

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Adolf Melichar

**Lokalizace GABA_B receptoru v dorzálním kochleárním jádře a sluchové kůře
myši za fyziologických a patologických podmínek**

Localization of GABA_B receptor in the mouse dorsal cochlear nucleus and
auditory cortex under physiological and pathological conditions

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Michaela Králíková, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 5. 8. 2018

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval své školitelce Ing. Michaele Králíkové, Ph.D. za čas a odbornou pomoc při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat vedoucímu oddělení neurofyzologie sluchu RNDr. Rostislavu Turečkovi, CSc. za pomoc při vypracování diplomové práce a za možnost provádět experimentální činnost na jeho oddělení. Také bych rád poděkoval RNDr. Natalii Rybalko, CSc. a Bc. Štěpánce Suchánkové za poskytnutí ohlušených myší pro imunohistochemické pokusy. V neposlední řadě patří dík také RNDr. Jiřímu Janáčkovi, PhD. za pomoc při analýze dat.

Abstrakt

GABA_B receptory hrají důležitou roli v regulaci excitability neuronů a stability neuronálních mikrokruhů. Bylo zjištěno, že dysregulace GABAergní signalizace se účastní řady onemocnění a patologických stavů (epilepsie, anxieta ad.). Výsledky současného výzkumu naznačují, že nerovnováha v inhibičním přenosu, způsobená mimo jiné změnami v expresi GABA_BR ve sluchovém systému, může být příčinou tinnitu. Cílem této práce bylo stanovit distribuci GABA_B receptoru a jeho přídatné podjednotky KCTD12 ve sluchové kůře a dorzálním kochleárním jádře (DCN) myši. Dále pak byla sledována změna lokalizace GABA_B receptoru v DCN u myši vystavených akustickému stresu.

GABA_BR byl exprimován napříč celou sluchovou kůrou, a to jak na těle buněk, tak na výběžcích neuronů. Naproti tomu KCTD12 se nacházel ve specifické frakci buněk podskupiny VIP a cholecystokinin pozitivních interneuronů. V DCN se GABA_BR a KCTD12 protein nacházely ve všech vrstvách jádra a ve všech zkoumaných podtypech buněk (fusiformních, cartwheel a hvězdicových). Po akustickém traumatu docházelo ke zvýšené internalizaci GABA_B receptoru specificky ve fusiformních buňkách, které vysílají eferentní vlákna z DCN. Nedostatek proteinu KCTD12, vedl k přesunu receptoru do intracelulárních oblastí u všech sledovaných buněk (fusiformních, cartwheel a hvězdicových buněk). Akustické trauma u KCTD12 KO myši již příliš nezvýšilo internalizaci receptoru, což naznačuje, že KCTD12 hraje důležitou roli ve stabilizaci GABA_BR na membráně a jeho funkce by mohla být zhoršena při tinnitu. Tato nová zjištění by mohla vést k lepšímu pochopení úlohy GABA_B receptoru ve studovaných oblastech a mohla by přispět k léčbě závažných onemocnění, jakým je tinnitus.

Klíčová slova: GABA_B receptor, tinnitus, sluchová kůra, dorzální kochleární jádro, KCTD12

Abstract

GABA_B receptors play an important role in regulation of neuronal excitability and stability of neural microcircuits. It is well known that dysregulation of slow GABAergic signalisation can lead to many pathological conditions (epilepsy, anxiety etc.). Current research indicates that the imbalance in the inhibitory transfer, caused by changes in the expression of GABA_BR in the auditory system could play an important role in the progression of tinnitus. The goal of the present thesis was to determine the distribution of the GABA_B receptor and its auxiliary subunit KCTD12 in the mouse auditory cortex and the dorsal cochlear nucleus (DCN). Furthermore, a change in GABA_B receptor localization in the DCN was observed in mice exposed to an acoustic stress.

The GABA_B receptor was expressed across the entire auditory cortex, both on the body and on the neuronal fibres. On the contrary, KCTD12 was found only in a particular subgroup of neurons that includes VIP (vasoactive intestinal peptide) and cholecystokinin positive interneurons., GABA_BR and KCTD12 protein were found in all layers and in all studied cells types (fusiform, cartwheel and stellate) of the DCN. Acoustic trauma of the WT mice resulted in GABA_B receptor internalization specifically in fusiform cells that are the main projection neurons of the DCN. Deficiency in the KCTD12 protein led to an increase in intracellularly located receptors in the neuronal subtypes (fusiform, cartwheel and stellate cells). Acoustic trauma of the KCTD12 KO mice did not substantially increase the GABA_B receptor internalization, which supports the hypothesis that KCTD12 regulates stability of the receptor on the membrane and this function could be compromised in tinnitus. These new findings could contribute to better understanding of the mechanism of GABA_B receptor signalling dysregulation and could contribute to treatment of serious diseases such as tinnitus.

Keywords: GABA_B receptor, tinnitus, auditory cortex, dorsal cochlear nucleus, KCTD12

Seznam zkratek

5HT_{3A} – ionotropní serotoninový receptor

A1 – primární sluchová kůra (*primary auditory cortex*)

A2 – sekundární sluchová kůra (*secondary auditory cortex*)

AAF – čelní sluchové pole (*anterior auditory field*)

Ab – protilátka (*antibody*)

AC – adenyllyl cykláza

AcCh – acetylcholin

AP – akční potenciál

BTB doména – Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac

CB1 – kanabinoidní receptor 1

CNS – centrální nervová soustava

CTR – centrální oblast (*center*)

DAF – dorzální anteriorní pole (*dorsal anterior field*)

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenylindol

DCN – dorzální kochleární jádro (*dorsal cochlear nucleus*)

DP – dorzoposteriorní pole (*dorsoposterior field*)

DPSS – Diode-pumped solid-state

FBI – zpětná inhibice (*feedback inhibition*) - zpětná inhibice

GABA – γ -aminomáselná kyselina (*γ -aminobutyric acid*)

GABA_BR – GABA_B receptor

GAD – glutamát dekarboxyláza kyseliny glutamové (*glutamate decarboxylase*)

GDP – guanosindifosfát

GIRK – G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel

GlyR – glycinový receptor

GPCR – receptory spřažené s trimerním G proteinem (*G-protein coupled receptors*)

GPIAS – gap pre-pulse inhibition of the acoustic startle reflex

GRK2 – G protein coupled receptor kinase 2

GTP – guanosintrifosfát

CHTA – směs chemiblocker, Triton X-100 a NaN₃

IC – *inferior colliculus*

IHC – vnitřní vlásková buňka

IN – interneuron

KCTD – potassium channel tetramerization domain.

KO – knock out

L1-L6 – vrstvy 1-6 (*layer 1-6*)

mAcChR – muskarinový acetylcholinový receptor

MAP2 – s mikrotubuly asociovaný protein 2 (*microtubule-associated protein 2*)

MGB – *corpus geniculatum mediale*

MUPP1 – multi-PDZ (Post-synaptic density protein) domain protein 1

nAcChR – nikotinový acetylcholinový receptor

NMDA – N-methyl-D-asparagová kyselina

PB – fosfátový pufr

PBS – fosfátový pufr s chloridem sodným a chloridem draselným

PF – paraformaldehyd

PV – parvalbumin

SK – sluchová kůra

SST – somatostatin

UF – ultrasonické pole (*ultrasonic field*)

VCN – ventrální kochleární jádro (*ventral cochlear nucleus*)

vGAT – vezikulární GABA transportér

vGluT – vezikulární glutamátový transportér

VIP – vasoaktivní intestinální peptid

VP – ventralní posteriorní pole (*ventral-posterior field*)

WT – divoký kmen (*wild type*)

Obsah

1	Úvod	1
---	------------	---

Literární přehled

2	Sluchová dráha	2
2.1	Dorzální kochleární jádro	2
2.2	Sluchová kůra	4
2.2.1	Korové interneurony	5
3	Tinnitus	9
3.1	Modely tinnitu u zvířat	10
3.1.1	Vliv salicylátu	10
3.1.2	Akustické trauma	11
3.1.3	Metody detekce tinnitu	12
4	GABA _B receptor	13
4.1	Struktura a funkce GABA _B R	14
4.1.1	Podjednotky GABA _B R – lokalizace a význam	15
4.1.2	Trimerní G protein a efekty GABA _B receptoru	16
4.1.3	KCTD proteiny	17
5	Funkční komplex GABA _B receptoru a tinnitus	19

Experimentální část

6	Metody a materiál	21
6.1	Materiál	21
6.1.1	Zvířata	21
6.1.2	Pomůcky a přístroje	21
6.1.3	Roztoky a pufry	22
6.1.4	Primární protilátky	23

6.1.5	Sekundární protilátky.....	23
6.2	Metody	24
6.2.1	Ohlušení zvířat a detekce tinnitu	24
6.2.2	Příprava řezů u myši.....	24
6.2.3	Imunohistochemie	25
6.2.4	Analýza neuronálních těl DCN	26
7	Cíle práce.....	27
8	Výsledky	29
8.1	Lokalizace GABA _B receptoru a proteinu KCTD12 ve sluchové kůře myši	29
8.2	Lokalizace GABA _B receptoru a proteinu KCTD12 v dorzálním kochleárním jádře.....	35
8.3	Vliv exprese KCTD12 proteinu na lokalizaci GABA _B receptoru v dorzálním kochleárním jádře myši	39
8.4	Změna distribuce GABA _B receptoru v buňkách dorzálního kochleárního jádra po ohlušení WT a KCTD12 myší	43
9	Diskuze	46
9.1	Distribuce GABA _B receptoru ve sluchové kůře myši.....	46
9.2	Změna distribuce GABA _B receptoru v DCN myši vystavené akustickému traumatu.....	47
10	Závěr.....	49
11	Literatura.....	50

1 Úvod

GABA_B receptor, receptor pro hlavní inhibiční neuropřenašeč, γ -aminomáselnou kyselinu (GABA), je důležitý pro řadu fyziologických i patofyziologických stavů. Nachází se napříč celou CNS (Clark et al. 2000) v presynaptických i postsynaptických kompartmentech (Bettler et al. 2004). Hlavní presynaptickou funkcí receptoru je inhibice vápníkových kanálů a tím způsobená inhibice výlevu neurotransmiteru. Na postsynaptické membráně aktivuje draslíkové kanály a tím snižuje excitabilitu buněk (Chen and van den Pol 1998; Reuveny et al. 1994). GABA_BR je tvořen heteromery podjednotek GABA_{B1} a GABA_{B2} a na intracelulární straně se na tento receptor váží přídavné podjednotky z rodiny KCTD proteinů – KCTD8, 12, 12b a 16. Tyto přídavné podjednotky zvyšují funkční diverzitu receptoru v CNS (Metz et al. 2011). Protein KCTD12 urychluje kinetiku GABA_BR a zvyšuje jeho povrchovou expresi (Ivankova et al., 2013, Turecek et al., 2014). Myši postrádající tento protein lze proto s výhodou použít jako model pro studium dysregulace GABA_BR. GABA_B receptor se vyskytuje napříč celou CNS (Clark et al. 2000), mimo jiné také ve sluchové dráze. Zde byla jeho lokalizace detailněji zkoumána v dorzálním kochleárním jádře potkana (Luján et al. 2004), ve sluchové kůře je známo jen jeho přibližné rozmístění (Jamal et al. 2011). Detailní lokalizace KCTD12 ve sluchové dráze nebyla prozatím studována.

Tinnitus je porucha, při níž postižená osoba vnímá zvuk bez zřejmého vnějšího podnětu. Jedná se o jednu z nejčtenějších poruch sluchu u člověka. Příčina tinnitu není dosud plně objasněna. Bylo zjištěno, že dochází k dysregulaci neuropřenašečových systémů a ke zvýšené spontánní a synchronní aktivitě v některých částech sluchového systému. GABA_B receptor hraje klíčovou úlohu v regulaci excitability a stability neuronálních okruhů. Podání baklofenu, agonisty GABA_B receptoru, mělo pozitivní efekt na potkany trpící tinnitem (Zheng et al. 2012). Role GABA_BR v indukci a přetrvávání tinnitu však není známa.

Naším cílem bylo detailněji popsat lokalizaci GABA_B receptoru a pomocné podjednotky KCTD12 ve sluchové kůře a dorzálním kochleárním jádře myši. Jedná se o oblasti sluchové dráhy, jež jsou nejčastěji spojovány s indukci a přetrváváním tinnitu. Dále jsme u divokého kmene myši (C57) a myši postrádající protein KCTD12 pozorovali změny distribuce GABA_B receptoru v dorzálním kochleárním jádře před a po vystavení akustickému traumatu..

Literární přehled

2 Sluchová dráha

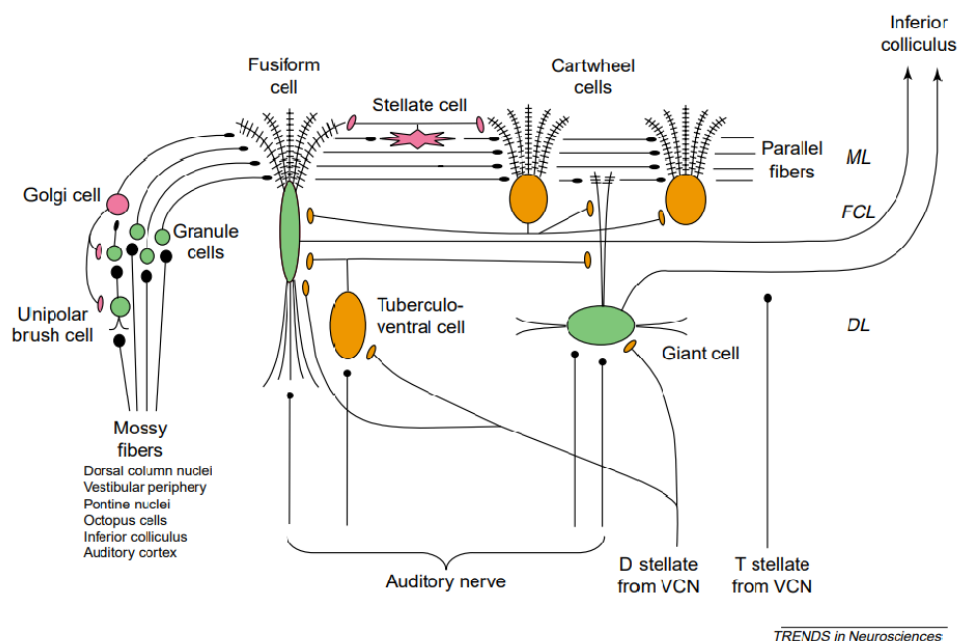
Sluchová dráha přenáší informace z Cortiho orgánu vnitřního ucha do sluchové kůry. Z vnitřního ucha vycházejí neurony, jejichž axony tvoří sluchový nerv jdoucí do kochleárních jader (do dorzálního a ventrálního kochleárního jádra). Část drah postupuje dále přímo do *inferior colliculus* (IC), část jde nejprve do komplexu olivy superior a následně do IC. Z *inferior colliculus* projikují aferentní vlákna do *corpus geniculatum mediale* (MGB) a dále do sluchové kůry.

2.1 Dorzální kochleární jádro

DCN se nachází v mozkovém kmeni a primárně přijímá vstupy z vnitřního ucha a z VCN (ventral cochlear nucleus). Na rozdíl od ventrálního kochleárního jádra je zde však i silná inervace z jiných oblastí, které probíhají v povrchové vrstvě DCN a tvoří tzv. paralelní vlákna. Paralelní vlákna přinášejí informaci kupříkladu z *nucleus cuneatus* (Weinberg and Rustioni 1987), vestibulárního nervu (Burian and Gstoettner 1988), *nuclei pontis* (Ohlrogge, Doucet, and Ryugo 2001) nebo *inferior colliculus* (Caicedo and Herbert 1993).

Samotné jádro tvoří tři vrstvy buněk. Povrchovou molekulární vrstvou probíhají paralelní vlákna, tvořená výběžky granulárních buněk, jejichž těla se nacházejí na rozhraní mezi DCN a VCN (Mugnaini, Warr, and Osen 1980). Dále se zde vyskytují hvězdicové inhibiční neurony (stellate cells), které zajišťují glycinergní i GABAergní inhibici na okolních buňkách (zvláště na buňkách fusiformních a cartwheel) (Apostolides and Trussell 2014). Mimo to jsou zde také výběžky Golgiho a kartáčových buněk (unipolar brush cells) (Oertel and Young 2004). Pod vrstvou molekulární se nachází vrstva fusiformní, nazvaná podle hlavních excitačních buněk této laminy. Fusiformní buňky mají bipolární tvar a jsou glutamatergní. Patří mezi hlavní výstupní buňky DCN do IC a přijímají informace nejen ze sluchového nervu, ale také z paralelních vláken. Axony fusiformních neuronů mohou tvořit zakončení v *inferior colliculus* anebo inervují přímo MGB. Fusiformní buňky jsou inhibovány především již zmíněnými hvězdicovými buňkami a dále cartwheel a tuberkuloventrálními neurony (Malmierca et al. 2002; Mugnaini et al. 1980; Smith and Rhode 1985). Takzvané cartwheel

cells se nacházejí také ve fusiformní vrstvě a představují početně největší skupinu interneuronů DCN (Mancilla and Manis 2009). Jedná se především o glycinergní neurony, ale obsahují γ -aminomáselnou kyselinu a exprimují GAD (dekarboxyláza kyseliny glutamové) (Adams and Mugnaini 1987; Golding and Oertel 1997). Přijímají vstupy z paralelních vláken a tvoří synapse především s fusiformními a okolními cartwheel buňkami (Oertel and Young 2004; Parham and Kim 1995). Při excitaci cartwheel neuronů jsou zpravidla s nimi synapticky spojené fusiformní buňky inhibovány. Inervované cartwheel neurony jsou naproti tomu depolarizovány při aktivaci GABA_AR a GlyR (chloridové kanály), neboť reverzní potenciál pro chloridy leží nad jejich klidovým membránovým napětím (Golding and Oertel 1996).



Obrázek 1: Buňky DCN a jejich synaptické propojení. Na obrázku jsou vidět hlavní buněčné typy DCN – buňky fusiformní, cartwheel, hvězdicové (stelite), tuberkuloventrální a obří (giant). Dále jsou zde vidět paralelní vlákna probíhající molekulární vrstvou a těla granulových buněk na rozhraní s VCN. Glycinergní neurony jsou znázorněny oranžově, glutamatergní zeleně a gabaergní růžově. Přejato z: (Oertel and Young 2004).

Poslední vrstva, uložená nejhluběji (mediálně), se nazývá polymorfní. Zde jsou hlavními (excitačními) glutamatergními neurony tzv. obří buňky (giant cells). Tyto buňky, podobně jako buňky fusiformní, tvoří synaptická spojení s paralelními vlákny i axony přicházejícími z VCN a sluchového nervu a jejich eferentní výběžky vystupují z DCN a projikují do *inferior colliculus*. V porovnání s fusiformními buňkami je jich však řádově méně. Obří neurony jsou typicky inhibovány skrze tuberkuloventrální buňky a také skrze D-hvězdicové buňky (D-stellate cells) ventrálního kochleárního jádra (Oertel and Young 2004; Ryugo and

Willard 1985). Přestože se nazývají obří, dělí se na velké, střední a malé obří buňky a větší velikosti dosahuje jen malá část z nich (Alibardi 2003). Posledním významným typem neuronu jsou tuberkuloventrální buňky polymorfní vrstvy. Ve vztahu k DCN mají vertikální orientaci a naprostá většina je glycinergní (Alibardi 2003).

Již řadu let vycházejí články věnující se vztahu mezi DCN a tinnitem a řada z nich poukázala v této oblasti na změny probíhající v určitých skupinách buněk. Například Zhang a kol. ukázali výrazné zvýšení spontánní aktivity v DCN po vystavení akustickému traumatu (Zhang and Kaltenbach 1998). Dále bylo ukázáno, že léze DCN brání indukci tinnitu (Brozoski et al. 2012). U jedinců trpících tinnitem také dochází ke změně glycinergní transmise specificky na fusiformních buňkách (Brozoski, Bauer, and Caspary 2002) Proto se touto oblastí sluchové dráhy a některými typy buněk DCN zabývá také experimentální část této práce.

2.2 Sluchová kůra

Sluchová kůra je součástí neokortexu, je konečným příjemcem aferentních drah z vnitřního ucha a má zásadní význam pro rozlišení a lokalizaci zvukových objektů (Angeloni and Geffen 2018). Dělí se do celé řady podoblastí. Pomocí dvoufotonové mikroskopie a transgenních zvířat exprimujících GCaMP6 bylo identifikováno dvanáct takových podoblastí, přičemž některé z nich vykazují v makroskopickém měřítku tonotopické uspořádání (A1 – primární sluchová kůra, AAF – čelní sluchové pole a UF – ultrasonic field), u zbylých je topografie méně patrná (VP – ventral-posterior field, DP – dorsoposterior field, A2 – sekundární sluchová kůra, posterior-UF, peri-UF, DAF – dorsal anterior field, peri-AAF, CTR a peri-A2) (Liu et al. 2017).

Sluchová kůra je tvořena šesti vrstvami buněk (L1-L6), které jsou organizovány do radiálních sloupců (Winkowski and Kanold 2013). Tyto vrstvy se odlišují funkčně i morfologicky. Hlavní vstupy vzestupné dráhy do sluchové kůry přichází z MGB thalamu a inervují především čtvrtou vrstvu sluchové kůry. Tato vrstva je proto často nazývána thalamorecipientní (Kanold, Nelken, and Polley 2014; Winkowski and Kanold 2013). Neurony L4 vysílají projekce do dalších vrstev kůry. Výrazná je projekce do L2/3 (Meng et al. 2017), dále také horizontální projekce do okolních L4 vrstev (Kratz and Manis 2015) Aktivita neuronů v kůře je regulována vlákny, která přichází z *locus coeruleus* (adrenergní), *nuclei*

raphe (serotonergní), ventrální tegmentální oblasti (dopaminergní) a nebo z *nucleus basalis Meynerti* (cholinergní). Hlavními výstupními vrstvami sluchové kůry jsou L5 a L6 vysílající eferentní vlákna do MGB, IC a dalších podkorových oblastí (Saldana 2015).

Zajímavé je, že pro frekvenční ladění konkrétních neuronů v jednotlivých vrstvách neplatí striktně tonotopické uspořádání, jak vyplývá z měření využívající „calcium imaging“ ve spojení s dvoufotonovou mikroskopií. V L4 jsou zdánlivě neurony uspořádány tonotopicky, v L2/3 se však již nacházejí vedle sebe neurony odpovídající na velmi odlišné frekvence. Různou frekvenční preferenci vykazují i jednotlivé dendritické trny L2/3 neuronů. (Winkowski and Kanold 2013). Avšak ani L4 nevykazuje úplnou tonotopii typickou pro MGB. Čtvrtá vrstva nepřijímá vstupy pouze z thalamu, ty tvoří jen cca 5 % vstupů, ale také horizontální projekce z L6 a L4 a vertikální z L2. Přesto je thalamokortikální projekce do čtvrté vrstvy zásadní, neboť čistý tón je u příslušných neuronů schopen vyvolat AP. U neuronů L2/3 ovšem čistý tón běžné intenzity AP nevyvolá. Na neuronech druhé a třetí vrstvy totiž konvergují vstupy mimo jiné z různě laděných L4 neuronů (Kanold et al. 2014).

Jednotlivé vrstvy sluchové kůry se odlišují nejen zdrojem aferentních a cílem eferentních drah, ale zvláště zastoupením funkčně odlišných neuronálních podtypů (Winer and Schreiner 2011). Dle převažující buněčné funkce dělíme neurony sluchové kůry na excitační (pyramidové a nepyramidové) a inhibiční interneurony (IN). Excitační neurony tvoří glutamatergní synapse a jsou hlavními projekčními neurony sluchové kůry (Takamori et al. 2000; Winer and Lee 2007). Interneurony se dělí dle funkce, morfologie a biologických markerů na řadu typů.

2.2.1 Korové interneurony

Inhibiční interneurony představují heterogenní populaci několika desítek podtypů, přičemž všechny využívají neuropřenašeč γ -aminomáselnou kyselinu (GABA) (A. Winer 1992). Lze je třídit dle buněčné morfologie, nomenklatura tohoto členění vychází z konference v Petilla de Aragon (2005) (Yuste 2005). Jednou ze skupin definovaných na této konferenci jsou basket cells (BC): jedná se o velké multipolární buňky, z nichž vybíhají horizontálně směřované axony, a to typicky na větší vzdálenosti. BC tvoří synaptická spojení na dendritech a somatu excitačních neuronů (hlavních buněk). Dělí se dále do podskupin large, small a nest. Large (velké) basket cells se nacházejí zejména v L4 (ale také v L2/3 a L5).

Small (malé) basket cells tvoří hustou axonální síť, která je však lokalizována typicky jen v jedné vrstvě. Morfologicky se jedná o „aspiny“ neurony, tedy neurony s hladkými dendrity bez dendritických trnů. Nest buňky jsou nejmenší a mají nepravidelný tvar. Tvoří také lokální axonální síť, ta pak vytváří charakteristickou pleteň okolo těla hlavní buňky. Tento typ IN se nachází převážně v L2/3.

Dále se v kůře vyskytují chandelier cells, nacházející se napříč vrstvami L2-L6. Tvoří synapse jen na iniciálních segmentech hlavních buněk, a naopak netvoří synaptická spojení s interneurony. Po aktivaci chandelier cells nedochází zpravidla k inhibici, nýbrž k excitaci hlavní buňky, způsobené otevřením GABA A iontových kanálů, protože v oblasti iniciálního segmentu je vyšší intracelulární koncentrace Cl⁻. Interneurony nazvané Martinotti se nacházejí v L2-L5. Vytvářejí nejhustší dendritickou síť ze všech interneuronů a tvoří často elektrické synapse. Jejich axony zpravidla tvoří synaptická spojení v L1. Cajal-Retzius cells vytvářejí výrazný, horizontálně orientovaný plexus v L1. V této vrstvě pak projikují na velké vzdálenosti. Jejich axony tvoří synapse na apikálních dendritech hlavních buněk. Dalšími morfologicky rozlišenými interneurony jsou double-bouquet, bipolární, neurogliaformní a bi-tufted cells (Druga 2009).

Členění interneuronů z hlediska morfologie je nejednoznačné kvůli jejich vysoké heterogenitě. Morfologické studie byly ostatně získány převážně z řezů, kde je zachována pouze částečná informace. Proto je nyní preferováno základní členění pomocí specifických markerů. Jednotlivé skupiny se liší expresí vápníkových proteinů (kalbindin, kalretinin, parvalbumin), neuropeptidů (vazoaktivní intestinální peptid [VIP], cholecystokinin [Cck], somatostatin, substance P, neuropeptid Y) a receptorových proteinů (5HT_{3A}R – ionotropní serotoninový receptor, nAcChR – nikotinový acetylcholinový receptor, mAChR – muskarinový acetylcholinový receptor). Podle přítomnosti těchto markerů byly interneurony rozděleny do tří skupin a několika podskupin. Hlavními markery jsou parvalbumin, somatostatin a serotoninový ionotropní receptor 5HT_{3A}R (Tremblay, Lee, and Rudy 2016). Do těchto tří skupin lze zařadit naprostou většinu známých interneuronů. Výjimku tvoří například malá skupina chandelier cells, které nevykazují expresi žádného z těchto markerů (pouze velmi slabou expresi parvalbuminu) (Taniguchi, Lu, and Huang 2013). Parvalbumin pozitivní buňky (PV pozitivní) jsou v neokortexu dominantní. Z morfologických skupin se do této skupiny řadí basket nebo chandelier cells. Somatostatin pozitivní buňky (SST pozitivní)

dělíme na Martinotti (jejichž terminály se nacházejí na pyramidálních dendritech L1 vrstvy) a non-Martinotti cells. Všechny SST pozitivní neurony také inervují buňky ve svém blízkém

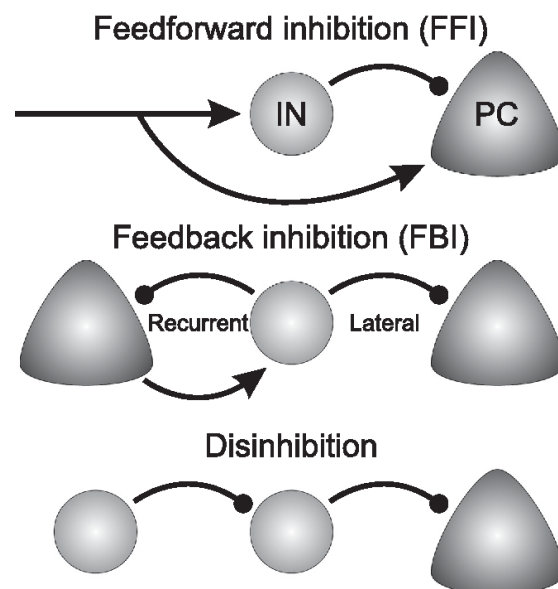


Obrázek 2: Členění interneuronů kůry dle hlavních markerů a morfologických charakteristik. Zde jsou rozčleněny interneurony do tří hlavních skupin: PV, SST a 5HT_{3A} pozitivní neurony. Dále jsou 5HT_{3A} pozitivní interneurony členěny na VIP pozitivní a VIP negativní. Do obou těchto skupin se řadí třída Cck pozitivních buněk. (Tremblay et al. 2016)

okolí. SST pozitivní buňky z L2/3 vrstvy tvoří většinou synapse na hlavních buňkách, naproti tomu synapse SST pozitivních buněk z L4 se vyskytují na PV pozitivních interneuronech (Xu et al. 2013). 5HT_{3A} pozitivní interneurony tvoří asi 30 % IN a jsou vysoce heterogenní (Miyoshi et al. 2010). Všechny tyto IN exprimují nejen 5HT_{3A} receptor, ale též nAcCh receptor (Lee et al. 2010). 5HT_{3A} pozitivní interneurony (konkrétně skupina non-VIP) tvoří také naprosto dominantní složku L1 vrstvy. VIP pozitivní neurony, které patří do 5HT_{3A} pozitivních IN, se vyskytují nejvíce v L2/3 a mají vertikálně bipolárně orientované dendrity, které zasahují hojně do L1. Jejich axon pak projikuje zejména do L4 nebo L5/6 (Tremblay et al. 2016). Zvláštní skupinu 5HT_{3A} pozitivních interneuronů tvoří Cck non-VIP basket cells. Tyto buňky exprimují CB1 kanabinoidní receptor a reagují na subkortikální vstupy z amygdaly a autonomního nervového systému. Aktivace CB1 receptorů na axonálních zakončeních inhibuje uvolňování GABA a vyvolává depolarizací-indukovanou synaptickou inhibici (Freund and Katona 2007).

Tremblay a kol. ve své práci shrnuli některé základní kortikální okruhy. V těchto okruzích hrají klíčovou roli interneurony a jejich inhibiční působení. Inhibici zprostředkovanou GABA receptory můžeme dělit na proximální, která má globálnější efekt, a distální s lokálním účinkem. Distální inhibice probíhá na dendritických trnech a zakončeních, proximální na cestě k somatu. Interneurony působící na distální oblasti hlavních buněk tedy ovlivňují míru reakce na podnět přicházející k hlavní buňce, buňky inhibující proximálně (chandelier, Cck, basket cells ad.) ovlivňují synchronizaci excitačních neuronů, jejich výstup a časování. Základní typy inhibice jsou feedforward (FFI), feedback (FBI) a disinhibice. U feedforward inhibice excituje jeden vstup jak glutamatergní buňku, tak IN. Následně IN

inhibuje hlavní neuron. Na tomto typu inhibice se často podílejí PV pozitivní basket cells. Příkladem může být thalamokortikální feedforward inhibice, kdy vstup z thalamu vytváří synapse v L4 na excitačním neuronu a PV pozitivním interneuronu. Inhibice, následující 1-2 ms po excitaci hlavní buňky, je velmi silná a umožňuje detekci koincidence synchronních talamických vstupů. U feedback inhibice lokální glutamatergní buňky aktivují interneuron, který zpětně inhibuje blízké excitační neurony, které způsobily jeho aktivitu. Zároveň z interneuronu také vybíhají kolaterály k okolním hlavním buňkám, které se neúčastnili jeho aktivace a zajišťují tak laterální inhibici (Kato, Asinof, and Isaacson 2017). FBI se účastní většina druhů interneuronů.



Obrázek 3: Znázornění jednotlivých typů inhibice v mikrookruzích kortexu. U feedforward inhibice excituje vstup jak hlavní buňku (PC), tak interneuron (IN), který následně inhibuje excitovanou PC. U feedback inhibice hlavní buňka excituje blízký interneuron, který zpětně inhibuje PC, ale také okolní neurony. Při disinhibici inhibuje jeden interneuron jiný IN, čímž je umožněna aktivace PC. (Tremblay et al. 2016)

Při disinhibici jeden IN snižuje aktivitu jiného IN a tím umožňuje výraznější excitaci hlavní buňky. Například SST pozitivní IN inhibují ostatní typy IN, ale sebe navzájem pouze výjimečně a tím posilují vlastní vliv na excitační neurony. Disinhibice využívají také VIP pozitivní IN v L2/3, které tvoří perisynaptické spoje s PV pozitivními interneurony a v A1 oblasti sluchové kůry vytváří synapse preferenčně na dendritech SST pozitivních interneuronů L2/3 vrstvy. Disinhibice se pravděpodobně účastní asociativního učení (zvuk – strach). Šok po zvuku vyvolává aktivaci AcCh drah a IN (single bouquet cells) v L1, které inhibují L2/3 PV pozitivní interneurony (Jiang et al. 2016; Tremblay et al. 2016). Přestože je

řada mikrookruhů popsána, neexistuje zatím zcela komplexní představa o jejich fungování ve sluchové kůře a o funkčním zapojení jednotlivých typů interneuronů.

3 Tinnitus

Tinnitus je porucha, při níž postižená osoba vnímá zvuk v nepřítomnosti zevního zdroje zvuku. Jedná se o jednu z nejčastějších sluchových poruch, která může velmi negativně ovlivnit život člověka. Ve Spojených státech amerických zažilo minimálně krátkodobý tinnitus cca 25 % lidí, chronický pak přibližně 8 % (Shargorodsky, Curhan, and Farwell 2010).

Tinnitus lze rozdělit na objektivní a subjektivní. Objektivní tinnitus je vzácný a způsobují jej detekovatelné zvukové podněty v bezprostřední blízkosti ucha. Jedná se zpravidla o turbulentní tok krve (například při stenóze *arteria carotis interna*) nebo kontrakci svalů (například myoklonus u *musculus tensor tympani* nebo *stapedius*) (Carlin, McGraw, and Anderson 1997). U subjektivního tinnitu neexistuje vazba sluchového vjemu na jakýkoli reálný zvuk. Jeho příčinou může být řada onemocnění (neurologická – sclerosis; metabolická – hyperlipidemie, deficit vit. B12; psychiatrická – deprese; lymeská borelióza, záněty ucha, Schwannom na sluchovém nervu), poranění hlavy, perforace bubínku, nadměrné užívání ototoxických léků nebo vystavení nadměrnému hluku. Periferní poškození vede následně ke změnám ve sluchové dráze, které mohou vést k přechodu od akutní fáze ke chronické formě tinnitu.

Tinnitus zasahuje na molekulární úrovni řadu oblastí sluchové dráhy. Na úrovni DCN dochází ke zvýšené neuronální aktivitě, ke změnám v cholinergní a glycinergní transmisi (Brozoski et al. 2002; Jin et al. 2006). V této oblasti sluchové dráhy dochází k integraci somatosenzorických vstupů. Tato integrace je zřejmě příčinou projevů tinnitu při nadměrné aktivaci trigeminálního nervu či neuronů zadních rohů míšních (Shore, Zhou, and Koehler 2007). Na úrovni IC dochází též ke změnám inhibiční transmise – především transmise GABAergní. Mění se hladina glutamát dekarboxylázy a GABA_A receptorů (Bauer et al. 2000; Milbrandt et al. 2000). Jak v DCN, tak v IC byla pozorována zvýšená neuronální aktivita, jejíž příčinou je, zdá se, porušená inhibiční neurotransmise. Na úrovni sluchové kůry probíhají změny v neuronální plasticitě a je zvýšena excitabilita a synchronicita buněk (Eggermont 2008; Eggermont and Roberts 2004). Též dochází k posunu receptivních polí. Za tyto změny nese odpovědnost zřejmě také oslabená inhibiční transmise (Scholl and Wehr 2008). Zdá se

tedy, že v indukci tinnitu hraje dominantní roli DCN a jeho příčinu lze hledat v porušeném inhibičním (zvláště GABAergním) přenosu. Sluchová kůra, v které dochází ke změnám v plasticitě, je pak předpokládanou oblastí, v které je tinnitus udržován.

3.1 Modely tinnitu u zvířat

Pro studium tinnitu na molekulární úrovni pomocí molekulárně biologických a elektrofyziologických metod je zásadní vytvoření validního zvířecího modelu. Dosavadní studie používají k vyvolání tinnitu u zvířat především dva typy metod. Jedná se o akustické trauma (o různé intenzitě zvuku a délce trvání) (Hickox and Liberman 2014; Ropp et al. 2014) a o podání ototoxických látek, například chininu (Mulheran 1999), aminoglykosidů (Jos J. Eggermont and Larry E. Roberts 2004), ale zvláště v praxi používaného salicylátu (Yang et al. 2007).

3.1.1 Vliv salicylátu

Salicylát působí přímo jak na periferní, tak na centrální sluchovou dráhu. Percepce tinnitu nastupuje po podání salicylátu velmi rychle (řádově v několika minutách) a tento efekt je reverzibilní (vymizí do tří dnů po podání dávky) (Stolzberg, Salvi, and Allman 2012). Na úrovni kochley snižuje motilitu vnějších vláskových buněk antagonistickou vazbou na prestin, protein reagující na změnu intracelulární koncentrace aniontů (Kakehata and Santos-Sacchi 1996). Ve sluchové dráze dále dochází pod vlivem salicylátu ke změně spontánní frekvence akčních potenciálů ve sluchovém nervu. Bylo zjištěno, že velmi vysoké dávky (400 mg/kg) tuto frekvenci zvyšují (Kumagai 1992), nižší dávky mají efekt opačný nebo pod jejich vlivem nedochází k signifikantní změně (Müller et al. 2003). V CNS snižuje salicylát především GABAergní signalizaci a ovlivňuje vodivost některých draslíkových a vápníkových kanálů (Bauer et al. 2000; Yan-xing Liu et al. 2005; Yanxing Liu et al. 2005), dochází k tomu například u L-typu Ca^{2+} kanálu v *colliculus inferior* a GIRK K^+ kanálu v *corpus geniculatum mediale* (Yanxing Liu et al. 2005; Wang et al. 2016). Salicylát naopak zvyšuje proud procházející NMDA receptory, což bylo popsáno již na úrovni spirálního ganglia (Guitton et al. 2003; Meng et al. 2012; Peng, Chen, and Lin 2003), po jeho aplikaci byl dále pozorován nárůst serotoninu (Liu et al. 2003).

Působením salicylátu dochází též k ovlivnění metabolismu. Wallhäusser-Franke a kol. ukázali pokles metabolické aktivity v *colliculus inferior* a její nárůst v MGB a sluchové kůře (Wallhäusser-Franke et al. 1996).

Dysbalance na úrovni receptorových proteinů a kanálů vede ke změně spontánní neuronální aktivity v IC, v sekundární sluchové kůře a ve sluchové kůře primární (Eggermont and Kenmochi 1998). Na úrovni sluchové kůry pak dochází ke snížení laterální inhibice a k synchronizované neurální aktivitě (Møller 2003).

3.1.2 Akustické trauma

Definované akustické trauma experimentálních zvířat se využívá jako model pro studium změn vyvolaných u člověka vystavenému intenzivnímu zvuku (Galazyuk and Hébert 2015). Vyvolání tinnitu akustickým traumatem je často pomalejší než vyvolání salicylátem a není zpravidla plně reverzibilní. V případě ireverzibilně vyvolaného tinnitu lze také snáze studovat jeho chronický vývoj a jeho dopad na organismus.

Hlasitý zvuk mající za cíl vyvolat tinnitus poškozuje primárně vnitřní ucho. Dochází k poničení vnitřních vláskových buněk (IHC) – především vysokofrekvenčně laděných – a k poklesu ribbon synapsí (Singer et al. 2013). Singer a kol. ukázali přímou korelaci mezi poklesem ribbon synapsí (v bazální části kochley) a vznikem tinnitu.

Poškození vnitřního ucha má pravděpodobně za následek detekované snížení frekvence spontánních akčních potenciálů na úrovni sluchového nervu (Lieberman and Kiang 1978).

Traumatizovaná zvířata vykazují naopak zvýšenou spontánní aktivitu v jádrech nervové sluchové dráhy. V DCN byla zaznamenána zvýšená neuronální aktivita (Finlayson and Kaltenbach 2009), pravděpodobně způsobená snížením inhibičního přenosu. Změny glycinergní transmise byly detekovány specificky v buňkách fusiformních (Brozoski et al. 2002), u nichž především ve vysokofrekvenční oblasti DCN dochází ke snížení exprese podjednotky $\alpha 1$ GlyR a zvýšení exprese gephyrinu (Wang et al. 2009). Dále byla pozorována zvýšená aktivita v IC (Ma, Hidaka, and May 2006) a kortexu (Llano, Turner, and Caspary 2012). V IC byl zaznamenán pokles množství mRNA pro $\alpha 1$ podjednotku GlyR, GABA_AR a GAD, což naznačuje změny v GABAergní signalizaci (podobně jako po podání salicylátu) (Dong et al. 2010). Ve sluchové kůře nebyla zvýšená spontánní aktivita zaznamenána

okamžitě po akustickém traumatu (15 minut), ale plně se rozvinula až dvě hodiny po zákroku (Møller 2003), což může být projevem neuroplasticity vedoucí k chronickým změnám (Møller 2016). Změny ve spontánní aktivitě a synchronizaci akčních potenciálů vedou také ke změnám v tonotopické mapě, což bylo prokázáno v primární sluchové kůře (Noreña and Eggermont 2003) a v DCN (Kaltenbach, Czaja, and Kaplan 1992).

3.1.3 Metody detekce tinnitu

Vjem subjektivního tinnitu je na úrovni současného poznání přístroji neměřitelný u člověka stejně jako u zvířat. Proto je nutné detekovat tinnitus u zvířat pomocí behaviorálních testů, jako jsou například GPIAS (gap pre-pulse inhibition of the acoustic startle reflex), metoda Sederholma a Swedberga nebo test vyvinutý Jastreboffem a kol.

Základem GPIAS je úleková reakce zvířete (předmětem měření je její motorická složka) na velmi intenzivní zvuk. Velikost úlekové reakce lze ovlivnit zařazením varovného signálu, který předchází vlastnímu intenzivnímu zvukovému podnětu. Pokud je zvíře vystaveno bazálnímu šumu a těsně před tím, než zazní tón, je šum krátce přerušen (gap), výsledná úleková reakce se sníží. Jestliže bude u zvířat s tinnitem použit bazální šum kvalitativně blízký jejich subjektivnímu tinnitu, oslabí se jejich schopnost vnímat gap a nedojde tedy k výraznému snížení úlekové reakce (Turner et al. 2006). Výhodou této metody je, že pro její použití není zapotřebí speciální trénink zvířat, dále ji lze použít opakovaně a také se hodí pro testování větší skupiny zvířat. Důležité pro správné provedení experimentu je nalezení kvalitativně blízkého šumu. Pokud bylo zvíře ohlušeno a vyvinul se u něj tinnitus, pak může mít frekvence tinnitu relativně velký rozptyl, jak ukazují jednotlivé studie (Longenecker and Galazyuk 2011; Turner et al. 2006). Může také docházet k poškození sluchu (především díky poškození vláskových buněk vnitřního ucha), což následně ovlivní GPIAS (tedy vnímání šumu, mezery v šumu, ale i intenzivního úlekového stimulu). V některých případech se může rozvinout i hyperakuze. Pak ohlušená zvířata (potenciálně trpící tinnitem) reagují na úlekový stimul silněji než kontrolní i v nepřítomnosti gapu v šumu (Chen et al. 2013; Lobarinas, Hayes, and Allman 2013).

Většina ostatních metod detekce tinnitu vyžaduje dlouhodobé trénování zvířat. Patří mezi ně test vyvinutý Jastreboffem a kol. V tomto testu se potkani naučí pít vodu, ve chvíli, kdy jsou vystaveni šumu. Pokud je šum přerušen, musí přestat pít, jinak je aplikován

bolestivý impulz. Zvířata trpící tinnitem reagují na přerušení šumu pomaleji (Jastreboff et al. 1988).

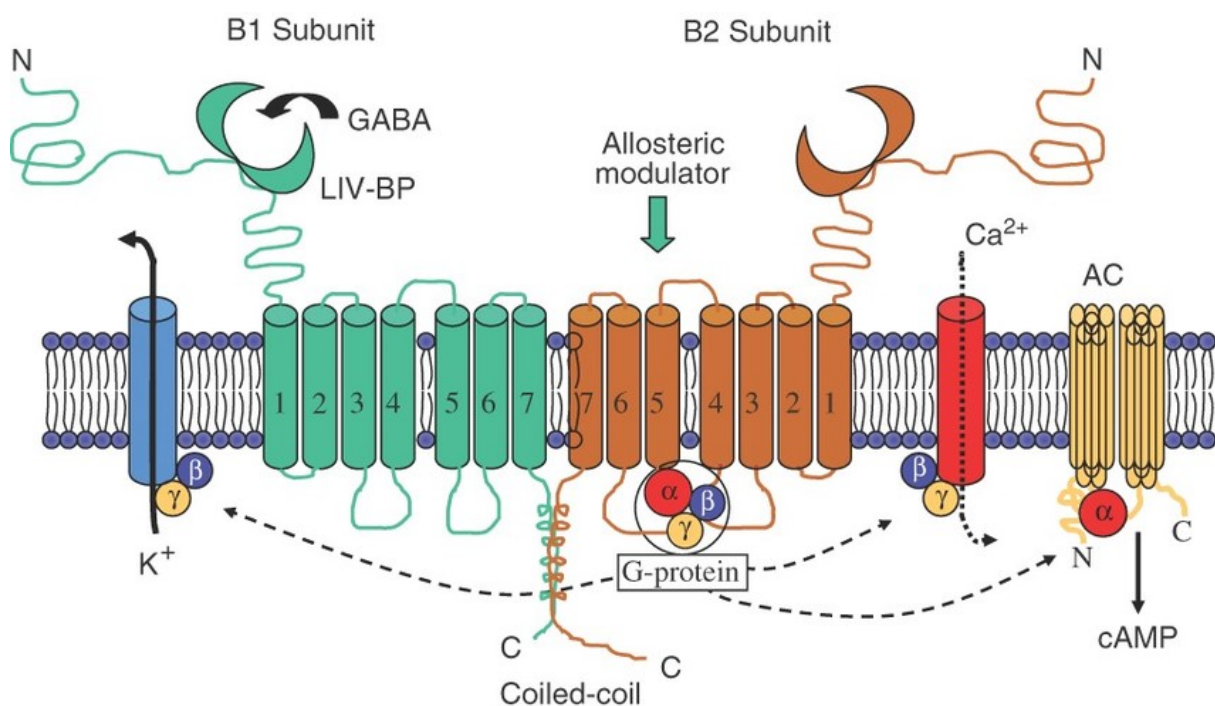
Dále je to například metoda Sederholma a Swedberga. Zde jsou zvířata učena zatáhnout za páku číslo jedna, pokud tón slyší, a za páku číslo dvě, pokud tón neslyší. Za správnou odpověď jsou odměněna. Tento test je odolný vůči zkreslení dat zhoršením sluchu, hyperakuzí nebo ztrátou motivace pokusných zvířat. Oproti předešlému testu je navíc ke zvířatům šetrnější (nevyžaduje trest) (Sederholm and Swedberg 2013).

4 GABA_B receptor

GABA_B receptor je metabotropní transmembránový protein. Hlavním agonistou receptoru je γ -aminomáselná kyselina (GABA), dominantní inhibiční neuropřenašeč v CNS savců. Funkční receptor tvoří heterodimer podjednotek GABA_{B1} a GABA_{B2}. GABA_BR se řadí do skupiny GPCR (G protein-coupled receptor) a je příbuzný s metabotropními glutamátovými receptory. Receptor se nachází na postsynaptické buňce i presynaptickém terminálu, je lokalizován zvláště extrasynapticky, ale byl detekován také přímo v synaptické štěrbině (Charara et al. 2005; Kulik et al. 2002).

4.1 Struktura a funkce GABA_BR

Každá z podjednotek obsahuje sedm transmembránových domén, které jsou spojené třemi intracelulárními a třemi extracelulárními kličkami, rozsáhlý extracelulární N konec a intracelulární C konec. C konce podjednotek tvoří coiled-coil domény, které jsou důležité pro heterodimerizaci receptoru a tvoří vazebnou doménu pro řadu intracelulárních proteinů (Bettler and Tiao 2006). Pro funkci receptoru je dimerizace naprosto zásadní. Samotná GABA_{B1} podjednotka zůstává zadržena v endoplazmatickém retikulu, protože obsahuje na svém C konci RXR(R) retenční signál, který podjednotce brání v transportu na plasmatickou membránu (Margeta-Mitrovic, Jan, and Jan 2000). Při heteromerizaci je tento signál překryt C-koncem GABA_{B2}, což vede k expresi receptoru na buněčné membráně. Po zabudování do membrány se na podjednotku GABA_{B1} může vázat ligand. Vazebné místo pro ligand se nachází v N-koncové doméně zvané LIV-BP (leucine-isoleucine-valine binding protein), nebo *venus fly trap domain*, která se skládá ze dvou laloků (Galvez et al. 1999). N konec GABA_{B2} podjednotky neobsahuje vazebné místo pro endogenní ligand, přesto je důležitý pro správný přenos signálu mezi podjednotkami (Margeta-Mitrovic, Jan, and Jan 2001). Hlavní funkcí



Obrázek 4: Struktura GABA_B receptoru. Dvě podjednotky GABA_BR tvoří heterodimer skrze svůj C konec tvořící coiled-coil doménu. B2 podjednotka interaguje s G proteinem a na B1 podjednotku se váže agonista GABA. Skrze G protein dochází k ovlivnění K⁺ kanálu, Ca²⁺ kanálu a adenylyl cyklázy. Převzato z: G. Adelman, B. H. Smith (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience* (3rd ed., CD-Rom). Amsterdam: Elsevier.

GABA_{B2} podjednotky je přenos signálu dovnitř buňky a aktivace trimerního G proteinu. Pro vazbu a aktivaci jsou zásadní intracelulární smyčky GABA_{B2} (Havlickova et al. 2002; Margeta-Mitrovic et al. 2001). Jedná se zvláště o kladně nabitě oblasti aminokyselin smyček dvě a tři, které interagují s negativně nabitým povrchem G proteinu (Robbins et al. 2001).

Na GABA_BR se váže celá řada endogenních, ale i exogenních látek. Hlavním endogenním agonistou je GABA, která se váže do ortosterického místa na GABA_{B1} podjednotce. Již klasickým exogenním agonistou receptoru je baklofen, který byl syntetizován v roce 1962. Vyskytuje se ve dvou enantiomerech, které se liší svojí afinitou ke GABA_B receptoru (Froestl et al. 1995). Dalšími agonisty GABA_BR jsou například gabapentin, který je selektivní pro GABA_{B1a/2} heterodimer (Bertrand, Morin, and Lacaille 2003), relativně novější látky jako CGP27492, AZD3355 nebo CGP44532 (Claire L Padgett and Slesinger 2010)

4.1.1 Podjednotky GABA_BR – lokalizace a význam

Byly nalezeny tři sestřihové varianty podjednotky GABA_{B2}, avšak prozatím u nich nebyl nalezen výrazný fyziologický význam (Billinton et al. 2001). Také bylo popsáno několik sestřihových variant GABA_{B1} (1a-1e), z nichž varianty 1a a 1b jsou konzervovány napříč živočišnými druhy, exprimovány v centrální nervové soustavě a mají fyziologický význam (Kaupmann et al. 1997, 1998). Tyto sestřihové varianty se liší oblastí N konce, kde se u podjednotky 1a nachází tzv. *sushi doména* (doména typická pro adhezni proteiny). Tato doména má řadu funkcí, zde zvyšuje stabilitu exprese GABA_{B1a/2} heterodimeru v plazmatické membráně (Hannan, Wilkins, and Smart 2012), zajišťuje axonální transport podjednotky 1a (Biermann et al. 2010) a umožňuje interakci s proteinem extracelulární matrix fibulinem (Tiao et al. 2008).

Jednotlivé podjednotky GABA_BR se navzájem odlišují lokalizací v rámci CNS. Na úrovni mozečku se nachází varianta 1a v granulóvní vrstvě buněk, naproti tomu 1b v purkyňových buňkách (Bischoff et al. 1999). Také byly pozorovány rozdíly na úrovni jednotlivých synapsí. Ovšem tyto výsledky jsou mírně rozporuplné. Dietmar Benke a kol. tvrdí, že varianta 1b je lokalizována presynapticky nebo extrasynapticky, 1a pak postsynapticky (Benke et al. 1999). Naproti tomu Andrew Billinton a kol. pozorovali lokalizaci sestřihových variant v mozečku potkana právě opačnou (Billinton, Upton, and Bowery 1999). V poslední době již zřejmě definitivně převládá názor Billintona a kol. (Biermann et al. 2010; Craig et al. 2013).

Nedochází však jen k prostorovým odlišnostem mezi 1a a 1b variantami. Ve fetální CNS naprosto dominuje varianta 1a, jejíž hladina následně klesá a u dospělého jedince je již početnější 1b (Fritschy et al. 1999).

4.1.2 Trimerní G protein a efektor GABA_B receptoru

GABA_BR je spřažen s trimerním G proteinem – predominantně s třídou Gi/o (s typy Gi a Go). Po aktivaci GABA_BR dochází v trimerním proteinu k výměně GDP za GTP a disociaci na podjednotku α a $\beta\gamma$ komplex. Tyto podjednotky působí na celou řadu cílů. U GABA_B receptoru se jedná především o inhibici otevírání Ca²⁺ kanálů (typ P/Q a N), aktivaci K⁺ kanálu typu GIRK (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel) nebo ovlivnění několika typů adenylyl cykláz (Knight and Bowery 1996; Olianas and Onali 1999). Vápníkové kanály (jak P/Q, tak N) jsou důležité pro kvantové uvolňování neuropřenašeče z presynaptických nervových zakončení. K inhibici dochází zvláště na presynaptické membráně neuronu a zajišťuje ji vazba $\beta\gamma$ komplexu na kanál (Chen and van den Pol 1998; Dolphin 2003). Inhibice vápníkových kanálů byla nalezena také na postsynaptické membráně, kde vede aktivace GABA_BR k snížené excitabilitě buňky (Harayama et al. 1998). Ovšem hlavním efektozem na postsynaptické membráně je GIRK kanál. GABA_B receptor zvyšuje jeho aktivitu aktivací $\beta\gamma$ podjednotek trimerního G proteinu, které se váží na draslíkový kanál a stabilizují jeho otevřenou konformaci (Reuveny et al. 1994). Tedy jak inhibice vápníkových kanálů, tak aktivace draslíkových vede zpravidla k inhibičnímu působení na vedení a přenos nervového vzruchu. Způsob ovlivnění funkce adenylyl cyklázy aktivací GABA_BR závisí na typu adenylyl cyklázy (AC). Bylo zjištěno, že α podjednotka inhibuje AC typu I, III, V a VII. Naproti tomu $\beta\gamma$ komplex aktivuje adenylyl cyklázy typu II, IV a VII (Bettler et al. 2004) Avšak tato aktivace je závislá na přítomnosti G α s podjednotky v buňce. Skrze působení na AC dochází jak k následným fosforylacím (via PKA – protein kináza A), tak k ovlivnění genové exprese (via CREB) (Claire L. Padgett and Slesinger 2010).

Na intracelulární straně interaguje GABA_B receptor s celou řadou dalších proteinů a proteinových komplexů. Pomocí C konce GABA_{B1} podjednotky se receptor váže na proteiny z rodiny 14-3-3 (konkrétně 14-3-3eta a 14-3-3zeta). Pro tuto vazbu je důležitá dimerizace receptoru a vznik coiled-coil domény. 14-3-3 slouží jako scaffolding proteiny a ovlivňují vazbu G proteinu ke GABA_BR (Couve et al. 2001). K C konci (podjednotky GABA_{B2}) se váže NSF faktor, jehož hlavní funkcí je napomoci transportu receptoru do plasmatické membrány

(Pontier et al. 2006). Dalšími proteiny interagujícími s GABA_B receptorem jsou tamalin, MUPP1 nebo β -filamin, který zajišťuje vazbu receptoru k cytoskeletu (Bettler et al. 2004).

GABA_B receptory spolu s trimerními G proteiny, scaffolding proteiny a downstream regulačními proteiny tvoří na membráně složité komplexy (Maurel et al. 2008). V těchto interakcích a regulacích jsou klíčové KCTD proteiny, které budou trochu podrobněji charakterizovány v následující podkapitole.

4.1.3 KCTD proteiny

KCTD proteiny (potassium channel tetramerisation domain-containing proteins) tvoří tetramerní a pentamerní komplexy, ale dokonce byly nalezeny i ve formě monomerů, nebo dimerů. Jejich různorodá oligomerizace zvyšuje univerzálnost při vazbě na okolní proteiny a struktury (Pinkas et al. 2017). KCTD mají relativně konzervovaný N konec tvořící BTB doménu – jednu z domén zásadních pro protein-proteinové interakce, díky kterým mohou KCTD proteiny ovlivňovat řadu buněčných procesů (transkripci, dynamiku cytoskeletu nebo ubikvitinaci (Bayón et al. 2008; Liu, Xiang, and Sun 2013; Zarelli and Dawid 2013)). KCTD proteiny typu 8, 12, 12b a 16 specificky interagují s GABA_B receptorem a zásadním způsobem ovlivňují jeho funkci, proto byly klasifikovány jako přídavné podjednotky receptoru (Schwenk et al. 2010). Regulace odpovědi jednotlivými typy KCTD proteinů pomohlo vysvětlit do té doby nepochopitelné farmakologické vlastnosti GABA_B receptoru v různých buněčných populacích (Gassmann and Bettler 2012).

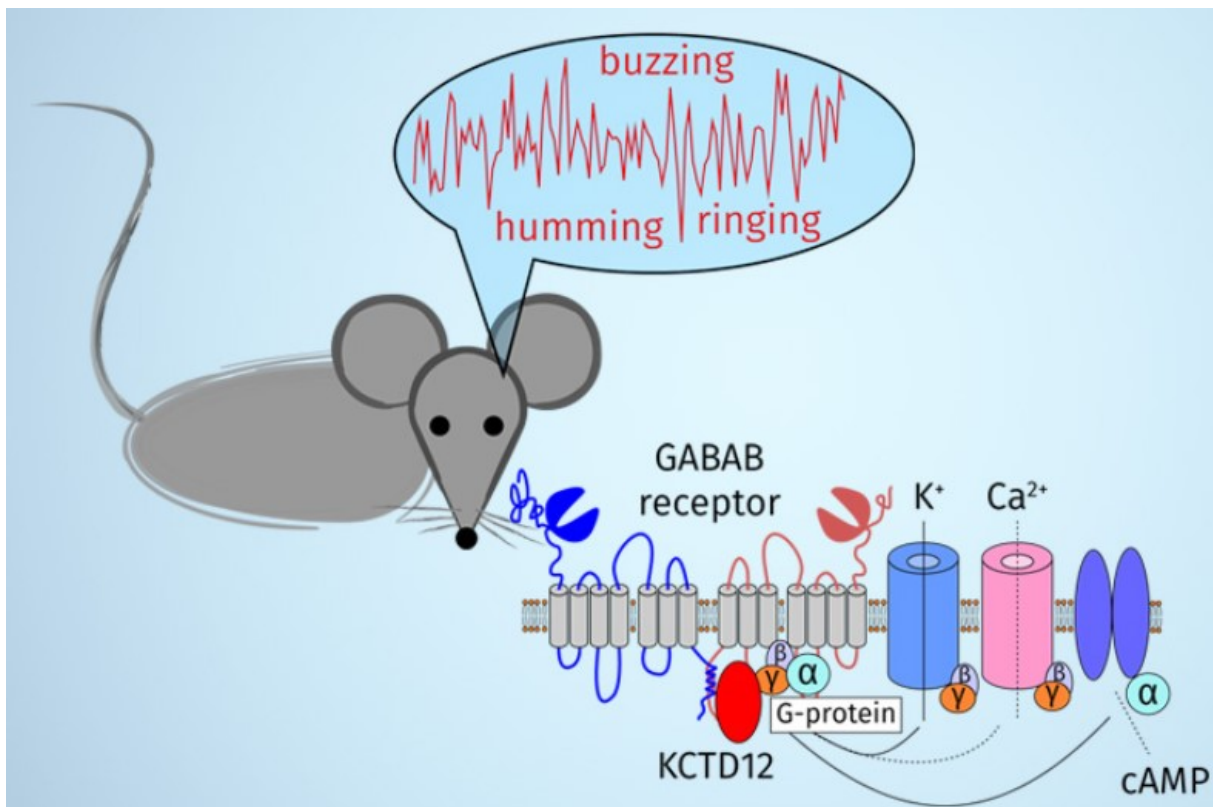
KCTD8, 12, 12b a 16 se vzájemně odlišují svou expresí v jednotlivých oblastech CNS. V oblasti neokortexu je dominantní přídavnou podjednotkou KCTD16. Tento protein se nachází prakticky ve všech vrstvách kůry. Naproti tomu KCTD8 ani KCTD12b nebyly v kůře detekovány. KCTD12 vykazuje expresi specifickou pro zatím nepopsanou skupinu buněk (morfologicky se zřejmě jedná o basket cells). KCTD8 má zvýšenou expresi pouze v čichovém laloku, mediální habenule a některých oblastech hipokampu. KCTD16 se kromě kůry vyskytuje v mnoha oblastech mozku – vysoká exprese byla zaznamenána zvláště v hipokampu a ve většině jader thalamu. KCTD12 se nachází především v hipokampu a také v hypothalamu (kde je jeho exprese částečně komplementární k expresi KCTD16) (Metz et al. 2011).

KCTD se váží na C konec GABA_{B2} podjednotky prostřednictvím BTB domény a urychlují nástup odpovědi po aktivaci receptoru (Schwenk et al. 2010). Jednotlivé typy KCTD proteinů (8, 12, 12b, 16) se liší svým působením na desenzitizaci proudů vyvolaných GABA_B receptorem. KCTD12 urychluje desenzitizaci receptorem vyvolané odpovědi, takže dochází k rychlému poklesu vodivosti GIRK kanálů nebo dysinhibici napěťově ovládaných vápníkových kanálů typu N a P/Q (Schwenk et al. 2010). Tato desenzitizace je velmi rychlá, nemůže být tedy způsobena internalizací receptoru, jak bylo ukázáno pro jiné GPCRs. KCTD12 se váže na G protein a stabilizuje jej v blízkosti GABA_B receptoru. Při aktivaci receptoru se pak váže na volné $\beta\gamma$ podjednotky G proteinu a napomáhá odvázní těchto podjednotek od GIRK kanálu a tak urychluje desenzitizaci (Turecek et al. 2014). KCTD12 zvyšuje expresi GABA_BR na plasmatické membráně a tím i velikost odpovědi (Ivankova et al. 2013a). KCTD12 neovlivňuje hlavní vazebné místo receptoru, ale má vliv na posílení efektu CGP7930 vážícího se do alosterického místa GABA_BR (Li et al. 2017). Naproti tomu KCTD16 a KCTD8 zvyšují afinitu γ -aminomáselné kyseliny k hlavnímu vazebnému místu na GABA_BR. Dále KCTD8 ovlivňuje trimerní G protein, neboť zkracuje dobu jeho aktivního stavu (Rajalu et al. 2015).

Již dříve byla popsána relativně vysoká diverzita odpovědí GABA_B receptoru, která by byla jen těžko odůvodnitelná pouhými dvěma variantami podjednotky jedna a jednou variantou podjednotky dvě. Nyní se zdá, že za část těchto odlišností nesou odpovědnost přídavné podjednotky KCTD.

5 Funkční komplex GABA_B receptoru a tinnitus

Jak bylo již popsáno ve druhé kapitole, u zvířat vykazujících tinnitus dochází k nárůstu spontánní aktivity ve sluchové dráze (sluchová kůra, DCN, IC) a k neuronální synchronizaci, které mohou mít původ ve zvýšeném glutamatergním, nebo sníženém inhibičním přenosu. GABA je hlavním inhibičním neuropřenašečem v CNS a její receptor, GABA_BR, je zásadní pro vývoj a regulaci neuronálních okruhů a je vysoce exprimován ve sluchové dráze (Fubara et al. 1996; Gaiarsa and Porcher 2013; Huang and Thathiah 2015).



Obrázek 5: Vliv dysregulace GABA_BR na projevy tinnitu. Na obrázku je znázorněn GABA_BR s pomocnou podjednotkou KCTD12. Efektory GABA_B odpovědi jsou draslíkové, vápníkové kanály a adenylyl cykláza. Receptor skrze tyto efektory ovlivňuje excitabilitu buňky. Dysregulace této odpovědi může vést k projevům tinnitu (například bzučení či zvonění). Převzato od kolegyně Mgr. Bohdany Hruškové, Ph.D.

Vztah mezi GABA_B receptorem a tinnitem byl poprvé zkoumán roku 1996, kdy Szczeplaniak a Møller pozorovali vliv baklofenu na *colliculus inferior*, u nějž byla zvukem indukována zvýšená excitabilita (Szczeplaniak and Møller 1996). Dále bylo ukázáno, že aplikace R-baklofenu snižuje tinnitus u potkanů (Zheng et al. 2012). Vliv baklofenu byl zkoumán u pacientů se subjektivním tinnitem. V klinické studii z roku 1996 ale nebyl nalezen pozitivní efekt (Westerberg, Roberson, and Stach 1996). Důvodem může být použití

racemátu baklofenu (směs účinnějšího R a méně účinného S baklofenu). Bylo zjištěno, že S enantiomer je nejen méně účinný, ale ve směsi přímo snižuje účinnost R enantiomeru (Smith, Zheng, and Darlington 2012; Terrence et al. 1983). Nevýhodou zmíněné studie je také zahrnutí pacientů se značně nevyrovnanou mírou závažnosti tinnitu.

Indukce tinnitu salicylátem vede ke zvýšené aktivitě v *inferior colliculus*. Pokud byl aplikován salicylát spolu s antagonistou GABA_BR, CGP35348, ukázalo se, že salicylát a antagonist GABA_BR spolu působí synergicky (efekt byl výraznější než samotná suma účinků jednotlivých látek) (Patel and Zhang 2014). Po podání salicylátu došlo ke snížení exprese obou podjednotek GABA_BR v IC, a to jak na těle neuronu, tak na výběžcích (Butt et al. 2016), což může být příčinou vyšší neuronové aktivity.

Ve shodě s touto hypotézou Sand a kol. zjistili, že se alela rs34544607 KCTD12 proteinu nachází ve větší míře u pacientů s tinnitem (Sand et al. 2012). Z hlediska této diplomové práce je pak zajímavý vztah tinnitu a komplexu GABA_BR-KCTD12. KCTD12 je důležitý pro povrchovou expresi GABA_BR a jeho downregulace může vést k snadnější indukci či k udržování tinnitu.

Experimentální část

6 Metody a materiál

6.1 Materiál

6.1.1 Zvířata

Byly použity dospělé myši kmene C57 a geneticky modifikované myši kmene C57 postrádající protein KCTD12 (stejného stáří jako divoké C57 a také bez rozlišení pohlaví). Část těchto myší byla následně ohlušená a u některých se vyvinul tinnitus. Myši použité pro kvantitativní zhodnocení změny lokalizace GABA_B receptoru v DCN shrnuje následující tabulka.

Tabulka 1:

Myš	Datum narození	Ohlušení	Tinnitus (10kHz)
C57 WT	18.5.2017	20.7.2017	ANO
C57 WT	7.9.2017	9.11.2017	NE
C57 WT	7.9.2017	14.11.2017	NE
C57WT	7.9.2017	10.11.2017	ANO
KCTD12 KO	23.8.2017	24.10.2017	ANO
KCTD12 KO	23.8.2017	30.10.2017	ANO
KCTD12 KO	21.3.2017	18.7.2017	ANO
KCTD12 KO	1.8.2017	24.10.2017	ANO

Dále byly použity myši exprimující červený fluorescenční protein tdTomato ve specifické skupině interneuronů. Jedná se o myši exprimující Cre rekombinázu pod promotorem pro somatostatin – C57 Sst-IRES-Cre (JAX # 018973), parvalbumin – C57 Pv-IRES-Cre (JAX # 012358) nebo vasoaktivní intestinální peptid – C57 Vip-IRES-Cre (JAX # 010908), které byly zkříženy s reportérovou linií tdTomato reporter line (JAX # 007909). U těchto myší také nebylo rozlišováno pohlaví a jedinci dosahovali věku 1-4 měsíců.

6.1.2 Pomůcky a přístroje

kryostat Leica CM3050 S

konfokální mikroskop Olympus BX 61

vibrační mikrotom Leica VT1000 S

konfokální mikroskop Zeiss LSM 5 DUO

deionizátor vody Millipore MILLI-Q synthesis A-10

přenosný pH metr HI 9024

centrifuga Eppendorf MiniSpin plus

analytické váhy Mettler toledo

třepačka Stovall Belly Dancer

pipetmany od firmy Eppendorf

binolupa Leica S6E

6.1.3 Roztoky a pufr

- Fosfátový pufr
 - 0,2 M PB: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (43,42 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5,24 g) ředěno v 1 l H_2O → dále ředěno na 0,1 M PB.
- Fosfátový pufr s chloridem sodným a chloridem draselným
 - 10 mM PBS: ředěno z 0,1 M PB s přidavkem 8,76 g NaCl a 0,2 g KCl na 1 l pufru.
- Fyziologický roztok
 - 0,9 g NaCl ředěno v 1 l H_2O .
- Fixační roztok
 - 4% paraformaldehyd (PF) w/v 0,1 M PB, konečné pH 7,4.
 - *Příprava:* paraformaldehyd byl rozpuštěn v 0,1 M PB za konstantního míchání při teplotě, která nepřesáhla 60 °C. Po rozpuštění bylo pH upraveno koncentrovanou HCl (NaOH) na pH 7,4. Roztok 4% PF byl přefiltrován, ochlazen na 4 °C a připraven k okamžitému použití nebo ke krátkodobému uskladnění při -20 °C.
- CHTA
 - Chemiblocker, Triton X-100 a NaN_3 : ředící směs primárních a sekundárních protilátek sloužící k zabránění nespecifické vazbě protilátek (5% chemiblocker), k permeabilizaci membrán (0,3% Triton X-100). Azid sodný (0,1% NaN_3) působí proti růstu bakterií a plísní. Látky ředěny v 0,1 M PB.

- Roztoky sacharózy
 - Použity 10%, 20% a 30% roztoky sacharózy (w/v) v 0,1 M PB.

6.1.4 Primární protilátky

Primární protilátky byly ředěny s použitím ředící směsi CHTA. Specificita značení byla ověřena vynecháním primárních protilátek, nebo použitím řezů připravených z KO zvířete (GABA_{B2} KO, KCTD12 KO).

Použité protilátky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 2: Použité primární protilátky

Antigen	Klonalita	Ředění	Zdroj
vGAT	monoklonální myší	1:500	Synaptic Systems
Cholecystokinin 8	monoklonální myší	1:500	Abcam
vGluT 1 (aa 456-560)	polyklonální morčecí	1:500	Synaptic Systems
β3 tubulin	monoklonální myší	1:500	GeneTex
Kalbindin D-28K	monoklonální myší	1:500	Swant
Kalretinin	polyklonální kozí	1:2000	Chemicon
Parvalbumin	monoklonální myší	1:500	Swant
KCTD12	polyklonální králíčí	1:200	prof. Bernhard Bettler
KCTD16	polyklonální králíčí	1:200	prof. Bernhard Bettler
GAD67		1:500	
MAP2	monoklonální myší	1:500	Sigma-Aldrich
GABA _{B2} R	monoklonální králíčí	1:500	Abcam

6.1.5 Sekundární protilátky

Použité sekundární protilátky jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 3: Použité sekundární protilátky

Typ	Klonalita	Ředění	Zdroj
Alexa Fluor 488	oslí proti koze	1:500	Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 488	oslí proti králíkovi	1:1000	Molecular Probes/Invitrogen
Alexa Fluor 647	kozí proti morčeti	1:500	Molecular Probes/Invitrogen
CY3	oslí proti myši	1:500	Jackson Immuno Research
CY5	oslí proti koze	1:500	Jackson Immuno Research

6.2 Metody

6.2.1 Ohlušení zvířat a detekce tinnitu

Všechna ohlušovaná zvířata (myši C57 a KCTD12 KO) byla nejprve uvedena do anestezie podáním ketaminu a xylazinu (100 mg/kg a 16 mg/kg váhy zvířete, i. p.; Inj. Calypsol, Richter Gedeon, Hungary; Inj. Xylapan, Vétoquiol, UK). Následně byla vložena do ohlušovacího boxu a byla orientována rostrálně směrem k reproduktoru. Proti pohybu byla zajištěna uchycením do kovové sítky. Zvířata byla ohlušována po jednu hodinu při 10 kHz (12 kHz) a 116 dB.

Tinnitus byl u pokusných myši detekován pomocí metody GPIAS (gap pre-pulse inhibition of the acoustic startle reflex), jejíž teoretický podklad je popsán v příslušné kapitole teoretické části. Úleková reakce byla měřena v audiometrické komoře (Coulbourn Habitest, model E10-21) umístěné ve zvukotěsné místnosti. Uvnitř této komory se nacházela malá drátěná klec s podložkou citlivou na pohyb. Úleková reakce pak byla měřena piezoelektrickým akcelerometrem. K zesílení signálu a jeho zpracování byl použit TDT systém III s Real-Time Processor RP 2 (Tucker Davis Technologies, Alachua, FL) a program vytvořený v interaktivním programovém prostředí Matlab. Odpověď na úlekový stimul byla měřena v prvních 100 ms od zaznění stimulu a byla zaznamenána amplituda reakce. Úlekové stimuly byly generovány TDT systémem (Real-Time Processor RP 2) a aplikovány skrze reproduktor (SEAS, 29AF/W) umístěný uvnitř komory. TDT systém generoval stimuly o různých frekvencích (4, 8, 16 a 32 kHz), různém průběhu a intenzitě. Úlekové stimuly byly aplikovány nahodile v rozmezí 10-30 sekund během jednoho měření, jednotlivá měření po sobě následovala v intervalu 30 sekund a obsahovala buď pouze úlekový stimul (v šumu, ale bez gapu) nebo úlekový stimul v kombinaci s gapem či nebylo zvíře vystaveno žádnému stimulu (pro nastavení jeho bazální aktivity). Všechna tato měření byla opakována vždy pětkrát.

6.2.2 Příprava řezů u myši

Všechny použité myši (C57, KCTD12 KO, SST-Cre, VIP-Cre, PV-Cre, m = 20-30 g) byly uvedeny do celkové anestezie podáním ketaminu a xylazinu (100 mg/kg a 16 mg/kg váhy zvířete, i. p.; Inj. Calypsol, Richter Gedeon, Hungary; Inj. Xylapan, Vétoquiol, UK). Tkáně pokusných zvířat byly nejprve promyty fyziologickým roztokem s heparinem (5 000 m.j. na 150 ml fyziologického roztoku) pomocí transkardiální perfúze. Poté byly tkáně promyty

vychlazeným fixačním roztokem o složení: 4% PF v 0,1M PB. Následně bylo zvíře dekapitováno a byl mu vyjmut celý mozek. Poté byla vyříznuta oblast zájmu (DCN, sluchová kůra) a tato oblast byla na vibračním mikrotomu Leica VT1000 S nakrájena na 300 μm silné koronální řezy. Řezy byly vloženy na 30 minut do jamek s fixačním roztokem (4% PF v 0,1M PB), poté promyty 3x 10 minut v 0,1M PB, a nakonec prosyceny vzestupnou řadou roztoků sacharózy (10%/1 hod., 20%/3 hod. při pokojové teplotě a 30% w/v přes noc při 4 °C).

Po vyjmutí řezů z lednice byla tkáň prosycena v kryoprotektivu (Jung Tissue Freezing Medium, Leica, Německo) a nakrájena na finální řezy o tloušťce 20-35 μm (Leica CM3050 S). Takto připravené řezy byly montovány na podložní skla s povrchovou úpravou (Menzel-Gläser SuperFrost®Plus, Gerhard Menzel GmbH, Německo) a skladovány při -20 °C.

6.2.3 Imunohistochemie

Podložní skla s řezy byla vyjmuta z -20 °C a 3x 10 minut promývána 10mM PBS. Poté byla inkubována 1 hodinu v ředící směsi CHTA (bez protilátek; pro zvýšení permeabilizace membrán a snížení nespecifické vazby protilátek). Následně byla inkubována 16-24 hodin při 4 °C v ředící směsi CHTA současně s primárními protilátkami. Směs byla odmyta v 10mM PBS (3x 10 minut). Dále byly řezy inkubovány v sekundárních protilátkách (ředící směs CHTA), promyty PBS (3x 10 minut) a značeny DAPI (ředění 1:1000 v deionizované H₂O). Nakonec byla podložní skla s řezy zamontována do média Aqua-Poly/Mount (Polysciences, USA) a přikryta krycím sklem.

Finální snímky byly pořízeny prostřednictvím konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. U tohoto mikroskopu byla pro snímání použita laserová dioda 405 nm, argonový iontový laser (458, 488, 477, 514 nm), helium-neonový laser (633 nm) a DPSS (Diode-pumped solid-state) laser 560 nm. Jednotlivé snímky byly zachyceny ve čtyřech kanálech (avšak vždy maximálně tři současně). Modrý kanál detekoval emisní spektrum v rozsahu 420-480 nm, zelený kanál v rozsahu 505-550 nm, červený kanál pak 575-615 nm a fialový kanál detekoval vlnové délky od 650 nm. Pro prvotní zpracování a uložení snímků byl použit program LSM Image Browser. Řezy byly snímány za pomoci objektivů Pln Apo 100x/1.4 Oil DIC III, EC PlnN 10x/0.3 DIC I, Pln Apo 20x/0.8 DIC II a Pln Apo 63x/1.4 Oil DIC III. Rozlišení snímků bylo optimalizováno k použitým objektivům (v rozsahu od 512x512 pixelů po 2048x2048 pixelů).

6.2.4 Analýza neuronálních těl DCN

Jednotlivé snímky byly vyhodnocovány pomocí programu ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Nejprve byl určen typ buňky dle morfologických parametrů a lokalizace v rámci DCN. Fusiformní buňky byly identifikovány jako neurony výrazného bipolárního tvaru, hvězdčovitě buňky byly identifikovány skrze jejich lokalizaci v molekulární vrstvě. Jako cartwheel buňky pak byly brány větší buňky fusiformní vrstvy nevykazující bipolární tvar.

Následně byla těla jednotlivých buněk obkreslena v programu ImageJ (freehand selection). K tomu byl vždy vybrán snímek zachycující průřez středem buňky. U takto obkresleného těla byl následně analyzován profil rozmístění značeného GABA_B receptoru. Pro tuto analýzu byl použit plugin napsaný RNDr. Jiřím Janáčkem, PhD (FGÚ AV ČR) Image Correlator ROI.

Z této analýzy byla získána sada dat, ze kterých byly vypočítány průměrné hodnoty fluorescence v určité vzdálenosti od okraje buňky. Z těchto dat byl v programu Clampfit (verze 10.7) vytvořen graf závislosti intenzity fluorescence na vzdálenosti normalizované k velikosti buněk a odečteno pozadí. Jako pozadí byla brána hodnota fluorescence v oblasti jádra, kde by se GABA_B receptor neměl vyskytovat. Takto upraveným grafem byla proložena křivka Lorentzovy distribuce, z níž byla získána polovina šířky pásma fluorescence odpovídající polovině maxima křivky (Lorentzova šířka). Dále byly z této analýzy získány hodnoty vzdálenosti vrcholu intenzitní křivky fluorescence od membrány, a vzdálenost za kterou poklesne intenzita fluorescence z 80 na 20 % maxima (měřeno od vrcholu směrem do středu buňky).

Výsledné grafy byly vytvořeny a statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism (verze 6.07). Statistická analýza byla provedena pomocí one-way ANOVA testu (v případě vícečetného srovnávání – jednotlivých typů buněk) následovaného Dunnetts multiple comparison testem. Následně byly grafy upraveny v programu CorelDRAW Graphics Suite 2018. Definitivní úprava obrázků (měřítkový bar, označení obrázků, jednotná úprava kontrastu) proběhla v programu Adobe Photoshop CS5.

7 Cíle práce

GABA_BR je široce rozšířen v celé CNS a je zásadní pro stabilitu a vývoj neuronálních okruhů. Jeho distribuce ve sluchové kůře a DCN však není u myši plně objasněna. U experimentálních zvířat dochází po akustickém traumatu ke zvýšené spontánní aktivitě neuronů DCN. Zvýšení excitability může být následkem snížení inhibičního přenosu v dané oblasti. Není však známo, zda dochází po traumatu DCN ke změnám v distribuci GABA_B receptoru.

První cíl práce:

- Popsat distribuci GABA_B receptoru v dorzálním kochleárním jádře myši

Tento cíl zahrnuje:

- Popsat distribuci GABA_B receptoru pomocí detekce GABA_{B2} podjednotky tohoto receptoru
- Popsat distribuci pomocné podjednotky KCTD12

Druhý cíl práce:

- Popsat distribuci GABA_B receptoru ve sluchové kůře myši

Tento cíl zahrnuje:

- Popsat distribuci GABA_B receptoru skrze lokalizaci GABA_{B2} podjednotky tohoto receptoru
- Popsat distribuci pomocné podjednotky KCTD12

Přídavná podjednotka GABA_B receptoru, KCTD12 protein, je ve vysoké míře exprimován v DCN – v oblasti, která je zřejmě zásadní pro indukci tinnitu (Brozoski et al. 2012). Výskyt jedné jeho varianty (rs34544607) koreluje s diagnostikovaným tinnitem u člověka (Sand et al. 2013) a naznačuje, že KCTD12 může být rizikovým faktorem. KCTD12 zásadně ovlivňuje kinetiku odpovědi GABA_B receptoru i velikost odpovědi stabilizací receptoru na buněčné membráně (Ivankova et al. 2013). Výsledky z naší laboratoře naznačují, že zvířata, která nemají KCTD12 protein (KCTD12 KO) vykazují příznaky tinnitu (nepublikovaná data). Z toho důvodu byl použit KCTD12 KO jako model dysregulace GABA_BR.

Třetí cíl práce:

- Popsat změny v distribuci GABA_BR u myši vystavených akustickému traumatu a u myši postrádajících pomocnou podjednotku KCTD12

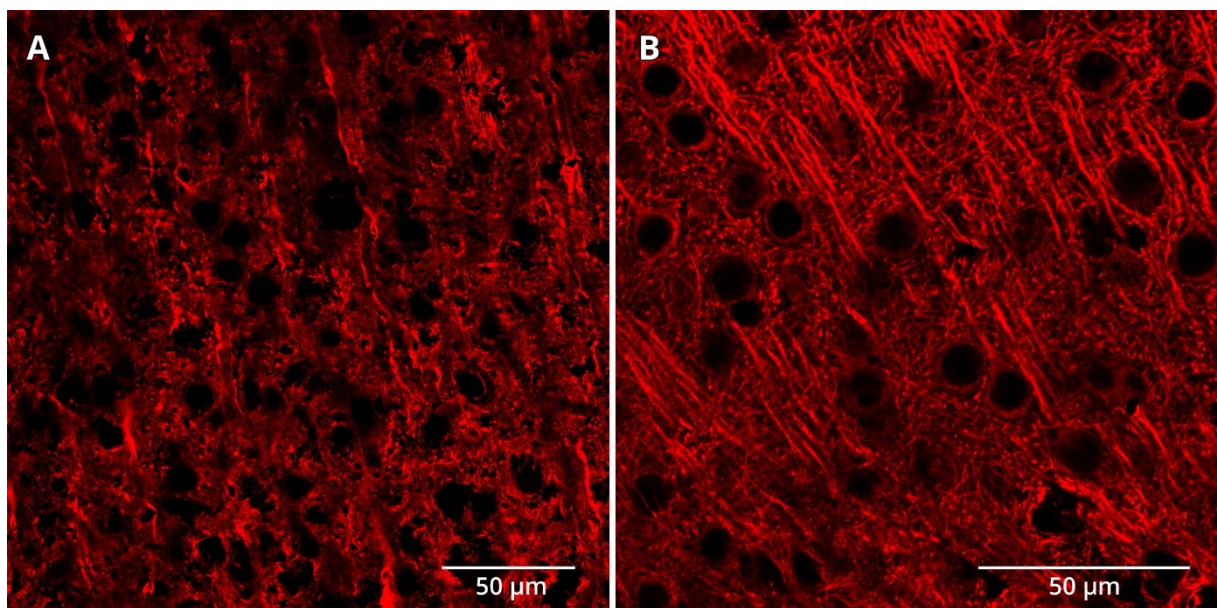
Tento cíl zahrnuje:

- Identifikovat jednotlivé typy neuronů dorzálního kochleárního jádra
- Kvantitativně vyhodnotit změny v distribuci GABA_B receptoru na těchto typech neuronů

8 Výsledky

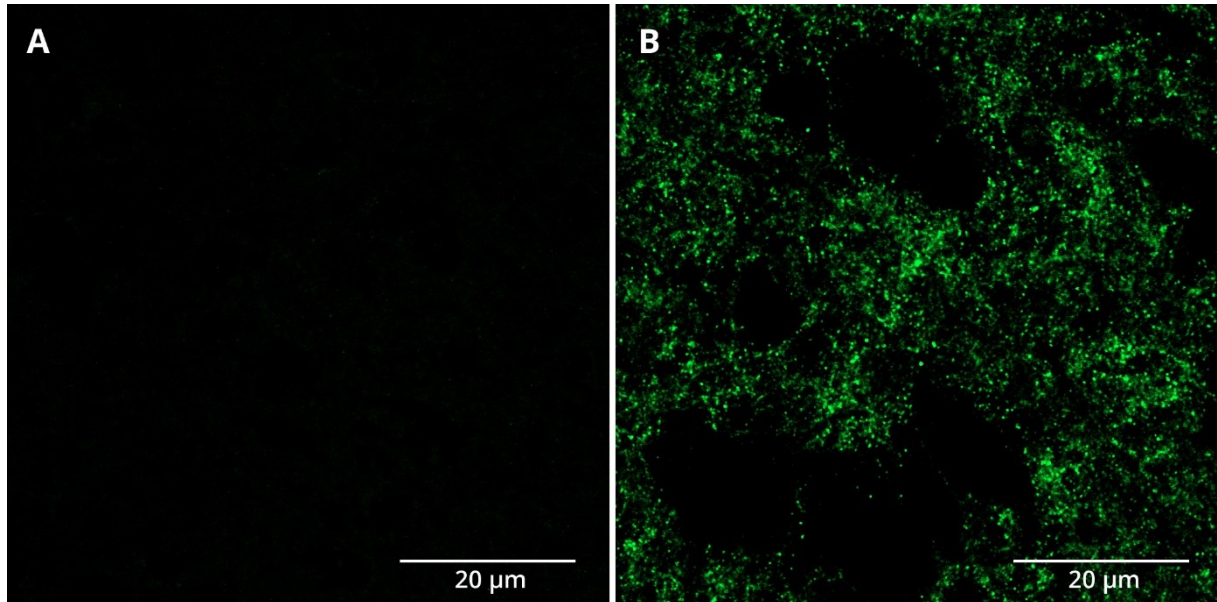
8.1 Lokalizace GABA_B receptoru a proteinu KCTD12 ve sluchové kůře myši

Kompenzační mechanismy, ke kterým dochází bezprostředně po vystavení intenzivnímu zvuku, se postupně projeví v celé sluchové dráze včetně sluchové kůry (Eggermont 2008). Zajímalo nás, zda se i ve sluchové kůře změní distribuce GABA_B receptoru po ohlušení nebo po odstranění KCTD12 proteinu. Prvním krokem byla detekce exprese GABA_B receptoru a jeho přídatné podjednotky u WT pomocí metod imunohistochemie a konfokální mikroskopie. Všechny řezy byly připraveny z myši divokého kmene C57, pokud není specifikováno jinak.

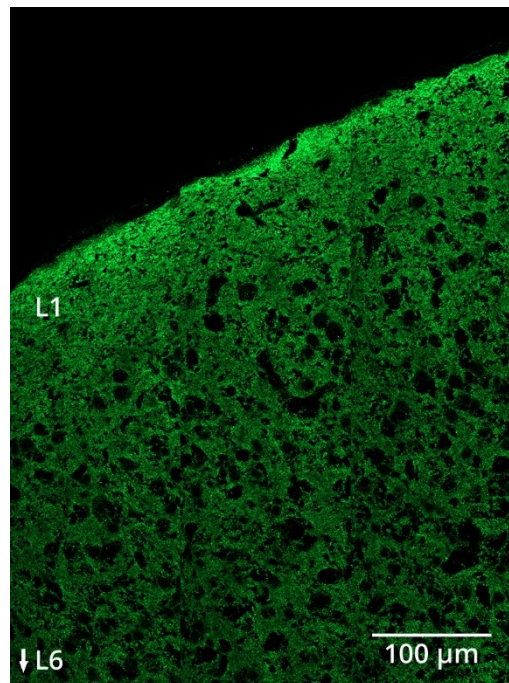


Obrázek 6: Porovnání protilátek proti $\beta 3$ tubulinu a MAP2. Snímek zobrazuje část sluchové kůry v oblasti druhé vrstvy. Zvětšení 630x. Na obrázku A jsou těla a výběžky neuronů značena $\beta 3$ tubulinem. Na obrázku B jsou těla a výběžky neuronů značena MAP2

Pro znázornění morfologie neuronů sluchové kůry byly testovány protilátky proti MAP2 (mikrotubule-associated protein 2) a $\beta 3$ tubulinu za různých podmínek inkubace. Pro lepší výsledky značení těl i výběžků neuronů byl následně používán pouze MAP2 (obr. 6).

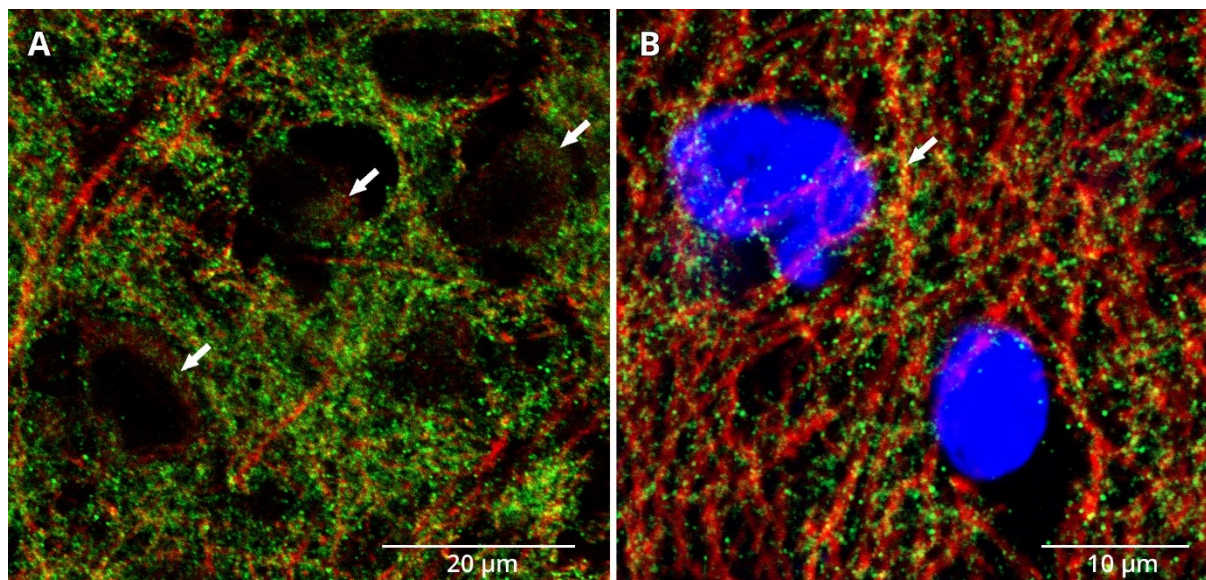


Obrázek 7: Konfokální snímky sluchové kůry se značenou $GABA_{B2}$ podjednotkou. Zvětšení 1000x. Oba snímky byly pořízeny při shodném nastavení mikroskopu. Obrázek A byl pořízen u deficientní myši postrádající $GABA_{B}R$. Obrázek B u divokého typu myši (C57).



Obrázek 8: Exprese $GABA_B$ receptoru ve sluchové kůře myši (konkrétně podjednotky $GABA_{B2}$). Snímek je složen z 16 nasnímaných polí. Zvětšení 400x. Na snímku lze pozorovat zvyšující se intenzitu fluorescence $GABA_{B}R$ směrem k L1, což naznačuje vyšší expresi $GABA_{B2}$ na terminálních částech apikálních dendritů excitačních neuronů.

Také byly testovány protilátky proti GABA_B receptoru. Byly zkoušeny protilátky proti GABA_{B1} a proti GABA_{B2} podjednotce. Pouze použití anti-GABA_{B2} protilátek vedlo ke specifickému značení. Dále byly používány pouze protilátky proti GABA_{B2}, jejichž specifita byla ověřena na řezech GABA_B knock outní myši (obr. 7).



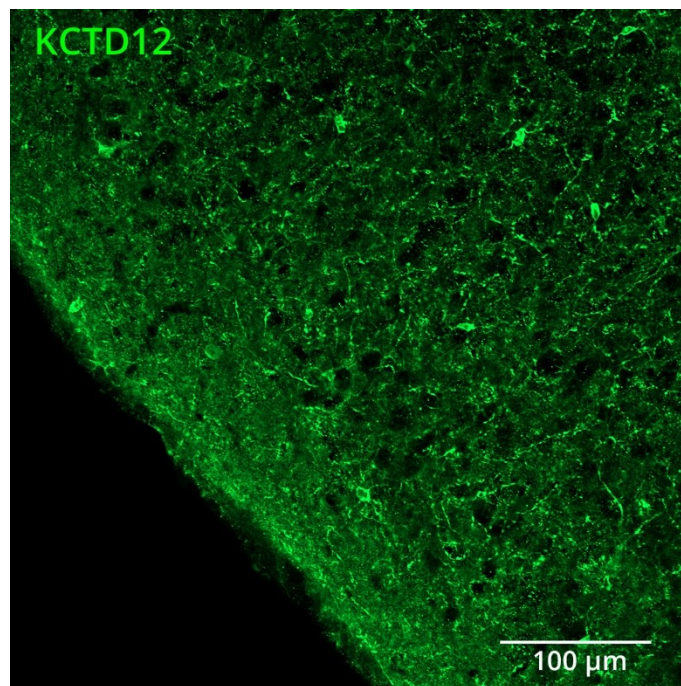
Obrázek 9: Konfokální snímky části sluchové kůry se zaměřením na těla (A) a výběžky (B) neuronů. Zvětšení 1000x Na obrázku A je značen GABA_BR a MAP2. Ze snímku je patrná relativně slabá exprese GABA_BR na těle neuronu (šipka). Naproti tomu obrázek B dokládá vysokou expresi GABA_BR na výběžcích (morfologie výběžků značí MAP2).

Při pohledu na expresi GABA_BR napříč celou sluchovou kůrou lze vyčíst zvýšenou expresi GABA_B receptoru v L1 (molekulární vrstvě) (obr. 8). Tento jev je zřejmě způsoben vyšší hustotou dendritických a axonálních výběžků, na nichž se nacházejí postsynaptické GABA_BR v této vrstvě. Tento předpoklad potvrzuje obr. 9, který ukazuje vyšší imunoreaktivitu GABA_BR na neuronálních výběžcích. Slabé značení bylo zjištěno na tělech neuronů (obr. 9A).

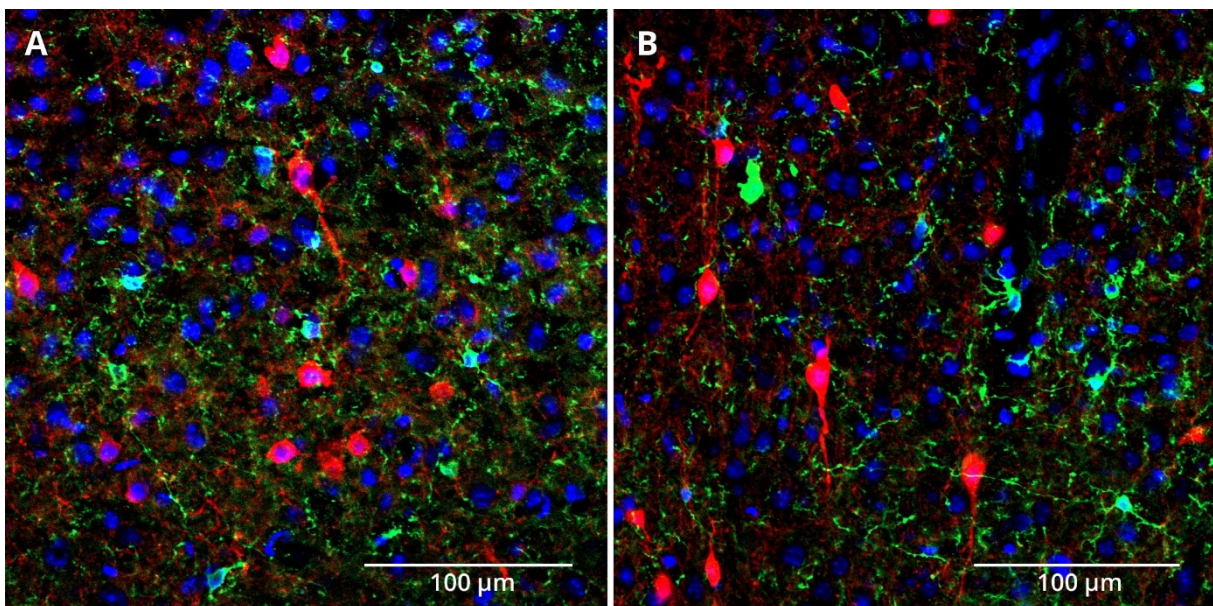
Zajímalo nás, zda preferovaná exprese GABA_B receptoru ve výběžcích souvisí s přítomností KCTD12 podjednotky, která stabilizuje receptor na buněčné membráně (Ivankova et al. 2013).

Značení specifickými protilátkami ukázalo, že KCTD12 byl ve sluchové kůře exprimován a byl lokalizován v těle a výběžcích prozatím neidentifikovaného typu neuronů. Tyto neurony se nacházely napříč všemi vrstvami sluchové kůry (obr. 10), i když tvarově se navzájem lišily – bylo možné rozeznat neurony s většími a menšími somaty. Vysoká exprese KCTD12 byla

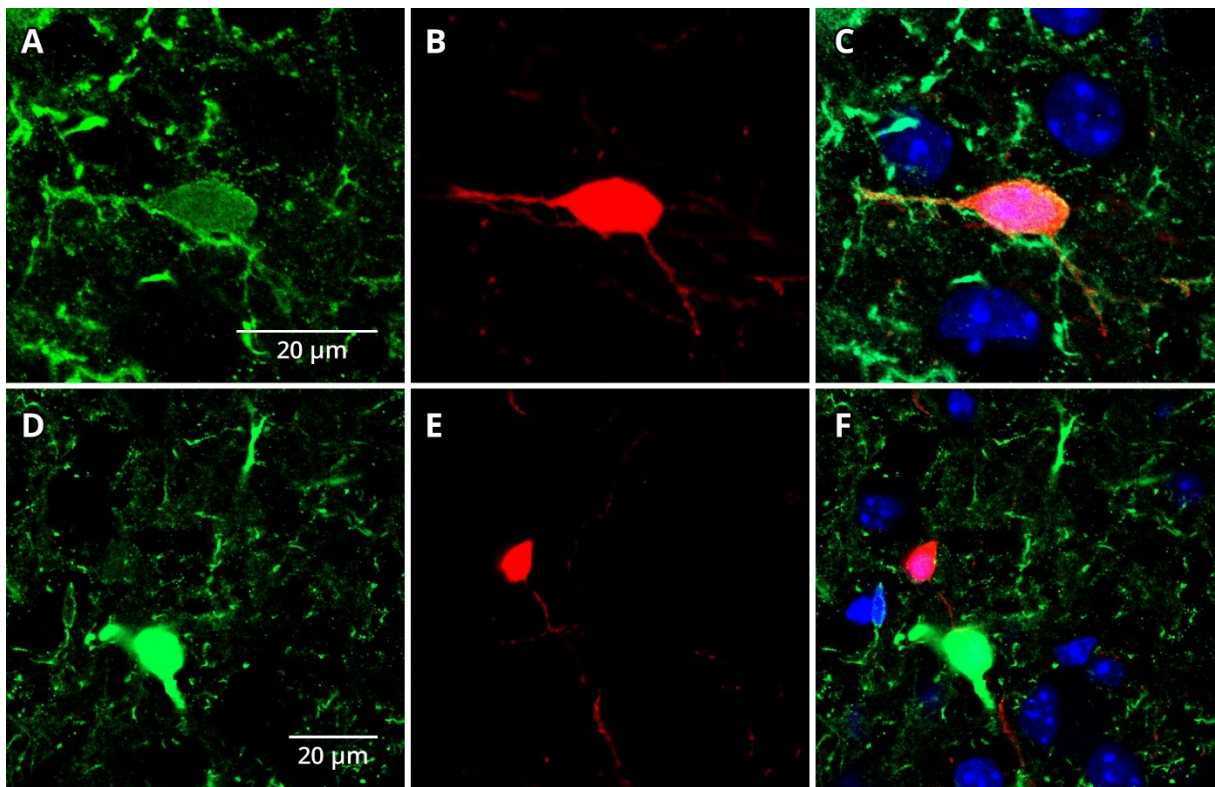
zjištěna především v somato-dendritických kompartmentech neuronů a v L1 (pravděpodobně z důvodu vyšší hustoty neuronálních výběžků v této vrstvě).



Obrázek 10: Exprese **KCTD12** pomocné podjednotky $GABA_B$ receptoru. Jedná se o výsek sluchové kůry (L1-L4). Zvětšení 200x.



Obrázek 11: Konfokální snímky sluchové kůry se značenými typy interneuronů. Zvětšení 400x. Na snímku A je značen **parvalbumin** a **KCTD12** (modře jsou značená jádra pomocí **DAPI**). Na snímku B je značen **somatostatin** a **KCTD12** (**DAPI**).



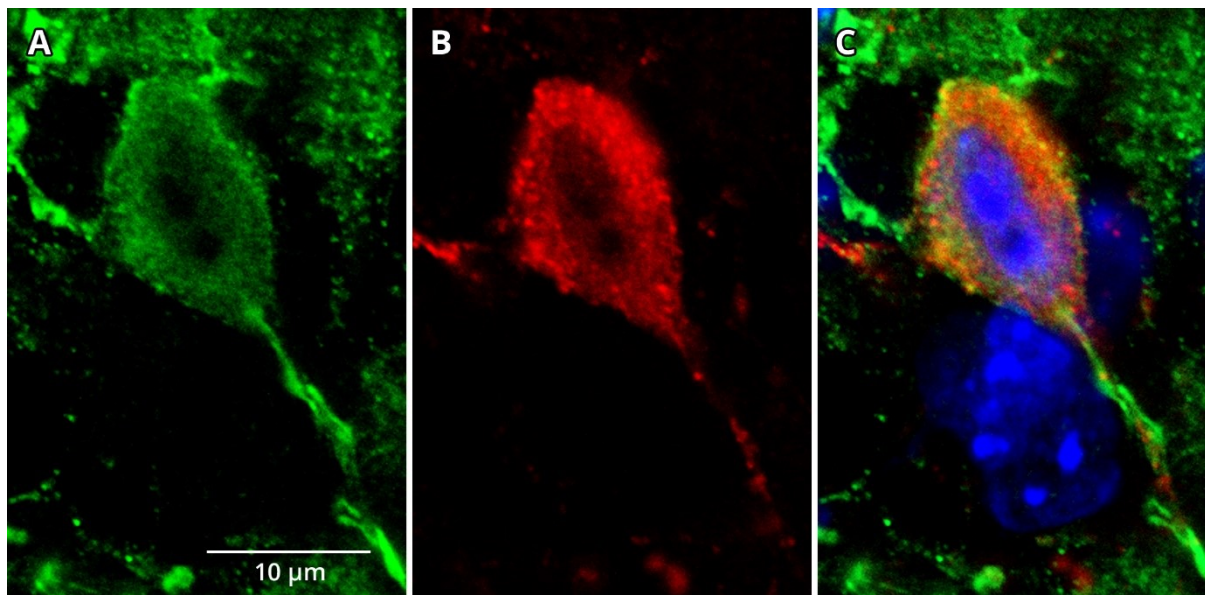
Obrázek 12: Konfokální snímky neuronů L2/3 sluchové kůry s VIP a KCTD12 pozitivními interneurony. Zvětšení 1000x. Na obrázcích je značen KCTD12 a VIP (DAPI). Na obrázku C je patrná kolokalizace KCTD12 a VIP pozitivních neuronů. Na snímku F ke kolokalizaci nedochází.

Určení typu neuronů, ve kterých je KCTD12 exprimován by přispělo k odhalení funkce GABA_B receptoru v neuronálních mikrookruzích sluchové kůry. Tvar těla a větvení výběžků naznačil, že se nejedná o excitační glutamatergní neurony. Rovněž nedávno publikovaná studie identifikovala Kctd12 RNA v GABAergních interneuronech neonatálních myší (Fukumoto et al. 2018). Byla proto testována kolokalizace s jednotlivými typy GABAergních interneuronů. Za tímto účelem byly použity jak protilátky proti markerům interneuronů (cholecystokinin), tak transgenní zvířata exprimující fluorescenční protein ve specifické skupině interneuronů (PV pozitivní, SST pozitivní, VIP pozitivní).

Na obrázku 11 jsou zobrazeny KCTD12 pozitivní, PV pozitivní a SST pozitivní interneurony. Zde nebyla nalezena kolokalizace. Tedy KCTD12 pozitivní neurony nepatří do třídy PV ani SST pozitivních interneuronů.

Zbylé interneurony (až na nepočtené výjimky) se řadí dle Tremblay a kol. do skupiny exprimující ionotropní serotoninový receptor (5HT_{3A}) a dále se tato skupina člení na VIP pozitivní a VIP negativní interneurony (Tremblay et al. 2016).

Pro vyloučení další skupiny interneuronů bylo provedeno dvojí značení – VIP a KCTD12. Zde byla pozorována částečná kolokalizace, tedy část VIP pozitivních interneuronů byla také KCTD12 pozitivních, jak dokládá obrázek 12.



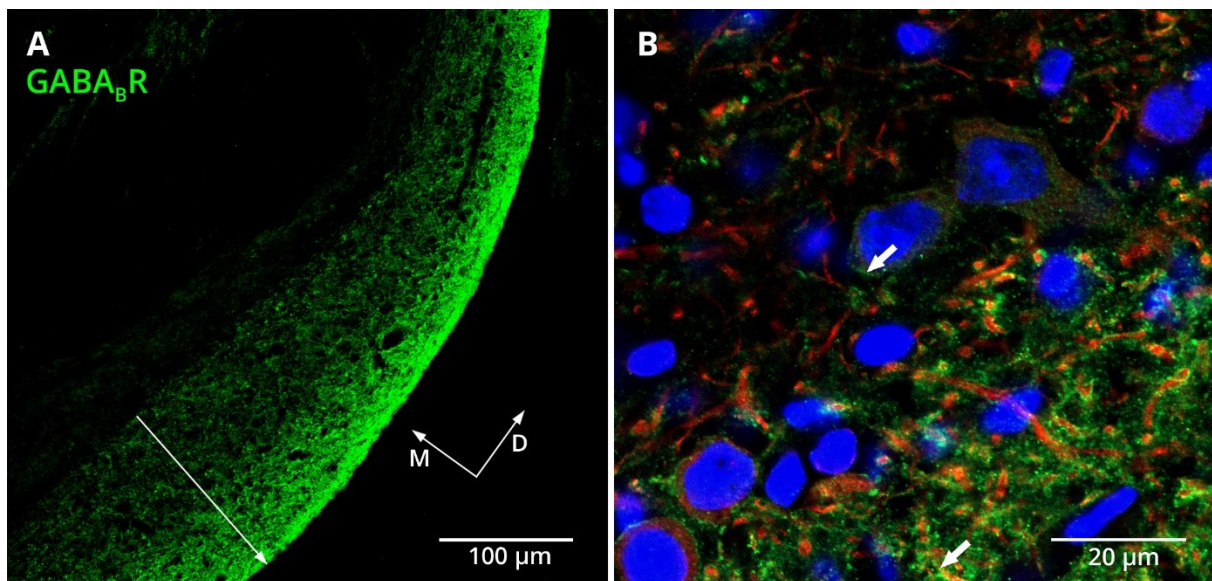
Obrázek 13: *Konfokální snímky interneuronu L2/3 sluchové kůry s CCK a KCTD12 pozitivním interneuronem. Zvětšení 1000x. Na obrázcích je značen KCTD12, který je kolokalizován s cholecystikininem. Modře jsou značená jádra buněk.*

Další skupinou interneuronů, které by mohly exprimovat KCTD12 byly cholecystikinin pozitivní interneurony. Tyto interneurony se řadí pod 5HT_{3A} pozitivní buňky a některé z nich jsou také VIP pozitivní (jiné však nikoliv). V potkaním hipokampu byly identifikovány KCTD12 pozitivní neurony jako cholecystikinin (Cck) pozitivní (Booker et al. 2017; Tremblay et al. 2016).

Z obrázku 13 je patrné, že také ve sluchové kůře Cck pozitivní interneurony exprimují protein KCTD12. Ovšem řezy byly značeny protilátkou proti Cck, která vykazovala relativně slabé značení, a proto nebyla u řady buněk kolokalizace KCTD12 a Cck jasně patrná. Ze souboru získaných dat lze tvrdit, že KCTD12 pozitivní buňky se neřadí do skupiny SST a PV pozitivních interneuronů, ale jedná se o skupinu buněk, kterou lze minimálně částečně identifikovat jako Cck pozitivní interneurony.

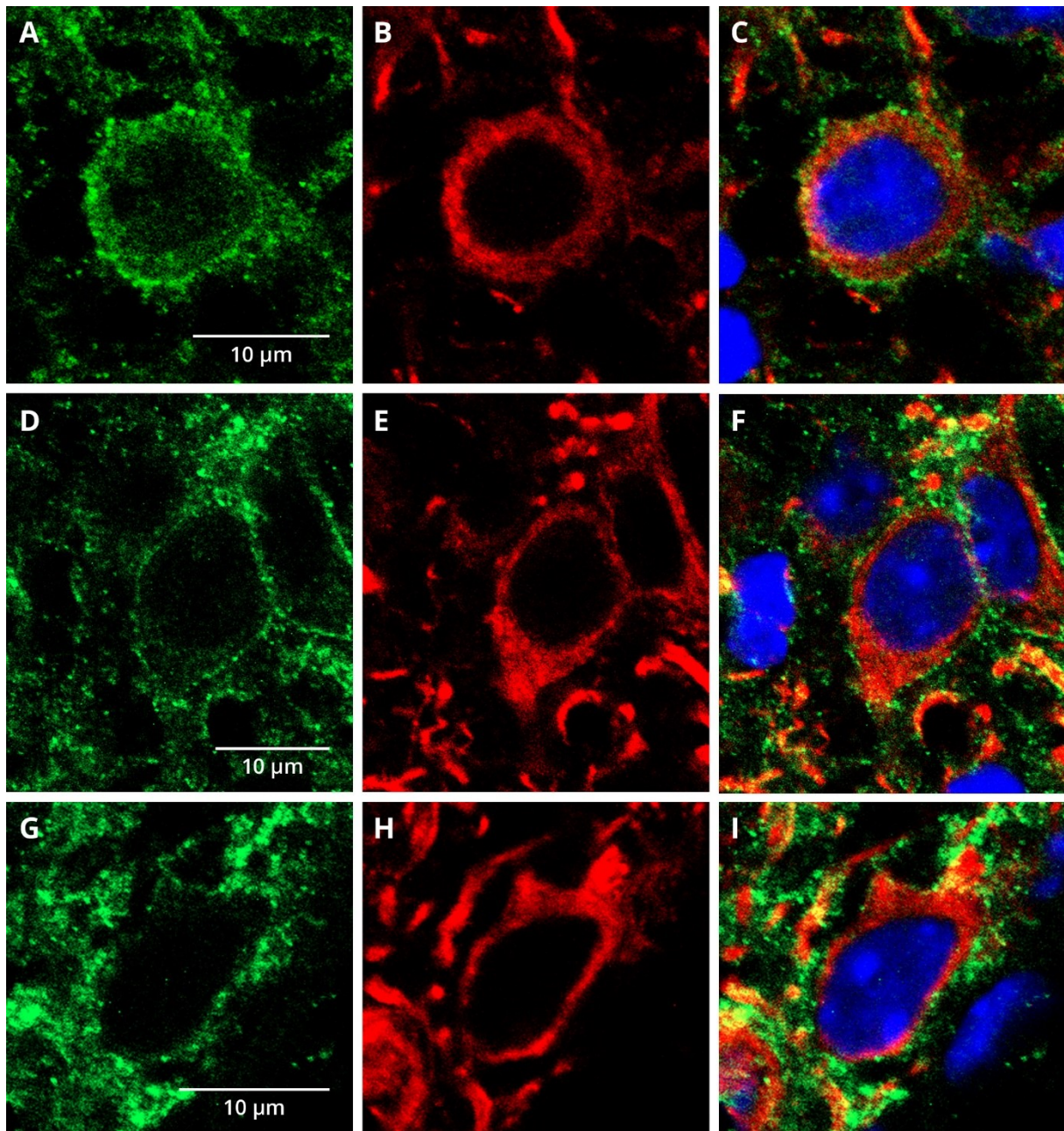
8.2 Lokalizace GABA_B receptoru a proteinu KCTD12 v dorzálním kochleárním jádře.

Dorzální kochleární jádro myši divokého kmene C57 bylo značeno protilátkou proti GABA_{B2} podjednotce (obr. 14). Exprese této podjednotky (dále již jen receptoru GABA_B) vykazovala zvyšující se gradient od vrstvy tuberkuloventrální po vrstvu molekulární. Zvýšená exprese receptoru zde koresponduje s vyšší hustotou dendritických a axonálních výběžků v molekulární vrstvě.



Obrázek 14: Distribuce GABA_B receptoru v dorzálním kochleárním jádře myši. Značení GABA_BR, MAP2 a DAPI. Na snímku A je zobrazeno celé DCN se značeným GABA_B receptorem. Na obrázku A je gradient intenzity fluorescence GABA_BR naznačen šipkou. Orientace DCN: D – dorzálně; M – mediálně. Zvětšení 100x. Na snímku B je zobrazen přechod mezi molekulární a fusiformní vrstvou. GABA_B receptor se vyskytoval jak na těle, tak výběžcích neuronů (šipky).

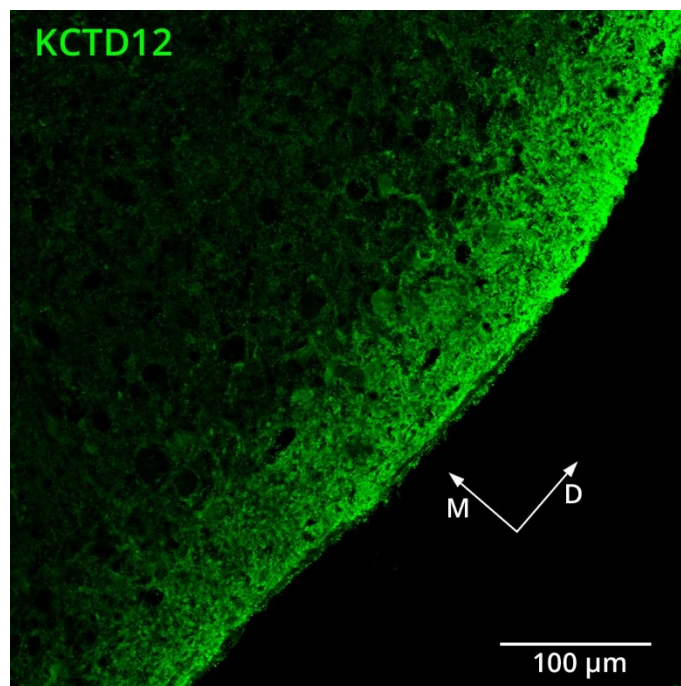
GABA_BR se v DCN nachází nejen na výběžcích, ale ve velké míře i na těle neuronů (obr. 14). Podrobněji byla studována a kvantifikována exprese GABA_B receptoru ve vybraných a pro výstupní signál z DCN zásadních typech buněk – fusiformních, cartwheel a hvězdicových (obr. 15). Receptory nacházející se v oblasti těla neuronu byly brány jako somatické, neboť Lujan a kol. ukázali, že na těle neuronů DCN se GABA_B receptory nacházejí, naproti tomu jejich výskyt přímo v synaptických terminálech je nízký. Presynapticky byly



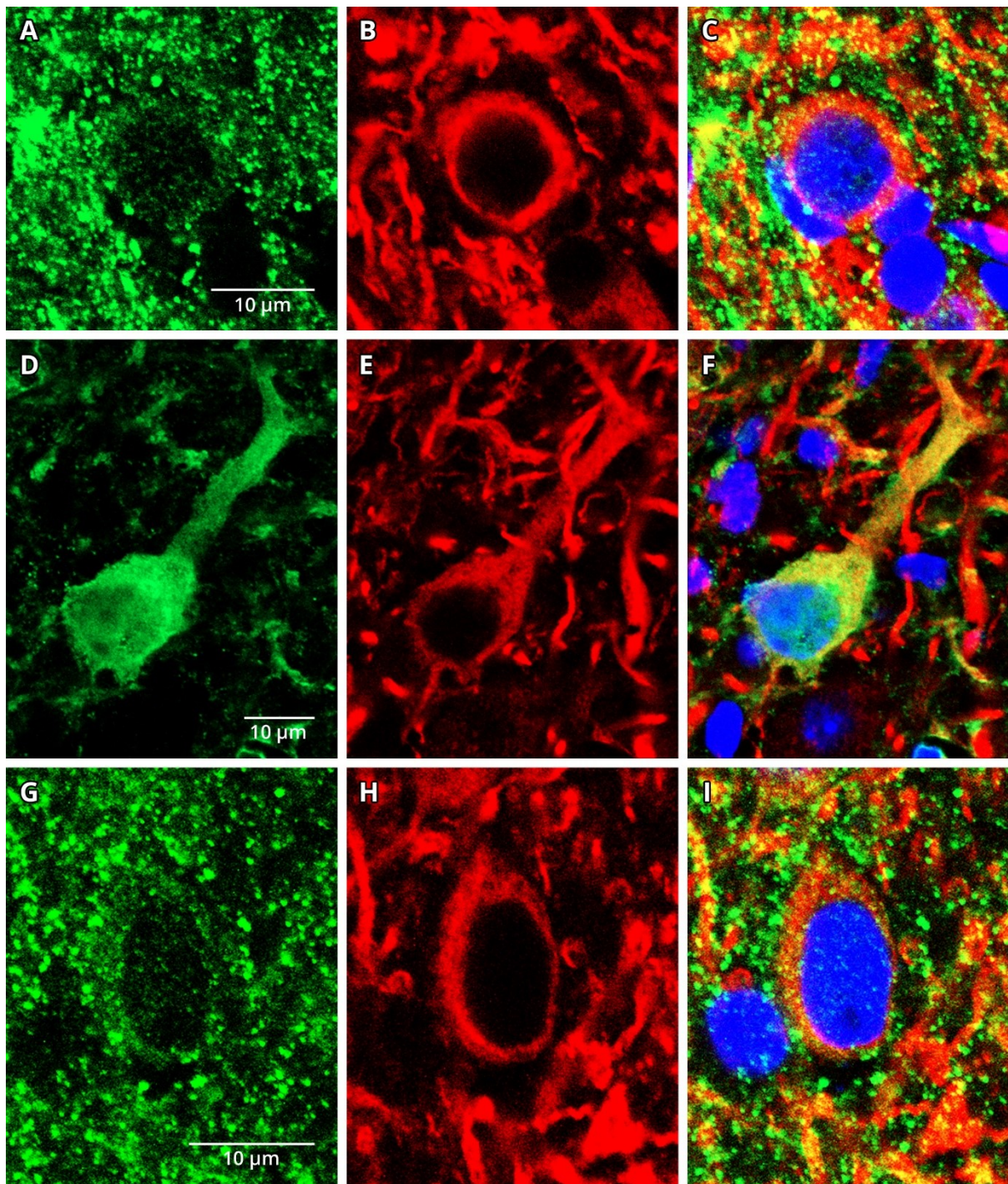
Obrázek 15: Konfokální snímky vybraných buněk dorzálního kochleárního jádra. Zvětšení 1000x. Na snímcích je značen GABA_BR, MAP2 a jádro (DAPI). Na Sérii obrázků A, B, C se nachází cartwheel cell. Na snímcích D, E, F fusiformní buňka a na G, H, I hvězdicová buňka. Na všech třech typech buněk lze pozorovat výrazné značení GABA_BR na těle buňky.

nalezeny dominantně v molekulární zóně (Luján et al. 2004). Také bylo DCN značeno protilátkami proti vGluT a vGAT (markerům zakončení excitačních a inhibičních neuronů) spolu s GABA_B a nebyla pozorována výrazná kolokalizace těchto presynaptických markerů s GABA_BR. Tyto protilátky byly (nepublikovaná data). Jednotlivé typy buněk DCN byly identifikovány pomocí jejich morfologie a lokalizace v rámci DCN. Byla testována identifikace prostřednictvím markerů vápník vázajících proteinů (kalbindinu, kalretininu, parvalbuminu) a markeru GABAergních buněk (GAD67), avšak optimální se ukázala identifikace skrze morfologii (MAP2) a lokalizaci buněk.

Exprese pomocné podjednotky KCTD12 která výrazně ovlivňuje vlastnosti GABA_B receptoru v DCN, byla popsána již dříve (Metz et al. 2011), avšak ne u jednotlivých typů buněk. Její exprese by mohla naznačit, jaký průběh bude mít GABA_B receptorem zprostředkovaná odpověď v daných typech buněk, případně, zda bude ovlivněna přítomnost receptoru na membráně.



Obrázek 16: *Distribuce pomocné podjednotky KCTD12 v dorzálním kochleárním jádře. Na obrázku je značen protein KCTD12. Zvětšení 100x. M – mediálně, D – dorzálně. Exprese KCTD12 je výrazně zvýšena v molekulární vrstvě DCN.*



Obrázek 17: Exprese *KCTD12* proteinu u vybraných buněk DCN. Zvětšení 1000x. Na obrázku je značen protein *KCTD12*, *MAP2* a jádro (DAPI). Série snímků A-C zobrazuje cartwheel cell, D-F fusiformní buňku a G-I hvězdicovou buňku. Jedná se o konfokální snímky a rovina zobrazení prochází středem buněk.

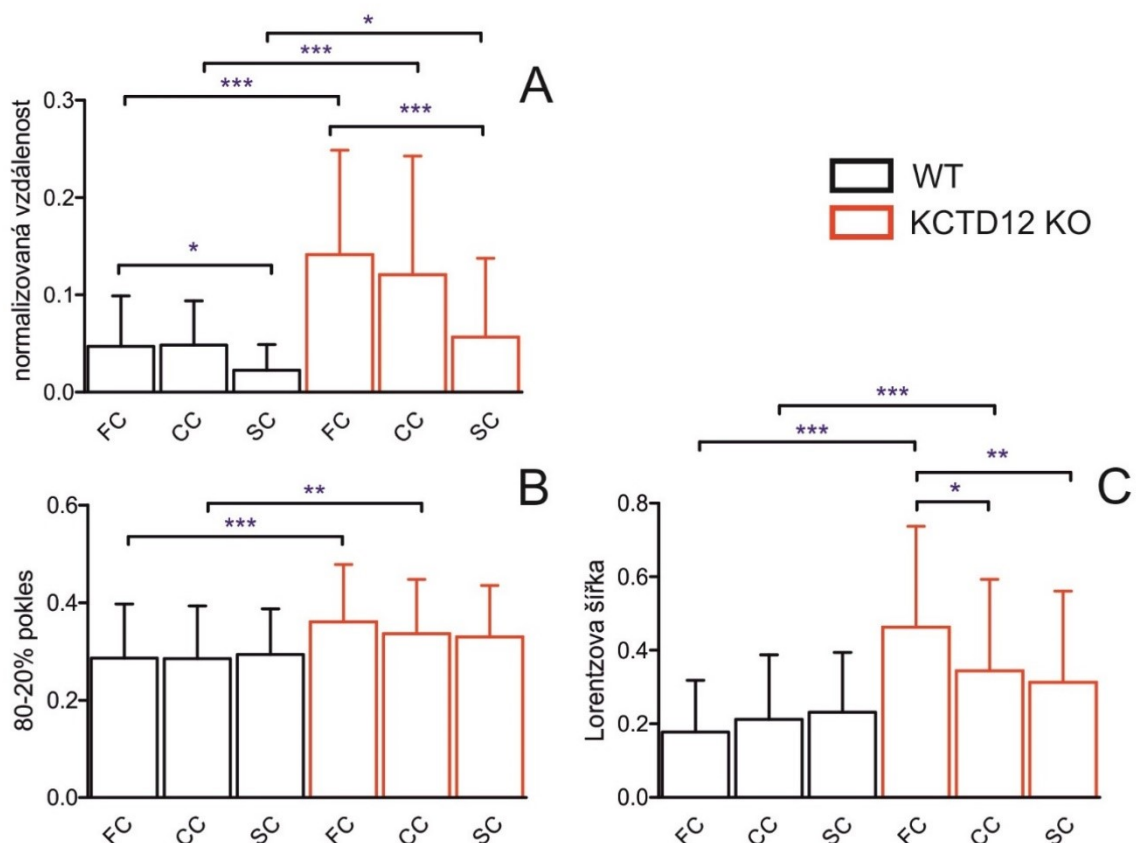
Zde jsme pozorovali vzestupný gradient exprese podjednotky KCTD12 směřující od hluboké vrstvy (tuberkuloventrální) po molekulární vrstvu (obr. 16). Všechny typy sledovaných buněk (cartwheel – CC, fusiformní – FC a hvězdicové – SC) vykazovali expresi KCTD12 proteinu, jak na těle, tak na výbězcích. Na obrázku 17 je znázorněna exprese KCTD12 na tělech všech tří typů buněk.

8.3 Vliv exprese KCTD12 proteinu na distribuci GABA_B receptoru v dorzálním kochleárním jádře myši

Jedinci trpící tinnitem vykazují zvýšenou neuronální aktivitu a změny tonotopie DCN, které by mohly být podpořeny dysregulací funkce GABA_B receptoru. Z toho důvodu byly myši (C57 a KCTD12 KO) vystaveny akustickému traumatu a následně bylo sledováno, zda dochází ke změnám v lokalizaci GABA_B receptoru ve vybraných typech buněk (hvězdicových, cartwheel, fusiformních). Změna subcelulární distribuce receptorů byla analyzována na tělech neuronů. Byly vyhodnoceny tři parametry popisující změnu této lokalizace: normalizovaná vzdálenost maxima fluorescence od plasmatické membrány, normalizovaná vzdálenost od 80 % po 20 % maxima intenzity fluorescence (pokles 80 %-20 %) a po proložení distribuce fluorescence v buňce Lorentzovou křivkou distribuce byla vyhodnocena normalizovaná šířka pásma od maxima fluorescence do poloviny tohoto maxima (Lorentzova šířka).

Zjistili jsme, že u neohlušených kontrolních zvířat (WT) byla u všech typů sledovaných buněk většina somatických GABA_B receptorů lokalizována v těsné blízkosti membrány, což odpovídá vzdálenosti vrcholu fluorescence od membrány (L_{max}) (obr. 18). Mezi hvězdicovými a fusiformními buňkami byl pozorován signifikantní rozdíl ve vzdálenosti L_{max}, který by mohl být vysvětlen tím, že u fusiformních buněk se větší množství GABA_B receptoru nachází v kompartmentech těsně pod membránou. V hodnotách Lorentzovy šířky a poklesu 80 %-20 % se jednotlivé buňky výrazně nelišily. U neohlušených KCTD12 KO myši byly rozdíly mezi fusiformním a hvězdicovým typem buněk patrnější. Fusiformní a hvězdicové buňky se lišily jak ve vzdálenosti maxima fluorescence od membrány, tak v Lorentzově šířce. V Lorentzově šířce se také lišily buňky fusiformní a cartwheel (obr. 18).

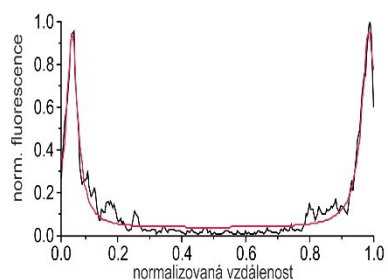
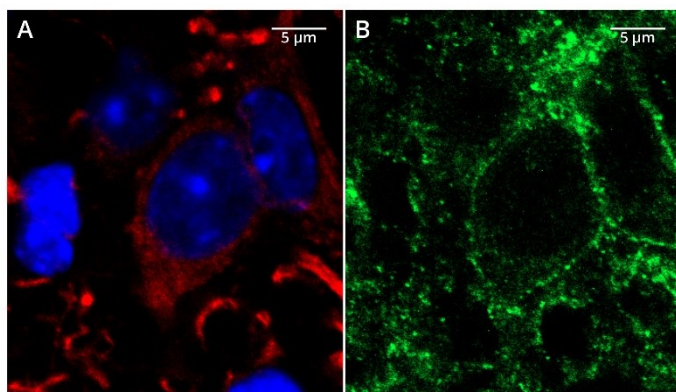
U KCTD12 KO myši byl u všech sledovaných typů buněk zjištěn signifikantní posun maxima fluorescenčního značení GABA_BR směrem do nitra buňky oproti WT C57 myším, což



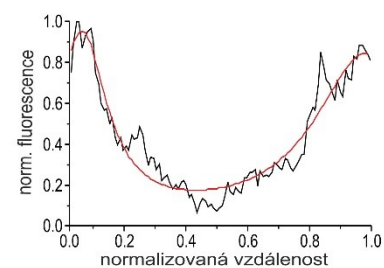
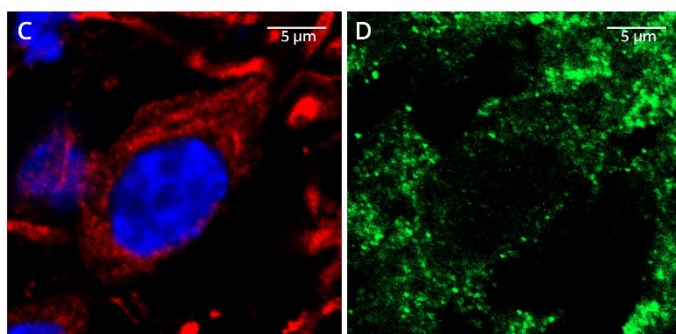
Obrázek 18: Lokalizace GABA_B receptoru u KCTD12 KO a C57 WT myši na buňkách fusiformních (FC), cartwheel (CC) a hvězdicových (SC). Vyhodnocované buňky byly získány ze čtyř KCTD12 KO a čtyř C57 WT myši. Pro vyhodnocení lokalizace GABA_B receptoru u C57 WT myši bylo použito 55 FC, 54 CC a 28 SC buněk. U KCTD12 KO pak bylo vyhodnocováno 76 FC, 78 CC a 37 SC buněk.

naznačuje zvýšenou internalizaci receptoru. Také vzdálenost poklesu 80 %-20 % a Lorentzova šířka byly signifikantně prodlouženy u fusiformních a cartwheel neuronů KCTD12 KO (obr. 18). Toto zjištění je v souladu s rolí KCTD12 proteinu v internalizaci GABA_B receptoru. Ke změnám v subcelulárním rozložení GABA_B receptorů docházelo markantněji v buňkách fusiformních a cartwheel (signifikantní změna ve všech třech měřených parametrech) než v hvězdicových neuronech (signifikantní změna pouze u vzdálenosti vrcholu fluorescence od membrány).

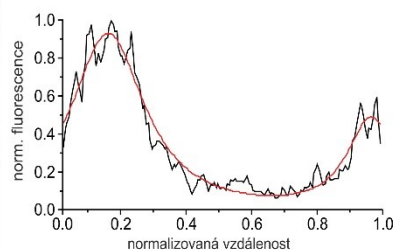
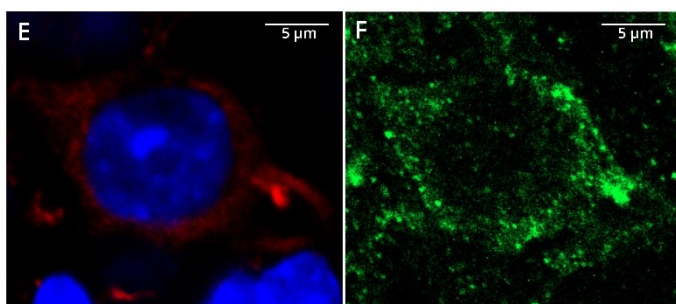
WT BN



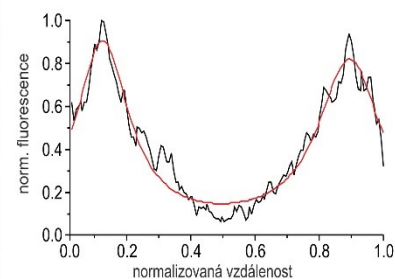
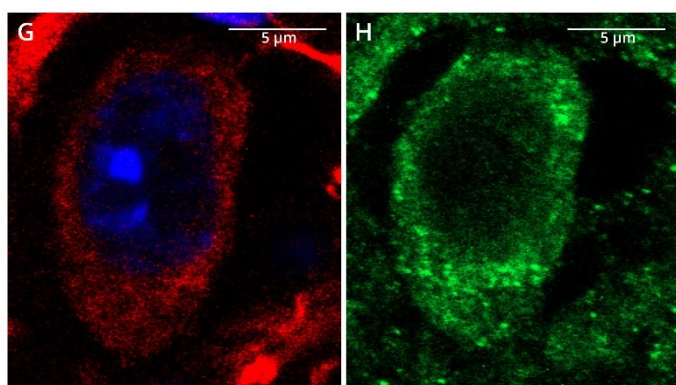
WT AN



KCTD12 KO BN



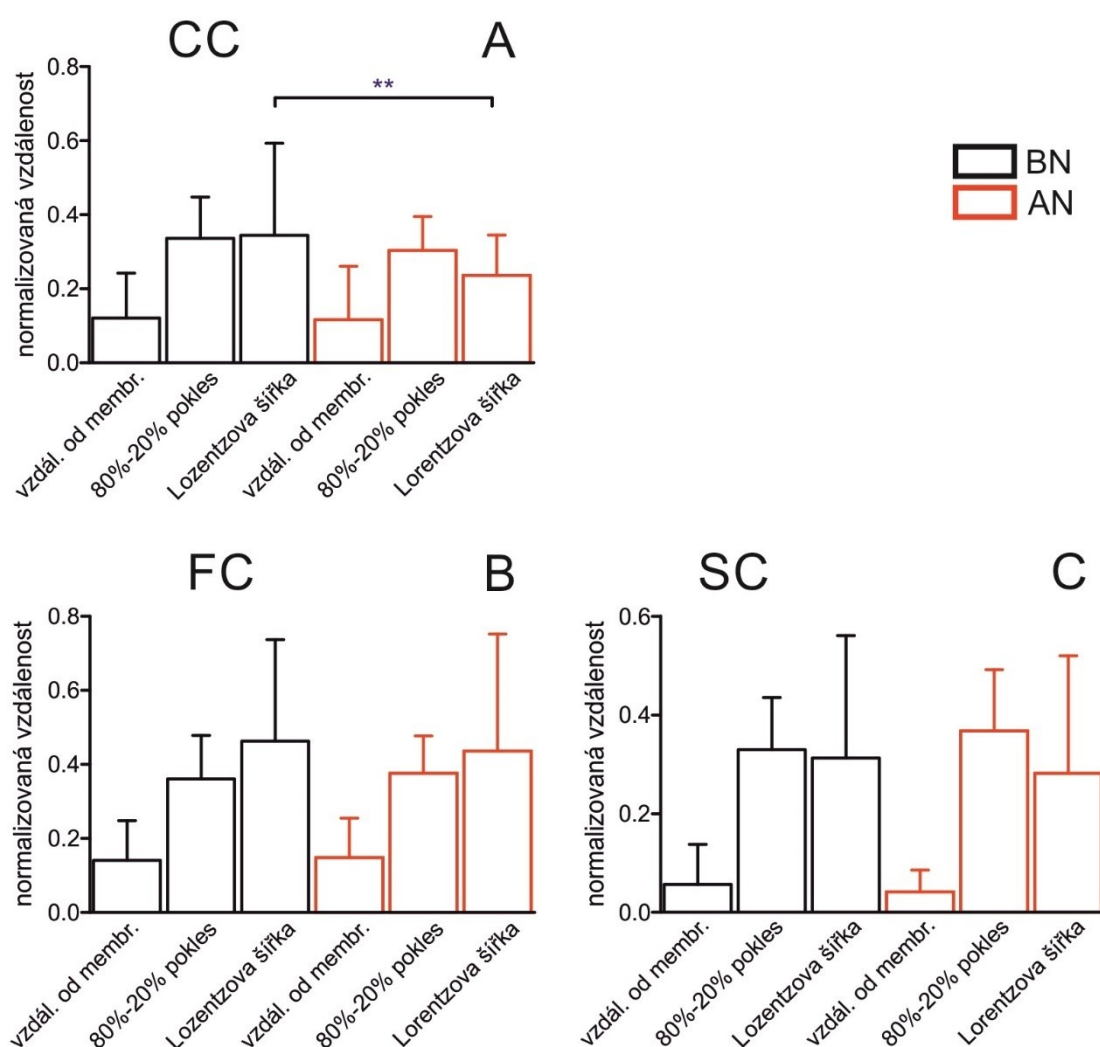
KCTD12 KO AN



Obrázek 19: Distribuce $GABA_B$ receptoru na fusiformních buňkách u WT, WT ohlušené, KCTD12 KO a KCTD12 KO ohlušené myši. Protilátkami byl značen $GABA_B R$, $MAP2$ a jádro bylo značeno $DAPI$. Na obrázcích A a B je zobrazena buňka z WT BN (BN – before noise exposure) myši. Na sousedním grafu je pak normalizovaná distribuce fluorescence $GABA_B R$ s proloženou Lorentzovou křivkou distribuce. Identické rozmístění a značení platí pro snímky C a D (z WT AN – after noise exposure – myši); E a F (z KCTD12 KO BN myši) a G a H (KCTD12 KO AN myši).

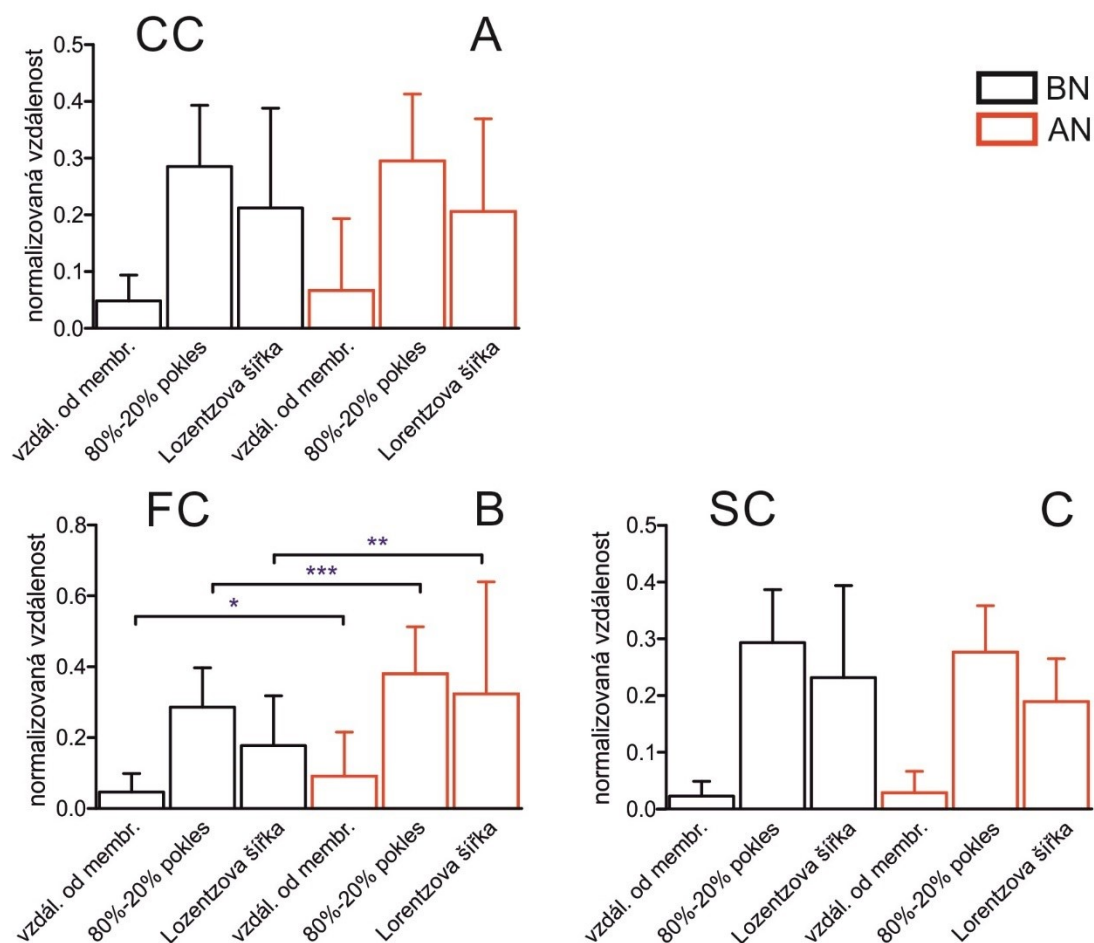
8.4 Změna distribuce $GABA_B$ receptoru v buňkách dorzálního kochleárního jádra po ohlušení WT a KCTD12 myši

Část experimentálních zvířat byla ve věku 2 měsíců vystavena intenzivnímu zvuku (viz. Metody) a po 14 dnech byla testována na přítomnost tinnitu metodou GPIAS. Jak ukazuje tabulka č.1, pro imunohistochemické experimenty byly použity WT myši, u kterých se vyvinul tinnitus a myši, u kterých detekován nebyl. Parametry buněk z obou skupin byly porovnány a nebyl mezi nimi nalezen statisticky signifikantní rozdíl, proto byly dále posuzovány jako 1 soubor dat – „po ohlušení“ (AN – after noise exposure).



Obrázek 20: Lokalizace $GABA_B$ receptoru u C57 WT myši (BN – before noise exposure) a C57 WT myši vystavené akustickému traumatu (AN – after noise exposure) na buňkách fusiformních (FC), cartwheel (CC) a hvězdicových (SC). Vyhodnocované buňky byly získány ze čtyř BN a čtyř AN myši. Pro vyhodnocení lokalizace $GABA_B$ receptoru u C57 WT myši bylo použito 55 FC, 54 CC a 28 SC buněk. U ohlušené C57 WT myši pak bylo vyhodnocováno 63 FC, 51 CC a 18 SC buněk.

Při porovnání neohlušených (BN – before noise exposure) a ohlušených WT myši nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v žádném sledovaném parametru u cartwheel a hvězdicových interneuronů (obr. 20). Naproti tomu u buněk fusiformních byla zjištěna výrazná internalizace GABA_B receptoru po ohlušení. Signifikantně se prodloužil pokles 80 %-20 %, Lorentzova šířka i normalizovaná vzdálenost vrcholu fluorescence od membrány. Fusiformní buňky jsou excitační neurony a jedná se o hlavní výstupní buňky DCN. Oslabení pomalé GABAergní signalizace na těchto buňkách vede ke zvýšené excitabilitě těchto neuronů a může tedy ovlivňovat přímo výstupní signál jdoucí do IC.



Obrázek 21: Lokalizace GABA_B receptoru u KCTD12 KO myši (BN – before noise exposure) a KCTD12 KO myši vystavené akustickému traumatu (AN – after noise exposure) na buňkách fusiformních (FC), cartwheel (CC) a hvězdicových (SC). Vyhodnocované buňky byly získány ze čtyř BN a čtyř AN myši. Pro vyhodnocení lokalizace GABA_B receptoru u KCTD12 KO myši bylo použito 76 FC, 78 CC a 37 SC buněk. U ohlušené KCTD12 KO myši pak bylo vyhodnocováno 53 FC, 23 CC a 17 SC buněk.

Po ohlušení vykazovala všechna KCTD12 KO zvířata známky tinnitu (viz tab.1), ale nedošlo k výrazné změně v distribuci GABA_B receptoru na jednotlivých typech neuronů. Signifikantní změna byla zaznamenána pouze u cartwheel cells, u nichž došlo k prodloužení Lorentzovy šířky (obr. 21). Tyto výsledky naznačují, že akustické trauma v nepřítomnosti KCTD12 proteinu již neovlivní internalizaci receptoru.

9 Diskuze

Cílem této práce bylo popsat lokalizaci GABA_B receptoru a přispět k pochopení změn v inhibičních mechanismech, které probíhají ve sluchové dráze po akustickém traumatu. K tomuto účelu jsme využili metody imunohistochemie a fluorescenční mikroskopie a stanovili jsme distribuci GABA_B receptoru a jeho pomocné podjednotky KCTD12 v dorzálním kochleárním jádře a sluchové kůře, které se účastní vzniku a přetrvávání tinnitu. V těchto oblastech jsme se zaměřili na dosud neobjasněné změny v distribuci GABA_B receptoru jednak u zvířecího modelu tinnitu – ohlušených myší a jednak u myší postrádající KCTD12 protein. Pro pochopení mikrookruhů ve sluchové dráze a jejich potenciálních změn u jedinců trpících tinnitem je tento popis a kvantifikace zásadní.

9.1 Distribuce GABA_B receptoru ve sluchové kůře myši

Naše data ukazují, že GABA_B receptor je ve velké míře exprimován ve všech vrstvách sluchové kůry, s výraznější hustotou značení v povrchové vrstvě L1. GABA_B receptory se mohou nacházet na presynaptických zakončeních, kde regulují uvolňování neurotransmiteru i na postsynaptické membráně (dendritické trny, krčky i na těle neuronů), kde přispívají k hyperpolarizaci aktivací draslíkových kanálů (Bettler et al. 2004). To je v souladu se studií distribuce GABA_B receptoru ve sluchové kůře potkana, kde byl receptor nalezen na těle i výběžcích pyramidových buněk a na těle buněk nepyramidových (Jamal et al. 2011). My jsme pozorovali znatelně větší množství receptoru na výběžcích než na tělech neuronů. Shluky GABA_B receptorů jsou patrné podél jednotlivých vláken značených MAP2, ale ani značení spolu s protilátkami proti presynaptickým markerům (vGAT a vGluT) nepřispělo k rozlišení presynaptických a postsynaptických receptorů (data nejsou prezentována). Na určení jejich přesné distribuce v rámci jednotlivých kompartmentů bychom do budoucna chtěli použít elektronovou mikroskopii, která by poskytla přesnější informace.

Funkce GABA_B receptoru je do značné míry ovlivněna interakcí s přídatnými podjednotkami, KCTD proteiny. Jednotlivé typy (KCTD8, 12, 12b a 16) určují kinetiku odpovědi vyvolané aktivací receptoru i její velikost (Schwenk et al. 2010). V nedávné době byla dokumentována exprese KCTD12 proteinu a přítomnost RNA v GABAergních interneuronech v kůře myši, i když nebyl dosud identifikován typ neuronu exprimující protein KCTD12 (Metz et al. 2011, Fukumoto et al. 2018).

Detekce KCTD12 proteinu ve sluchové kůře ukázala podobné rozložení pozitivních neuronů jako v již zmíněné práci (Metz et al. 2011). KCTD12 neurony se nacházely rovnoměrně ve všech vrstvách L1-L6. Bylo možné rozlišit 2 skupiny neuronů podle velikosti somatu. Nepřítomnost apikálního dendritu a charakter větvení výběžků naznačoval, že se jedná o podskupinu interneuronů. V hipokampu byly KCTD12 obsahující neurony zařazeny do skupiny cholecystokininových interneuronů, u kterých byla naměřena silná desenzitizace GABA_B receptorem aktivovaných draslíkových proudů (Booker et al. 2017). To je v souladu s našimi výsledky, které ukazují, že KCTD12 není exprimován v PV pozitivních nebo SST pozitivních interneuronech. Naopak cholecystokininové interneurony (podskupina 5HT_{3A} interneuronů) sluchové kůry byly označeny anti-KCTD12 protilátkami. Přesto kolokalizace nebyla úplná. Zdá se, že ve sluchové kůře tvoří KCTD12 exprimující neurony zvláštní skupinu interneuronů, jejíž přesné vlastnosti a funkce budou ještě předmětem dalšího výzkumu. Stejně tak zůstává otázkou, zda a jak tyto interneurony přispívají ke zvýšení aktivity po akustickém traumatu. Rovněž bude zajímavé zjistit, zda KCTD12 ovlivňuje postsynaptickou, nebo presynaptickou populaci GABA_B receptoru.

9.2 Změna distribuce GABA_B receptoru v DCN myši vystavené akustickému traumatu

Akustické trauma, které může vest k vnímání fantomového zvuku, způsobí řadu změn v aktivitě sluchové dráhy. Výsledky Brozoskiho a kol. ukazují, že u ohlušených zvířat dochází ke zvýšení aktivity specificky na fusiformních buňkách DCN (Brozoski et al. 2002), u kterých byla detekována menší povrchová exprese inhibičních glycinových receptorů. V DCN se inhibiční signalizace spolu s glycinem účastní i GABA působící na GABA_A a GABA_B receptory. My jsme se zaměřili na distribuci metabotropního GABA_B receptoru a vliv jeho přídatné podjednotky KCTD12 v několika typech neuronů DCN (fusiformní, cartwheel a hvězdicové). Po ohlušení WT myši C57 byla, podobně jako u GlyRs (Wang, H 2009), zjištěna zvýšená internalizace GABA_B receptoru pouze u buněk fusiformních. Internalizace GABA_BR by mohla přispět ke zvýšené spontánní neuronální aktivitě v DCN, ale zřejmě také v IC, MGB a SK (sluchové kůře) u jedinců trpících tinnitem, neboť internalizací zasažené fusiformní buňky jsou hlavní výstupní buňky dorzálního kochleárního jádra.

Protože KCTD12 podjednotka zásadním způsobem reguluje odpověď GABA_B receptoru i jeho stabilitu na membráně (Ivankova 2013, Schwenk 2010), zajímalo nás, jaký vliv bude mít nedostatek tohoto proteinu na distribuci receptorů v buňkách DCN. Odstranění KCTD12 proteinu vedlo k přesunu velké části fluorescenčně označených receptorů od povrchu dovnitř buňky. Efekt byl zvláště markantní pro fusiformní a cartwheel neurony. Tento výsledek koreluje s daty získanými z behaviorálních testů (GPIAS), kdy KCTD12 KO zvířata měla problémy s detekcí gapu, což by mohlo být způsobené přítomností bazálního tinnitu (Rybalko et al. dosud nepublikováno). Vystavení KCTD12 KO akustickému traumatu vyvolalo další změny pouze u cartwheel cells, kde byl zaznamenán rozdíl v parametru Lorentzovy šířky.

Tyto výsledky naznačují, že po vystavení jedince akustickému traumatu dochází ke snížení povrchové exprese inhibičních GABA_B receptorů, a to zejména na výstupních buňkách DCN, a že mechanismus internalizace receptorů je závislý na přítomnosti KCTD12.

10 Závěr

Náš výzkum byl zaměřen na lokalizaci funkčního komplexu tvořeného GABA_B receptorem a jeho přídatnou podjednotkou KCTD12 a na změny, ke kterým dochází po akustickém traumatu.

Ve sluchové kůře byl pomocí specifických protilátek detekován GABA_B receptor ve všech vrstvách, se zvýšenou koncentrací v L1. Při detailnějším pohledu byl receptor nalezen především na výběžcích, ale do jisté míry i na tělech neuronů. Protein KCTD12 se nachází ve specifické populaci interneuronů, která je částečně Cck pozitivní a VIP pozitivní.

Na rozdíl od kůry, v DCN byl GABA_B receptor lokalizován ve velké míře na těle cartwheel, fusiformních i hvězdicových buněk, i když se hojně vyskytoval i na výběžcích. Pomocná podjednotka GABA_B receptoru, KCTD12, byla nalezena ve všech vrstvách dorzálního kochleárního jádra, včetně cartwheel, fusiformních i hvězdicových buněk.

U myší vystavených akustickému traumatu docházelo k výrazné internalizaci GABA_B receptoru specificky ve fusiformních buňkách DCN. U myší postrádajících protein KCTD12 došlo také ke zvýšené internalizaci GABA_BR, a to ve všech třech sledovaných typech buněk. Ohlušení KCTD12 KO zvířat již nezměnilo výrazně distribuci GABA_B receptoru.

Naše výsledky naznačují, že inhibice zprostředkovaná signálním komplexem GABA_B receptoru by mohla hrát důležitou roli při regulaci korových okruhů prostřednictvím specifické podskupiny interneuronů. Stejně významný se zdá vliv GABA_B receptoru a podjednotky KCTD12 na aktivitu neuronů DCN, zejména fusiformních buněk. Naše data naznačují, že po akustickém traumatu dochází k internalizaci receptoru prostřednictvím mechanismu závislého na KCTD12 proteinu. Získané poznatky by mohly přispět k odhalení změn zodpovědných za vznik tinnitu a tím i umožnit účinnější terapii této nemoci.

11 Literatura

Sekundární literatura je značena: * (hvězdičkou)

- A. Winer, Jeffery. 1992. The Functional Architecture of the Medial Geniculate Body and the Primary Auditory Cortex. *The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy*
- Adams, Joe C. and Enrico Mugnaini. 1987. "Patterns of Glutamate Decarboxylase Immunostaining in the Feline Cochlear Nuclear Complex Studied with Silver Enhancement and Electron Microscopy." *Journal of Comparative Neurology*.
- Adelfinger, Lisa, Rostislav Turecek, Klara Ivankova, Anders A. Jensen, Stephen J. Moss, Martin Gassmann and Bernhard Bettler 2014. "GABAB Receptor Phosphorylation Regulates KCTD12-Induced K⁺ Current Desensitization." *Biochemical Pharmacology* 91(3):369–79.
- Alibardi, Lorenzo. 2003. "Ultrastructural Distribution of Glycinergic and GABAergic Neurons and Axon Terminals in the Rat Dorsal Cochlear Nucleus, with Emphasis on Granule Cell Areas." *Journal of Anatomy*.
- Angeloni, C. and MN Geffen. 2018. "Contextual Modulation of Sound Processing in the Auditory Cortex." *Current Opinion in Neurobiology*
- Apostolides, Pierre F. and Laurence O. Trussell. 2014. "Chemical Synaptic Transmission onto Superficial Stellate Cells of the Mouse Dorsal Cochlear Nucleus." *Journal of Neurophysiology*.
- Bauer, C. A., T. J. Brozoski, T. M. Holder, and D. M. Caspary. 2000. "Effects of Chronic Salicylate on GABAergic Activity in Rat Inferior Colliculus." *Hearing Research*
- Bayón Y, Trinidad AG, de la Puerta ML, Del Carmen Rodríguez M, Bogetz J, Rojas A, De Pereda JM, Rahmouni S, Williams S, Matsuzawa S, Reed JC, Crespo MS, Mustelin T, Alonso A 2008. "KCTD5, a Putative Substrate Adaptor for Cullin3 Ubiquitin Ligases." *FEBS Journal*.
- Benke, Dietmar, Michael Honer, Claudia Michel, Bernhard Bettler, and Hanns Mohler. 1999. "γ-Aminobutyric Acid Type B Receptor Splice Variant Proteins GBR1a and GBR1b Are Both Associated with GBR2 in Situ and Display Differential Regional and Subcellular Distribution." *Journal of Biological Chemistry*.

- Bertrand, Sandrine, France Morin, and Jean Claude Lacaille. 2003. "Different Actions of Gabapentin and Baclofen in Hippocampus from Weaver Mice." *Hippocampus*.
- * Bettler, Bernhard, Klemens Kaupmann, Johannes Mosbacher, Martin Gassmann, and Molecular Structure. 2004. "Molecular Structure and Physiological Functions of GABA B Receptors." *Fisiol Rev*.
- * Bettler, Bernhard and Jim Yu Hsiang Tiao. 2006. "Molecular Diversity, Trafficking and Subcellular Localization of GABAB Receptors." *Pharmacology and Therapeutics*
- Biermann B, Ivankova-Susankova K, Bradaia A, Abdel Aziz S, Besseyrias V, Kapfhammer JP, Missler M, Gassmann M, Bettler B. 2010. "The Sushi Domains of GABAB Receptors Function as Axonal Targeting Signals." *Journal of Neuroscience*
- * Billinton A1, Ige AO, Bolam JP, White JH, Marshall FH, Emson PC.2001. "Advances in the Molecular Understanding of GABA(B) Receptors." *Trends in Neurosciences*.
- Billinton, Andrew, Neil Upton, and Norman G. Bowery. 1999. "GABA(B) Receptor Isoforms GBR1a and GBR1b, Appear to Be Associated with Pre- and Post-Synaptic Elements Respectively in Rat and Human Cerebellum." *British Journal of Pharmacology*.
- Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, Schuler V, Shigemoto R, Kaupmann K, Bettler B 1999. "Spatial Distribution of GABA(B)R1 Receptor mRNA and Binding Sites in the Rat Brain." *The Journal of Comparative Neurology*.
- Booker SA, Althof D, Gross A, Loreth D, Müller J, Unger A, Fakler B, Varro A, Watanabe M, Gassmann M, Bettler B, Shigemoto R, Vida I, Kulik Á 2017. "KCTD12 Auxiliary Proteins Modulate Kinetics of GABAB Receptor-Mediated Inhibition in Cholecystokinin-Containing Interneurons." *Cerebral Cortex*
- Brozoski, T. J., C. A. Bauer, and D. M. Caspary. 2002. "Elevated Fusiform Cell Activity in the Dorsal Cochlear Nucleus of Chinchillas with Psychophysical Evidence of Tinnitus." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*
- Brozoski, Thomas Jeffrey, Kurt W. Wisner, Lauren T. Sybert, and Carol A. Bauer. 2012. "Bilateral Dorsal Cochlear Nucleus Lesions Prevent Acoustic-Trauma Induced Tinnitus in an Animal Model." *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*.

- Burian, Martin and Wolfgang Gstoettner. 1988. "Projection of Primary Vestibular Afferent Fibres to the Cochlear Nucleus in the Guinea Pig." *Neuroscience Letters*.
- Butt, S., F. Ashraf, L. A. Porter, and H. Zhang. 2016. "Sodium Salicylate Reduces the Level of GABAB Receptors in the Rat's Inferior Colliculus." *Neuroscience*.
- Caicedo, Alejandro and Horst Herbert. 1993. "Topography of Descending Projections from the Inferior Colliculus to Auditory Brainstem Nuclei in the Rat." *Journal of Comparative Neurology*.
- Carlin, R. E., D. J. McGraw, and C. B. Anderson. 1997. "Objective Tinnitus Resulting from Internal Carotid Artery Stenosis." *Journal of Vascular Surgery* 25(3):581–83.
- Charara, A., J. F. Pare, A. I. Levey, and Y. Smith. 2005. "Synaptic and Extrasynaptic GABA-A and GABA-B Receptors in the Globus Pallidus: An Electron Microscopic Immunogold Analysis in Monkeys." *Neuroscience* 131(4):917–33.
- Chen G, Lee C, Sandridge SA, Butler HM, Manzoor NF, Kaltenbach JA 2013. "Behavioral Evidence for Possible Simultaneous Induction of Hyperacusis and Tinnitus Following Intense Sound Exposure." *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 14(3):413–24.
- Chen, G. and a N. van den Pol. 1998. "Presynaptic GABAB Autoreceptor Modulation of P/Q-Type Calcium Channels and GABA Release in Rat Suprachiasmatic Nucleus Neurons." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
- Clark, J. A., E. Mezey, A. S. Lam, and T. I. Bonner. 2000. "Distribution of the GABA(B) Receptor Subunit Gb2 in Rat CNS." *Brain Research*.
- Couve A, Kittler JT, Uren JM, Calver AR, Pangalos MN, Walsh FS, Moss SJ. 2001. "Association of GABABreceptors and Members of the 14-3-3 Family of Signaling Proteins." *Molecular and Cellular Neuroscience*.
- Craig, Michael T., Elizabeth W. Mayne, Bernhard Bettler, Ole Paulsen, and Chris J. Mcbain. 2013. "Distinct Roles of GABAB1a- and GABAB1b-Containing GABABreceptors in Spontaneous and Evoked Termination of Persistent Cortical Activity." *Journal of Physiology*.

- * Dolphin, Annette C. 2003. "G Protein Modulation of Voltage-Gated Calcium Channels." *Pharmacological Reviews*.
- Dong, Songyu, Wilhelmina H. A. M. Mulders, Jennifer Rodger, Samantha Woo, and Donald Robertson. 2010. "Acoustic Trauma Evokes Hyperactivity and Changes in Gene Expression in Guinea-Pig Auditory Brainstem." *European Journal of Neuroscience*.
- * Druga, Rastislav. 2009. "Neocortical Inhibitory System." *Folia Biologica* 55(6):201–17.
- * Eggermont, Jos J. 2008. "The Role of Sound in Adult and Developmental Auditory Cortical Plasticity." *Ear and Hearing*.
- Eggermont, Jos J. and Mutsumi Kenmochi. 1998. "Salicylate and Quinine Selectively Increase Spontaneous Firing Rates in Secondary Auditory Cortex." *Hearing Research* 117(1–2):149–60.
- Finlayson, Paul G. and James A. Kaltenbach. 2009. "Alterations in the Spontaneous Discharge Patterns of Single Units in the Dorsal Cochlear Nucleus Following Intense Sound Exposure." *Hearing Research* 256(1–2):104–17.
- * Freund, Tamás F. and István Katona. 2007. "Perisomatic Inhibition." *Neuron* 56(1):33–42.
- Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. 1999. "GABA_B - Receptor Splice Variants GB1a and GB1b in Rat Brain: Developmental Regulation, Cellular Distribution and Extrasynaptic Localization." *European Journal of Neuroscience*
- Froestl, Stuart J. Mickel, Roger G. Hall, Georg von Sprecher, Dietrich Strub, Peter A. Baumann, Felix Brugger, Conrad Gentsch, Joachim Jaekel, and Helmut Bittiger 1995. "Phosphinic Acid Analogs of GABA. 1. New Potent and Selective GABAB Agonists." *Journal of Medicinal Chemistry*.
- Fubara, B. M., J. H. Casseday, E. Covey, and R. D. Schwartz-Bloom. 1996. "Distribution of GABAA, GABAB, and Glycine Receptors in the Central Auditory System of the Big Brown Bat, *Eptesicus Fuscus*." *The Journal of Comparative Neurology*.
- Fukumoto, K., Tamada, K., Toya, T., Nishino, T., Yanagawa, Y., & Takumi, T. (2018). Identification of genes regulating GABAergic interneuron maturation. *Neuroscience Research*.

- * Gaiarsa, Jean-Luc and Christophe Porcher. 2013. "Emerging Neurotrophic Role of GABAB Receptors in Neuronal Circuit Development." *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- * Galazyuk, Alexander and Sylvie Hébert. 2015. "Gap-Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Reflex (GPIAS) for Tinnitus Assessment: Current Status and Future Directions." *Frontiers in Neurology* 6(April).
- Galvez Thierry, Marie-Laure Parmentier, Cécile Joly, Barbara Malitschek, Klemens Kaupmann, Rainer Kuhn, Helmut Bittiger, Wolfgang Froestl, Bernhard Bettler and Jean-Philippe Pin. 1999. "Mutagenesis and Modeling of the GABA(B) Receptor Extracellular Domain Support a Venus Flytrap Mechanism for Ligand Binding." *Journal of Biological Chemistry*.
- * Gassmann, Martin and Bernhard Bettler. 2012. "Regulation of Neuronal GABAB Receptor Functions by Subunit Composition." *Nature Reviews Neuroscience* 13(6):380–94..
- Golding, Nace L. and Donata Oertel. 1996. "Context-Dependent Synaptic Action of Glycinergic and GABAergic Inputs in the Dorsal Cochlear Nucleus." *Journal of Neuroscience*.
- Golding, Nace L. and Donata Oertel. 1997. "Physiological Identification of the Targets of Cartwheel Cells in the Dorsal Cochlear Nucleus." *Journal of Neurophysiology*.
- Guillon, Matthieu J, Caston J, Ruel J, Johnson RM, Pujol R, Puel JL. 2003. "Salicylate Induces Tinnitus through Activation of Cochlear NMDA Receptors." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
- Hannan, Saad, Megan E. Wilkins, and Trevor G. Smart. 2012. "Sushi Domains Confer Distinct Trafficking Profiles on GABA_B Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Harayama, Nobuya Izumi Shibuya, Keiko Tanaka, Narutoshi Kabashima, Yoichi Ueta, and Hiroshi Yamashita 1998. "Inhibition of N- and P/Q-Type Calcium Channels by Postsynaptic GABA(B) Receptor Activation in Rat Supraoptic Neurons." *Journal of Physiology*.
- Havlickova, Michaela Prezeau L, Duthey B, Bettler B, Pin JP, Blahos J. 2002. "The Intracellular

Loops of the GB2 Subunit Are Crucial for G-Protein Coupling of the Heteromeric Gamma-Aminobutyrate B Receptor." *Molecular Pharmacology*.

Hickox, A. E. and M. C. Liberman. 2014. "Is Noise-Induced Cochlear Neuropathy Key to the Generation of Hyperacusis or Tinnitus?" *Journal of Neurophysiology* 111(3):552–64.

* Huang, Yunhong and Amantha Thathiah. 2015. "Regulation of Neuronal Communication by G Protein-Coupled Receptors." *FEBS Letters*.

Ivankova, Klara, Turecek R, Fritzius T, Seddik R, Prezeau L, Comps-Agrar L, Pin JP, Fakler B, Besseyrias V, Gassmann M, Bettler B. 2013. "Up-Regulation of GABAB Receptor Signaling by Constitutive Assembly with the K⁺ Channel Tetramerization Domain-Containing Protein 12 (KCTD12)." *Journal of Biological Chemistry*.

Jamal, L., H. Zhang, P. G. Finlayson, L. A. Porter, and H. Zhang. 2011. "The Level and Distribution of the GABABR2 Receptor Subunit in the Rat's Central Auditory System." *Neuroscience* 181:243–56.

Jastreboff, Pawel J., James F. Brennan, John K. Coleman, and Clarence T. Sasaki. 1988. "Phantom Auditory Sensation in Rats: An Animal Model for Tinnitus." *Behavioral Neuroscience* 102(6):811–22.

Jiang, X. Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS. 2016. "Principles of Connectivity among Morphologically Defined Cell Types in Adult Neocortex." *Science* 353(6304):1108–1108.

Jin, Yong Ming, Donald A. Godfrey, Jie Wang, and James A. Kaltenbach. 2006. "Effects of Intense Tone Exposure on Choline Acetyltransferase Activity in the Hamster Cochlear Nucleus." *Hearing Research*.

* Jos J. Eggermont and Larry E. Roberts. 2004. "The Neuroscience of Tinnitus." *Trends in Neurosciences* 27(November).

Kakehata, S. and J. Santos-Sacchi. 1996. "Effects of Salicylate and Lanthanides on Outer Hair Cell Motility and Associated Gating Charge." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16(16):4881–89.

Kaltenbach, James A., Judith M. Czaja, and Christopher R. Kaplan. 1992. "Changes in the

Tonotopic Map of the Dorsal Cochlear Nucleus Following Induction of Cochlear Lesions by Exposure to Intense Sound." *Hearing Research* 59(2):213–23.

* Kanold, Patrick O., Israel Nelken, and Daniel B. Polley. 2014. "Local versus Global Scales of Organization in Auditory Cortex." *Trends in Neurosciences* 37(9):502–10.

Kato, Hiroyuki K., Samuel K. Asinof, and Jeffry S. Isaacson. 2017. "Network-Level Control of Frequency Tuning in Auditory Cortex." *Neuron* 95(2):412–423.e4.

Kaupmann, K. Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. 1998. "GABA(B)-Receptor Subtypes Assemble into Functional Heteromeric Complexes." *Nature*.

Kaupmann, Klemens Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B 1997. "Expression Cloning of GABA(B) Receptors Uncovers Similarity to Metabotropic Glutamate Receptors." *Nature*.

Knight, A. R. and N. G. Bowery. 1996. "The Pharmacology of Adenylyl Cyclase Modulation by GABA(B) Receptors in Rat Brain Slices." *Neuropharmacology*.

Kratz, Megan B. and Paul B. Manis. 2015. "Spatial Organization of Excitatory Synaptic Inputs to Layer 4 Neurons in Mouse Primary Auditory Cortex." *Frontiers in Neural Circuits* 9(April):1–17.

Kulik, Ákos Nakadate K, Nyíri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R 2002. "Distinct Localization of GABAB Receptors Relative to Synaptic Sites in the Rat Cerebellum and Ventrobasal Thalamus." *European Journal of Neuroscience* 15(2):291–307.

Kumagai, M. 1992. "Effect of Intravenous Injection of Aspirin on the Cochlea." *Hokkaido Igaku Zasshi* 67(2):216–33.

Lee, S., J. Hjerling-Leffler, E. Zagha, G. Fishell, and B. Rudy. 2010. "The Largest Group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors." *Journal of Neuroscience*.

Li, Melody Milligan CJ, Wang H, Walker A, Churilov L, Lawrence AJ, Reid CA, Hopkins SC, Petrou S 2017. "KCTD12 Modulation of GABA(B) Receptor Function." *Pharmacology*

Research and Perspectives.

- Lieberman, M. Charles and Nelson Y. S. Kiang. 1978. "Acoustic Trauma in Cats. Cochlear Pathology and Auditory-Nerve Activity." *Acta Oto-Laryngologica Supplement*
- Liu, Ji, Matthew R. Whiteway, Daniel A. Butts, and Patrick O. Kanold. 2017. "Spatial Organization of the Mouse Auditory Cortex to Sound Dynamics." 1(301).
- Liu, Junxiu Li X, Wang L, Dong Y, Han H, Liu G. 2003. "Effects of Salicylate on Serotonergic Activities in Rat Inferior Colliculus and Auditory Cortex." *Hearing Research* 175(SUPPL.):45–53.
- Liu, Yan-xing Li XP, Liu JX, Shi GM, Lu H, Ma CS. 2005. "Inhibition of Salicylate on Potassium Channels in Rat Inferior Colliculus Neurons." *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi = Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*
- Liu, Yanxing, Xuepei Li, Changsheng Ma, Junxiu Liu, and Hong Lu. 2005. "Salicylate Blocks L-Type Calcium Channels in Rat Inferior Colliculus Neurons." *Hearing Research* 205(1–2):271–76.
- * Liu, Zhepeng, Yaqian Xiang, and Guihong Sun. 2013. "The KCTD Family of Proteins: Structure, Function, Disease Relevance." *Cell & Bioscience*.
- Llano, D. A., J. Turner, and D. M. Caspary. 2012. "Diminished Cortical Inhibition in an Aging Mouse Model of Chronic Tinnitus." *Journal of Neuroscience*
- Lobarinas, Edward, Sarah H. Hayes, and Brian L. Allman. 2013. "The Gap-Startle Paradigm for Tinnitus Screening in Animal Models: Limitations and Optimization." *Hearing Research* 295:150–60.
- Longenecker, Ryan J. and Alexander V. Galazyuk. 2011. "Development of Tinnitus in CBA/Cal Mice Following Sound Exposure." *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 12(5):647–58.
- Luján, Rafael, Ryuichi Shigemoto, Akos Kulik, and José M. Juiz. 2004. "Localization of the GABAB Receptor 1a/b Subunit Relative to Glutamatergic Synapses in the Dorsal Cochlear Nucleus of the Rat." *The Journal of Comparative Neurology*.
- Ma, Wei Li Diana, Hiroshi Hidaka, and Bradford J. May. 2006. "Spontaneous Activity in the

- Inferior Colliculus of CBA/J Mice after Manipulations That Induce Tinnitus." *Hearing Research* 212(1–2):9–21.
- Malmierca, Manuel S., Miguel A. Merchán, Craig K. Henkel, and Douglas L. Oliver. 2002. "Direct Projections from Cochlear Nuclear Complex to Auditory Thalamus in the Rat." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
- Mancilla, J. G. and P. B. Manis. 2009. "Two Distinct Types of Inhibition Mediated by Cartwheel Cells in the Dorsal Cochlear Nucleus." *Journal of Neurophysiology*.
- Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 2001. "Ligand-Induced Signal Transduction within Heterodimeric GABA(B) Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Margeta-Mitrovic, Marta, Yuh Nung Jan, and Lily Yeh Jan. 2000. "A Trafficking Checkpoint Controls GABA(B) Receptor Heterodimerization." *Neuron*.
- Maurel, Damien Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, Bazin H, Tinel N, Durroux T, Prézeau L, Trinquet E, Pin JP. 2008. "Cell-Surface Protein-Protein Interaction Analysis with Time-Resolved FRET and Snap-Tag Technologies: Application to GPCR Oligomerization." *Nature Methods*.
- Meng, GAO. Xiu You, Fang; Shuang, Feng; Ren Jun, Wang; Li Li, Deng; Ji Ping, Su. 2012. "Salicylate Enhances Expression and Function of NMDA Receptors in Cochlear Spiral Ganglion Neurons." *Journal of Otology*
- Meng, Xiangying, Daniel E. Winkowski, Joseph P. Y. Kao, and Patrick O. Kanold. 2017. "Sublaminar Subdivision of Mouse Auditory Cortex Layer 2/3 Based on Functional Translaminar Connections." *The Journal of Neuroscience*.
- Metz, Michaela, Martin Gassmann, Bernd Fakler, Nicole Schaeren-Wiemers, and Bernhard Bettler. 2011. "Distribution of the Auxiliary GABAB Receptor Subunits KCTD8, 12, 12b, and 16 in the Mouse Brain." *Journal of Comparative Neurology* 519(8):1435–54.
- Milbrandt, J. C., T. M. Holder, M. C. Wilson, R. J. Salvi, and D. M. Caspary. 2000. "GAD Levels and Muscimol Binding in Rat Inferior Colliculus Following Acoustic Trauma." *Hearing Research*.

- Miyoshi, G. Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, 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." *Journal of Neuroscience*.
- * Møller, Aage R. 2003. "Pathophysiology of Tinnitus." *Otolaryngologic Clinics of North America* 36(2):249–66.
- * Møller, Aage R. 2016. "Sensorineural Tinnitus: Its Pathology and Probable Therapies." *International Journal of Otolaryngology*.
- Mugnaini, E., W. B. Warr, and K. K. Osen. 1980. "Distribution and Light Microscopic Features of Granule Cells in the Cochlear Nuclei of Cat, Rat, and Mouse." *The Journal of Comparative Neurology*.
- Mulheran, Michael. 1999. "The Effects of Quinine on Cochlear Nerve Fibre Activity in the Guinea Pig." *Hearing Research* 134(1–2):145–52.
- Müller, Marcus, Rainer Klinke, Wolfgang Arnold, and Elmar Oestreicher. 2003. "Auditory Nerve Fibre Responses to Salicylate Revisited." *Hearing Research* 183(1–2):37–43.
- Noreña, A. J. and J. J. Eggermont. 2003. "Changes in Spontaneous Neural Activity Immediately after an Acoustic Trauma: Implications for Neural Correlates of Tinnitus." *Hearing Research* 183(1–2):137–53.
- * Oertel, Donata and Eric D. Young. 2004. "What's a Cerebellar Circuit Doing in the Auditory System?" *Trends in Neurosciences*.
- Ohlrogge, Matthias, John R. Doucet, and David K. Ryugo. 2001. "Projections of the Pontine Nuclei to the Cochlear Nucleus in Rats." *Journal of Comparative Neurology*.
- Olianas, M. C. and P. Onali. 1999. "GABA(B) Receptor-Mediated Stimulation of Adenylyl Cyclase Activity in Membranes of Rat Olfactory Bulb." *British Journal of Pharmacology*.
- * Padgett, Claire L. and Paul A. Slesinger. 2010. "GABAB Receptor Coupling to G-Proteins and Ion Channels." *Advances in Pharmacology*.
- * Padgett, Claire L. and Paul A. Slesinger. 2010. *GABAB Receptor Pharmacology - A Tribute to Norman Bowery*.

- Parham, K. and D. O. Kim. 1995. "Spontaneous and Sound-Evoked Discharge Characteristics of Complex-Spiking Neurons in the Dorsal Cochlear Nucleus of the Unanesthetized Decerebrate Cat." *Journal of Neurophysiology*.
- Patel, Chirag R. and Huiming Zhang. 2014. "Local Application of Sodium Salicylate Enhances Auditory Responses in the Rat's Dorsal Cortex of the Inferior Colliculus." *Frontiers in Neurology* 5(NOV):1–15.
- Peng, Ben Gang, Shanping Chen, and Xi Lin. 2003. "Aspirin Selectively Augmented N-Methyl-D-Aspartate Types of Glutamate Responses in Cultured Spiral Ganglion Neurons of Mice." *Neuroscience Letters* 343(1):21–24.
- Pinkas, Daniel M. Sanvitale CE, Bufton JC, Sorrell FJ, Solcan N, Chalk R, Douth J, Bullock AN 2017. "Structural Complexity in the KCTD Family of Cullin3-Dependent E3 Ubiquitin Ligases." *Biochemical Journal*.
- Pontier, Stéphanie M. Nicolas Lahaie, Rachel Ginham, Fannie St-Gelais, Hélène Bonin, David J Bell, Helen Flynn, Louis-Eric Trudeau, Jeffrey McIlhinney, Julia H White, and Michel Bouvier. 2006. "Coordinated Action of NSF and PKC Regulates GABABreceptor Signaling Efficacy." *EMBO Journal*.
- Rajalu, Fritzius T, Adelfinger L, Jacquier V, Besseyrias V, Gassmann M, Bettler B. 2015. "Pharmacological Characterization of GABABreceptor Subtypes Assembled with Auxiliary KCTD Subunits." *Neuropharmacology*.
- Reuveny, Eitan Slesinger PA, Inglese J, Morales JM, Iñiguez-Lluhi JA, Lefkowitz RJ, Bourne HR, Jan YN, Jan LY. 1994. "Activation of the Cloned Muscarinic Potassium Channel by G Protein By Subunits." *Nature*.
- Robbins, M. J. Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN. 2001. "GABA(B2) Is Essential for G-Protein Coupling of the GABA(B) Receptor Heterodimer." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
- Ropp, Tessa Jonne F., Kerrie L. Tiedemann, Eric D. Young, and Bradford J. May. 2014. "Effects of Unilateral Acoustic Trauma on Tinnitus-Related Spontaneous Activity in the Inferior Colliculus." *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*

- Ryugo, D. K. and F. H. Willard. 1985. "The Dorsal Cochlear Nucleus of the Mouse: A Light Microscopic Analysis of Neurons That Project to the Inferior Colliculus." *The Journal of Comparative Neurology*.
- Sand, P. B. Langguth, J. Itzhacki, A. Bauer, S. Geis, Z. E. Cárdenas-Conejo, V. Pimentel, and T. Kleinjung. 2012. "Resequencing of the Auxiliary GABAB Receptor Subunit Gene KCTD12 in Chronic Tinnitus." *Frontiers in Systems Neuroscience*.
- Scholl, Ben and Michael Wehr. 2008. "Disruption of Balanced Cortical Excitation and Inhibition by Acoustic Trauma." *Journal of Neurophysiology*.
- Schwenk, Jochen Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B. 2010. "Native GABAB Receptors Are Heteromultimers with a Family of Auxiliary Subunits." *Nature* 465(7295):231–35.
- Sederholm, Fredrik and Michael D. B. Swedberg. 2013. "Establishment of Auditory Discrimination and Detection of Tinnitus Induced by Salicylic Acid and Intense Tone Exposure in the Rat." *Brain Research* 1510:48–62.
- Shargorodsky, Josef, Gary C. Curhan, and Wildon R. Farwell. 2010. "Prevalence and Characteristics of Tinnitus among US Adults." *American Journal of Medicine*
- * Shore, Susan, Jianxun Zhou, and Seth Koehler. 2007. "Neural Mechanisms Underlying Somatic Tinnitus." *Progress in Brain Research*.
- Singer, Wibke Zuccotti A, Jaumann M, Lee SC, Panford-Walsh R, Xiong H, Zimmermann U, Franz C, Geisler HS, Köpschall I, Rohbock K, Varakina K, Verpoorten S, Reinbothe T, Schimmang T, Rüttiger L, Knipper M. 2013. "Noise-Induced Inner Hair Cell Ribbon Loss Disturbs Central Arc Mobilization: A Novel Molecular Paradigm for Understanding Tinnitus." *Molecular Neurobiology* 47(1):261–79.
- * Smith, Paul F., Yiwen Zheng, and Cynthia L. Darlington. 2012. "Revisiting Baclofen for the Treatment of Severe Chronic Tinnitus." *Frontiers in Neurology* MAR(March):1–2.
- Smith, Philip H. and William S. Rhode. 1985. "Electron Microscopic Features of Physiologically Characterized, HRP-labeled Fusiform Cells in the Cat Dorsal Cochlear

- Nucleus." *Journal of Comparative Neurology*.
- Stolzberg, Daniel, Richard J. Salvi, and Brian L. Allman. 2012. "Salicylate Toxicity Model of Tinnitus." *Frontiers in Systems Neuroscience* 6.
- Szczepaniak, William S. and Aage R. Møller. 1996. "Effects of (-)-Baclofen, Clonazepam, and Diazepam on Tone Exposure- Induced Hyperexcitability of the Inferior Colliculus in the Rat: Possible Therapeutic Implications for Pharmacological Management of Tinnitus and Hyperacusis." *Hearing Research* 97(1–2):46–53.
- Takamori, S., J. S. Rhee, C. Rosenmund, and R. Jahn. 2000. "Identification of a Vesicular Glutamate Transporter That Defines a Glutamatergic Phenotype in Neurons." *Nature* 407(6801):189–94.
- Taniguchi, Hiroki, Jiangteng Lu, and Z. Josh Huang. 2013. "The Spatial and Temporal Origin of Chandelier Cells in Mouse Neocortex." *Science*.
- Terrence, Christopher F., Martin Sax, Gerhard H. Fromm, Chang Hwan Chang, and C. S. Yoo. 1983. "Effect of Baclofen Enantiomorphs on the Spinal Trigeminal Nucleus and Steric Similarities of Carbamazepine." *Pharmacology*.
- Tiao, Jim Y. Bradaia A, Biermann B, Kaupmann K, Metz M, Haller C, Rolink AG, Pless E, Barlow PN, Gassmann M, Bettler B. 2008. "The Sushi Domains of Secreted GABAB1 Isoforms Selectively Impair GABAB Heteroreceptor Function." *Journal of Biological Chemistry*.
- * Tremblay, Robin, Soohyun Lee, and Bernardo Rudy. 2016. "GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits." *Neuron* 91(2):260–92.
- Turecek, Rostislav Schwenk J, Fritzius T, Ivankova K, Zolles G, Adelfinger L, Jacquier V, Besseyrias V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B. 2014. "Auxiliary GABAB Receptor Subunits Uncouple G Protein By Subunits from Effector Channels to Induce Desensitization." *Neuron* 82(5):1032–44.
- Turner, Jeremy G. Brozoski TJ, Bauer CA, Parrish JL, Myers K, Hughes LF, Caspary DM. 2006. "Gap Detection Deficits in Rats with Tinnitus: A Potential Novel Screening Tool." *Behavioral Neuroscience* 120(1):188–95.
- Wallhäusser-Franke, E., S. Braun, and G. Langner. 1996. "Salicylate Alters 2-DG Uptake in the

- Auditory System: A Model for Tinnitus?" *NeuroReport* 7(10):1585–88.
- Wang, H. Brozoski TJ, Turner JG, Ling L, Parrish JL, Hughes LF, Caspary DM. 2009. "Plasticity at Glycinergic Synapses in Dorsal Cochlear Nucleus of Rats with Behavioral Evidence of Tinnitus." *Neuroscience* 164(2):747–59.
- Wang, Xin Xing Jin Y, Luo B, Sun JW, Zhang J, Wang M, Chen L. 2016. "Sodium Salicylate Potentiates the GABAB-GIRK Pathway to Suppress Rebound Depolarization in Neurons of the Rat's Medial Geniculate Body." *Hearing Research* 332:104–12.
- Weinberg, R. J. and A. Rustioni. 1987. "A Cuneocochlear Pathway in the Rat." *Neuroscience*.
- Westerberg, B. D., J. B. Jr Roberson, and B. A. Stach. 1996. "A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Baclofen in the Treatment of Tinnitus." *The American Journal of Otology*.
- * Winer, Jeffery A. and Charles C. Lee. 2007. "The Distributed Auditory Cortex." *Hearing Research* 229(1–2):3–13.
- * Winer, Jeffery A. and Christoph E. Schreiner. 2011. *The Auditory Cortex*.
- Winkowski, D. E. and P. O. Kanold. 2013. "Laminar Transformation of Frequency Organization in Auditory Cortex." *Journal of Neuroscience* 33(4):1498–1508.
- Xu, Han, Hyo Young Jeong, Robin Tremblay, and Bernardo Rudy. 2013. "Neocortical Somatostatin-Expressing GABAergic Interneurons Disinhibit the Thalamorecipient Layer 4." *Neuron*.
- Yang, Guang, Lobarinas E, Zhang L, Turner J, Stolzberg D, Salvi R, Sun W. 2007. "Salicylate Induced Tinnitus: Behavioral Measures and Neural Activity in Auditory Cortex of Awake Rats." *Hearing Research* 226(1–2):244–53.
- * Yuste, Rafael. 2005. "Origin and Classification of Neocortical Interneurons." *Neuron*.
- Zarelli, Valeria E. and Igor B. Dawid. 2013. "Inhibition of Neural Crest Formation by Kctd15 Involves Regulation of Transcription Factor AP-2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Zhang, J. S. and J. a Kaltenbach. 1998. "Increases in Spontaneous Activity in the Dorsal

Cochlear Nucleus of the Rat Following Exposure to High-Intensity Sound.” *Neuroscience Letters*.

Zheng, Yiwen, Shweta Vagal, Emily McNamara, Cynthia L. Darlington, and Paul F. Smith. 2012. “A Dose-Response Analysis of the Effects of L-Baclofen on Chronic Tinnitus Caused by Acoustic Trauma in Rats.” *Neuropharmacology* 62(2):940–46.