–631

Prönneke A, Scheuer B, Wagener RJ, Mock M, Witte M, Staiger JF (2015): Characterizing VIP Neurons in the Barrel Cortex of VIPcre/tdTomato Mice Reveals Layer-Specific Differences. Cereb Cortex 25, 4854–4868

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM: Neuroscience; Sinauer Associates, Sunderland 2001

Ramon y Cajal S: Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados; Moya, Madrid 1899

Roberts GW, Crow TJ, Polak JM (1985): Location of neuronal tangles in somatostatin neurones in Alzheimer's disease. Nature 314, 92–94

Roux L, Buzsaki G (2015): Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. Neuropharmacology 88, 10–23

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011): Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Dev Neurobiol 71, 45–61

Ruiz-Marcos A, Valverde F (1970): Dynamic architecture of the visual cortex. Brain Res 19, 25–39

Runyan CA, Sur M (2013): Response Selectivity Is Correlated to Dendritic Structure in Parvalbumin-Expressing Inhibitory Neurons in Visual Cortex. J Neurosci 33, 11724–11733

Scala F, Kobak D, Shan S, Bernaerts Y, Laturnus S, Cadwell CR, Hartmanis L, Froudarakis E, Castro JR, Tan ZH et al. (2019): Layer 4 of mouse neocortex differs in cell types and circuit organization between sensory areas. Nat Commun 10, 4174

Scanziani M, Häusser M (2009): Electrophysiology in the age of light. Nature 461, 930–939

Schubert D, Kotter R, Staiger JF (2007): Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. Brain Struct Funct 212, 107–119

Shu Y, Yu Y, Yang J, McCormick DA (2007): Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K+ current. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 11453–11458

Silberberg G, Markram H (2007): Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. Neuron 53, 735–746

Sloviter RS (1987): Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. Science 235, 73–76

Sloviter RS (1991): Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. Hippocampus 1, 41–66

Sohn J, Okamoto S, Kataoka N, Kaneko T, Nakamura K, Hioki H (2016): Differential Inputs to the Perisomatic and Distal-Dendritic Compartments of VIP-Positive Neurons in Layer 2/3 of the Mouse Barrel Cortex. Front Neuroanat 10, 124

Somogyi P (1977): A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. Brain Res 136, 345–350

Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998): Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. Brain Res Brain Res Rev 26, 113–135

Spruston N, Jaffe DB, Johnston D (1994): Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. Trends Neurosci 17, 161–166

Staiger JF: Cortical GABAergic Neurons. In: Arthur TW (Hrsg.): Brain Mapping: An Encyclopedic Reference; Elsevier, Amsterdam 2015, 69–80

Staiger JF, Zilles K, Freund TF (1996): Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. Eur J Neurosci 8, 2273–2285

Staiger JF, Kotter R, Zilles K, Luhmann HJ (2000): Laminar characteristics of functional connectivity in rat barrel cortex revealed by stimulation with caged-glutamate. Neurosci Res 37, 49–58

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

Staiger JF, Flagmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kotter R, Luhmann HJ (2004a): Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. Cereb Cortex 14, 690–701

Staiger JF, Masanneck C, Schleicher A, Zuschratter W (2004b): Calbindin-containing interneurons are a target for VIP-immunoreactive synapses in rat primary somatosensory cortex. J Comp Neurol 468, 179–189

Staiger JF, Zuschratter W, Luhmann HJ, Schubert D (2009): Local circuits targeting parvalbumin-containing interneurons in layer IV of rat barrel cortex. Brain Struct Funct 214, 1–13

Staiger JF, Möck M, Proenneke A, Witte M (2015a): What types of neocortical GABAergic neurons do really exist? eNeuroforum 6, 49–56

Staiger JF, Bojak I, Miceli S, Schubert D (2015b): A gradual depth-dependent change in connectivity features of supragranular pyramidal cells in rat barrel cortex. Brain Struct Funct 220, 1317–1337

Stokes CCA, Teeter CM, Isaacson JS (2014): Single dendrite-targeting interneurons generate branch-specific inhibition. Front Neural Circuits 8, 139

Stuart G, Spruston N (1998): Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. J Neurosci 18, 3501–3510

Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997): Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. J Physiol 500, 715–738

Tamas G, Somogyi P, Buhl EH (1998): Differentially interconnected networks of GABAergic interneurons in the visual cortex of the cat. J Neurosci 18, 4255–4270

Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y et al. (2011): A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. Neuron 71, 995–1013

Thomson AM, Deuchars J (1997): Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro. Cereb Cortex 7, 510–522

Traub RD, Bibbig A, LeBeau FEN, Buhl EH, Whittington MA (2004): Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. Annu Rev Neurosci 27, 247–278

Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO, Yuste R (2006): Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. J Neurosci 26, 12447–12455

Trevelyan AJ, Sussillo D, Yuste R (2007): Feedforward inhibition contributes to the control of epileptiform propagation speed. J Neurosci 27, 3383–3387

Urban-Ciecko J, Barth AL (2016): Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. Nat Rev Neurosci 17, 401–409

Valverde F (1976): Aspects of cortical organization related to the geometry of neurons with intra-cortical axons. J Neurocytol 5, 509–529

Walker F, Möck M, Feyerabend M, Guy J, Wagener RJ, Schubert D, Staiger JF, Witte M (2016): Parvalbumin- and vasoactive intestinal polypeptide-expressing neocortical interneurons impose differential inhibition on Martinotti cells. Nat Commun 7, 13664

Walker F: Functional connectivity of layer II/III and V GABAergic Martinotti cells in the primary somatosensory (barrel) cortex of mice. Bio. Diss. Göttingen 2016

Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H (2004): Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. J Physiol 561, 65–90

Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H (2002): Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. Cereb Cortex 12, 395–410

Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG (1995): Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. Nature 373, 612–615

Williams SR, Mitchell SJ (2008): Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons. Nat Neurosci 11, 790–798

Witte M, Staiger JF: Transgenic mice in Neuroanatomy – Blessing or Curse? 113. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Rostock 27.09.2018

Wolff SBE, Grundemann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson GA, Muller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ (2014): Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. Nature 509, 453–458

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

Xu H, Jeong H-Y, Tremblay R, Rudy B (2013): Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. Neuron 77, 155–167

Xu N-l, Harnett MT, Williams SR, Huber D, O'Connor DH, Svoboda K, Magee JC (2012): Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. Nature 492, 247–251

Xu X, Callaway EM (2009): Laminar Specificity of Functional Input to Distinct Types of Inhibitory Cortical Neurons. J Neurosci 29, 70–85

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

Yavorska I, Wehr M (2016): Somatostatin-Expressing Inhibitory Interneurons in Cortical Circuits. Front Neural Circuits 10, 76

Zhou X, Rickmann M, Hafner G, Staiger JF (2017): Subcellular Targeting of VIP Boutons in Mouse Barrel Cortex is Layer-Dependent and not Restricted to Interneurons. Cereb Cortex 27, 5353–5368

Zhou X, Mansori I, Fischer T, Witte M, Staiger JF (2020): Characterizing the morphology of somatostatin-expressing interneurons and their synaptic innervation pattern in the barrel cortex of the GFP-expressing inhibitory neurons mouse. J Comp Neurol 528, 244–260

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Jochen Staiger, für die Möglichkeit diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen sowie für die mir dafür zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte. Ich danke ihm sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie für die angenehme und anregende Atmosphäre und den regen Austausch im ganzen Team.

Insbesondere möchte ich meinem direkten Betreuer Dr. Mirko Witte danken, der mich in allen Arbeitsschritten unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Seine stete Ermutigung und seine Korrekturen waren eine große Hilfe für mich.

Ich möchte Dr. Mirko Witte zudem danken für die Erhebung der elektrophysiologischen Rohdaten sowie Dr. Julien Guy für die stereotaktischen Injektionen der Cre-abhängigen Viren, Patricia Sprysch für die histologischen Färbungen und Dr. Martin Möck für seinen Rat bei der Auswertung elektrophysiologischer Rohdaten mit den von ihm geschriebenen Auswertungsskripten. Zuletzt gilt mein Dank allen zuvor genannten Personen sowie Dr. Alvar Prönneke, Dr. Florian Walker, Dr. Bianca Scheuer und Michael Feyerabend für das Teilen ihrer Erfahrung und für ihr konstruktives Feedback.