

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Neurowissenschaften
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Arthur Konnerth)

**Der Piriforme Kortex als Schrittmacher
Früher Netzwerkoszillationen
im unreifen Mauskortex**

Johannes Bastian Fatke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Th. R. Tölle

Die Dissertation wurde am 28.04.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 01.02.2012
angenommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Während der Gehirnentwicklung tritt bei vielen verschiedenen Tierarten spontane neuronale Aktivität in unterschiedlichen Teilen des Nervensystems auf. Ein für das unreife Gehirn charakteristisches Aktivitätsmuster sind spontane Oszillationen der neuronalen Aktivität, die sich wellenähnlich über das gesamte Netzwerk ausbreiten. Diese sogenannten frühen Netzwerkoszillationen (engl. „*Early Network Oscillations*“, *ENOs*) spielen vermutlich in der Hirnentwicklung eine entscheidende Rolle.

Es ist bekannt, dass der piriforme Kortex, ein phylogenetisch alter Teil des Kortex, der sich im Vergleich zur übrigen Hirnrinde früh entwickelt, besonders zu spontaner oszillatorischer Aktivität neigt. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der piriforme Kortex im unreifen Gehirn der Maus auf seine Bedeutung für das Auftreten der ENOs untersucht.

In unterschiedlichen Hirnarealen fanden sich ENOs mit charakteristischen Frequenzen und in einer bestimmten zeitlichen Abfolge. Durch Kalzium-Imaging wurde gezeigt, dass im koronalen Schnittpräparat des jungen Mäusehirns innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen der piriforme Kortex das Kortexareal mit der höchsten Frequenz der ENOs ist. Mit einer zeitlichen Verzögerung von wenigen hundert Millisekunden zeigten sich Kalzium-Transienten in den unmittelbar angrenzenden Arealen der Amygdala und des perirhinalen Kortex. Die höchste Frequenz war am dritten Tag nach der Geburt (P3) zu beobachten. Im Lauf der Entwicklung traten ENOs mit abfallender Frequenz bis P12 auf. Sie ließen sich entweder durch Tetrodotoxin (TTX), einen Blocker spannungsabhängiger Natrium-Kanäle, oder eine Kombination aus Blockern der glutamatergen AMPA- und NMDA-Rezeptoren (CNQX und AP5) blockieren. Eine Blockade der GABAergen synaptischen Übertragung durch den GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin sowie eine alleinige Gabe von CNQX oder AP5 senkte die Frequenz der ENOs.

Die Übertragung der ENOs fand – ausgehend vom piriformen Kortex – hauptsächlich in eine Richtung statt. War der piriforme Kortex vom übrigen Hirngewebe isoliert, traten dort ENOs mit unverminderter Frequenz auf, während in der benachbarten Amygdala und im perirhinalen Kortex die Frequenz stark verringert war. Eine lokale Blockade der ENOs im piri-

piriformen Kortex durch TTX verringerte die Frequenz der ENOs in der Amygdala. Eine Blockade der ENOs in der Amygdala hatte hingegen keine Auswirkungen auf die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex. Darüberhinaus wurden mit GABA/Glutamat induzierte Kalzium-Transienten signifikant häufiger vom piriformen Kortex in die Amygdala übertragen als umgekehrt.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der piriforme Kortex als Schrittmacher intrinsische ENOs generiert, die sich aktiv in die Amygdala und den perirhinalen Kortex ausbreiten. Ihre Entstehung und Weiterleitung beruht auf Aktionspotentialaktivität und der erregenden synaptischen Wirkung von GABA und Glutamat.

Ein Manuskript mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird zur Publikation vorbereitet:

The piriform cortex as a pacemaker of early network oscillations in the immature mouse brain.

(Fatke, B., Holthoff, K., Marandi, N., Konnerth, K.)

ABSTRACT

During brain development spontaneous neuronal activity arises in different parts of the nervous system and has been found in a diverse set of species. Spontaneous oscillations of neuronal activity, propagating wave-like through the network, represent a characteristic activity pattern of the immature brain. These so-called *Early Network Oscillations* (ENOs) are likely to play a critical role in brain development.

A phylogenetically old part of the cortex, which develops early relative to the remainder of the cortex, is the piriform cortex. This area is prone to generate spontaneous oscillatory activity. This study investigated in this context the significance of the piriform cortex in the immature mouse brain for the occurrence of ENOs.

ENOs appeared in different brain areas with characteristic frequencies and in a distinct chronological pattern. Calcium imaging in a coronal slice preparation of the young mouse brain revealed ENOs within the first two postnatal weeks, with the piriform cortex displaying the highest frequency in the cortex. With a latency of a few hundred milliseconds, calcium transients appeared in adjacent areas of the amygdala and the perirhinal cortex. The highest frequency was recorded at the third postnatal day (P3). ENOs were detected until P12 with decreasing frequency. They were blocked by application of tetrodotoxin (TTX), a blocker of voltage-dependent sodium channels, or a combination of blockers of the glutamatergic AMPA- and NMDA-receptors (CNQX and AP5). A block of the GABAergic synaptic transmission by the GABA_A-receptor antagonist bicuculline as well as the application of CNQX or AP5 alone reduced the frequency of the ENOs.

Starting in the piriform cortex, ENOs were transmitted predominantly in one direction. Upon isolation of the piriform cortex from other tissue ENOs were detected in the piriform cortex with unchanged frequency, whereas both in the amygdala and in the perirhinal cortex the frequency was markedly reduced. The frequency in the amygdala was also reduced by local TTX block in the piriform cortex; local TTX block in the amygdala, however, did not alter the frequency of ENOs in the piriform cortex. A significantly higher proportion of calcium transients, induced by local application of GABA/glutamate, was transmitted from the piriform cortex to the amygdala than vice versa.

Thus, the piriform cortex generates intrinsic ENOs, which propagate actively into the amygdala and the perirhinal cortex. Their occurrence and propagation rely on firing of action potentials and require excitatory synaptic transmission of GABA and glutamate.

A manuscript with the data of this thesis is being prepared for publication:

The piriform cortex as a pacemaker of early network oscillations in the immature mouse brain.

(Fatke, B., Holthoff, K., Marandi, N., Konnerth, K.)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	3
INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGEN	7
1 EINLEITUNG	11
1.1 ENTWICKLUNG DES NEOKORTEX	11
1.2 ENTWICKLUNG SUBKORTIKALER HIRNREGIONEN	12
1.3 ANATOMIE UND ENTWICKLUNG DES PIRIFORMEN KORTEX	12
1.4 WIRKUNG VON GLUTAMAT UND γ -AMINOBUTTERSÄURE IM UNREIFEN GEHIRN	15
1.5 DIE BEDEUTUNG NEURONALER AKTIVITÄT IN DER HIRNENTWICKLUNG	17
1.6 NEURONALE AKTIVITÄT IM PIRIFORMEN KORTEX	19
1.7 FRAGESTELLUNG	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 TIERE	22
2.2 VORBEREITUNG DES GEWEBES	22
2.2.1 Hirnschnitte	22
2.2.2 Färbung der Hirnschnitte	23
2.3 VERSUCHSANORDNUNG UND -DURCHFÜHRUNG	24
2.3.1 Lösungen	24
2.3.1.1 Ringerlösungen	24
2.3.1.2 Pharmaka	25
2.3.2 Kalzium-Fluoreszenzmikroskopie im lebenden Hirngewebe	25
2.3.2.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1 AM	26
2.3.2.2 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	28
2.3.2.3 Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie	30
2.3.2.4 Das Zwei-Photonen-Laser-Scanning-System	31
2.3.2.5 Das Prinzip der Nipkow-Disk-Mikroskopie	33
2.3.2.6 Das Nipkow-Disk-Laser-Scanning-System	34
2.3.2.7 Objektive	36
2.4 DATENANALYSE	37

3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	FRÜHE NETZWERKOSZILLATIONEN IM HIRNSCHNITTPRÄPARAT DER MAUS	39
3.1.1	Frühe Netzwerkoszillationen im Kortex.....	39
3.1.2	Frühe Netzwerkoszillationen in subkortikalen Hirnarealen	43
3.2	INTRINSISCHE NETZWERKOSZILLATIONEN IM PIRIFORMEN KORTEX	46
3.2.1	Isolierung des piriformen Kortex.....	46
3.2.2	Schicht II des piriformen Kortex als Hauptentstehungsort	51
3.3	ANTEIL DER AN NETZWERKOSZILLATIONEN BETEILIGTEN NEURONEN.....	53
3.4	ALTERSPROFIL DER FRÜHEN NETZWERKOSZILLATIONEN	55
3.5	DEN NETZWERKOSZILLATIONEN ZUGRUNDE LIEGENDE MECHANISMEN.....	56
3.5.1	Aktionspotentiale als notwendige Bedingung für Netzwerkoszillationen	57
3.5.2	Glutamaterge synaptische Signalübertragung als notwendige Bedingung für Netzwerkoszillationen	58
3.5.3	Beteiligung von AMPA-Rezeptor-Aktivierung an der Entstehung der Netzwerkoszillationen	59
3.5.4	Beteiligung von NMDA-Rezeptor-Aktivierung an der Entstehung der Netzwerkoszillationen	60
3.5.5	Beitrag GABAerger Signaltransmission zur Entstehung von Netzwerkoszillationen	61
3.5.6	Entwicklungsabhängiger GABAerger Einfluss auf Netzwerkoszillationen.....	62
3.6	ZUSAMMENHANG DER FREQUENZEN DER NETZWERKOSZILLATIONEN IM PIRIFORMEN KORTEX UND IN DER AMYGDALA.....	63
3.6.1	Lokale Blockade der Netzwerkoszillationen	65
3.6.2	Übertragung lokal induzierter Netzwerkaktivität	68
4	DISKUSSION.....	71
4.1	FRÜHE NETZWERKOSZILLATIONEN IM MÄUSEHIRN.....	71
4.2	FRÜHE NETZWERKOSZILLATIONEN IM PIRIFORMEN KORTEX	73
4.3	SYNAPTISCHE MECHANISMEN DER NETZWERKOSZILLATIONEN	75
4.4	BEDEUTUNG FRÜHER NETZWERKOSZILLATIONEN IN DER HIRNENTWICKLUNG	80
4.5	MÖGLICHE KLINISCHE IMPLIKATIONEN	82
	LITERATURVERZEICHNIS	85
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	98
	DANK.....	99

ABKÜRZUNGEN

W_1	Ein-Photon-Absorptionsrate
W_2	Zwei-Photonen-Absorptionsrate
$\langle \phi \rangle$	durchschnittliche Photon-Fluss-Dichte
σ	Wirkungsquerschnitt für Ein-Photon-Absorption (engl. „ <i>one-photon-cross-section</i> “)
δ	Wirkungsquerschnitt für Zwei-Photonen-Absorption (engl. „ <i>two-photon-cross-section</i> “)
λ	Wellenlänge
Δf	Frequenzänderung
ΔF	Fluoreszenzänderung
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalzium-Ionen-Konzentration
$[Cl^-]_i$	intrazelluläre Chlorid-Konzentration
$^{\circ}C$	Grad Celsius
2PLSM	Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> (dt. „künstlicher Liquor“)
AF594	Alexa Fluor 594
AM-Ester	Acetoxymethyl-Ester
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AMY	Amygdala
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> (dt. etwa „aus dem Gehirn stammender neurotrophischer Faktor“)
C4	viertes zervikales Rückenmarksegment
CA1	Cornu ammonis (Region 1)
CA2	Cornu ammonis (Region 2)
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
CA3	Cornu ammonis (Region 3)
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>charge-coupled device</i> (dt. etwa „ladungsgespeichertes Bauteil“)
cENOs	<i>cortical Early Network Oscillations</i> (dt. „kortikale Frühe Netzwerkoszillationen“)

Cl ⁻	Chlorid-Ion
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Pedunculus cerebri
D-AP5	D-(2R)-amino-5-phosphonopentanoat
dF	Fluoreszenzänderung
DG	Gyrus dentatus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyriboNukleic acid</i> (dt. „Desoxyribonukleinsäure“)
E	embryonales Alter (in Tagen)
EEG	Elektroencephalogramm
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraacetat
ENOs	<i>Early Network Oscillations</i> (dt. „Frühe Netzwerkoszillationen“)
f	Frequenz
F	Fluoreszenz
F ₀	Fluoreszenzgrundwert
fs	Femtosekunde(n)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDPs	<i>Giant Depolarizing Potentials</i> (dt. „depolarisierende Riesenpotentiale“)
HCO ₃ ⁻	Hydrogenkarbonat-Ion
HeLa-Zellen	permanente Zelllinie von Epithelzellen des Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks
HP	Hippocampus
HTN	hypothalamische Nuklei
Hz	Hertz
IR	infrarot
K ⁺	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
kHz	Kilohertz
KLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
KNM	konfokale Nipkow-Disk-Mikroskopie
kW	Kilowatt

LG	Nucleus geniculatus lateralis
m/s	Meter pro Sekunde
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
min.	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	millimolar
mm/s	Millimeter pro Sekunde
mosm/l	Milliosmol pro Liter
ms	Millisekunde(n)
MTH	Tractus mamillothalamicus
MTN	mediale thalamische Nuklei
NA	numerische Apertur
Na ²⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
OC	okzipitaler Kortex
OG-1 AM	Oregon Green 488 BAPTA-1 Acetoxymethyl-Ester
P	postnatales Alter (in Tagen)
p(t)	p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit für gepaarten Zweistichproben-t-Test)
PA	parietaler Kortex
PIR	piriformer Kortex
PMT	Photomultiplier
PR	perirhinaler Kortex
psi	<i>pound(s) per square inch</i> (Maßeinheit des Drucks, dt.: „Pfund pro Quadratzoll, 1 psi ≈ 69 Millibar)

ROI(s)	<i>region(s) of interest</i> (dt. „interessierender Bereich“, Messregion zur Auswertung des Signals)
RS	retrosplenialer Kortex
s	Sekunde(n)
S ₀	energetischer Grundzustand eines Moleküls
S ₁	energetisch angeregter Zustand eines Moleküls
SAT	<i>spontaneous activity transients</i> (dt. „spontane Aktivitätstransienten“)
SSA	<i>synchronized spontaneous activity</i> (dt. „synchrone spontane Aktivität“)
SU	Subiculum
TE	temporaler Kortex
TiSa-Laser	Titan:Saphir-Laser
TTX	Tetrodotoxin
U/min.	Umdrehung(en) pro Minute
UV	ultraviolett
VTN	ventrale thalamische Nuklei
W	Watt
μM	mikromolar
μm	Mikrometer

1 EINLEITUNG

Im Gehirn von Säugetieren treten in den ersten postnatalen Tagen spontane Aktivitätswellen in Form weiträumiger neuronaler Netzwerkoszillationen auf. Sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle beim Aufbau synaptischer Verbindungen im sich entwickelnden Gehirn. Der piriforme Kortex ist ein Gehirnareal, das sich vergleichsweise früh entwickelt und dazu neigt, spontane oszillatorische Aktivität zu erzeugen. Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Charakterisierung der postnatalen spontanen neuronalen Oszillationen, sogenannter früher Netzwerkoszillationen (engl. „*Early Network Oscillations*“; ENOs), im piriformen Kortex der Maus sowie die Analyse ihrer Beziehung zu Netzwerkoszillationen in benachbarten Gehirnarealen. Einleitend sollen der Stand der Forschung zusammengefasst sowie Ausgangspunkt und Fragestellung der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Dabei werden einige Prinzipien der Gehirnentwicklung bei Nagern vorgestellt mit Berücksichtigung möglicher physiologischer Funktionen spontaner neuronaler Aktivität im unreifen Gehirn.

1.1 Entwicklung des Neokortex

Die Entwicklung des Gehirns fußt auf einer komplexen Sequenz von zeitlich überlagerten und sich gegenseitig beeinflussenden Ereignissen wie Neurogenese, neuronaler Migration, zellulärer Differenzierung und Entstehen sowie Rückbilden von Synapsen (Sidman und Rakic 1973; Allendoerfer und Shatz 1994; Price et al. 2006). Die Entstehung des Zentralen Nervensystem der Maus beginnt am Tag 7.5 der Embryonalentwicklung (E7.5) in der Neuralplatte (Cecchi und Boncinelli 2000). Die Neuronen des Neokortex der Maus entwickeln sich zwischen den Tagen 10 und 18 (E10–E18) (Caviness und Sidman 1973; Clancy et al. 2001). Dabei spielen komplexe Migrations- und Proliferationsprozesse eine Rolle, die verschiedene vorläufige Schichten neuronaler Gliederung entstehen lassen (Marin-Padilla 1971; Rickmann et al. 1977). Aus diesen beginnen sich gegen Ende der Embryonalzeit (E14–E18) die sechs Schichten des Neokortex zu entwickeln (Finlay und Darlington 1995; Clancy et al. 2001), womit dessen Entwicklung jedoch noch nicht abgeschlossen ist. In der ersten postnatalen Woche findet noch neuronale Migration in den Kortex statt (Molnar und Hannan 2000),

und erst um den achten postnatalen Tag (P8) ist die reife sechsschichtige Struktur vollständig ausgebildet (Price et al. 2006). Noch in den ersten Tagen bis Wochen nach der Geburt etablieren sich kortikokortikale Assoziationsfasern und thalamokortikale Verbindungen (Lopez-Bendito und Molnar 2003). Beispielsweise weisen im *barrel cortex* (dt. „Fässchen-Kortex“) der Ratte, einem spezialisierten Teil des somato-sensorischen Kortex, die Pyramidenzellen erst an P12 eine größtenteils ausgereifte Morphologie auf, und erst an P16 entsprechen ihre rezeptiven Felder dem reifen Stadium. Bis zu diesem Zeitpunkt hat sich die synaptische Dichte um das Fünffache vergrößert (Bureau et al. 2004).

1.2 Entwicklung subkortikaler Hirnregionen

Früher als die Neuronen des zerebralen Kortex entwickeln sich die Zellen subkortikaler Areale (Clancy et al. 2001). Die Proliferation der Neuronen verschiedener Hirnnervenkerne im Hirnstamm beginnt zwischen E9 und E10 und ist zwischen E13 und E14 praktisch abgeschlossen (Taber 1963; Taber Pierce 1967; Taber Pierce 1970; Clancy et al. 2001). Der Beginn der morphologischen Segmentierung im Zwischenhirn ist ab E9.5 zu beobachten (Martinez und Puelles 2000). Die Nervenzellen in den Regionen CA1 und CA2 des Hippocampus formieren sich hauptsächlich um E15 (Clancy et al. 2001), an E17 ist die Zellteilung weitestgehend abgeschlossen (Angevine 1964). Die Kerne der Amygdala entstehen zwischen E10 und E16, d.h. früher als die umgebenden Kortexareale (Sidman und Angevine 1962; McConnell 1975). Thalamokortikale Axone erreichen den Kortex ab E15, ihr charakteristisches Verzweigungsmuster ist jedoch erst um P6 bis P8 erkennbar (Molnar und Hannan 2000; Lopez-Bendito und Molnar 2003).

1.3 Anatomie und Entwicklung des piriformen Kortex

Innerhalb des zerebralen Kortex nimmt der piriforme Kortex bezüglich seiner Anatomie und seiner Entwicklung eine gesonderte Stellung ein, die in diesem Kapitel näher beschrieben werden soll.

Der piriforme Kortex ist ein Teil des Paläokortex, eines phylogenetisch älteren Teils des Gehirns (Litaudon et al. 1997a). Er gehört zum olfaktorischen System des Gehirns und wird aus diesem Grund auch als primärer olfaktorischer Kortex bezeichnet (Valverde 1998). Er befindet sich im ventrolateralen Telencephalon und besteht aus drei Schichten: Schicht I oder plexiforme Schicht, Schicht II oder oberflächliche Zellschicht (engl. „*superficial cellular layer*“) und Schicht III oder tiefe Zellschicht (engl. „*deep cellular layer*“) (Haberly und Price 1978a; Martinez et al. 1987).

Schicht I verläuft oberflächlich, direkt unterhalb der afferenten Fasern des lateralen olfaktorischen Trakts aus dem Bulbus olfactorius. Es werden zwei Unterschichten unterschieden: Schicht Ia wird gebildet aus myelinisierten Fasern, welche den piriformen Kortex aus dem lateralen olfaktorischen Trakt erreichen, und aus den distalen Anteilen der Dendriten von Nervenzellen aus Schicht II; Schicht Ib besteht aus intrinsischen kortikokortikalen Assoziationsfasern und aus parallel zur koronalen Ebene verlaufenden Dendriten der Neuronen aus Schicht II. Diese ist eine kompakte Zellschicht, welche vor allem aus Pyramidenzellen besteht, deren große apikale Dendriten in Richtung der Schicht I und der Hirnoberfläche orientiert sind. Ihre basalen Dendriten verlaufen in den tieferen Teil des piriformen Kortex. Schicht III ist schmaler und besitzt eine geringere Zelldichte als Schicht II. Das liegt an myelinisierten und nicht-myelinisierten Axonen, die dort, wenn auch in geringerem Maße als in Schicht I, vorhanden sind (Martinez et al. 1987; Litaudon et al. 1997a). Tiefergelegen von Schicht III befindet sich der endopiriforme Nukleus, der auch als mögliche Schicht IV des piriformen Kortex angesehen wird und zahlreiche reziproke Verbindungen mit dem darüberliegenden Paläokortex hat (Krettek und Price 1977a).

Der im piriformen Kortex am häufigsten anzutreffende Zelltyp ist die Pyramidenzelle. Sie ist in allen drei Schichten zu finden, hauptsächlich jedoch in den zellreichen Schichten II und III. Ihre apikalen Dendriten verzweigen sich in Schicht I, die basalen Dendriten verzweigen sich horizontal und vertikal in den Schichten II und III. Zudem wurden weitere Zelltypen wie semilunare, horizontale und multipolare Zellen beschrieben (Martinez et al. 1987; Litaudon et al. 1997a).

Eine wichtige Eigenschaft des anatomischen Aufbaus des piriformen Kortex ist sein dichtes Netzwerk intrinsischer Assoziationsfasern, das seinen Ursprung in den Axonen der Pyramidenzellen hat. Diese Axone und ihre Kollateralen können sich über beträchtliche

Distanzen im piriformen Kortex erstrecken. Sie verlaufen in Schicht III und formen dort Synapsen mit basalen Dendriten von Pyramidenzellen oder steigen auf in Schicht Ib, wo sie Synapsen mit apikalen Dendriten der Pyramidenzellen bilden (Litaudon et al. 1997a). Die intrinsischen Assoziationsfasern sind laminar angeordnet, und ihr Verlauf erstreckt sich vor allem in rostrocaudaler bzw. caudorostraler Richtung. Im Gegensatz also zum radialen Aufbau des Neokortex in Säulen ist für den piriformen Kortex die Organisation in tangentialer Ausrichtung von größerer Bedeutung (Haberly und Price 1978a; Luskin und Price 1983a; Luskin und Price 1983b; Datiche et al. 1996).

Zusätzlich zu intrinsischen Assoziationsfasern besitzt der piriforme Kortex eine Reihe von sowohl afferenten als auch efferenten Verbindungen mit anderen kortikalen und subkortikalen Arealen. Die wichtigsten Afferenzen kommen über den lateralen olfaktorischen Trakt aus dem Bulbus olfactorius. Andere Areale des olfaktorischen Systems, wie der Nukleus des lateralen olfaktorischen Trakts und das Tuberculum olfactorium, sind ebenfalls an der afferenten Innervation des piriformen Kortex beteiligt. Dieser erhält zudem Afferenzen aus umliegenden kortikalen Arealen wie dem perirhinalen Kortex und dem entorhinalen Kortex (Furtak et al. 2007). Von der Amygdala, die auch an olfaktorischer Informationsverarbeitung beteiligt ist, sowie von thalamischen Arealen und aus dem Hippocampus gehen gleichfalls afferente Fasern zum piriformen Kortex. Zu allen diesen Arealen sind vom piriformen Kortex ausgehende efferente Verbindungen beschrieben worden (Haberly und Price 1978b; Luskin und Price 1983a; Luskin und Price 1983b; Schwabe et al. 2004). Der piriforme Kortex zeigt also zahlreiche reziproke Verbindungen innerhalb des olfaktorischen Systems sowie zu anderen kortikalen und subkortikalen Arealen.

Aufgrund seiner Struktur sowie seiner hohen intrinsischen und extrinsischen Konnektivität ist die Hypothese formuliert worden, dass der piriforme Kortex die Funktion eines Assoziativspeichers (auch „inhaltsadressierbarer Speicher“, engl. „*content-addressable memory*“) erfüllt (Haberly 1985; Haberly 2001). *In vivo* wurden bei anästhesierten Ratten im piriformen Kortex nach assoziativem olfaktorischen Lernen dauerhafte Veränderungen synaptischer Antworten gemessen (Litaudon et al. 1997b).

Im Vergleich zum Neokortex findet die Ausbildung der Neuronen im piriformen Kortex etwas früher, zwischen E10 und E16, statt (Hinds und Angevine 1965; Derer et al. 1977). Die ersten im piriformen Kortex gebildeten Neuronen entsprechen den späteren Schichten I und

III. Bei Ratten wurde gezeigt, dass einige dieser Neuronen bereits an E12 ihr letztes Teilungsstadium erreicht haben (Valverde und Santacana 1994). Das entspricht E10 bei der Maus (Clancy et al. 2001). Etwas später entstehende Neuronen wandern zwischen diese Schichten und bilden die Schicht II (Derer et al. 1977). Während der Entwicklung des piriformen Kortex erscheinen die Neuronen reifer als jene in anderen, angrenzenden Arealen des Kortex zum selben Zeitpunkt. Das stimmt mit dem Befund überein, dass sich das olfaktorische System im Vergleich zu anderen kortikalen Regionen früh entwickelt (Creps 1974; Bossy 1980; Valverde und Santacana 1994). Die fortgeschrittene Reifung der Neuronen im piriformen Kortex könnte ihre Ursache in der frühen Ausbildung von Afferenzen aus dem Bulbus olfactorius über den lateralen olfaktorischen Trakt haben (Santacana et al. 1992; Valverde und Santacana 1994). Bei acht Tage alten Ratten (P8) hat der piriforme Kortex bereits seine reife Struktur mit voll entwickelten Pyramidenzellen ausgebildet (Valverde und Santacana 1994). Das entspricht etwa P6 in der Maus (Clancy et al. 2001). Die frühe Entwicklung des piriformen Kortex wird auch dadurch illustriert, dass schon bei drei Tage alten Ratten (P3; entsprechend P2 bei der Maus) seine funktionale Beteiligung an der Geruchsdetektion nachgewiesen werden konnte (Illig 2007).

1.4 Wirkung von Glutamat und γ -Aminobuttersäure im unreifen Gehirn

Für die Entwicklungsvorgänge im Gehirn sind die Neurotransmitter Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) von Bedeutung. Ihre Wirkung im unreifen Gehirn unterscheidet sich wesentlich von ihren Funktionen im erwachsenen Gehirn. Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im adulten Großhirn. Einer der beiden wichtigsten Subtypen der ionotropen Glutamatrezeptoren, der AMPA¹-Rezeptor, ist jedoch als funktioneller Rezeptor erst gegen Ende der ersten postnatalen Woche nachweisbar (Isaac et al. 1995; Durand et al. 1996). In der frühen postnatalen Phase existiert auf den glutamatergen Synapsen im Hippocampus der Ratte mit dem NMDA²-Rezeptor beinahe ausschließlich der zweite Subtyp

¹ α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure

² N-Methyl-D-Aspartat

ionotroper Glutamatrezeptoren (Cherubini et al. 1991a). NMDA-Rezeptoren sind beim Ruhepotential durch Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) blockiert, die Synapsen sind unter diesen Bedingungen sozusagen „stumm“ (Isaac et al. 1997; Feldman et al. 1999).

Funktionelle GABA-Rezeptoren gibt es schon früh in der Entwicklung. Im Gehirn von erwachsenen Säugetieren ist GABA der wichtigste hemmende Neurotransmitter. Ihre hyperpolarisierende Wirkung beruht hauptsächlich auf der Aktivierung des $GABA_A$ -Rezeptors, eines ligandenaktivierten Ionenkanals, der durchlässig für Chlorid- (Cl^-) und Bikarbonat- (HCO_3^-) Ionen ist. Im unreifen Gehirn hingegen wirkt GABA als erregender Neurotransmitter (Ben-Ari et al. 1989; Cherubini et al. 1990; Sipilä et al. 2005), da wegen der höheren intrazellulären Cl^- -Konzentration ($[Cl^-]_i$) in Neuronen in den ersten Tagen nach Geburt das Cl^- -Gleichgewichtspotential auf einem höheren (depolarisierteren) Niveau als das Ruhemembranpotential liegt (Ben-Ari 2002). Die hohe $[Cl^-]_i$ wird durch den Ionen-Kotransporter NKCC1 bewirkt (Ben-Ari et al. 2007), welcher ein Natrium-Ion (Na^+), ein Kalium-Ion (K^+) und zwei Cl^- in die Zelle befördert (Payne et al. 2003). NKCC1 wird vor allem in der frühen postnatalen Periode in unreifen Neuronen stark exprimiert (Yamada et al. 2004). Die Freisetzung von GABA kann daher zu einer Depolarisation der Zellmembran führen und über die Aktivierung spannungsabhängiger Kalzium-Ionen (Ca^{2+})-Kanäle eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Ionen-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge haben (Ben-Ari et al. 2007). Die Depolarisation genügt, um die spannungsabhängige Mg^{2+} -Blockade der NMDA-Kanäle aufzuheben. Die synergistische Wirkung von GABA und NMDA-Kanälen in der frühen Hirnentwicklung nimmt auf diese Weise eine Schlüsselstellung bei der Erzeugung neuronaler Aktivität im Netzwerk ein. GABA kann durch die Öffnung von Cl^- -Kanälen jedoch auch neuronale Aktivität hemmen, indem sie durch die Verminderung des Eingangswiderstandes die Wirkung erregender glutamaterger postsynaptischer Ströme auf das Membranpotential verringert (Ben-Ari 2002). Somit kann GABA in der frühen Entwicklung sowohl erregend als auch hemmend wirken (Khazipov et al. 2004). Neben der Funktion als Neurotransmitter hat GABA in der frühen Hirnentwicklung eine Vielzahl weiterer Effekte. So beeinflusst es beispielsweise die DNA-Synthese sowie die neuronale Migration und zeigt Eigenschaften eines Neurotrophins (Owens und Kriegstein 2002; Ben-Ari et al. 2007).

In der zweiten Woche der postnatalen Hirnentwicklung wird die Expression von NKCC1 herabreguliert (Yamada et al. 2004; Dzhala et al. 2005). Gleichzeitig wird der K^+/Cl^- -Kotransporter KCC2, welcher diese beiden Ionen aus der Zelle befördert, vermehrt exprimiert

(Rivera et al. 1999; Balakrishnan et al. 2003). Dadurch wird die $[Cl^-]_i$ gesenkt und das Cl^- -Gleichgewichtspotential in Richtung des Ruhemembranpotentials verschoben, was die depolarisierende Wirkung von GABA in eine hyperpolarisierende wandelt (Stein et al. 2004). Vermutlich hat GABA selbst Einfluss auf diesen Wechsel seiner eigenen Wirkung (Leitch et al. 2005).

1.5 Die Bedeutung neuronaler Aktivität in der Hirnentwicklung

Die Ausbildung des groben Grundmusters synaptischer Verbindungen im Gehirn von Säugetieren beruht vermutlich vor allem auf genetisch determinierten Mechanismen, die teilweise von neuronaler Aktivität unabhängig sind (Shatz 1990; Verhage et al. 2000). Feinjustierung und Spezifizierung funktionaler synaptischer Schaltkreise sind jedoch auf die Aktivität von Nervenzellen angewiesen (Goodman und Shatz 1993; Feller 1999). „Aktivität“ bedeutet in diesem Zusammenhang die Freisetzung erregender Neurotransmitter und das dadurch bedingte Feuern von Aktionspotentialen durch aktivierte Zellen. Das führt zu periodischen Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$), die von großer Bedeutung für die Hirnentwicklung sind. So werden beispielsweise Genexpression (Ghosh und Greenberg 1995), Zellproliferation (LoTurco et al. 1995) und Zellmigration (Komuro und Rakic 1996; Komuro und Rakic 1998) beeinflusst und damit Wachstum und Differenzierung von Neuronen reguliert (Spitzer 2002). Zudem sind $[Ca^{2+}]_i$ -Fluktuationen wichtig für die Ausbildung von Synapsen, indem sie die Motilität axonaler und dendritischer Wachstumskegel (Kater et al. 1988; Nagerl et al. 2004), die Bildung postsynaptischer Rezeptorkanäle (Kirsch und Betz 1998) und die aktivitätsabhängige Reifung glutamaterger Synapsen (Durand et al. 1996) fördern. Spontane synchrone neuronale Entladungen spielen bei diesen Prozessen eine große Rolle und sind ein häufiges Aktivitätsmuster während der Hirnentwicklung (Spitzer 1994; Katz und Shatz 1996; Hanse et al. 1997; Garaschuk et al. 1998; Garaschuk et al. 2000; Ben-Ari 2001; Adelsberger et al. 2005).

Solch eine Aktivität, die in mehreren Neuronen synchron auftritt, ist beispielsweise im Rückenmark von Hühnerembryonen (O'Donovan et al. 1998) und im Rautenhirn von Mäuseembryonen (Gust et al. 2003) nachgewiesen worden. In der pränatalen Retina wurde spontane neuronale Aktivität beobachtet, wo sie korrelierte $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in einem Netzwerk

amakriner Zellen und retinaler Ganglienzellen in komplexen räumlich-zeitlichen Mustern generiert (Meister et al. 1991; Wong et al. 1995). Daran sind synaptische Signalübertragung und Acetylcholinrezeptoren beteiligt (Feller et al. 1996). In der CA3-Region des Hippocampus neugeborener Ratten wurden spontane $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen beschrieben, die gleichzeitig in Gruppen benachbarter Zellen auftreten (Leinekugel et al. 1997). Das Auftreten dieser $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen korreliert stark mit spontanen oszillatorischen Änderungen der elektrischen Aktivität der Neuronen, sogenannten *Giant Depolarizing Potentials* (GDPs) (Ben-Ari et al. 1989). Spontane, transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege sind ebenso in der CA1-Region des Hippocampus neugeborener Ratten beschrieben worden, sogenannte frühe Netzwerkoszillationen (engl. „*Early Network Oscillations*“, ENOs) (Garaschuk et al. 1998). Sie treten in beinahe allen Neuronen der CA1-Region synchron auf und sind lediglich während der ersten beiden Wochen nach Geburt nachweisbar. Sie erfordern Aktionspotentialaktivität, sind durch $GABA_A$ -Rezeptorantagonisten komplett blockierbar, und ihre Frequenz wird durch Antagonisten ionotroper Glutamatrezeptoren deutlich reduziert. Simultan zu auftretenden ENOs können in Pyramidenzellen Aktionspotentialsalven abgeleitet werden. Ähnliche Aktivitätsmuster wurden im Hippocampus neugeborener Hasen (Menendez de la Prida et al. 1998) und bei Primaten (Khazipov et al. 2001a) nachgewiesen. Auch *in vivo* konnte bei neugeborenen Ratten im Hippocampus korrelierte neuronale Aktivität gezeigt werden, die Ähnlichkeiten mit den *in vitro* gefundenen GDPs aufwies (Leinekugel et al. 2002).

Im Neokortex neugeborener Ratten wurde zunächst von Bereichen aktiver Zellen, sogenannten „Domänen“, berichtet. Es wurden Gruppen von 5–50 benachbarten Neuronen beobachtet, die sich nicht überlappen und spontane, transiente und synchrone $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege zeigen (Yuste et al. 1992). Die Aktivität breitete sich innerhalb dieser Domänen in Form von $[Ca^{2+}]_i$ -Wellen über *gap junctions* aus und benötigte keine synaptische Signalübertragung (Yuste et al. 1995). Ebenfalls im Neokortex neugeborener Ratten wurde eine andere Form spontaner neuronaler Aktivität entdeckt, ähnlich den im Hippocampus beschriebenen ENOs, bei welcher sich synchrone $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen als sogenannte *cortical Early Network Oscillations* (cENOs) wellenartig durch den Kortex bewegen (Garaschuk et al. 2000). Diese cENOs hatten ihren Ursprung meistens am posterioren Ende der verwendeten horizontalen Hirnschnitte im entorhinalen Kortex und wanderten mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 2.1 mm/s zum anterioren Ende. Sie waren assoziiert mit Änderungen im Feldpotential und erforderten die Aktivierung von ionotropen Glutamatrezeptoren und

Aktionspotentialaktivität. Am Ende der ersten postnatalen Woche (P7) spielt die über GABA_A-Rezeptoren vermittelte synaptische Hemmung eine Rolle bei der Beendigung der oszillatorischen Aktivität. Synchrone Ca²⁺-Transienten sind im unreifen Mäusekortex mit elektrischer neuronaler Aktivität korreliert und wurden im späten Embryonalstadium bis wenige Tage nach Geburt (E16–P2) beobachtet (Corlew et al. 2004). Es wurde berichtet, dass diese synchrone spontane Aktivität (SSA, engl. „*synchronized spontaneous activity*“) simultan in beiden Hemisphären koronaler Hirnschnitte der Maus auftritt und Schrittmacher im Temporale Kortex (TE) besitzt (Lischalk et al. 2009). Ca²⁺-Wellen, die Eigenschaften von ENOs aufweisen, sind ebenfalls im Kortex neugeborener Mäuse *in vivo* gezeigt worden (Adelsberger et al. 2005). Das Auftreten dieser Ca²⁺-Wellen korreliert positiv mit Schlafphasen und ist deutlich reduziert, wenn die Mäuse sich bewegen. Da neugeborene Mäuse und Ratten 60% bis 80% der Zeit schlafend verbringen, wird vermutet, dass die Ca²⁺-abhängige neuronale Reifung im Kortex hauptsächlich auf Ca²⁺-Wellen beruht, die ENOs bzw. SSA entsprechen.

1.6 Neuronale Aktivität im piriformen Kortex

Unter den verschiedenen Rhythmen spontaner neuronaler Aktivität, die das Gehirn generiert, sind sogenannte *slow oscillations* gefunden worden, die mit einer Frequenz von < 1 Hz wellenähnlich über den zerebralen Kortex wandern. Diese Oszillationen, an denen sich über 85% der Neuronen beteiligen, wurden zuerst bei adulten anästhesierten Katzen *in vivo* nachgewiesen und haben Ähnlichkeit mit im Schlaf beobachteter Hirnaktivität (Steriade et al. 1993a; Steriade et al. 1993b; Steriade et al. 1993c). Später wurde gezeigt, dass auch akute Hirnschnitte *slow oscillations* aufweisen (Sanchez-Vives und McCormick 2000). Im piriformen Kortex horizontaler Hirnschnitte von Frettchen wurde diese Art von neuronaler Aktivität ebenfalls gefunden (Sanchez-Vives et al. 2008). Die Oszillationen wiesen hier eine Frequenz von 1.8 Hz auf und hatten im Vergleich mit der neokortikalen Aktivität eine mit 114 mm/s um eine Größenordnung schnellere Ausbreitungsgeschwindigkeit. Sie entstanden in Schicht III und im ED des piriformen Kortex.

Es gibt Hinweise auf eine ausgeprägte Tendenz des piriformen Kortex, epileptiforme Aktivität zu erzeugen (Piredda und Gale 1985; Racine et al. 1988; McIntyre und Plant 1989). So konnte gezeigt werden, dass die Schicht III des posterioren piriformen Kortex besonders

sensibel epileptogen auf elektrische Stimulation reagiert (Hönack et al. 1991). Sein anatomischer Aufbau – mit seinem hohen Grad an intrinsischen Assoziationsverbindungen und seinen reziproken Projektionen in andere kortikale und subkortikale Hirnregionen – scheint ihn für die Erzeugung epileptiformer und spontaner oszillatorischer Aktivität zu prädestinieren (Löscher und Ebert 1996; Behan und Haberly 1999). Tatsächlich wurde beobachtet, dass in Hirnschnitten der piriforme Kortex unter Einwirkung von Bicucullin, eines Antagonisten von GABA_A-Rezeptoren, interiktale Entladungen mit einer doppelt so hohen Frequenz erzeugt wie andere Areale des zerebralen Kortex (0.2 Hz resp. 0.1 Hz). Als das Hirngewebe zwischen piriformem Kortex und restlichem Kortex durchtrennt wurde, blieb die Frequenz im piriformen Kortex gleich, während sie im übrigen Kortex sank (Rigas und Castro-Alamancos 2004). In anderen Experimenten wurde gezeigt, dass der piriforme Kortex ebenso die Erregbarkeit der unmittelbar benachbarten Amygdala zu beeinflussen scheint, deren Empfindlichkeit auf elektrische Stimulation nach einer künstlich herbeigeführten Läsion des piriformen Kortex sank (Wahnschaffe et al. 1993). Die im piriformen Kortex beobachteten *slow oscillations* korrelieren zeitlich mit respiratorischer Aktivität. Dabei besteht vermutlich ein Zusammenhang zwischen rhythmisch eingehender respiratorischer Information und der Tendenz des piriformen Kortex, oszillatorische Aktivität zu zeigen (Fontanini et al. 2003).

Die ausgeprägten reziproken Verbindungen zwischen piriformem Kortex und Amygdala (McDonald 1998; McDonald 2003) sowie zwischen dem benachbarten perirhinalen Kortex und der Amygdala (Faulkner und Brown 1999) lassen vermuten, dass Amygdala und die unmittelbar benachbarte Kortexregion des piriformen und des perirhinalen Kortex funktionell gekoppelt sind. Diese Annahme wird durch die Beobachtung von spontanen stark korrelierten *slow oscillations* und Gammaoszillationen im perirhinalen Kortex und in der Amygdala unterstützt (Collins et al. 2001).

Die Korrelation spontaner neuronaler Aktivität im piriformen Kortex und in der Amygdala und die Kopplung dieser Areale mit respiratorischer Aktivität wurden bei neugeborenen Ratten (P0–P1) untersucht (Onimaru und Homma 2007). Hierbei wurden spontane neuronale Oszillationen gefunden, die im piriformen Kortex entstanden und mit einer Latenz von 1.6 ± 0.3 s in den lateralen und den basolateralen Nukleus der Amygdala übertragen wurden. Die durchschnittliche Frequenz der Oszillationen betrug 2.0 ± 0.8 /min. Weitere Analysen zeigten eine Korrelation der Oszillationen in der Amygdala mit inspiratorischer Aktivität der Ventralwurzel des vierten zervikalen Rückenmarksegments (C4). Nach Durchtrennen der

Verbindung zwischen höheren Hirnarealen und Hirnstamm auf Höhe der Pons traten sowohl in der Amygdala als auch in C4 weiterhin spontane Oszillationen auf, die jedoch nicht mehr miteinander korrelierten. Diese Ergebnisse zeigen spontane neuronale Netzwerkoszillationen bei neugeborenen Ratten, die vom piriformen Kortex in die Amygdala übertragen werden. Sie liefern weiterhin Hinweise auf die Bedeutung spontaner neuronaler Entladungen im unreifen Hirn im Zusammenhang mit respiratorischer Aktivität. Die Autoren vermuten, dass die beschriebenen spontanen Oszillationen für den Aufbau von Verbindungen zwischen piriformem Kortex und Amygdala wichtig sind und an der Ausbildung des olfaktorischen Systems beteiligt sein könnten.

1.7 Fragestellung

Wie oben dargestellt, wurden spontane synchrone oszillatorische Aktivitäten der neuronalen Netzwerke in vielen Hirnregionen und bei verschiedenen Wirbeltier-Spezies beschrieben. Sie scheinen bei der Entwicklung des ZNS eine wichtige Rolle zu spielen. Als Assoziationsareal im olfaktorischen System ist der piriforme Kortex aufgrund seiner anatomischen Struktur ein Hirnareal, das besonders zu spontaner oszillatorischer Aktivität neigt und benachbarte Hirnareale wie perirhinalen Kortex und Amygdala in ihrer Aktivität beeinflussen könnte. Angesichts der vergleichsweise frühen Ausbildung des olfaktorischen Systems und des piriformen Kortex in der Hirnentwicklung war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob frühe Netzwerkoszillationen im piriformen Kortex des unreifen Mäusehirns auftreten und inwiefern dieser die Aktivität umliegender Hirnareale beeinflusst.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Treten ENOs im piriformen Kortex des unreifen Mäusehirns auf?
- Hat die Aktivität des piriformen Kortex eine Beziehung zu anderen Hirnarealen?
- In welchem Alter treten die ENOs im piriformen Kortex auf?
- Welche Mechanismen sind an der Entstehung von ENOs im piriformen Kortex des unreifen Mäusehirns beteiligt?

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen früher Netzwerkoszillationen im piriformen Kortex wurden an akuten Hirnschnitten von jungen Mäusen durchgeführt. Da neuronale Aktivität einen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg verursacht, lassen sich durch optische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ unmittelbar Rückschlüsse auf die Aktivität der Neuronen ziehen. Daher wurde für die vorliegende Arbeit Kalzium-Imaging unter Anwendung der Zwei-Photonen-Laser-Fluoreszenzmikroskopie sowie der konfokalen Nipkow-Disk-Laser-Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden ebenso wie die verwendeten Methoden im Folgenden näher erläutert.

2.1 Tiere

Alle Experimente wurden entsprechend Tierschutzrichtlinien ausgeführt und von der bayerischen Regierung genehmigt. Es wurden Balb/c-Mäuse beider Geschlechter in einem Alter von einem Tag nach Geburt (P1) bis einschließlich zwölf Tagen nach Geburt (P12) verwendet, die von der Zuchteinrichtung der Ludwig-Maximilians-Universität München bzw. von der Charles-River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden.

2.2 Vorbereitung des Gewebes

2.2.1 Hirnschnitte

Schnittpräparate des Gehirns bieten für die vorliegende Arbeit einige prinzipielle Vorteile gegenüber Experimenten am lebenden Tier. So können umgebendes Medium und Temperatur unter kontrollierten Bedingungen gehalten und verändert werden. Weiterhin können Pharmaka in definierten Konzentrationen sowohl auf den gesamten Schnitt als auch gezielt in einzelne Regionen des Schnitts appliziert werden. Zudem ist im Schnittpräparat die Untersuchung subkortikaler Strukturen wie Hippocampus, Amygdala und von Regionen des Zwischen- und Mittelhirns möglich.

Zur Herstellung der Schnittpräparate wurden die Tiere mittels einer Präparationsschere enthauptet. Der Schädel wurde rasch entlang der sagittalen Sutur geöffnet, sodass das Gehirn als ganzes mit einem Spatel entnommen und sofort in mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begaste, eisgekühlte (1–3 °C), Ca²⁺-freie Ringer-Lösung (Zusammensetzung siehe 2.3.1.1) gegeben werden konnte. Mit einem Skalpell wurden Hirnstamm, Kleinhirn und Bulbus olfactorius abgetrennt. Auf der so hergestellten flachen frontalen Seite wurde das Gehirn mit Cyanoacrylatklebstoff (Uhu GmbH, Bühl, Deutschland) auf einen Silikonblock geklebt, der im anschließenden Schneidvorgang für Stabilität sorgte. Im nächsten Schritt wurden Silikonblock und das Gehirn mit seiner ventralen Seite auf eine Schneidkammer geklebt, die sofort mit eisgekühltem Ca²⁺-freien Ringer gefüllt wurde. Mit einem Vibratom (VT1000S, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden dann koronale Hirnschnitte von 400 µm Dicke angefertigt³, die anschließend eine Stunde in mit Carbogen begastem Ca²⁺-freien Ringer bei 34 °C gehalten wurden. Die hohe Temperatur begünstigt ein Absterben der oberflächlichen, durch das Schneiden geschädigten Zellen, sodass die tiefer liegenden intakten Zellen für Messungen zugänglich werden. Nach einer Stunde wurde die Temperatur auf Raumtemperatur gesenkt, um den Stoffwechsel des Gewebes herabzusetzen und so die Lebensdauer der Zellen zu erhöhen.

Zu Beginn jedes Experiments wurden ein bis zwei Schnitte mit Hilfe eines feinen Gitters aus einem U-förmigen Platindraht und dünnen Nylonfäden in der Messkammer platziert. Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Messkammer kontinuierlich mit künstlichem Liquor (ACSF, engl. „*artificial cerebrospinal fluid*“; Zusammensetzung siehe 2.3.1.1) perfundiert, der permanent mit Carbogen begast und mithilfe eines Heizelements (Eigenbau) und Temperaturreglers (Eigenbau) auf 34–35 °C erwärmt wurde.

2.2.2 Färbung der Hirnschnitte

Unmittelbar vor Beginn der Experimente wurden die Hirnschnitte in der Messkammer mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OG-1 AM; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gefärbt. OG-1 AM wurde zuvor in 20% Pluronic F-127 in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst und dann verdünnt mit Ca²⁺-freiem Ringer in einer Endkonzentration von ~10 µM auf die Hirnschnitte

³ ca. zwischen -1.8 mm und -2.5 mm in Bezug auf Bregma

gegeben. Anschließend wurden die Hirnschnitte für 10–30 min. bei 37 °C im oxygenierten Brutschrank inkubiert, bevor die Kammer mit den Schnitten in den Messstand gebracht wurde.

Bei zwei Reihen von Experimenten, bei welchen mittels einer Applikationspipette in die Hirnschnitte injiziert wurde (TTX bzw. GABA/Glutamat), wurde die Pipette zusätzlich mit dem nicht Membran-permeablen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 594 (AF594, Molecular Probes) in einer Konzentration von 10 µM befüllt. Dieses Fluorochrom wird bei der Zwei-Photonen-Absorption in einem ähnlichen Wellenlängenbereich wie OG-1 AM angeregt, emittiert Fluoreszenz aber in einem langwelligeren Bereich mit einem Maximum bei 613 nm (Panchuk-Voloshina et al. 1999; Haugland et al. 2005). Durch einen im Strahlengang des Mikroskops befindlichen dichroitischen Spiegel wurde das Fluoreszenzlicht aufgeteilt, sodass die unterschiedlichen Fluoreszenzemissionen von OG-1 AM und AF594 mit zwei verschiedenen Aufnahmekanälen registriert werden konnten. Das erlaubte eine visuelle Kontrolle der Ausbreitung der injizierten Substanzen im Hirnschnitt.

2.3 Versuchsanordnung und -durchführung

2.3.1 Lösungen

Im Folgenden werden die verwendeten Lösungen und Pharmaka erläutert.

2.3.1.1 Ringerlösungen

Zum Anfertigen der Hirnschnitte sowie während der einstündigen Inkubation bei 34 °C wurde ein Ca²⁺-freier Ringer benutzt. Während der Experimente wurden die Hirnschnitte mit ACSF perfundiert, in welchem in einigen Experimenten bei der sogenannten „Badapplikation“ die verwendeten Pharmaka gelöst wurden. Ca²⁺-freier Ringer wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. ACSF wurde durch Begasung mit Carbogen ebenfalls auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Die Ringerlösungen hatten eine Osmolarität von ca. 310 mosm/l. Ihre Zusammensetzung ist in folgender Tabelle wiedergegeben:

	Ca²⁺-freier Ringer	ACSF
NaCl	125 mM	125 mM
KCl	2.5 mM	4.5 mM
NaHCO₃	26 mM	26 mM
NaH₂PO₄	1.25 mM	1.25 mM
CaCl₂	0 mM	2 mM
MgCl₂	6 mM	1 mM
Glucose	20 mM	20 mM

Tab. 1: Zusammensetzungen der verwendeten Ringer-Lösungen.

2.3.1.2 Pharmaka

Die eingesetzten Pharmaka sowie die Art ihrer Applikation werden in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnisteils beschrieben. Hier seien lediglich die Bezugsquellen aufgeführt: Tetrodotoxin (TTX, Calbiochem, Schwalbach, Deutschland), 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), D-(2R)-amino-5-phosphonopentanoat (D-AP5, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Bicucullin Methobromid (Axxora, Lörrach, Deutschland), γ -Aminobuttersäure (GABA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Glutamat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

2.3.2 Kalzium-Fluoreszenzmikroskopie im lebenden Hirngewebe

Für die Experimente wurden zwei verschiedene Messstände verwendet. Einer war mit einem Zwei-Photonen-Laser-Mikroskop, der andere mit einem Nipkow-Disk-Laser-Scanning-Mikroskop ausgestattet. An diesen Mikroskopie-Systemen wurden optische Ca²⁺-Messungen durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, gleichzeitig an mehreren Orten der Probe Änderungen der Ca²⁺-Konzentration zu messen. Das ist für die Untersuchung von

Nervensystemen besonders wichtig, in welchen mehrere Zellen oder mehrere Regionen einer Probe gleichzeitig aktiv sein können. Das Ca^{2+} -Imaging für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente geschah mittels der Fluoreszenzmikroskopie, deren Prinzipien in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

2.3.2.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1 AM

Eine Voraussetzung der Fluoreszenzmikroskopie ist der Einsatz eines fluoreszierenden Farbstoffs (Fluorochrom) in der Probe. Dieser kann als Indikator für die Anwesenheit bzw. Konzentration eines bestimmten Stoffs dienen. Ca^{2+} -Indikator-Farbstoffe sind für das Imaging der Aktivität von Neuronenpopulationen geeignet, da neuronale Aktivität mit prä- und postsynaptischem Ca^{2+} -Einstrom assoziiert ist (Tank et al. 1988; Delaney et al. 1989; Svoboda et al. 1997). Der langsame Einstrom von Ca^{2+} in das Zellsoma steht in linearem Zusammenhang mit der Zahl der in einem Neuron auftretenden Aktionspotentiale (Smetters et al. 1999; Mao et al. 2001). Ein entscheidender Beitrag zur Untersuchung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderungen war die Entwicklung einer Reihe von fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren auf der Basis der Ca^{2+} -selektiven Chelatoren Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA) und 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat (BAPTA), die in lebende Zellen eingebracht werden können (Tsien 1980; Tsien 1981).

Für die vorliegende Arbeit wurde aus verschiedenen Gründen der Membran-permeable Acetoxymethyl-Ester (AM-Ester) des fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator-Farbstoffs Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OG-1 AM) gewählt (**Abb. 1a**). OG-1 AM ist mit einer niedrigen *in vitro* gemessenen Dissoziationskonstante (K_d) für Ca^{2+} von 170 nM ein hochaffiner Ca^{2+} -Indikator (Haugland et al. 2005). Die K_d ist abhängig von einer Reihe von Faktoren wie pH-Wert, Temperatur und Konzentration verschiedener Ionen. *In situ* wurde in HeLa-Zellen eine zytoplasmatische K_d für Ca^{2+} von 430 ± 80 nM gemessen, welche im Vergleich zu anderen hochaffinen Ca^{2+} -Indikatoren sehr niedrig ist (Thomas et al. 2000). Die hohe Affinität zu Ca^{2+} ist vorteilhaft, weil geringe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen Signale mit hoher Amplitude erzeugen (Haugland et al. 2005; Regehr 2005; Paredes et al. 2008). Ein weiterer Grund für den Einsatz von OG-1 AM war sein im Wellenlängenbereich gebräuchlicher Laser liegendes Absorptionsspektrum sowohl für die Ein- wie auch die Zwei-Photonen-Anregung (siehe 2.3.2.2), wobei

der Farbstoff bei Zwei-Photonen-Anregung effizienter absorbiert als vergleichbare Ca^{2+} -Indikatoren (Paredes et al. 2008). Für die Ein-Photon-Anregung liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge (λ) von 492 nm (**Abb. 1b**) und damit im Bereich des Anregungslichts des für die meisten Experimente verwendeten Argon-Lasers ($\lambda = 488$ nm). Eine etwas weniger als doppelt so große Wellenlänge wird meist für Zwei-Photonen-Anregung verwendet, die mit dem verwendeten Zwei-Photonen-Laser erreicht werden kann. Zudem ist gezeigt worden, dass die Fluoreszenzintensität von Ca^{2+} -Indikatoren für Ein- und Zwei-Photonen-Anregung vergleichbar ist (Xu et al. 1996). Ein weiterer Vorteil eines AM-Ester-Farbstoffs wie OG-1 AM ist die einfache Färbung großer Zellpopulationen im Hirnschnitt (Yuste et al. 1992).

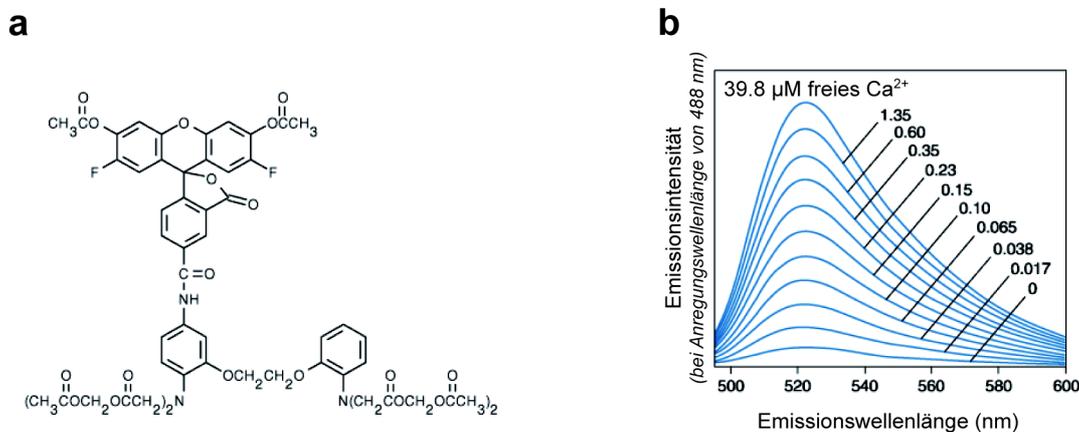


Abb. 1a: Chemische Strukturformel von Oregon Green BAPTA-1 AM (OG-1 AM).

b: Emissionsspektrum von OG-1 AM. Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission von der Ca^{2+} -Konzentration bei einer Wellenlänge des Anregungslichts von 488 nm. Die einzelnen Kurven repräsentieren die Intensität des von OG-1 AM emittierten Lichts (willkürliche Einheiten) bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen. Auf der x-Achse ist die Wellenlänge des emittierten Lichts aufgetragen, auf der y-Achse die Intensität des emittierten Lichts. Das Maximum der Emissions-Intensität für alle aufgetragenen Ca^{2+} -Konzentrationen liegt bei 524 nm.

(a) und (b) modifiziert nach Haugland et al. (2005), gedruckt mit Erlaubnis von Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA.

Die Modifikation der Carboxylate des Fluorochroms mit lipophilen AM-Estern ermöglicht dem somit ungeladenen Farbstoffmolekül die Diffusion durch die Zellmembran. Intrazellulär werden die AM-Ester durch Esterasen hydrolysiert, wodurch der Polycarboxylat-Indikator entsteht. Dieser ist nicht Membran-permeabel, was ein Austreten aus der Zelle verhindert (Katerinopoulos und Foukaraki 2002; Haugland et al. 2005).

2.3.2.2 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich zur bevorzugten Mikroskopiertechnik bei der Untersuchung biologischer Proben entwickelt, da sie die selektive und spezifische Detektion von Molekülen in geringen Konzentrationen mit einem guten Verhältnis von Signal zu Hintergrund ermöglicht (Yuste 2005). Sie basiert auf der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge durch die Moleküle eines Fluorochroms, wodurch die Farbstoffmoleküle von ihrem energetischen Grundzustand in einen energetisch höheren, angeregten Zustand gehoben werden. Hierbei wird durch die Energie des absorbierten Photons ein Elektron des Fluorochroms aus seinem Orbital in ein leeres, unbesetztes Orbital mit höherem Energiegehalt gehoben. Da dieser angeregte Zustand energetisch nicht stabil ist, fällt das Elektron nach einer kurzen Zeit (der sogenannten „Lebenszeit des angeregten Zustands“, die wenige Nanosekunden dauert; engl. „*excited state lifetime*“) in sein ursprüngliches Orbital zurück, wobei die Energie meist wieder in Form eines Photons abgegeben wird. Die Energie des emittierten Photons entspricht dem Unterschied zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand des Fluorochroms. Sie hängt weder von der Wellenlänge des Anregungslichts noch von der Richtung der eintreffenden Photonen ab (Lichtman und Conchello 2005). Während ein Photon mit ausreichender Energie für diesen Prozess genügt, können auch mehrere Photonen, deren Energie sich addiert, ein Fluorochrom in den angeregten Zustand bringen (**Abb. 2**). Dafür müssen sie am selben Ort im annähernd selben Zeitfenster sein, welches ca. 0.5 fs beträgt (Helmchen und Denk 2005). Bei der Zwei-Photonen-Anregung werden die Energien von zwei Photonen des infraroten Spektrums mit der halben Energie (und annähernd der doppelten Wellenlänge) kombiniert, die für das Erreichen des angeregten Zustands notwendig ist (Lichtman und Conchello 2005; Diaspro et al. 2006).

Bei der Ein-Photon-Mikroskopie wird das Anregungslicht auf dem Weg zum Fokus in der Probe gestreut. Ebenso unterliegen die durch Fluoreszenz emittierten Photonen der Streuung, bevor sie aus der Probe treten und detektiert werden können. Dies liegt an Inhomogenitäten des Brechungsindex, wie sie in jedem Gewebe vorhanden sind, und führt zu einer Verminderung von Auflösung und Kontrast. Das behindert die dreidimensionale Mikroskopie von lebendem Gewebe (Denk und Svoboda 1997).

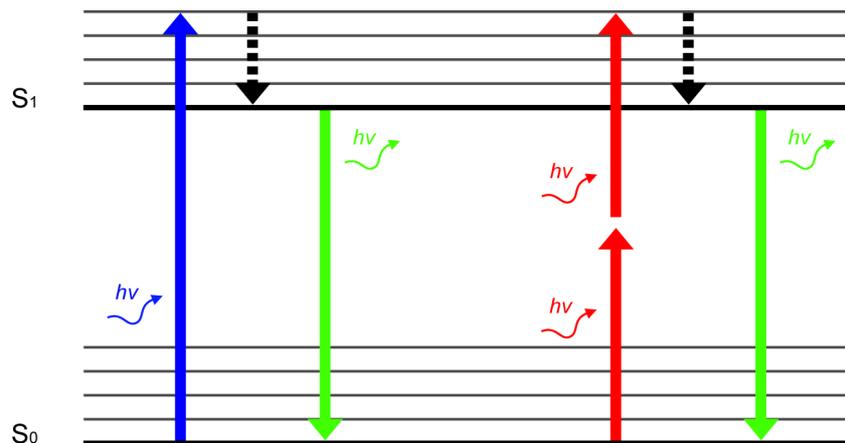


Abb. 2: Jablonski-Diagramm. Das Diagramm zeigt schematisch das Prinzip der Ein- bzw. Zwei-Photonen-Anregung. Links: Bei der Ein-Photonen-Anregung wird das Fluorochrom durch die Absorption eines kurzwelligen Photons (meist aus dem blauen oder UV-Bereich des Spektrums) von seinem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) gebracht (blauer Pfeil). Bei der Rückkehr in den Grundzustand gibt es ein (langwelligeres) Photon ab (grüner Pfeil). Rechts: Bei der Zwei-Photonen-Anregung erreichen zwei langwellige Photonen (aus dem roten oder IR-Spektralbereich) das Fluorochrom simultan, wobei ihre kumulierte Energie das Fluorochrom in einen angeregten Zustand versetzt (rote Pfeile), wodurch bei der Rückkehr des Farbstoffmoleküls in seinen Grundzustand ebenfalls ein Photon abgegeben wird (grüner Pfeil). In diesem Fall hat das emittierte Photon eine höhere Energie als die einzelnen absorbierten Photonen.

Durch das Einbringen einer Lochblende im Strahlengang kann Licht von außerhalb der Fokusebene blockiert werden, wodurch die Schärfentiefe verringert wird. Somit wird die Möglichkeit geschaffen, Bilder in mehreren Schärfeebenen nacheinander aufzunehmen und ein dreidimensionales Bild zu erstellen. Dieses Prinzips bedient sich die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM). So werden jedoch bei Proben von mehreren hundert Mikrometern Dicke 99% der erzeugten Fluoreszenz vergeudet (Denk 2005), weil weniger als 1% des vom Fluorochrom emittierten Lichts die Lochblende passiert. Um diesen Signalverlust auszugleichen, muss die Anregungsintensität erhöht werden. Dadurch werden das Ausbleichen des Fluorochroms und die Phototoxizität verstärkt, welche durch die Absorption von Photonen verursacht werden. Hinzu kommt, dass durch Fluoreszenz erzeugte Photonen im Gewebe gestreut werden und so, selbst wenn sie im Fokus entstehen, nicht zum detektierten Signal beitragen, aber gleichwohl Ausbleichen und Phototoxizität bedingen (Denk 1996).

Diese Probleme können umgangen werden, indem die oben beschriebene Zwei-Photonen-Anregung genutzt wird, um Fluoreszenz zu erzeugen (Denk und Svoboda 1997).

2.3.2.3 Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Bereits 1931 sagte Maria Göppert-Mayer voraus, dass die Fluoreszenz-Anregung eines Moleküls durch die Absorption von zwei Photonen möglich sei (Göppert-Mayer 1931). Die Absorptionsrate von einem Photon pro Fluorochrom (W_1) hängt linear von der durchschnittlichen Photon-Fluss-Dichte ($\langle\phi\rangle$) und dem Wirkungsquerschnitt für Ein-Photon-Absorption⁴ (σ ; engl. „one-photon cross section“) ab:

$$W_1 = \sigma \times \langle\phi\rangle$$

Die Absorptionsrate von zwei Photonen (W_2) hingegen ist von der Dichte von Photonen-Paaren abhängig und daher proportional zum Quadrat der durchschnittlichen Photon-Fluss-Dichte und zum Wirkungsquerschnitt für Zwei-Photonen-Absorption (δ ; engl. „two-photon cross section“):

$$W_2 = \delta \times \langle\phi^2\rangle$$

Die Energie von Photonen-Paaren kann sich somit nur addieren, wenn diese Photonen einen hinreichend kleinen Raum in einem hinreichend schmalen Zeitfenster passieren (Williams et al. 1994).

Die Effizienz der Zwei-Photonen-Absorption ist also abhängig von Eigenschaften des Farbstoffmoleküls sowie von der zeitlichen und räumlichen Verteilung des Anregungslichts. Um ein genügend starkes Signal zu erzeugen, muss das Anregungslicht zeitlich und räumlich konzentriert werden, was durch die Anwendung von gepulsten, modengekoppelten Lasern möglich wurde (Denk et al. 1990). Eine hohe räumliche Dichte wird durch die Fokussierung des Lasers durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur (NA) erreicht. Zeitliche Konzentration kann durch einen Laser mit Modenkopplung geschaffen werden, der Licht in ultrakurzen Pulsen (ca. 100 fs) emittiert, wodurch die zur Anregung verfügbaren Photonen quasi zeitgleich das Fokusvolumen⁵ erreichen (Helmchen und Denk 2005). Für die Dauer des Pulses erzeugt der Laser eine sehr hohe maximale Leistung (im Kilo- bis Megawattbereich), während die durchschnittliche Laserleistung, der die Probe ausgesetzt wird, gering ist (im Milliwattbereich) (Wise 2005).

⁴ Der Wirkungsquerschnitt für Ein- (resp. Zwei-) Photonen-Absorption eines Fluorochroms ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorochrom ein Photon (resp. zwei Photonen) absorbiert.

⁵ ca. 1 Femtoliter

Der quadratische Zusammenhang von Absorptionsrate und Photonenkonzentration (d.i. Lichtintensität) führt dazu, dass bei der Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (2PLSM) – anders als bei der KLSM mit Ein-Photon-Anregung – Fluoreszenz beinahe ausschließlich im Fokusvolumen erzeugt wird. Im Gegensatz zur KLSM ist also keine Lochblende im Strahlengang notwendig, um verschiedene Schärfenebenen aufnehmen zu können. Da es außerhalb des Fokusvolumens zu einem steilen Abfall der Absorptionsrate kommt, findet dort praktisch keine Anregung von Fluorochromen statt (Denk 1996; Diaspro et al. 2006). Dies bedingt, dass Ausbleichen und Phototoxizität im Vergleich zur KLSM stark reduziert sind. Hinzu kommt, dass vom Fluorochrom emittierte Photonen, die im Gewebe gestreut werden, zeitlich und räumlich zu gering konzentriert sind, als dass sie Fluoreszenz außerhalb des Fokusvolumens erzeugen könnten. Das trägt ebenfalls zum geringeren Ausbleichen sowie schwächerer Phototoxizität bei (Denk und Svoboda 1997). Ein weiterer Vorteil, der insbesondere beim Imaging von lebendem Gewebe mit größerer Dicke zum Tragen kommt, ist das bei der 2PLSM meist eingesetzte langwellige rote bzw. IR-Licht⁶, welches das Mikroskopieren in Gewebetiefen von bis zu 1 mm erlaubt, da es weniger gestreut wird (Theer et al. 2003). Weil praktisch sämtliche in der Probe erzeugten Photonen dem Fokusvolumen entstammen, auch wenn sie vor allem in tieferen Gewebeschichten gestreut werden, kann das gesamte Fluoreszenzlicht der Signaldetektion dienen (Svoboda und Yasuda 2006).

2.3.2.4 Das Zwei-Photonen-Laser-Scanning-System

1990 wurde zum ersten Mal das Prinzip der Zwei-Photonen-Anregung auf die Laser-Scanning-Mikroskopie angewandt (Denk et al. 1990). Die Hauptkomponenten eines Zwei-Photonen-Mikroskops sind die Lichtquelle, die Scan-Spiegel sowie die Optik, ein Fluoreszenzdetektor und ein System zur Datenaufnahme (**Abb. 3**). Als Lichtquelle dient ein gepulster, modengekoppelter Laser. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Titan:Saphir-Laser (TiSa-Laser) verwendet (MaiTai, SpectraPhysics Lasers Division, Newport Corp., Mountain View, California, USA), der sehr gute Eigenschaften in Bezug auf Leistung (durchschnittliche Leistung 1.5 W, maximale Leistung > 185 kW) und einstellbaren Wellenlängenbereich (700–

⁶ Es wird ungefähr die doppelte Wellenlänge verwendet, die zur Anregung des gleichen Fluorochroms bei Ein-Photonen-Anregung notwendig ist.

1100 nm) aufweist und ultrakurze Pulse (~ 100 fs) emittiert (Curley et al. 1992; Wise 2005). Die Puls-Wiederholungsrate von ~ 100 MHz entspricht der Lebenszeit des angeregten Fluorochroms, die im Bereich von Nanosekunden liegt (Helmchen und Denk 2005). Die Wellenlänge war auf 800 nm eingestellt, bei der OG-1 AM eine maximale Fluoreszenzemission zeigte. Die Laserintensität konnte durch eine im Strahlengang angebrachte Pockels-Zelle reguliert werden.

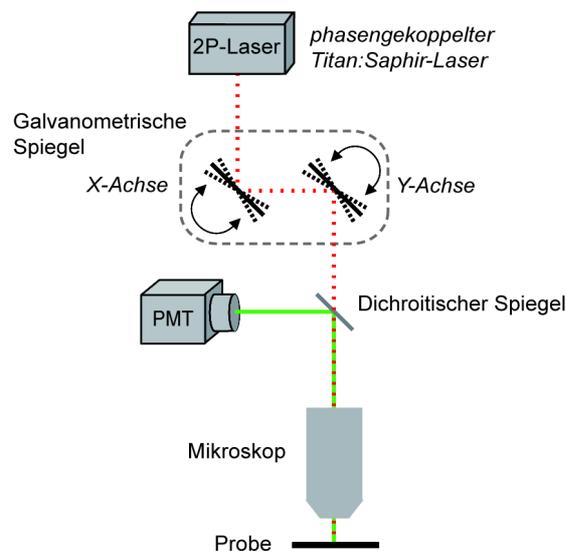


Abb. 3: Schema des Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Systems. Ein phasengekoppelter Titan:Saphir-Laser erzeugt das Anregungslicht mit Wellenlängen im roten Spektrum in ultrakurzen Pulsen (Pulsbreite < 100 fs). Der Laserstrahl wird mittels galvanometrischer Spiegel in den x- und y-Achsen abgelenkt, wodurch ein Raster gescannt werden kann, und durch das Objektiv auf die Probe geführt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv zurückgeleitet, durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt und von einem Photomultiplier (PTM) detektiert.

Die Scan-Spiegel und anderen optischen Komponenten des Mikroskops sind für IR-Licht optimiert. Als Scan-Einheit wurde ein Fluoview300-System (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan) verwendet, das mit einem Auflichtmikroskop (BX51WI, Olympus Corp.) verbunden war. Der Laserstrahl wird mittels eines Paares galvanometrischer Spiegel in seiner x- und y-Achse ausgelenkt und verbreitert, um die rückwärtige Apertur des Objektivs zu füllen, welches das Licht auf die Probe fokussiert. Die punktförmige Laserlichtquelle scannt die Probe rasterförmig (Helmchen und Denk 2005). Durch dasselbe Objektiv wird die emittierte

Fluoreszenz zurückgeleitet, vom Strahlengang des Lasers mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers getrennt und auf einen Detektor geleitet. Hierzu diente ein Photomultiplier.

Der gesamte Messstand war auf einem schwingungsfreien Tisch (Newport Corp., Irvine, California, USA) aufgebaut. Das System wurde von einem Computer (Toshiba-PC, Toshiba Corp., Minato, Tokyo, Japan; Betriebssystem Windows 2000, Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) mit einer Steuerungs- und Datenerfassungssoftware (Fluoview300, Olympus Corp.) betrieben. Die Aufnahmefrequenz für die an diesem Messstand durchgeführten Experimente betrug 0.5–1.0 Hz. Zusätzlich waren am Messstand ein Picospritzer II (General Valve Corp., Fairfield, New Jersey, USA) und LN Mini-Manipulatoren (Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland) installiert. Mit diesen wurden Applikationspipetten aus Borosilikatglas (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) gesteuert, die zuvor an einem Mikropipetten-Puller (Narishige PC-10 Micropipette Puller, Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) gefertigt worden waren.

2.3.2.5 Das Prinzip der Nipkow-Disk-Mikroskopie

Konfokale und Zwei-Photonen-Mikroskopie ermöglichen das Imaging von Gewebe bei geringer Schärfentiefe und erlauben das Aufnehmen von mehreren Schärfenebenen zur Konstruktion von dreidimensionalen Bildern mit niedrigem Hintergrundrauschen. Sowohl bei der KLSM als auch bei der klassischen 2PLSM wird der Laser jedoch nur auf einen Punkt in der Probe fokussiert und mithilfe der galvanometrischen Spiegel in einem Raster über die Probe bewegt. Die mechanische Bewegung der Spiegel benötigt eine gewisse Zeit, weswegen es üblicherweise einen Zeitraum in der Größenordnung von einer oder mehreren Sekunden dauert, bis ein Vollbild (engl. „*full-frame image*“) zusammengesetzt ist (Nakano 2002).

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist, den Laserstrahl aufzuteilen und in mehreren Punkten gleichzeitig über die Probe zu scannen, was die Geschwindigkeit der Datenerfassung erhöht. Die konfokale Nipkow-Disk-Mikroskopie (KNM) wendet diese Methode an. Dabei wird eine sogenannte Nipkow-Scheibe im Strahlengang des Lasers platziert. Es handelt sich dabei um eine sich drehende Scheibe mit einer Vielzahl von spiralförmig angeordneten Lochblenden, die bereits 1884 von Paul Nipkow entwickelt wurde (Tanaami et al. 2002). Wenn die Nipkow-Scheibe sich dreht, wird der durch die Lochblenden aufgeteilte La-

serstrahl über die Probe geführt. Das erzeugte Fluoreszenzlicht wird durch die Lochblenden zur Detektion zurückgeleitet. Eine Umdrehung der Schreibe dauert bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 1800 U/min. $\frac{1}{30}$ s (Mellors und Silver 1951), was eine hohe Bildfrequenz der Aufnahme ermöglicht. Ein zusätzlicher Vorteil im Vergleich zur Raster-Scan-Methode der KLSM und 2PLSM besteht darin, dass die Achse des Laserstrahls nicht verschoben wird, sodass die Fluoreszenzsignale reale konfokale Bilder produzieren, die per Auge oder mittels einer Kamera in Echtzeit beobachtet werden können (Nakano 2002).

Ein Problem der KNM ist jedoch das niedrige Signal/Rausch-Verhältnis. Um Interferenzen zu vermeiden, muss ein gewisser Abstand zwischen den Lochblenden eingehalten werden. Die Folge ist, dass nur ein Bruchteil des Anregungslichts durch das Mikroskop weitergeleitet wird. Wenn beispielsweise der Abstand der Lochblenden zueinander ein Zehnfaches ihres Durchmessers beträgt, gelangt nur 1% des eintreffenden Lichts durch die Nipkow-Scheibe, wodurch die in der Probe ankommende Anregungsintensität vergleichsweise gering ist. 99% des Anregungslichts werden hingegen innerhalb des Mikroskops von der Nipkow-Scheibe reflektiert und tragen zu unerwünschtem Hintergrundrauschen bei (Inoue und Inoue 2002).

2.3.2.6 Das Nipkow-Disk-Laser-Scanning-System

Mit dem Einbringen einer zweiten Scheibe vor der Nipkow-Scheibe mit den Lochblenden kann die Lichttransmission um ein Vielfaches erhöht werden. Das Nipkow-Disk-Laser-Scanning-System, das für die Mehrzahl der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente verwendet wurde, besitzt zwei miteinander verbundene Nipkow-Scheiben (**Abb. 4**) (CSU-10, Yokogawa Electric Corp., Tokyo, Japan). In die erste sind ca. 20000 Mikrolinsen eingefügt, die jeweils auf eine korrespondierende Lochblende auf der zweiten Nipkow-Scheibe ausgerichtet sind. Ein Argon-Laser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer justierbaren Leistung von 5–50 mW (Reliant 50S-488, LaserPhysics Ltd., Cheshire, UK). Der Strahl trifft auf einen Teil der ersten Scheibe und wird in ca. 1000 Einzelstrahlen aufgeteilt, welche durch die Mikrolinsen auf die Lochblenden fokussiert werden. Dadurch wird die Transmission des Laserlichts von ca. 1% auf 40–60% erhöht. Die Mikrolinsen und Lochblenden sind in einem besonderen geometrischen Muster angeordnet (spiralförmig mit

konstantem Abstand; engl. „*constant-pitch helical*“), welches homogene Bilder ermöglicht, die von gleichmäßig verteilten Scan-Linien beleuchtet werden (Inoue und Inoue 2002).

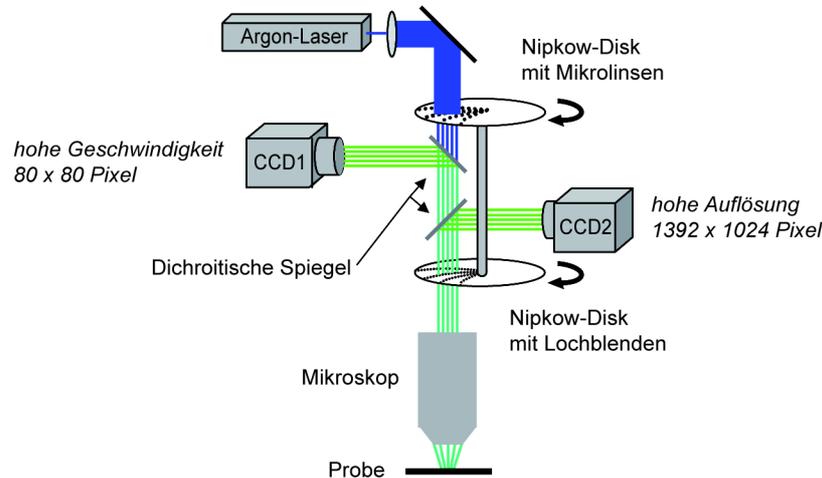


Abb. 4: Schema des Nipkow-Disk-Laser-Scanning-Systems. Der Strahl eines Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm wird mit einer Linse verbreitert und über zwei sich synchron mit ca. 1800 U/min. drehende Nipkow-Scheiben durch das Mikroskop auf das in der Fokusebene befindliche Präparat geleitet. Die erste der Nipkow-Scheiben enthält ca. 20000 mit Mikrolinsen bestückte Blenden, die den Laserstrahl auf die Lochblenden der nachfolgenden Scheibe fokussieren. Das vom Präparat emittierte Licht wird durch das Mikroskop und die untere Nipkow-Scheibe zurückgeleitet, woraufhin es mittels dichroitischer Spiegel auf den Lichtdetektor umgeleitet wird. Als Detektoren sind an das System zwei CCD-Kameras angeschlossen: CCD1 ist eine NeuroCCD-Kamera mit einer Auflösung von 80×80 Pixel und einer maximalen Aufnahme­frequenz von 2000 Hz. CCD2 ist eine Pixelfly-Kamera mit einer Auflösung von 1392×1024 Pixel und einer maximalen Aufnahme-Frequenz von 12 Hz.

Das Scannen mit 1000 Einzelstrahlen ist tausendfach heller und schneller als das Scannen desselben Bildausschnitts mit einem einzigen Laserstrahl, sodass konfokale Mikroskopie mit Bildwiederholraten von bis zu 1 kHz möglich ist (Tanaami et al. 2002). Weitere Vorteile der KNM sind neben der hohen Aufnahmegeschwindigkeit das sehr geringe Ausbleichen sowie die deutlich reduzierte Phototoxizität im Vergleich zur konventionellen KLSM, was durch die niedrige Dosisrate der multiplen Einzelstrahlen erklärt wird (Inoue und Inoue 2002). Dadurch eignet sich die KNM hervorragend für Langzeitmessungen mit hohen Aufnahme­frequenzen in lebendem Gewebe.

Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskop (Auflichtmikroskop, BX51WI, Olympus Corp.) zurückgeleitet und auf die Lochblenden der zweiten Nipkow-Scheibe fokussiert. Nach dem Durchtritt durch die Lochblenden wird es mittels eines

dichroitischen Spiegels vom Anregungslicht getrennt und auf einen Detektor geleitet. Als Detektoren wurden zwei CCD⁷-Kameras verwendet: eine sehr schnelle, rauschreduzierte NeuroCCD-Kamera (RedShirtImaging, Decatur, Georgia, USA) mit einer Auflösung von 80×80 Pixel und einer maximalen Aufnahme­frequenz von 2000 Hz, mit der die meisten der in dieser Arbeit gezeigten Bilddaten aufgenommen wurden. Die Aufnahme­frequenz bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten betrug 40 Hz. Die zweite Kamera war eine Pixelfly-Kamera (PCO AG, Kelheim, Deutschland) mit hoher Auflösung (1392×1024 Pixel), aber geringer Aufnahme­frequenz (max. 12 Hz), mit welcher Übersichtsbilder der Hirnschnitte angefertigt wurden. Die Kameras wurden von einem Computer (Dell Inc., Round Rock, Texas, USA; Betriebssystem Windows 2000) mit einer mit LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) geschriebenen Datenerfassungssoftware gesteuert. Das gesamte System war auf einem schwingungsfreien Tisch (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, Massachusetts, USA) installiert.

2.3.2.7 Objektive

Folgende Trockenobjektive wurden für die Experimente verwendet: ×1, 0.04 NA (Nikon Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan); ×2.5, 0.12 NA (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland); ×4, 0.1 NA (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Außerdem fanden folgende Wasserimmersionsobjektive Anwendung: ×10, 0.3 NA (Nikon Corp.), ×63, 0.9 NA (Leica Microsystems GmbH).

⁷ *charge-coupled device* (dt. etwa „ladungsgespeichertes Bauteil“)

2.4 Datenanalyse

Die Auswertung der erfassten Bilddaten erfolgte mit in LabView geschriebenen Programmroutinen. Die am Fluoview-System erstellten Daten wurden als TIFF-Sequenzen gespeichert. Die am Nipkow-Disk-System gewonnenen Daten wurden als binäre Dateien gesichert und mussten danach mittels einer Labview-Routine in TIFF-Sequenzen umgewandelt werden. Anschließend war das Einlesen der TIFF-Sequenzen in eine weitere Labview-Routine möglich, mit der einzelne Regionen als Messregionen (ROIs, engl. „*regions of interest*“) definiert werden konnten. Mit dieser Routine wurden dann die durchschnittlichen Emissionsintensitäten der ROIs gemessen und als Text-Datei abgespeichert. Die Daten für die Fluoreszenzwerte werden in dieser Arbeit durchgehend als relative Änderungen der Fluoreszenz über die Zeit ($\Delta F/F = (F_0 - F_1)/F_0$) gezeigt. Zur Darstellung und statistischen Auswertung wurde die Software Igor Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) verwendet. Weitere statistische Auswertungen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA), SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) und Stata (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) vorgenommen. Die Abbildungen wurden mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/> [National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA]) und Adobe Illustrator (Adobe Systems, San Jose, California, USA) erstellt.

3 ERGEBNISSE

Spontane Aktivitätswellen, die in Form weiträumiger neuronaler Netzwerkoszillationen auftreten, sogenannte Frühe Netzwerkoszillationen („*Early Network Oscillations*“, ENOs), sind ein wichtiges Merkmal der Gehirnentwicklung. Sie werden in der vorliegenden Arbeit in akuten koronalen Hirnschnitten von Mäusen untersucht. Besonderes Augenmerk gilt dabei dem piriformen Kortex, einem Areal, das zur Generierung spontaner oszillatorischer Aktivität neigt, und seiner Rolle bei dem Auftreten von ENOs in angrenzenden Arealen.

Dazu wurden Hirnschnitte von Balb/c-Mäusen zunächst in ihrer Gesamtheit auf spontane Netzwerkaktivität im Kortex und in subkortikalen Arealen untersucht. Sodann wurde der piriforme Kortex durch Gewebsschnitte isoliert, und es wurden Frequenzänderungen der ENOs dort und in den angrenzenden Arealen perirhinaler Kortex und Amygdala gemessen. Durch Aufnahmen mit zellulärer Auflösung konnte der Entstehungsort der ENOs im piriformen Kortex identifiziert sowie der Anteil der Neuronen im piriformen Kortex und in der Amygdala, die zu den ENOs beitragen, charakterisiert werden. Zudem wurde ein Altersprofil der Frequenzen der ENOs erstellt, das sich über die ersten zwölf postnatalen Tage erstreckt. Weiterhin wurden in einer Reihe pharmakologischer Experimente die den ENOs zugrunde liegenden Mechanismen untersucht. Abschließende Experimente gaben Hinweise auf den Einfluss des piriformen Kortex auf die ENOs der angrenzenden Areale perirhinaler Kortex und Amygdala. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse im Detail dargestellt.

3.1 Frühe Netzwerkoszillationen im Hirnschnittpräparat der Maus

Zunächst wurden sämtliche Hirnareale im koronalen Hirnschnittpräparat, die zuvor mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff OG-1 AM gefärbt worden waren, auf ihre spontane synchrone Netzwerkaktivität untersucht (**Abb. 5**).

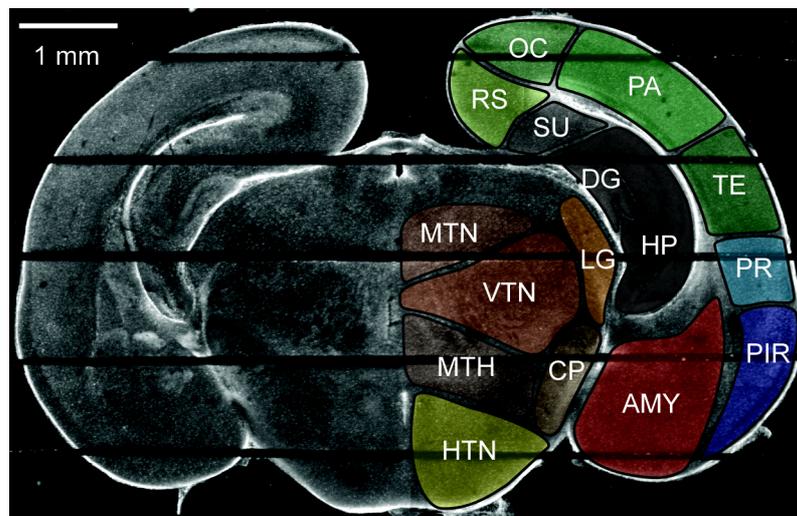


Abb. 5: Koronaler Hirnschnitt einer vier Tage alten Maus. Die Abbildung zeigt die Aufnahme eines im Experiment verwendeten Hirnschnitts. Sie wurde mit einem Nipkow-Disk-System, einem $\times 1$ -Nikon-Objektiv und einer Pixelfly-CCD-Kamera erstellt. Der rechten Hemisphäre sind in schematischer Darstellung die entsprechenden Hirnareale farblich überlagert (modifiziert aus Valverde (1998); Paxinos und Franklin (2001)).

(AMY: Amygdala; CP: Pedunculus cerebri; DG: Gyrus dentatus; HP: Hippocampus; HTN: hypothalamische Nuklei; LG: Nukleus geniculatus lateralis; MTH: Tractus mamillothalamicus; MTN: mediale thalamische Nuklei; OC: okzipitaler Kortex; PA: parietaler Kortex; PIR: piriformer Kortex; PR: perirhinaler Kortex; RS: retrosplenialer Kortex; SU: Subiculum; TE: temporaler Kortex; VTN: ventrale thalamische Nuklei.)

3.1.1 Frühe Netzwerkoszillationen im Kortex

Im gesamten Kortex fanden sich spontane Ca^{2+} -Transienten (**Abb. 6**), ähnlich den im Rattenkortex bereits beschriebenen ENOs (Garaschuk et al. 2000) und der im Mauskortex gezeigten synchronen spontanen neuronalen Aktivität (Corlew et al. 2004; Lischalk et al. 2009). Untersucht wurden Hirnschnitte von Mäusen in einem Alter zwischen einem bis

einschließlich fünf Tagen nach Geburt (P1–P5). Im piriformen Kortex war die höchste Frequenz der ENOs zu beobachten. Ca^{2+} -Transienten in den anderen kortikalen Arealen traten zeitlich korreliert mit jenen im piriformen Kortex auf. Die hohe zeitliche Auflösung der Aufnahme (40 Hz) offenbarte, dass jede Aktivitätswelle im piriformen Kortex initiiert wurde, da die Ca^{2+} -Transienten zuerst hier nachweisbar waren. Die Transienten in den anderen Kortexarealen folgten mit einer zeitlichen Verzögerung, die desto länger war, je weiter dorsal vom piriformen Kortex das betreffende Hirnareal lag. Die Oszillationen bewegten sich wellenartig mit einer mittleren Geschwindigkeit von 1.3 ± 0.1 mm/s in dorsaler Richtung über den Kortex ($n = 7$ Schnitte) (Abb. 7 u. Abb. 8).

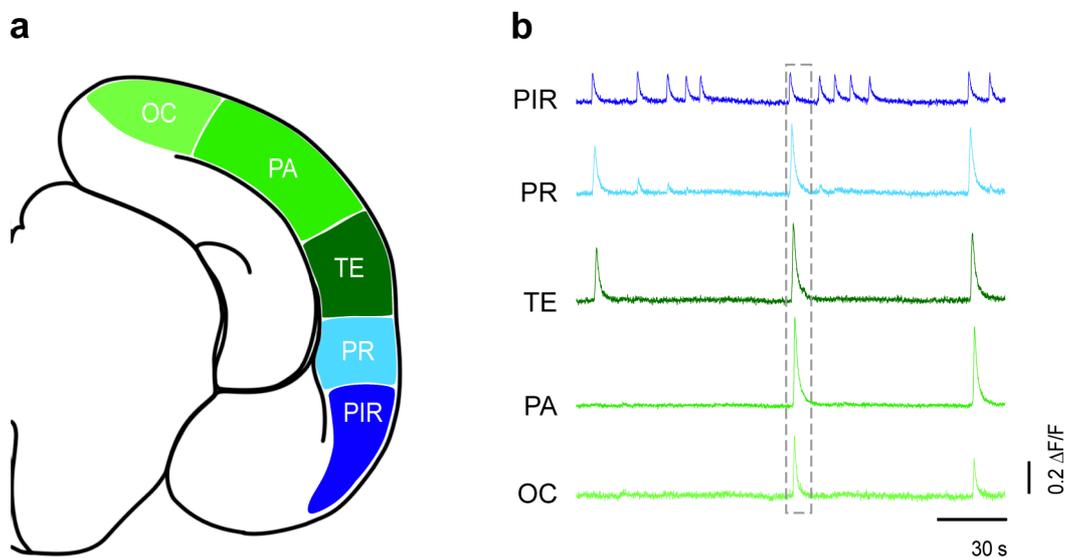


Abb. 6a: Kortikale Areale im Mäusehirn. Die Abbildung zeigt das Schema einer rechten Hemisphäre eines koronalen Hirnschnittes. Die verschiedenen kortikalen Areale sind farblich gekennzeichnet (modifiziert aus Valverde (1998); Paxinos und Franklin (2001)).

b: ENOs im Kortex einer vier Tage alten Maus. Die einzelnen Ca^{2+} -Transienten entstammen einer Aufnahme des gesamten Hirnschnittes, die mit einem Nipkow-Disk-System und einem $\times 1$ -Nikon-Objektiv erstellt wurde. Die einzelnen Aufnahmespuren sind farblich nach den ihnen entsprechenden Kortex-Arealen in (a) gekennzeichnet. Der piriforme Kortex zeigt die höchste Frequenz der Ca^{2+} -Transienten. Einige Transienten sind gleichzeitig auch in weiter dorsal gelegenen Kortex-Arealen sichtbar. Die durch den gestrichelten Kasten hervorgehobenen Transienten sind in Abb. 7a hochaufgelöst dargestellt.

(OC: okzipitaler Kortex; PA: parietaler Kortex; PIR: piriformer Kortex; PR: perirhinaler Kortex; TE: temporaler Kortex)

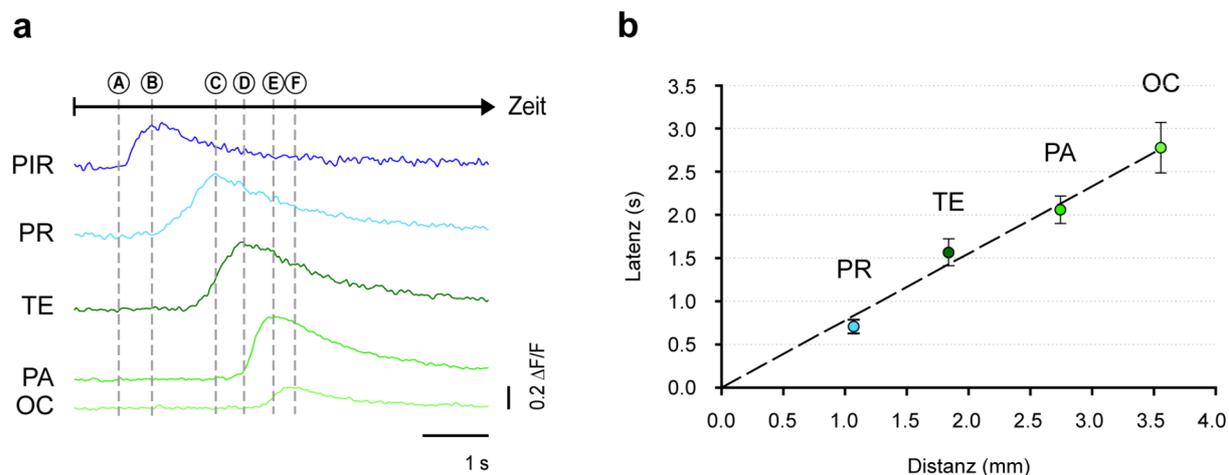


Abb. 7a: Im piriformen Kortex treten die Ca^{2+} -Transienten zuerst auf. Gezeigt sind zeitlich hochaufgelöste Ca^{2+} -Transienten (40 Hz), die den in Abb. 6b durch den gestrichelten Kasten hervorgehobenen entsprechen. Im piriformen Kortex tritt die Aktivität zuerst auf und ist dann in der Reihenfolge der dorsalen Entfernung vom piriformen Kortex in den Arealen perirhinaler Kortex, temporalen Kortex, parietalen Kortex und okzipitalen Kortex zu sehen. Die durch Buchstaben (A-F) gekennzeichneten Zeitpunkte entsprechen den in Abb. 8 gezeigten Einzelbildern.

b: Die Latenz der Ca^{2+} -Transienten steigt mit der Entfernung vom piriformen Kortex. Dargestellt sind die durchschnittlichen Latenzen mit Standardfehlern des Anstiegs der in den verschiedenen kortikalen Arealen gemessenen Ca^{2+} -Transienten relativ zur im piriformen Kortex gemessenen Aktivität. Mit wachsender Distanz vom piriformen Kortex (x-Achse) steigt die Latenz der Ca^{2+} -Aktivität (y-Achse). Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit der Aktivität beträgt 1.3 ± 0.1 mm/s.

(OC: okzipitaler Kortex; PA: parietaler Kortex; PIR: piriformer Kortex; PR: perirhinaler Kortex; TE: temporaler Kortex)

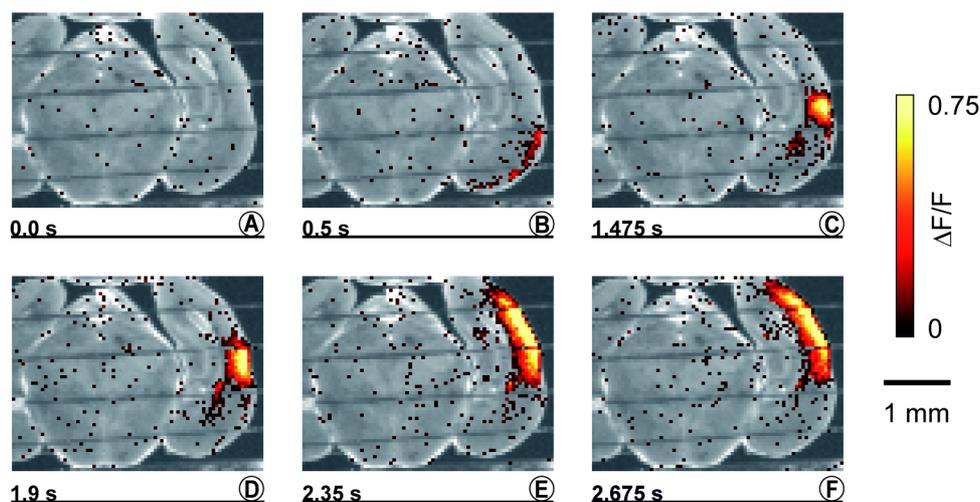


Abb. 8: Weiterleitung der Ca^{2+} -Welle vom piriformen Kortex über den Kortex in dorsaler Richtung. Dargestellt ist eine Bildfolge aus einer Ca^{2+} -Fluoreszenzmessung im Hirnschnitt einer vier Tage alten Maus. Die Aufnahme wurde mit einem Nipkow-Disk-System, einem $\times 1$ -Nikon-Objektiv und einer Redshirt-CCD-Kamera erstellt. Die mit Buchstaben gekennzeichneten Einzelbilder entsprechen den mit korrespondierenden Buchstaben bezeichneten Zeitpunkten in Abb. 7a. Die signalgebende Fluoreszenz wird nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz in Falschfarben gezeigt und ist der Aufnahme des Hirnschnitts überlagert. Es ist eine Ca^{2+} -Welle zu sehen, die im piriformen Kortex entsteht (0.5 s) und sich von dort in die Amygdala (1.475 s) und dorsal über den restlichen Kortex (1.475–2.35 s) bis zum okzipitalen Kortex (2.675 s) ausbreitet.

Im piriformen Kortex war die höchste durchschnittliche Frequenz der ENOs zu beobachten ($3.1 \pm 0.2/\text{min.}$ [Standardfehler], $n = 74$ Schnitte), gefolgt vom perirhinalen Kortex mit niedrigerer Frequenz ($2.1 \pm 0.2/\text{min.}$, $n = 54$ Schnitte). Mit steigender dorsaler Entfernung vom piriformen Kortex nahm die Frequenz in den Arealen temporalen Kortex ($0.9 \pm 0.3/\text{min.}$, $n = 19$ Schnitte), parietalen Kortex ($0.4 \pm 0.1/\text{min.}$, $n = 17$ Schnitte) und okzipitalen Kortex ($0.3 \pm 0.05/\text{min.}$, $n = 16$ Schnitte) ab (**Abb. 9**).

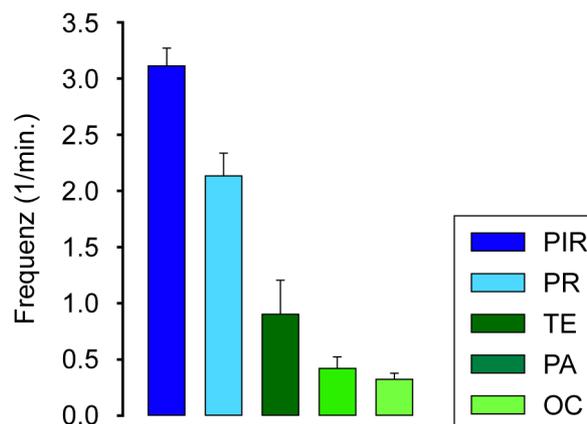


Abb. 9: Der piriforme Kortex zeigt die höchste Frequenz der ENOs im Kortex. Dargestellt ist ein Säulendiagramm der gemittelten Frequenzen der ENOs (1/min.) mit Standardfehlern in den einzelnen kortikalen Arealen. Der piriforme Kortex (PIR, n = 74 Schnitte) zeigt die höchste Frequenz mit $3.1 \pm 0.2/\text{min.}$, gefolgt vom perirhinalen Kortex (PR, n = 54 Schnitte, $2.1 \pm 0.2/\text{min.}$). Mit steigender dorsaler Entfernung der folgenden Hirnareale vom piriformen Kortex nimmt die Frequenz weiter ab (temporaler Kortex [TE]: $0.9 \pm 0.3/\text{min.}$, n = 19 Schnitte; parietaler Kortex [PA]: $0.4 \pm 0.1/\text{min.}$, n = 17 Schnitte; okzipitaler Kortex [OC]: $0.3 \pm 0.05/\text{min.}$, n = 16 Schnitte).

3.1.2 Frühe Netzerwerksoszillationen in subkortikalen Hirnarealen

In denselben Hirnschnitten wurden ENOs in einigen subkortikalen Arealen beobachtet (**Abb. 10**). Es fiel auf, dass die Amygdala das einzige subkortikale Areal war, in welchem mit hoher Frequenz und zeitlich korreliert mit dem piriformen Kortex ENOs auftraten. Die hippocampale Region mit Hippocampus und Gyrus dentatus zeigte ebenfalls ENOs, die jedoch nicht synchron mit jenen in anderen Hirnarealen auftraten. Sofern Ca^{2+} -Transienten im Mittelhirn gemessen wurden, waren diese weder synchron mit anderen subkortikalen Arealen noch mit dem piriformen Kortex. Die in der Amygdala ($2.5 \pm 0.1/\text{min.}$ [Standardfehler], n = 74 Schnitte) und im Hippocampus ($2.6 \pm 0.4/\text{min.}$, n = 42 Schnitte) beobachteten ENO-Frequenzen waren der im piriformen Kortex vorhandenen Frequenz ähnlich. Jene im Gyrus dentatus war geringer ($1.4 \pm 0.1/\text{min.}$, n = 4 Schnitte). In den Arealen des Zwischen- und Mittelhirns (n = 6 Schnitte; Pedunculus cerebri: keine ENOs nachweisbar; Nucleus geniculatus lateralis: $0.1 \pm 0.1/\text{min.}$; ventrale thalamische Nuklei: $0.1 \pm 0.1/\text{min.}$; mediale thalamische Nuklei: $0.1 \pm 0.1/\text{min.}$; Tractus mamillothalamicus: $0.1 \pm 0.1/\text{min.}$; hypothalamische Nuklei: $0.05 \pm 0.05/\text{min.}$) waren wenige bis keine ENOs nachweisbar (**Abb. 11**).

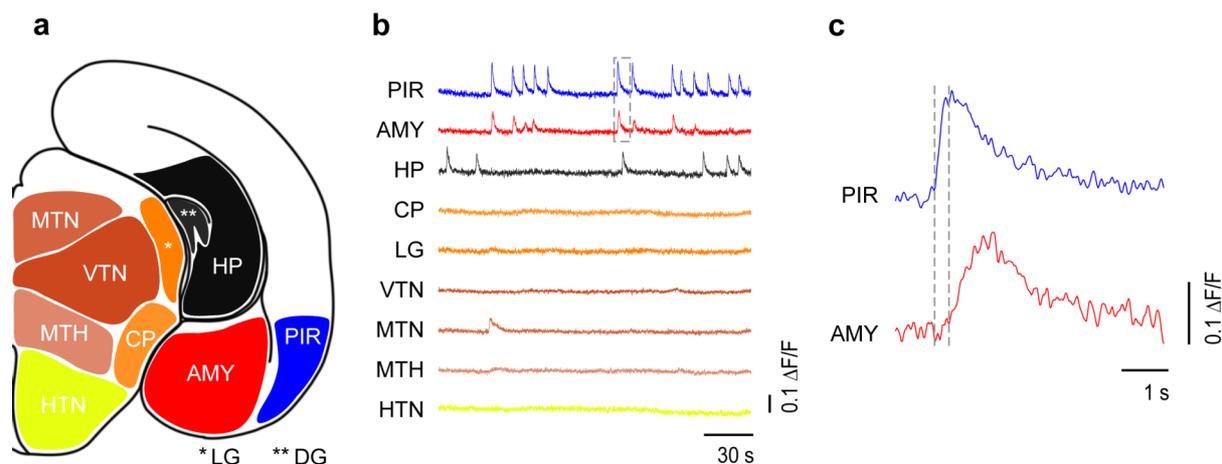


Abb. 10a: Subkortikale Areale im Mäusehirn. Die Abbildung zeigt das Schema einer rechten Hemisphäre eines koronalen Hirnschnitts. Die verschiedenen subkortikalen Areale und der piriforme Kortex sind farblich gekennzeichnet (modifiziert aus Valverde (1998); Paxinos und Franklin (2001)).

b: ENOs in subkortikalen Arealen einer vier Tage alten Maus. Die einzelnen Ca^{2+} -Transienten entstammen derselben Aufnahme wie in Abb. 6. Die einzelnen Aufnahme-spuren sind farblich nach den ihnen entsprechenden Arealen in (a) gekennzeichnet. ENOs treten in der Amygdala zeitlich korreliert mit jenen im piriformen Kortex auf, allerdings mit geringerer Frequenz. Im Mittelhirn ist bis auf einen Ca^{2+} -Transienten in den medialen Thalamuskernen keine Aktivität sichtbar. Die Transienten der ENOs in der hippocampalen Region mit Hippocampus und Gyrus dentatus sind nicht mit jenen im piriformen Kortex synchron.

c: Im piriformen Kortex treten die Ca^{2+} -Transienten früher auf als in der Amygdala. Zu sehen sind zeitlich hochaufgelöste Ca^{2+} -Transienten (40 Hz). Die Latenz im gezeigten Beispiel beträgt 450 ms.

(AMY: Amygdala; CP: Pedunculus cerebri; DG: Gyrus dentatus; HP: Hippocampus; HTN: hypothalamische Nuklei; LG: Nucleus geniculatus lateralis; MTH: Tractus mamillothalamicus; MTN: mediale thalamische Nuklei; PIR: piriformer Kortex; VTN: ventrale thalamische Nuklei.)

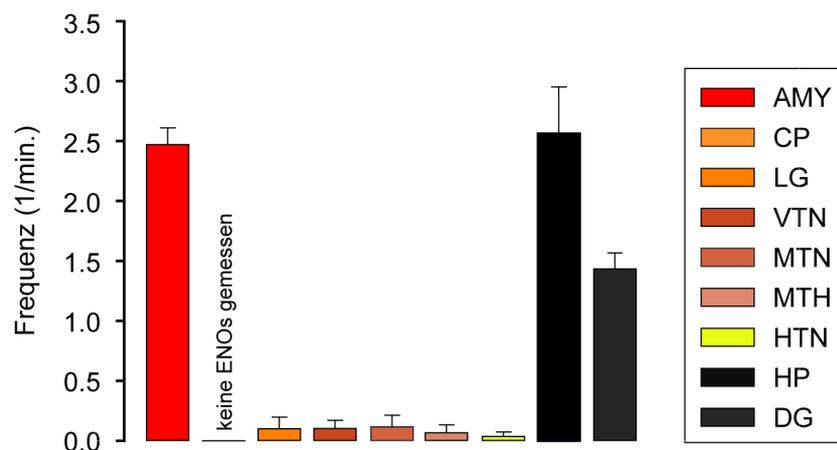


Abb. 11: Die Amygdala und die Hippocampus-Region zeigen als einzige subkortikale Areale ENOs mit hoher Frequenz. Dargestellt ist ein Säulendiagramm der gemittelten Frequenzen der ENOs (1/min.) mit Standardfehlern in den einzelnen subkortikalen Arealen. Die hippocampale Region mit Hippocampus (HP) und Gyrus Dentatus (DG) und die Amygdala (AMY) sind die subkortikalen Areale mit den höchsten Frequenzen der ENOs (HP: 2.6 ± 0.4 /min., $n = 42$ Schnitte; DG: 1.4 ± 0.1 /min., $n = 4$ Schnitte; AMY: 2.5 ± 0.1 /min., $n = 74$ Schnitte). In den Arealen des Mittelhirns sind wenige bis keine ENOs nachweisbar ($n = 6$ Schnitte; Pedunculus cerebri [CP]: keine ENOs nachweisbar; Nucleus geniculatus lateralis [LG]: 0.1 ± 0.1 /min.; ventrale thalamische Nuklei [VTN]: 0.1 ± 0.1 /min.; mediale thalamische Nuklei [MTN]: 0.1 ± 0.1 /min.; Tractus mamillothalamicus [MTH]: 0.1 ± 0.1 /min.; hypothalamische Nuklei [HTN]: 0.05 ± 0.05 /min.).

Die zeitliche Verzögerung der ENOs in der Amygdala im Vergleich zur Aktivität im piriformen Kortex wurde durch Registrierungen der piriform-amygdaloiden Region mit höherer räumlicher Vergrößerung ($\times 2.5$) näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass die ENOs im piriformen Kortex initiiert wurden und sich daraufhin wellenähnlich ventral- und dorsalwärts über den piriformen Kortex, in (dorsale) Richtung zum perirhinalen Kortex und in mediale Richtung über den basolateralen und lateralen Nucleus in die Amygdala ausbreiteten (**Abb. 13a**). Die Ca^{2+} -Transienten traten in der Amygdala im Vergleich zum piriformen Kortex mit einer durchschnittlichen zeitlichen Verzögerung von 508 ± 67 ms auf ($n = 10$ Schnitte). Das entspricht einer Ausbreitungsgeschwindigkeit der Oszillationen vom piriformen Kortex in die Amygdala von 1.5 ± 0.2 mm/s (**Abb. 10c**).

3.2 Intrinsische Netzwerkoszillationen im piriformen Kortex

Die Tatsache, dass ENOs in mehreren Hirnarealen zeitlich korreliert auftraten, wirft die Frage nach dem Zusammenhang und der Ausbreitungsrichtung der Aktivität dieser Areale auf. In den folgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass im piriformen Kortex intrinsische, von anderen Hirnarealen unabhängige ENOs entstehen. Diese werden in die angrenzenden Hirnareale fortgeleitet, was dem piriformen Kortex die Funktion eines Schrittmachers der ENOs verleiht.

3.2.1 Isolierung des piriformen Kortex

Die zwei Resultate, (1) dass im piriformen Kortex die Frequenz der ENOs am höchsten war und (2) dass die Ca^{2+} -Transienten dort früher auftraten als in anderen Arealen, legen die Folgerung nahe, dass ENOs im piriformen Kortex generiert werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde in einer Reihe von Experimenten der piriforme Kortex vom restlichen Gewebe des Hirnschnitts durch Schnitte mittels eines Skalpell isoliert.

Zunächst wurden Kontrollaufnahmen der Areale piriformer Kortex, perirhinaler Kortex und Amygdala im intakten Hirnschnitt gemacht, wobei zeitlich korrelierte ENOs in allen drei Arealen auftraten (**Abb. 12a, b**). Daraufhin wurde das Gewebe zwischen dem piriformen Kortex und der Amygdala sowie zwischen dem piriformen Kortex und dem perirhinalen Kortex vollständig durchtrennt. Nach einer Erholungsphase von 30–60 Minuten wurde erneut Spontanaktivität beobachtet (**Abb. 12c, d**). Die Falschfarbendarstellung der Ca^{2+} -Aktivität in der piriform-amygdaloiden Region vor und nach der Isolierung des piriformen Kortex in Einzelbildern der Aufnahmesequenzen verdeutlicht die Entstehung und Ausbreitung der ENOs in den isolierten Hirnarealen piriformer Kortex und Amygdala (**Abb. 13**).

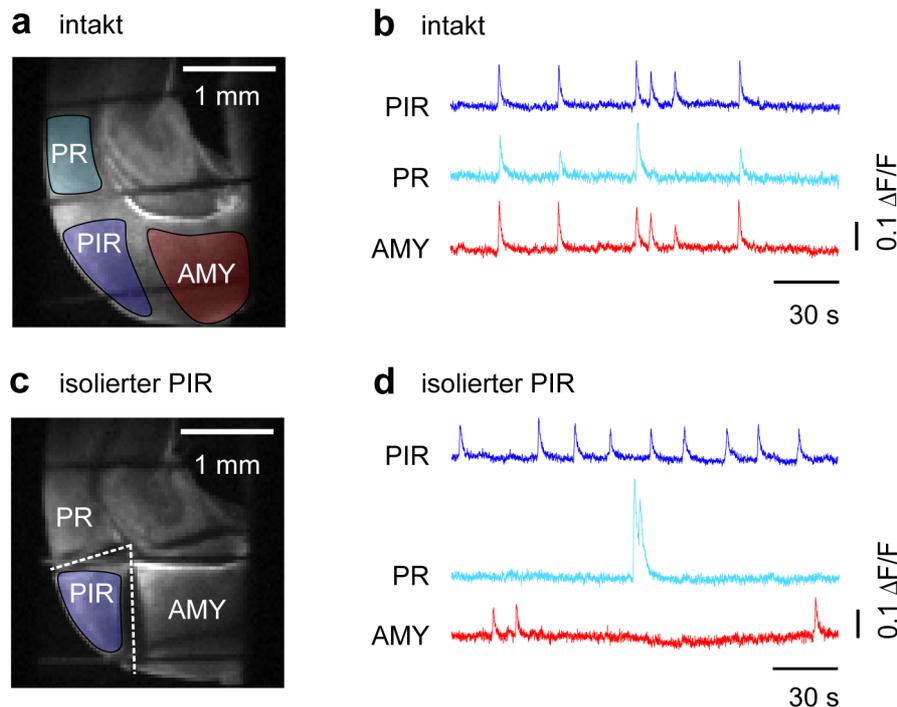


Abb. 12: Intrinsische ENOs nach Isolierung des piriformen Kortex.

a: Linker ventraler Ausschnitt eines koronalen Hirnschnitts einer zwei Tage alten Maus mit den Hirnarealen perirhinaler Kortex (PR, hellblau eingefärbt), piriformer Kortex (PIR, dunkelblau eingefärbt) und Amygdala (AMY, rot eingefärbt). Die Aufnahme wurde mit einem Nipkow-Disk-System, einem $\times 2.5$ -Zeiss-Objektiv und einer Redshift-CCD-Kamera erstellt.

b: Zeitlich korrelierte spontane Ca^{2+} -Transienten in piriformem Kortex (dunkelblau), perirhinalen Kortex (hellblau) und Amygdala (rot) im intakten Gewebe des in (a) gezeigten Hirnschnitts.

c: Derselbe Ausschnitt wie in (a) nach Durchtrennen des Gewebes zwischen dem piriformen Kortex und der Amygdala sowie zwischen dem piriformen und dem perirhinalen Kortex. Die weißen gestrichelten Linien zeigen die Gewebsschnitte zur Isolierung des piriformen Kortex an.

d: Spontane Ca^{2+} -Transienten in denselben Arealen nach Isolierung des piriformen Kortex. Die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex ist unverändert hoch. Die ENOs im perirhinalen Kortex und in der Amygdala zeigen eine niedrigere Frequenz als in (a) und treten nicht mehr zeitlich korreliert mit jenen im piriformen Kortex auf.

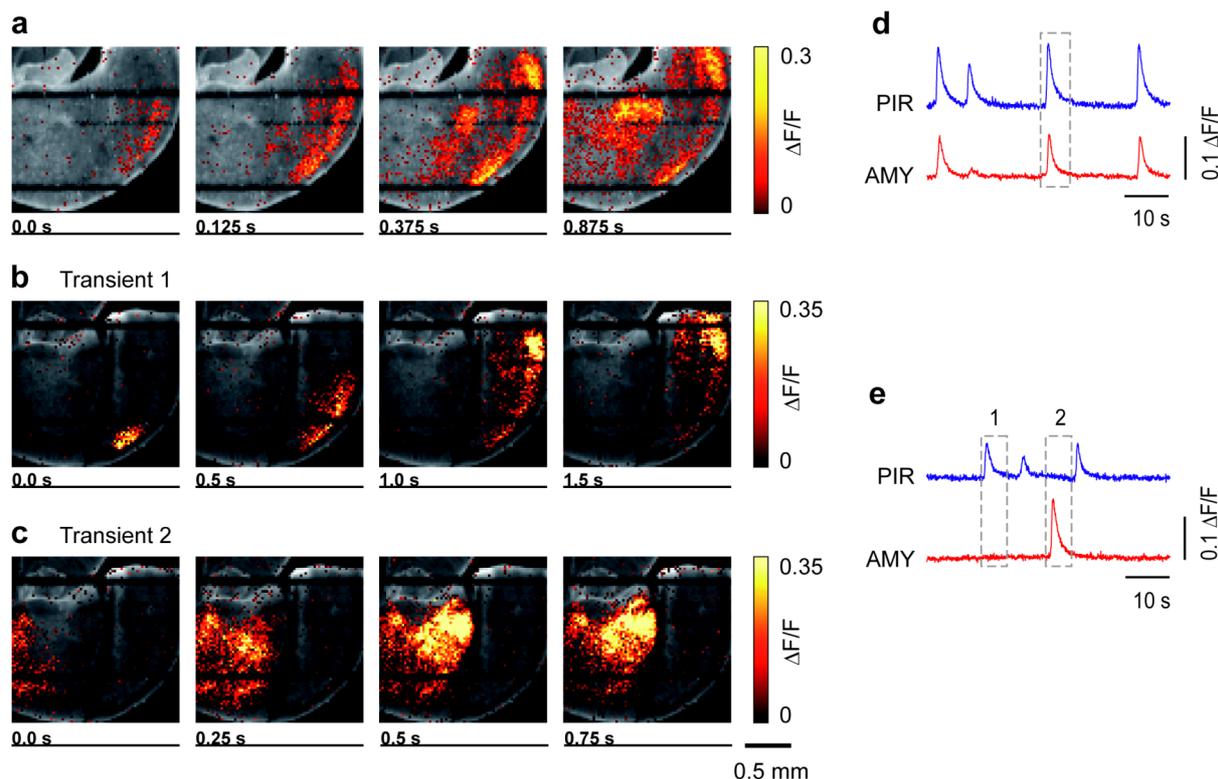


Abb 13a: Weiterleitung der Ca^{2+} -Welle aus dem piriformen Kortex in die Amygdala. Dargestellt ist eine Bildfolge aus einer Ca^{2+} -Fluoreszenzmessung im Hirnschnitt einer drei Tage alten Maus. Die Aufnahme wurde mit einem Nipkow-Disk-System, einem $\times 2.5$ -Zeiss-Objektiv und einer Redshirt-CCD-Kamera erstellt. Die signalgebende Fluoreszenz wird nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz in Falschfarben gezeigt. Es ist eine Ca^{2+} -Welle zu sehen, die im piriformen Kortex entsteht (0 s) und sich über diesen in ventraler und dorsaler Richtung ausbreitet (0.125–0.375 s). In medialer Richtung breitet sie sich über den basolateralen und lateralen Nucleus in der Amygdala aus (0.125–0.875 s). Die abgebildete Aktivität entspricht dem in (d) durch den gestrichelten Kasten hervorgehobenen Ca^{2+} -Transienten.

b: Ca^{2+} -Welle im piriformen Kortex nach seiner Isolierung. Dargestellt ist eine Bildfolge einer Messung im selben Hirnschnitt wie in (a). Es ist eine Ca^{2+} -Welle zu sehen, die sich im piriformen Kortex ausbreitet. Sie wird nicht in die Amygdala fortgeleitet. Die abgebildete Aktivität entspricht dem in (e) mit 1 bezeichneten und durch den gestrichelten Kasten hervorgehobenen Transienten.

c: Ca^{2+} -Welle in der Amygdala nach Durchtrennung der Verbindung zum piriformen Kortex. Dargestellt ist eine im selben Hirnschnitt wie in (a) aufgenommene Bildfolge. In der vom piriformen Kortex getrennten Amygdala entsteht Ca^{2+} -Aktivität, die sich über die Amygdala ausbreitet. Sie entspricht dem in (e) mit 2 bezeichneten und durch den gestrichelten Kasten hervorgehobenen Transienten.

d: Synchroner Ca^{2+} -Transienten in piriformem Kortex und Amygdala im intakten Hirnschnitt. Die gezeigten Transienten entstammen derselben Aufnahme wie die in (a) gezeigten Einzelbilder. Die in (a) gezeigte Aktivität entspricht dem durch den gestrichelten Kasten hervorgehobenen Transienten.

e: Ca^{2+} -Transienten in piriformem Kortex und Amygdala nach Isolierung des piriformen Kortex. Die gezeigten Transienten entstammen derselben Aufnahme wie die in (a) gezeigten Einzelbilder. Die in (b) und (c) gezeigte Aktivität entspricht den durch die gestrichelten Kästen hervorgehobenen und mit 1 bzw. 2 bezeichneten Transienten.

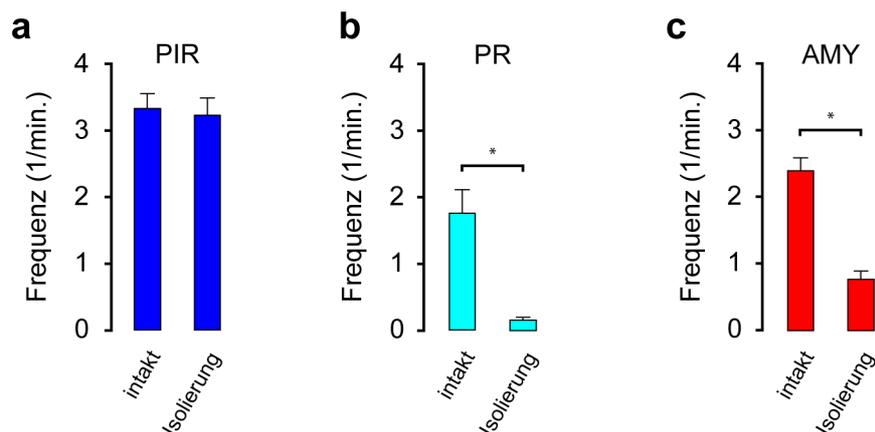


Abb. 14a: Unveränderte Frequenz der intrinsischen ENOs im piriformen Kortex nach seiner Isolierung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Frequenzen der Ca^{2+} -Transienten im piriformen Kortex (PIR; $n = 10\text{--}12$) vor („intakt“) und nach seiner Isolierung („Isolierung“). Im isolierten piriformen Kortex ist die Frequenz der ENOs unverändert ($\Delta f = -3.1 \pm 7.8\%$, $p(t) = 0.44$).

b: Abnahme der Frequenz der ENOs im perirhinalen Kortex nach Trennung vom piriformen Kortex. Dargestellt sind die Frequenzmittelwerte der ENOs im perirhinalen Kortex (PR; $n = 8\text{--}11$) vor und nach Trennung vom piriformen Kortex. Die Frequenzen sind nach Gewebstrennung signifikant reduziert ($\Delta f = -90.8 \pm 2.7\%$, * $p(t) < 0.004$).

c: Abnahme der Frequenz der ENOs in der Amygdala nach Trennung vom piriformen Kortex. Dargestellt sind die Frequenzmittelwerte der ENOs in der Amygdala (AMY; $n = 10\text{--}12$) vor und nach Trennung vom piriformen Kortex. Die Frequenzen sind nach Gewebstrennung signifikant reduziert ($\Delta f = -67.8 \pm 5.3\%$, * $p(t) < 0.0004$).

Die durchschnittliche Frequenz der ENOs im piriformen Kortex war verglichen mit ihrem Ausgangswert in den Kontrollaufnahmen⁸ unverändert (Frequenzänderung [Δf] = $-3.1 \pm 7.8\%$; $p[t] = 0.44$) (Abb. 14a; P2–P3; $n = 10$ Schnitte). Selbst als der piriforme Kortex isoliert und ohne Verbindung zu seinen benachbarten Arealen war, konnten hier also intrinsische ENOs nachgewiesen werden, die in ihrer Frequenz unabhängig von anderen Arealen waren. Die durchschnittlichen Frequenzen der ENOs in den benachbarten Arealen perirhinaler Kortex und Amygdala hingegen nahmen nach der Trennung der Verbindung zum piriformen Kortex im Vergleich zu den Kontrollaufnahmen⁹ signifikant ab (Abb. 14b u. c; perirhinaler Kortex: $\Delta f = -90.8 \pm 2.7\%$; $p(t) < 0.004$; Amygdala: $\Delta f = -67.8 \pm 5.3\%$; $p(t) < 0.0004$). Dieses Ergebnis zeigt, dass ohne Einfluss des piriformen Kortex im perirhinalen Kortex und in der Amygdala eigenständig ENOs generiert werden können (Abb. 12d u. 13c), wenn auch mit geringerer Frequenz als im piriformen Kortex.

⁸ $3.3 \pm 0.2/\text{min.}$

⁹ perirhinaler Kortex: $1.8 \pm 0.4/\text{min.}$; Amygdala: $2.4 \pm 0.2/\text{min.}$

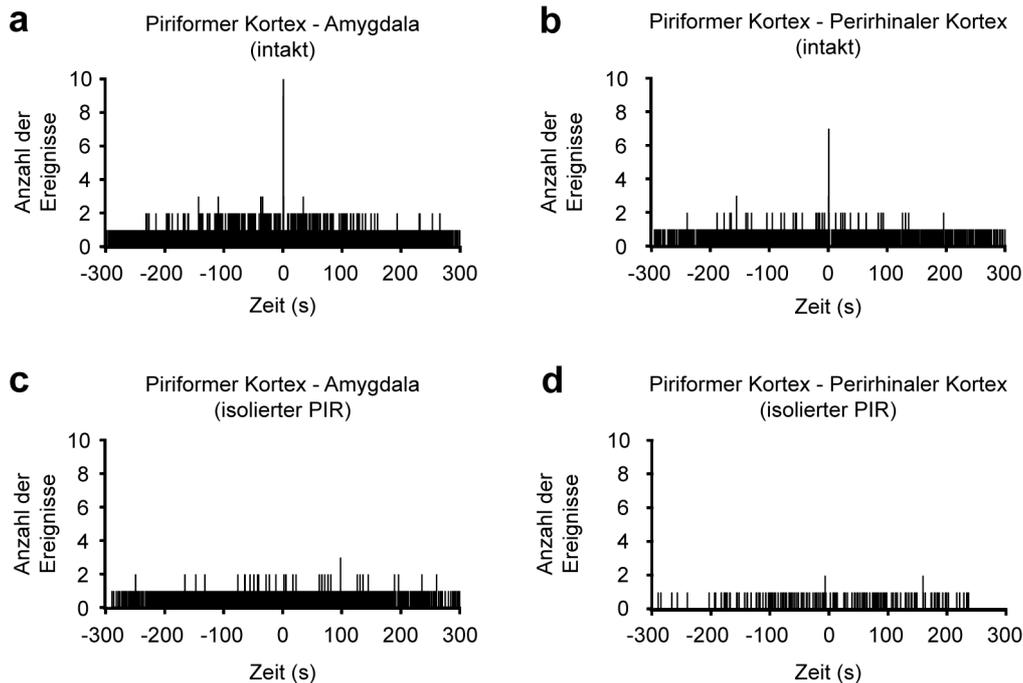


Abb. 15a: Korrelierte ENOs im piriformen Kortex (PIR) und in der Amygdala (AMY) im intakten Hirnschnitt. Aufgetragen im Kreuzkorrelogramm ist die Anzahl der Transienten („Ereignisse“), welche im selben Zeitfenster (d.h. ein Einzelbild der Ca^{2+} -Fluoreszenzaufnahme, entspricht 25 ms) korreliert in beiden Hirnarealen (piriformer Kortex und Amygdala) auftreten. Es ist eine zeitliche Verschiebung vom piriformen Kortex zur Amygdala von 0.475 s festzustellen.

b: Korrelierte ENOs im piriformen und perirhinalen Kortex (PR) im intakten Hirnschnitt. Das Kreuzkorrelogramm zeigt eine Korrelation der Transienten in beiden Arealen mit einer zeitlichen Verschiebung von 0.65 s.

c: Nach Gewebstrennung keine korrelierten ENOs mehr im piriformen Kortex und in der Amygdala.

d: Nach Gewebstrennung keine korrelierten ENOs mehr im piriformen Kortex und im perirhinalen Kortex.

Mit den Daten dieser Experimente wurde eine Kreuzkorrelationsanalyse erstellt, die jeweils für die Hirnareale piriformer Kortex und Amygdala sowie piriformer Kortex und perirhinaler Kortex berechnet wurde (**Abb. 15**). Dafür wurden die Aufnahmespuren der Ca^{2+} -Fluoreszenzmessungen mithilfe einer in Igor Pro implementierten Software-Routine in binäre Daten verwandelt, wobei dem Beginn des Anstiegs eines Ca^{2+} -Transienten der Wert „1“ zugewiesen wurde, sämtlichen anderen Datenpunkten der Wert „0“. Damit wurden für jede Aufnahmespur für die jeweiligen Paare der Hirnareale Kreuzkorrelationen berechnet. Die Kreuzkorrelogramme für jedes einzelne Experiment wurden addiert. Im intakten Hirnschnitt

zeigte sich sowohl für die Hirnareale piriformer Kortex und Amygdala (n = 10 Hirnschnitte) als auch für den piriformen und den perirhinalen Kortex (n = 8 Hirnschnitte) eine deutliche Korrelation mit einer zeitlichen Verschiebung der Maxima der Kreuzkorrelogramme gegenüber dem Nullwert von 0.475 s bzw. 0.65 s. Diese Verschiebung spiegelt die bereits in den Abschnitten 3.1.1 (siehe auch Abb. 7b) und 3.1.2 (siehe auch Abb. 10c) beschriebene Latenz der Transienten von piriformem Kortex zur Amygdala bzw. zum perirhinalen Kortex wider. Nach dem Durchtrennen der Verbindung zwischen piriformem Kortex und Amygdala (n = 11 Hirnschnitte) sowie zwischen piriformem und perirhinalen Kortex (n = 8 Hirnschnitte) waren die Ca²⁺-Transienten der jeweiligen Areale nicht mehr zeitlich korreliert.

Die Korrelation der Ca²⁺-Transienten im perirhinalen Kortex und in der Amygdala im intakten Hirngewebe mit jenen im piriformen Kortex, die wesentlich höhere Frequenz der ENOs in diesen beiden Arealen bei intakter Verbindung zum piriformen Kortex sowie die Tatsache, dass die ENOs im piriformen Kortex zuerst auftreten und mit einer gewissen Latenz in der Amygdala und im perirhinalen Kortex erscheinen, weisen darauf hin, dass in diesem Schnittpräparat im piriformen Kortex der Entstehungsort der ENOs zu finden ist, die sich dann dorsal über den Kortex (siehe 3.1.1) und subkortikal in die Amygdala (siehe auch 3.1.2) ausbreiten.

3.2.2 Schicht II des piriformen Kortex als Hauptentstehungsort

Um zu bestimmen, in welcher Schicht des piriformen Kortex intrinsische ENOs entstehen, wurden in mehreren Hirnschnitten in diesem Areal mit höherer räumlicher Vergrößerung (×4 / ×10) spontane Ca²⁺-Transienten mit einer Aufnahme­frequenz von 40 Hz gemessen (**Abb. 16a**). Dabei wurden in Schicht II und III regelmäßig zeitlich korreliert auftretende ENOs beobachtet, in Schicht I dagegen selten (**Abb. 16b**). Die Mehrzahl (71.8% [51/71]) der beobachteten Transienten trat zuerst in Schicht II auf (**Abb. 16c**; P3; n = 4 Schnitte, 71 Transienten). In Schicht III traten 45.1% (32/71) der Transienten zuerst auf. In Schicht I waren dies 1.4% (1/71). Der Anstiegszeitpunkt einiger Transienten war in mehreren Schichten (meist Schicht II und III) gleichzeitig¹⁰. Das erklärt, dass die Summe der Prozentwerte der einzelnen Schichten größer als hundert ist. Die Experimente zeigen, dass ENOs in allen drei

¹⁰ d.h. entsprechend der zeitlichen Auflösung innerhalb des Aufnahmeintervalls von 25 ms

Schichten des piriformen Kortex entstehen können, wobei die überwiegende Mehrheit in den zellreichen Schichten II und III beginnt. In Schicht II, wo die höchste Dichte an Neuronensomata zu finden ist, werden die meisten der ENOs generiert.

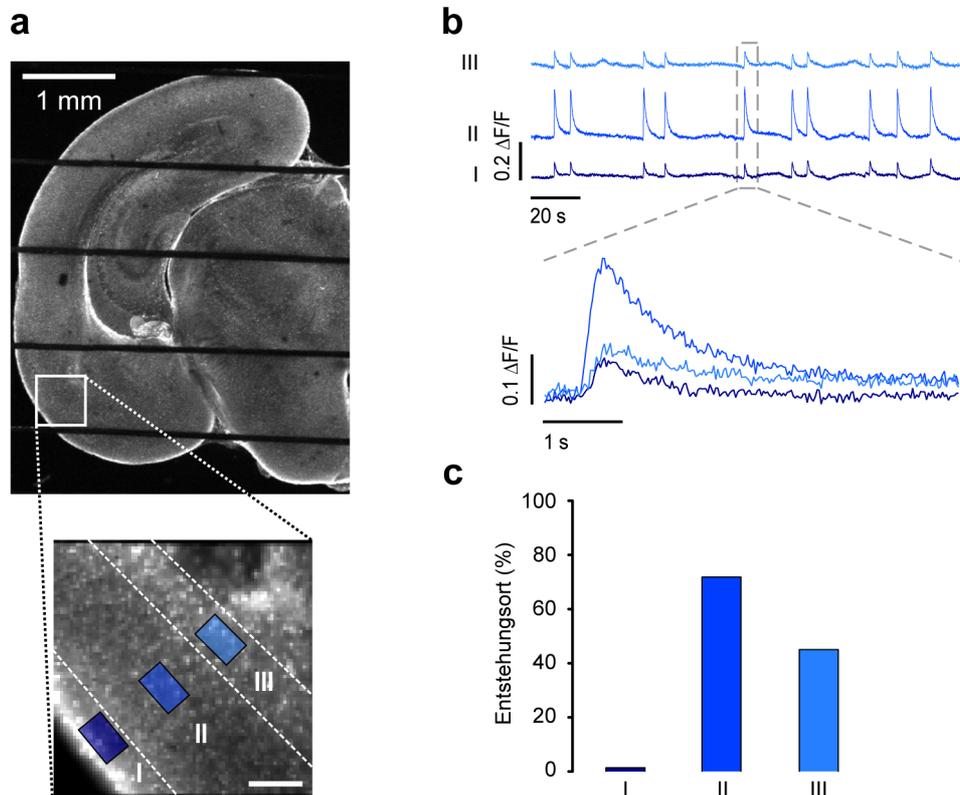


Abb. 16a: Die drei Schichten des piriformen Kortex. Oben: Die Abbildung zeigt ein Übersichtsbild einer linken Hemisphäre eines koronalen Hirnschnitts. Sie wurde an einem Nipkow-Disk-System mit einem $\times 1$ -Nikon-Objektiv und einer Pixelfly-CCD-Kamera erstellt. Unten: Der Ausschnitt zeigt eine mit einem $\times 10$ -Nikon-Objektiv und einer Redshirt-CCD-Kamera an einem Nipkow-Disk-System erstellte Aufnahme im piriformen Kortex. Die weißen gestrichelten Linien sollen die drei Schichten des piriformen Kortex (I, II, III) verdeutlichen. Die farblich gekennzeichneten Regionen zeigen die *regions of interest* (ROIs) bei der Auswertung des Signals an. Skalierungsbalken: 100 μm .

b: ENOs in den drei Schichten des piriformen Kortex. Oben: Zeitlich korrelierte Ca^{2+} -Transienten in den drei Schichten des piriformen Kortex. Unten: Ca^{2+} -Transienten der drei Schichten in hoher zeitlicher Auflösung. In Schicht II (blau) tritt der Transient zuerst auf, in Schicht I (dunkelblau) und Schicht III (hellblau) beginnt der Transient mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 200 ms.

c: Die Mehrheit der ENOs tritt in Schicht II zuerst auf. Das Säulendiagramm zeigt den Anteil der Ca^{2+} -Transienten an der Gesamtzahl der beobachteten Transienten ($n = 4$ Schnitte, 71 Transienten), die in der jeweiligen Schicht entstehen. In Schicht II tritt die Mehrzahl der Ca^{2+} -Transienten zuerst auf (51/71, 71.8%), in Schicht III treten 45.1% (32/71) zuerst auf, in Schicht I sind es 1.4% (1/71). Die Tatsache, dass die Summe der Prozentwerte größer als hundert ist, ergibt sich aus der Beobachtung, dass manche Ca^{2+} -Transienten in mehr als einer Region gleichzeitig beginnen (meistens Schicht II und III).

3.3 Anteil der an Netzwerkoszillationen beteiligten Neuronen

Wegen der globalen Ausbreitung der ENOs auch über weite Distanzen ist zu vermuten, dass eine große Zahl an Neuronen an ihnen beteiligt ist. Zudem wurde für den Rattenkortex bereits beschrieben, dass über 85% der Neuronen an den ENOs teilnehmen (Garaschuk et al. 2000). Im Mäusekortex wurde beobachtet, dass abhängig vom Alter der Tiere 20–100% der Neuronen synchrone Ca^{2+} -Transienten zeigen (Corlew et al. 2004). Durch Aufnahmen mit hoher räumlicher Vergrößerung ($\times 63$) sowohl im piriformen Kortex als auch in der Amygdala wurde in der vorliegenden Arbeit der Anteil der an ENOs beteiligten Neuronen bestimmt (**Abb. 17 u. 18**; P2–P4). Die Mehrzahl zellulärer spontaner Ca^{2+} -Transienten trat in mehreren Zellen zeitlich korreliert auf neben wenigen Transienten, die in einzelnen Zellen beobachtet wurden und nicht korreliert mit Aktivität anderer Neuronen war. Als ENOs wurden Ca^{2+} -Transienten definiert, welche in $\geq 20\%$ der Neuronen synchron auftraten. Es konnte gezeigt werden, dass sich in Schicht II des piriformen Kortex ($n = 6$ Schnitte, 180 Zellen) als hauptsächlichem Entstehungsort der ENOs $94.5 \pm 1.6\%$ der Neuronen an ENOs beteiligten. Als benachbarte Region, deren ENOs wesentlich durch die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex beeinflusst werden und die ausgeprägte reziproke Verbindungen mit dem piriformen Kortex besitzt, wurde der basolaterale Nukleus der Amygdala gewählt (Krettek und Price 1977b; Russchen 1982; McDonald 1992). Hier ($n = 6$ Schnitte, 102 Zellen) nahmen $93.6 \pm 1.5\%$ der Neuronen an ENOs teil. Diese Ergebnisse bestätigen bereits beschriebene Funde, wonach ein hoher Anteil der Neuronen bei spontanen Oszillationen synchron aktiv ist. Die in diesem Schnittpräparat beobachteten ENOs im piriformen Kortex und in der Amygdala basieren demnach auf spontaner neuronaler Aktivität, an welcher sich beinahe das gesamte neuronale Netzwerk mit hoher Synchronität beteiligt. Die Zahl der beteiligten Neuronen ist unabhängig davon, ob sie am Entstehungsort im piriformen Kortex die ENOs generieren oder ob sie sich an der Aktivität beteiligen, wenn sie durch übertragene ENOs in der Amygdala angeregt werden.

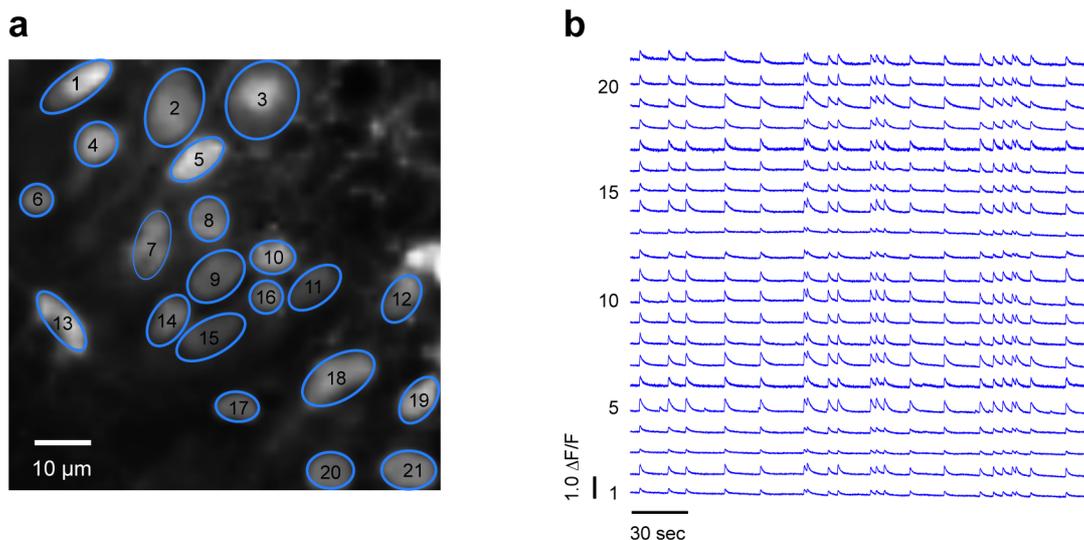


Abb. 17a: Neuronen im piriformen Kortex. Gezeigt wird eine mit einem Nipkow-Disk-System, einem $\times 63$ -Leica-Objektiv und einer Redshirt-CCD-Kamera angefertigte Aufnahme der Schicht II des piriformen Kortex. Für die Messung aufgenommene Neuronen sind durch dunkelblaue Ovale und ihre Nummerierung gekennzeichnet.

b: Über die 90% der Neuronen im piriformen Kortex beteiligen sich an den Netzwerkoszillationen. Zu sehen sind die Ca^{2+} -Messungen der Neuronen aus (a). Die Nummerierung am linken Rand entspricht jener in (a). Alle Neuronen zeigen synchrone Ca^{2+} -Transienten. An den meisten der in mehr als 20% der Zellen zeitlich korrelierten auftretenden Ca^{2+} -Transienten beteiligen sich alle Zellen.

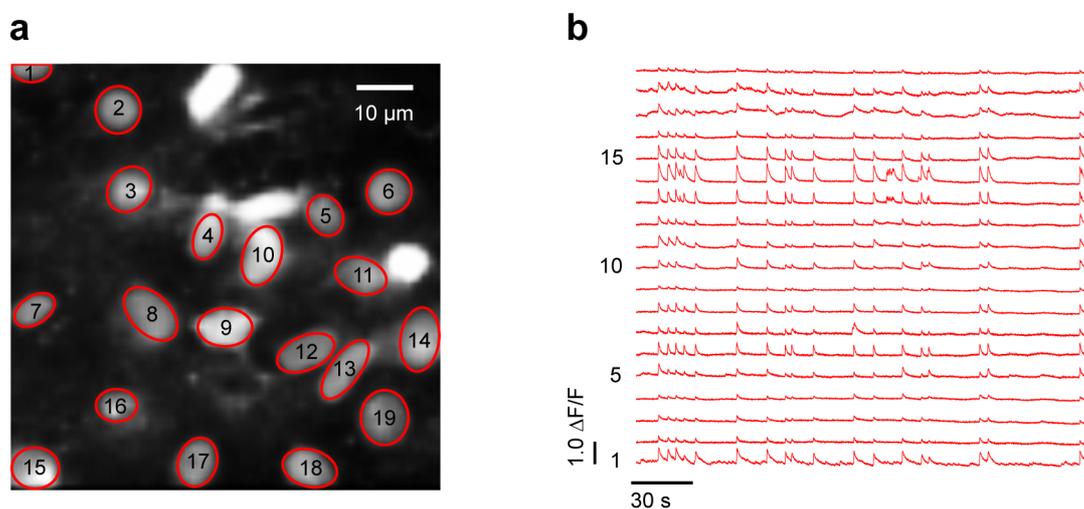


Abb. 18a: Neuronen in der Amygdala. Gezeigt wird eine mit demselben System wie in Abb. 17 angefertigte Aufnahme des basolateralen Kerns der Amygdala. Für die Messung beobachtete Neuronen sind durch rote Ovale und ihre Nummerierung gekennzeichnet.

b: Über die 90% der Neuronen in Amygdala beteiligen sich an den Netzwerkoszillationen. Zu sehen sind die Aufnahmespuren der Neuronen aus (a). Die Nummerierung am linken Rand entspricht jener in (a). An allen zeitlich korrelierten Ca^{2+} -Transienten sind alle Neuronen beteiligt.

3.4 Altersprofil der frühen Netzwerkoszillationen

Es ist bereits bekannt, dass die Frequenz der ENOs im Rattenkortex mit steigendem Alter der Tiere abnimmt und ab P6–P7 keine kortikalen ENOs mehr nachweisbar sind (Garaschuk et al. 2000). Im Mauskortex wurde beschrieben, dass synchrone spontane Aktivität (SSA) insbesondere um den Tag der Geburt (P0) auftritt und die Synchronität in den folgenden Tagen (> P2) sehr rasch abnimmt (Corlew et al. 2004). Um das Auftreten von ENOs im unreifen piriformen Kortex im Lauf der postnatalen Hirnentwicklung zu untersuchen, wurden für die vorliegende Arbeit Hirnschnitte von Mäusen im Alter zwischen einem und einschließlich zwölf Tagen nach Geburt (P1–P12) auf die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex untersucht (**Abb. 19**). Die durchschnittliche Frequenz der ENOs nahm in den ersten drei Tagen nach Geburt zu, bis sie an P3–P4 ihr höchstes Niveau erreichte (P3: $4.0 \pm 0.3/\text{min.}$, $n = 12$ Schnitte; P4: $3.9 \pm 0.3/\text{min.}$, $n = 18$ Schnitte). Danach verringerte sich die Frequenz kontinuierlich bis P9, wo sie einen Wert von $1.5 \pm 0.8/\text{min.}$ erreichte ($n = 4$ Schnitte). An P10 fiel die Frequenz dann steil ab ($0.3 \pm 0.1/\text{min.}$, $n = 6$ Schnitte). Zudem zeigten die Ca^{2+} -Transienten im Vergleich zu jüngeren Tieren eine stark (um einen Faktor von 2–3) verringerte Amplitude. An P12 waren keine ENOs mehr nachweisbar.

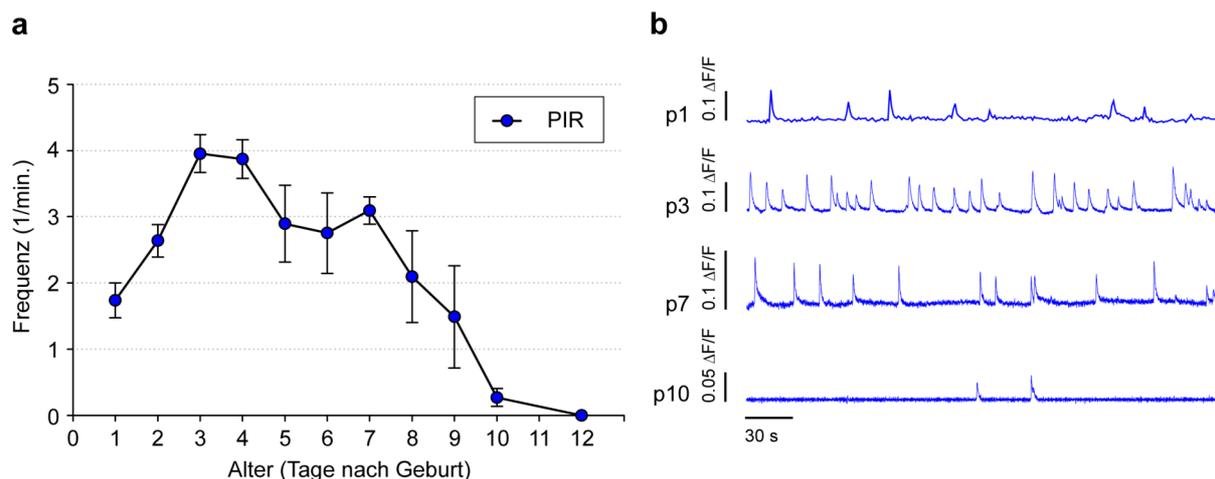


Abb. 19a: Entwicklungsprofil der ENO-Frequenzen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der Frequenzen der ENOs (1/min.) im piriformen Kortex 1–12 Tage postnatal (P1–P12; $n = 4$ –27).

b: ENOs in unterschiedlichen Altersstufen. Gezeigt werden Ca^{2+} -Messungen im piriformen Kortex an P1, P3, P7 und P10. Die Frequenz der ENOs nimmt zunächst zu und mit steigendem Alter wieder ab.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich zwar von den im Rattenkortex gemessenen Daten, wo die ENO-Aktivität früher sistiert. Ebenso zeigen sie eine über einen längeren Zeitraum andauernde synchrone Netzwerkaktivität, als bisher vom Mäusekortex bekannt. Sie bestätigen hingegen, dass die intrinsisch im piriformen Kortex generierte spontane oszillatorische Aktivität ähnlich den bisher beschriebenen ENOs ein auf die frühen postnatalen Tage begrenztes Phänomen der Hirnentwicklung ist und damit diesen wahrscheinlich entspricht.

3.5 Den Netzwerkoszillationen zugrunde liegende Mechanismen

Um die Mechanismen, die den im piriformen Kortex intrinsisch generierten ENOs zugrunde liegen, zu erhellen, wurden verschiedene pharmakologische Substanzen mittels der sogenannten „Badapplikation“ eingesetzt. Dabei werden die Pharmaka dem ACSF hinzugegeben, der die Messkammer perfundiert, in welcher sich der Hirnschnitt befindet. Nach einer gewissen Zeit diffundieren die Pharmaka in den Hirnschnitt. Das Auswaschen der Pharmaka geschieht, indem die Messkammer mit ACSF ohne zugesetztes Pharmakon perfundiert wird. Messungen wurden vor dem Einwaschen des Pharmakons vorgenommen („Kontrolle“), während der Anwesenheit des Pharmakons in der Perfusionslösung und nach einer Auswaschzeit von ca. 45–60 Minuten („Auswaschen“). Die Ergebnisse dieser Experimente sind im Folgenden dargestellt.

3.5.1 Aktionspotentiale als notwendige Bedingung für Netzwerkoszillationen

Tetrodotoxin (TTX) ist ein spezifischer Blocker von spannungsabhängigen Natrium-Ionen (Na^+)-Kanälen, die für die Erzeugung von Aktionspotentialen erforderlich sind. Durch das Einwaschen von TTX wurden ENOs vollständig in den drei beobachteten Hirnarealen perirhinaler Kortex, piriformer Kortex und Amygdala blockiert (**Abb. 20**; 250 nM TTX; P1–P2; perirhinaler u. piriformer Kortex: n = 4 Schnitte; Amygdala: n = 6 Schnitte). Nach dem Auswaschen war der Effekt reversibel, und ENOs waren wieder in ähnlicher Frequenz wie in der Kontrolle zu beobachten. Dieses Ergebnis bestätigt den bereits bei Ratten und Mäusen gezeigten Befund, dass eine notwendige Bedingung für die Entstehung von ENOs das Feuern von Aktionspotentialen ist (Garaschuk et al. 2000; Corlew et al. 2004).

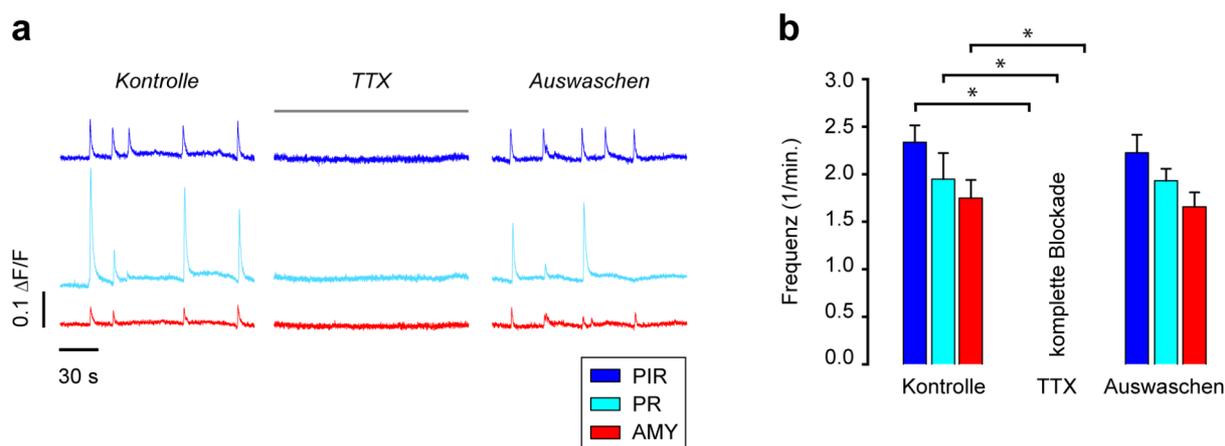


Abb. 20: Der Natriumkanal-Blocker TTX blockiert die ENOs vollständig und reversibel.

a: Ca^{2+} -Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (PIR, dunkelblau), perirhinaler Kortex (PR, hellblau) und Amygdala (AMY, rot). Während Einwaschens von TTX (250 nM) sind die ENOs vollständig blockiert.

b: Gemittelte Frequenzen der ENOs mit Standardfehlern für den piriformen Kortex, den perirhinalen Kortex und die Amygdala. Einwaschen von TTX führt zu einer kompletten reversiblen Blockade der ENOs (* $p(t) < 0.01$).

3.5.2 Glutamaterge synaptische Signalübertragung als notwendige Bedingung für Netzwerkoszillationen

Die ENOs wurden ebenfalls vollständig und reversibel durch das Einwaschen von CNQX und D-AP5, zwei kompetitiven Antagonisten von ionotropen Glutamat-Rezeptoren, blockiert (**Abb. 21**; 10 μ M CNQX / 50 μ M D-AP5; P2–P4; perirhinaler Kortex: n = 3 Schnitte, p(t) = 0.25; piriformer Kortex: n = 3 Schnitte, p(t) = 0.066; Amygdala: n = 4 Schnitte, p(t) = 0.093). Das bestätigt, dass aktive glutamaterge synaptische Signalübertragung für die Entstehung von ENOs notwendig ist. Anschließend wurden weitere Experimente durchgeführt, um zu bestimmen, welche glutamatergen Rezeptorkanäle an der Bildung von ENOs beteiligt sind. Der Einfluss der zwei Subtypen der ionotropen Glutamat-Rezeptoren, AMPA- und NMDA-Rezeptor, wurde getrennt untersucht.

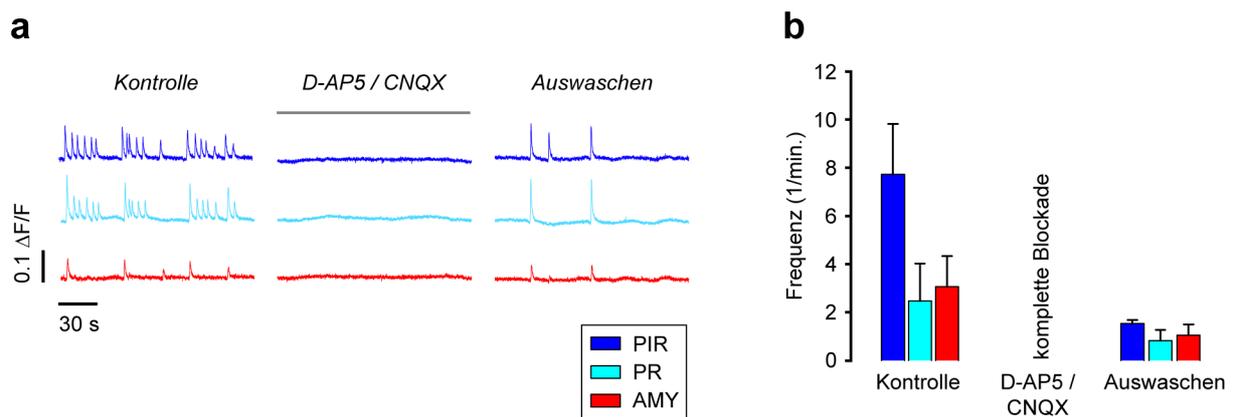


Abb. 21: Die Kombination der Glutamat-Rezeptor-Blocker D-AP5 und CNQX blockiert die ENOs vollständig und reversibel.

a: Ca^{2+} -Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (PIR, dunkelblau), perirhinaler Kortex (PR, hellblau) und Amygdala (AMY, rot). Während gleichzeitigen Einwaschens von D-AP5 (50 μ M) und CNQX (10 μ M) sind die ENOs vollständig blockiert.

b: Gemittelte Frequenzen der ENOs mit Standardfehlern für den piriformen Kortex, den perirhinalen Kortex und die Amygdala. Einwaschen von D-AP5 und CNQX führt zu einer kompletten reversiblen Blockade der ENOs.

3.5.3 Beteiligung von AMPA-Rezeptor-Aktivierung an der Entstehung der Netzwerkoszillationen

Die Rolle von Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ wurde durch die Badapplikation des kompetitiven AMPA-Rezeptor-Antagonisten CNQX untersucht. CNQX reduzierte die Frequenz der ENOs, ohne sie komplett zu blockieren (**Abb. 22**; 2–10 μM CNQX; P1–P5; $n = 7$ Schnitte; perirhinaler Kortex: $\Delta f = -78.3 \pm 4.8\%$, $p(t) < 0.012$; piriformer Kortex: $\Delta f = 76.1 \pm 5.5\%$, $p(t) < 0.014$; Amygdala: $\Delta f = -79.3 \pm 7.4\%$, $p(t) < 0.016$). Während der Einwirkung von CNQX veränderte sich die Form der Ca^{2+} -Transienten, die eine ähnliche Amplitude wie in der Kontrolle, jedoch einen langsameren Aktivitätsabfall zeigten. Nach dem Auswaschen traten ENOs in einer ähnlichen Frequenz und in gleicher Form wie in der Kontrolle auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei der Entstehung der ENOs die Aktivierung von glutamatergen Synapsen über den AMPA-Rezeptor-Typ eine wichtige Rolle spielt, deren Fehlen eine reduzierte Frequenz der ENOs zur Folge hat.

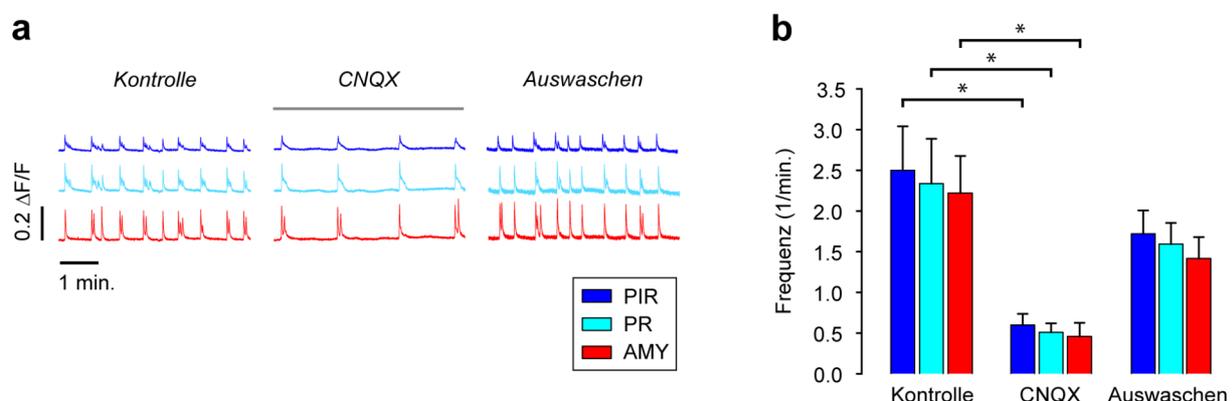


Abb. 22: Der AMPA-Rezeptor-Blocker CNQX reduziert die Frequenz der ENOs reversibel.

a: Ca^{2+} -Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (PIR, dunkelblau), perirhinaler Kortex (PR, hellblau) und Amygdala (AMY, rot). Während Einwaschens von CNQX (2–10 μM) ist die Frequenz der ENOs reduziert.

b: Gemittelte Frequenzen der ENOs mit Standardfehlern für den piriformen Kortex, den perirhinalen Kortex und die Amygdala. Einwaschen von CNQX führt zu einer reversiblen Reduktion der Frequenz der ENOs (* $p(t) < 0.02$).

3.5.4 Beteiligung von NMDA-Rezeptor-Aktivierung an der Entstehung der Netzwerkoszillationen

D-AP5 ist ein kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist. In für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten reduzierte er reversibel die Frequenz der ENOs, ohne sie komplett zu blockieren (**Abb. 23**; 25–50 μM D-AP5; P1–P4; perirhinaler Kortex: $\Delta f = -81.1 \pm 8.4\%$, $n = 5$ Schnitte, $p(t) < 0.036$; piriformer Kortex: $\Delta f = -81.8 \pm 5.6\%$, $n = 7$ Schnitte, $p(t) < 0.0003$; Amygdala: $-86.8\% \pm 5.0\%$, $n = 7$ Schnitte, $p(t) < 0.0008$). Die Ähnlichkeit dieses Ergebnisses zum oben geschilderten Experiment mit CNQX (siehe 3.5.3) legt den Schluss nahe, dass NMDA-Rezeptoren ebenso wie AMPA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung der ENOs spielen. Einzeln – wenn also der jeweils andere Glutamat-Rezeptor-Typ blockiert ist – kann einer der beiden Rezeptor-Typen zur Entstehung der ENOs beitragen. Die wichtige Rolle der glutamatergen Synapsen wird durch das in Abschnitt 3.5.2 geschilderte Ergebnis unterstrichen, das zeigt, dass keine ENOs mehr stattfinden, sobald beide Rezeptor-Typen gleichzeitig blockiert sind.

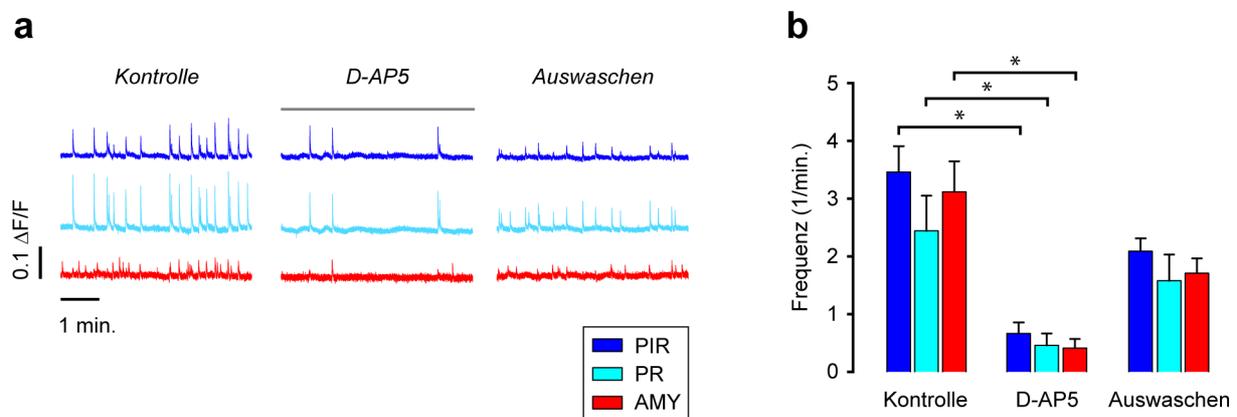


Abb. 23: Der NMDA-Rezeptor-Blocker AP5 reduziert die Frequenz der ENOs reversibel.

a: Ca^{2+} -Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (PIR, dunkelblau), perirhinaler Kortex (PR, hellblau) und Amygdala (AMY, rot). Während Einwaschens von D-AP5 (25–50 μM) ist die Frequenz der ENOs reduziert.

b: Gemittelte Frequenzen der ENOs mit Standardfehlern für den piriformen Kortex, den perirhinalen Kortex und die Amygdala. Einwaschen von D-AP5 führt zu einer reversiblen Reduktion der Frequenz der ENOs (* $p(t) < 0.04$).

3.5.5 Beitrag GABAerger Signaltransmission zur Entstehung von Netzwerkoszillationen

Für ENOs im Hippocampus von Ratten ist die erregende Wirkung von GABA erforderlich (Garaschuk et al. 1998), und im Kortex von Ratten treten sie nach dem entwicklungsbedingten Wechsel von erregender zu hemmender GABAerger Signalübertragung¹¹ nicht mehr auf (Garaschuk et al. 2000). Um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss GABA auf ENOs bei Mäusen hat, wurden Hirnschnitte von Mäusen im Alter von P2 bis P5 Bicucullin in Badapplikation ausgesetzt. Bicucullin ist ein kompetitiver Antagonist von GABA_A-Rezeptoren. Im Experiment reduzierte das Einwaschen von Bicucullin die Frequenz der ENOs reversibel (Abb. 24; 20 μM Bicucullin; P2–P5; perirhinaler Kortex: $\Delta f = -77.8 \pm 8.0\%$, $n = 3$ Schnitte, $p(t) < 0.006$; piriformer Kortex: $\Delta f = -88.7 \pm 2.4\%$, $n = 5$ Schnitte, $p(t) < 0.007$; Amygdala: $\Delta f = -86.7 \pm 2.9\%$, $n = 7$ Schnitte, $p(t) < 0.001$). Auffallend war die deutlich veränderte Erscheinung der Ca²⁺-Transienten, die unter Einfluss von Bicucullin eine salvenähnliche Form zeigten.

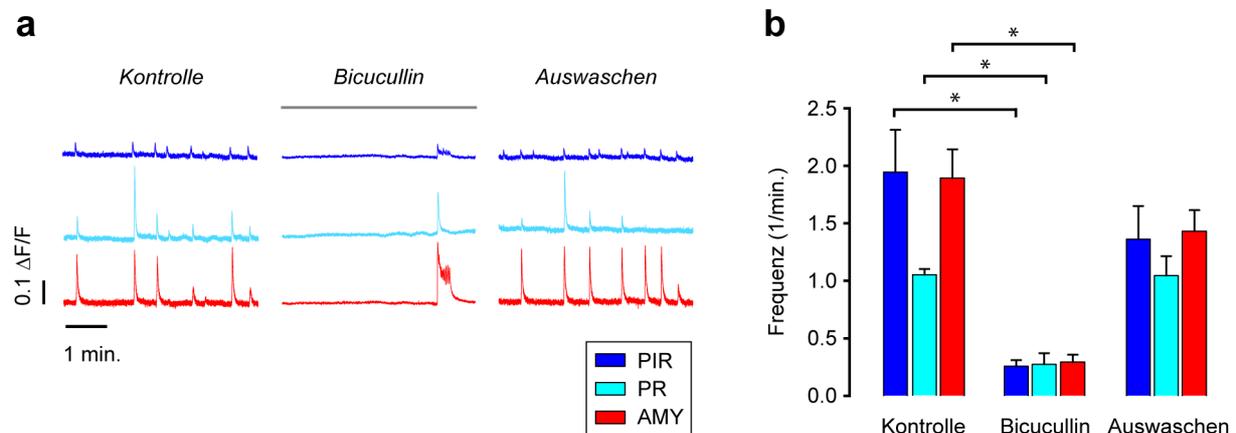


Abb. 24: Der kompetitive GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicucullin reduziert die Frequenz der ENOs reversibel bis zu einem Alter von 5 Tagen.

a Ca²⁺-Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (PIR, dunkelblau), perirhinaler Kortex (PR, hellblau) und Amygdala (AMY, rot). Während Einwaschens von Bicucullin (20 μM) ist die Frequenz der ENOs reduziert. Die Amplitude des Ca²⁺-Transienten ist vergrößert, und er nimmt eine salvenähnliche Form an.

b: Gemittelte Frequenzen der ENOs mit Standardfehlern für den piriformen Kortex, den perirhinalen Kortex und die Amygdala, gemessen zwischen P1 und P5. Einwaschen von Bicucullin führt zu einer reversiblen Reduktion der Frequenz der ENOs (* $p(t) < 0.01$).

¹¹ Bei Ratten tritt dieser Wechsel in der zweiten Woche nach Geburt auf.

3.5.6 Entwicklungsabhängiger GABAerger Einfluss auf Netzwerkoszillationen

Es ist bekannt, dass das Alter der Tiere Einfluss auf den Beitrag von GABA zur Entstehung der ENOs hat aufgrund der entwicklungsabhängigen Veränderung der Wirkung von GABA vom erregenden zum hemmenden Neurotransmitter. Um zu testen, welche Rolle diese Umstellung im Mäusehirn spielt, wurde das oben geschilderte Experiment mit älteren Tieren (P7–P8) wiederholt. Im Gegensatz zur Wirkung von Bicucullin bei Tieren unter P6 wurde keine Änderung in der Frequenz der ENOs beobachtet (**Abb. 25**; 20 μ M Bicucullin; n = 4 Schnitte; perirhinaler Kortex: $\Delta f = -17.7 \pm 9.2\%$, $p(t) = 0.44$; piriformer Kortex: $\Delta f = -7.2 \pm 11.4\%$, $p(t) = 0.89$; Amygdala: $\Delta f = +69.3 \pm 23.0\%$, $p(t) = 0.28$). Unter Einwirkung von Bicucullin wurde eine salvenähnliche Veränderung der Transienten beobachtet, vergleichbar mit dem Experiment mit Tieren unter P6. Die Amplitude der Transienten war um den Faktor 2–4 erhöht. Die Effekte waren nach dem Auswaschen reversibel.

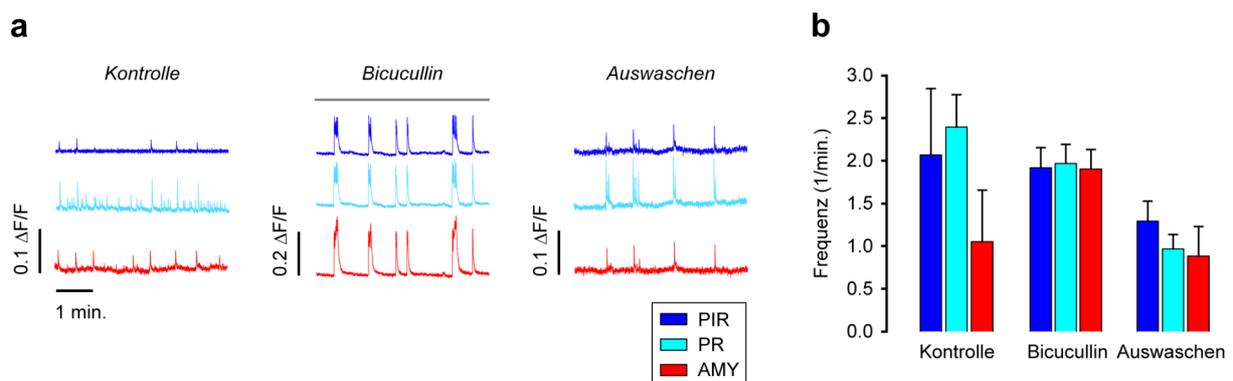


Abb. 25: Ab einem Alter von 7 Tagen hat der kompetitive GABA_A-Rezeptor-Antagonist Bicucullin keinen Einfluss mehr auf die Frequenz der ENOs.

a: Ca²⁺-Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (PIR, dunkelblau), perirhinaler Kortex (PR, hellblau) und Amygdala (AMY, rot). Während Einwaschens von Bicucullin (20 μ M) bleibt die Frequenz weitgehend unverändert. Die Amplitude der Ca²⁺-Transienten ist vergrößert, und die Transienten nehmen eine salvenähnliche Form an.

b: Gemittelte Frequenzen der ENOs mit Standardfehlern für den piriformen Kortex, den perirhinalen Kortex und die Amygdala, gemessen in Mäusen im Alter von P7–P8. Beim Einwaschen von Bicucullin bleibt die Frequenz der ENOs unverändert ($p(t) > 0.25$). Nach dem Auswaschen ist eine leicht, jedoch nicht signifikant verringerte Frequenz zu beobachten ($p(t) > 0.05$).

3.6 Zusammenhang der Frequenzen der Netzwerkoszillationen im piriformen Kortex und in der Amygdala

Die in Abschnitt 3.2.1 gezeigten Ergebnisse, dass die ENOs in der Amygdala mit jenen im piriformen Kortex zeitlich korreliert sind, dass sie mit einer spezifischen Latenz nach den ENOs im piriformen Kortex auftreten und dass ihre Frequenz vom piriformen Kortex beeinflusst wird, deuten auf eine Abhängigkeit der Netzwerkaktivität in der Amygdala vom piriformen Kortex hin. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein lineares Regressionsmodell mittels der Methode der kleinsten Quadrate geschätzt¹² (Abb. 26). Datengrundlage bilden die Frequenzen der ENOs, die im piriformen Kortex und in der Amygdala in Hirnschnitten von Mäusen im Alter von P1–P5 gemessen wurden ($n = 74$). Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang der Frequenzen beider Areale. Das Modell bietet eine hohe Erklärungskraft für die zu erwartende Frequenz in der Amygdala, ausgehend von der Frequenz im piriformen Kortex (Regressionskoeffizient = 0.77, $r^2 = 0.75$, $t = 13.03$, $p(t) < 0.00001$).

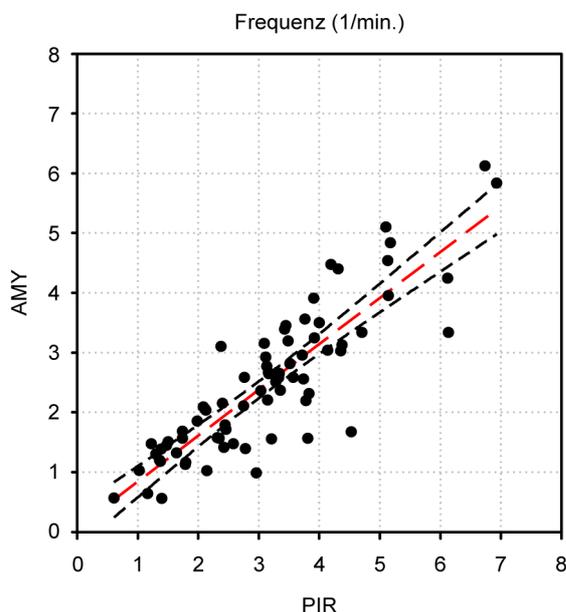


Abb. 26: Zusammenhang der Frequenzen der ENOs im piriformen Kortex und in der Amygdala. Dargestellt sind ein Streudiagramm und die Regressionsgerade nach Methode der kleinsten Quadrate für die Frequenzen der ENOs im piriformen Kortex und in der Amygdala ($n = 74$ Schnitte). Jeder Punkt repräsentiert ein Experiment, für das jeweils die Frequenz der gleichzeitig gemessenen Ca^{2+} -Transienten im piriformen Kortex und in der Amygdala aufgetragen ist. Die lineare Regressionsgerade ist in rot dargestellt, die schwarzen gestrichelten Linien zeigen das 95%-Konfidenzintervall. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang der Frequenzen im piriformen Kortex und in der Amygdala. (Regressionskoeffizient = 0.77, $r^2 = 0.75$, $t = 13.03$, $p(t) < 0.00001$).

¹² Da der Breusch-Pagan-Test zeigt, dass für die vorliegenden Daten keine Homoskedastizität angenommen werden kann (und somit eine der Annahmen der Regressionsschätzung verletzt ist), wurden im Modell robuste Standardfehler verwendet (White 1980).

Es ist anzunehmen, dass dieser Zusammenhang nach der Durchtrennung der Verbindung zwischen piriformem Kortex und Amygdala nicht mehr gegeben ist. Um diese Hypothese zu testen, wurden mit den Frequenzdaten aus dem piriformen Kortex und der Amygdala des in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Experiments, bei dem der piriforme Kortex isoliert wurde, zwei lineare Regressionsmodelle mittels der Methode der kleinsten Quadrate berechnet¹³. Zunächst wurden Frequenzwerte aus zehn Kontrollexperimenten vor Durchtrennung des Gewebes als Datengrundlage verwendet (**Abb. 27**). Zwar ist die Vorhersagekraft dieses Modells höchstwahrscheinlich aufgrund der geringeren Zahl der Daten ($n = 10$) nicht so hoch wie jene des oben geschilderten Regressionsmodells (**Abb. 26**). Dennoch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der Frequenzen beider Areale (Regressionskoeffizient = 0.80, $r^2 = 0.51$, $t = 2.69$, $p(t) < 0.03$).

Ein zweites Regressionsmodell wurde auf Grundlage der Frequenzwerte berechnet, die nach der Durchtrennung der Verbindung zwischen piriformem Kortex und Amygdala gemessen worden waren (**Abb. 26**). Wie erwartet, zeigte sich hier kein signifikanter Zusammenhang der Frequenzen in diesen beiden Arealen mehr ($t = -0.81$, $p = 0.44$).

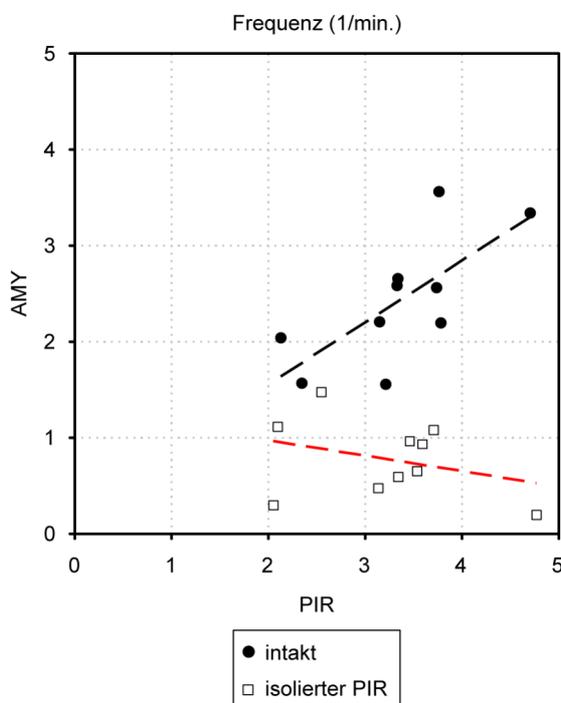


Abb. 27: Zusammenhang der Frequenzen der ENOs im piriformen Kortex und in der Amygdala verschwindet nach Durchtrennung der Verbindung. Analog zu Abb. 26 sind ein Streudiagramm und zwei Regressionsgeraden für Frequenzen der ENOs im piriformen Kortex und in der Amygdala dargestellt ($n = 10$). Die schwarzen Punkte repräsentieren gleichzeitig im piriformen Kortex und in der Amygdala gemessene Frequenzen bei intaktem Hirngewebe („intakt“). Die durch die weißen Quadrate abgebildeten Daten haben gleichzeitig im piriformen Kortex und in der Amygdala aufgenommene Frequenzen nach dem Durchtrennen der Verbindung zwischen diesen beiden Arealen zur Grundlage („isolierter PIR“). Bei intaktem Gewebe besteht ein Zusammenhang beider Frequenzwerte (schwarze Regressionsgerade, (Regressionskoeffizient = 0.80, $r^2 = 0.51$, $t = 2.69$, $p(t) < 0.03$). Nach dem Durchtrennen besteht kein signifikanter Zusammenhang mehr ($t = -0.81$, $p = 0.44$).

¹³ Für die Daten konnte keine Homoskedastizität angenommen werden, weshalb im Modell robuste Standardfehler verwendet wurden.

3.6.1 Lokale Blockade der Netzwerkoszillationen

In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde die Abhängigkeit der ENOs in der Amygdala von jenen im piriformen Kortex ergänzend untersucht.

Um aufzuzeigen, inwiefern sich piriformer Kortex und Amygdala gegenseitig beeinflussen, wurde in einer Reihe von Experimenten in jeweils einem der beiden Areale eine lokale Blockade der ENOs herbeigeführt und währenddessen die Spontanaktivität im jeweils anderen Areal gemessen. Wie in Abschnitt 3.5.1 gezeigt, lässt sich mit TTX eine vollständige und reversible Blockade der ENOs herbeiführen. Um eine lokal begrenzte Blockade zu erzeugen, wurde eine Applikationspipette mit TTX (250 nM in ACSF) befüllt, welche mit einem Picospritzer verbunden war.

Nach einer Kontrollaufnahme, die spontane ENOs im piriformen Kortex und in der Amygdala zeigte, wurde TTX durch Druck (3–6 psi) über eine Dauer von 3–9 Minuten appliziert, was zu einem vollständigen Verschwinden der ENOs im betreffenden Areal führte. Nach der Beendigung der TTX-Applikation und einer Auswaschzeit von 15–30 Minuten wurden erneut synchrone ENOs mit einer ähnlichen Frequenz wie in der Kontrollaufnahme in beiden Arealen gemessen (**Abb. 28**). Dieses Experiment wurde sowohl im piriformen Kortex als auch in der Amygdala jeweils zehnmal durchgeführt, wobei fünfmal die Applikationspipette axial ca. 100 μM tief in den Schnitt eingebracht wurde, weitere fünfmal wurde sie bis auf wenige Mikrometer an die Schnittoberfläche herangeführt. Da die Ergebnisse der verschiedenartigen Applikationsmethoden sich nicht unterscheiden, werden sie im Folgenden zusammengefasst dargestellt.

Zusätzlich befand sich der nicht Membran-permeable Fluoreszenzfarbstoff AF594 (10 μM) in der Pipette. Er wurde mit der übrigen Lösung in der Applikationspipette in den Schnitt appliziert. Da er nicht in die Zellen gelangt, breitete er sich im Applikationsbereich im extrazellulären Raum aus. Die unterschiedlichen Fluoreszenzemissionen von AF594 und OG-1 AM wurden mit zwei verschiedenen Aufnahmekanälen registriert. Der Kanal für OG-1 AM ist grün dargestellt, jener für AF594 rot (**Abb. 28**). Diese Methode erlaubte eine visuelle Kontrolle der Ausdehnung des applizierten Pipetteninhalts und zeigte, dass eine Ausbreitung des applizierten TTX lediglich lokal stattfand.

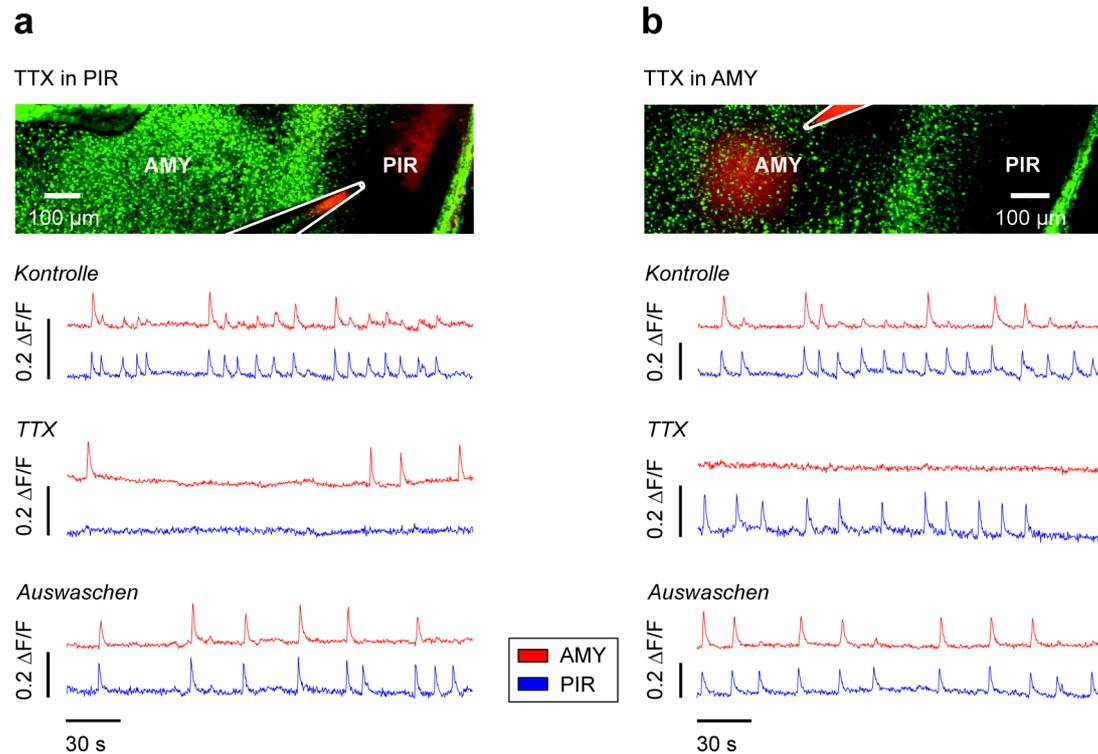


Abb. 28a: Lokale Applikation des Natriumkanal-Blockers TTX im piriformen Kortex. Oben: Ausschnitt eines rechts-lateralen, ventralen Hirnschnitts einer Maus (P2), der die Hirnareale piriformer Kortex (PIR) und Amygdala (AMY) beinhaltet. Die Aufnahme wurde mit einem Zwei-Photonen-System und einem $\times 10$ -Nikon-Objektiv erstellt. Die Position der Applikationspipette mit TTX-Lösung (250 nm in ACSF) im piriformen Kortex ist im Bild schematisch hervorgehoben. Die Fluoreszenz von OG-1 AM ist grün, jene von AF594 rot dargestellt. Unten: Ca^{2+} -Messungen der Hirnareale piriformer Kortex (blau) und Amygdala (rot) vor „Kontrolle“, während „TTX“ und nach „Auswaschen“ der Applikation von TTX. TTX blockiert ENOs im piriformen Kortex reversibel. Die Frequenz der ENOs in der Amygdala ist reversibel reduziert.

b: Lokale Applikation des Natriumkanal-Blockers TTX in der Amygdala. Oben: Dieselbe Hirnregion wie in (a). Die Applikationspipette ist in der Amygdala platziert. Unten: Ca^{2+} -Messungen vor, während und nach Applikation von TTX in die Amygdala. TTX blockiert ENOs in der Amygdala reversibel. Die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex ist unverändert.

Bei der TTX-Applikation im piriformen Kortex wurden ENOs in diesem Areal vollständig und reversibel blockiert. Die Frequenz der ENOs in der Amygdala war um $57.2 \pm 8.5\%$ reduziert ($p(t) < 0.0001$). Nach dem Auswaschen betrug die Frequenz im piriformen Kortex $98.1 \pm 11.5\%$ und in der Amygdala $94.1 \pm 11.6\%$ des jeweiligen gemittelten Ausgangswertes in den Kontrollaufnahmen¹⁴ (Abb. 29a).

¹⁴ piriformer Kortex: $3.1 \pm 0.4/\text{min.}$; Amygdala: $2.6 \pm 0.4/\text{min.}$

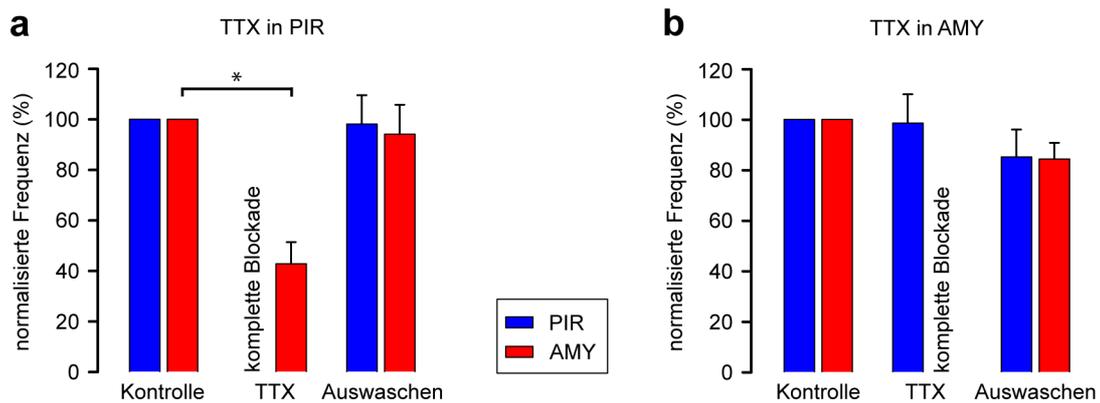


Abb. 29a: Reduzierte Frequenz der ENOs in der Amygdala bei lokaler TTX-Applikation im piriformen Kortex. Die Abbildung zeigt die normalisierten Frequenzen der Ca^{2+} -Transients im piriformen Kortex und in der Amygdala ($n = 10$; Frequenz der Kontrollaufnahme = 100%). Die Frequenz der ENOs in der Amygdala wird bei vollständiger Blockade der ENOs im piriformen Kortex signifikant und reversibel um 57.2% reduziert (* $p(t) < 0.0001$).

b: Keine Beeinflussung der Frequenz der ENOs im piriformen Kortex durch lokale TTX-Applikation in der Amygdala. Es werden die normalisierten Frequenzen der Ca^{2+} -Transients im piriformen Kortex und in der Amygdala gezeigt. Die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex bleibt bei vollständiger Blockade der ENOs in der Amygdala unverändert.

Während der TTX-Applikation in der Amygdala trat dort eine vollständige und reversible Blockade der ENOs auf. Die Frequenz der ENOs im piriformen Kortex betrug während der TTX-Applikation in der Amygdala $98.5 \pm 11.4\%$. Nach dem Auswaschen war im piriformen Kortex eine Frequenz von $85.1 \pm 10.8\%$ des Ausgangswertes¹⁵ zu beobachten, in der Amygdala von $84.3 \pm 6.5\%$ (**Abb. 29b**).

Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss, den der piriforme Kortex als Schrittmacher der ENOs auf die Amygdala hat. Ebenso bestätigen sie die in Abschnitt 3.2.1 gezeigten Ergebnisse. Die Frequenz der ENOs in der Amygdala war bei Blockade der ENOs im piriformen Kortex um ein ähnliches Verhältnis reduziert wie nach dem Trennen der Verbindung zwischen beiden Arealen. Auch besaß die Amygdala in beiden Experimenten die Fähigkeit, selbst ENOs zu generieren. Die Reversibilität der in diesem Experiment beschriebenen Effekte ([1] lokale komplette Blockade des Applikationsareals, [2] Frequenzreduktion in der Amygdala) zeigt, dass der piriforme Kortex selbst nach einer temporären Blockade seiner Schrittmacherfunktion erneut ENOs generieren und die Frequenz im abhängigen Areal Amygdala bestimmen kann.

¹⁵ piriformer Kortex: $3.1 \pm 0.3/\text{min}$.; Amygdala: $2.4 \pm 0.2/\text{min}$.

3.6.2 Übertragung lokal induzierter Netzwerkaktivität

Die Abhängigkeit der ENOs in der Amygdala von den intrinsischen ENOs im piriformen Kortex setzt voraus, dass erstens im piriformen Kortex auftretende intrinsische ENOs effektiv in die Amygdala weitergeleitet werden können. Zudem liegt zweitens nahe, dass die Weiterleitung der Aktivität wahrscheinlicher vom piriformen Kortex in die Amygdala als in umgekehrter Richtung stattfindet. Beide Vermutungen wurden untersucht, indem mittels einer Applikationspipette GABA und Glutamat oberflächlich jeweils in Schicht II des medialen piriformen Kortex und in den basolateralen Kern der Amygdala appliziert wurden (**Abb. 30**). Dafür wurde die Pipette mit 50 μM GABA und 50 μM Glutamat in ACSF befüllt und axial oberflächlich¹⁶ in den Schnitt eingebracht. Appliziert wurde manuell durch kurze Druckpulse (1–6 psi, 50–1000 ms) mit einem Picospritze, an welchen die Pipette angeschlossen war. Ebenso, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, wurde die Pipette zusätzlich mit AF594 befüllt, um die Ausbreitung der lokalen Applikation visuell zu kontrollieren.

Sowohl im piriformen Kortex als auch in der Amygdala konnten regelmäßig Ca^{2+} -Transienten induziert werden, die Ähnlichkeit mit den bei spontanen ENOs auftretenden Transienten aufwiesen (**Abb. 30**). Im piriformen Kortex ($n = 4$ Schnitte) waren in 100% der Fälle induzierte Ca^{2+} -Transienten unmittelbar bei der Applikationspipette nach Applikation der Stimulationslösung zu beobachten („Induktion“) (**Abb. 31**; [1] blauer Balken). In $78.4 \pm 12.8\%$ der Fälle fand nach lokaler Induktion ein Ausbreiten der Ca^{2+} -Transienten auf den gesamten piriformen Kortex statt („lokale Ausbreitung“) (**Abb. 31**; [2] blauer Balken). Bei lokaler Ausbreitung im piriformen Kortex war in $54.0 \pm 16.3\%$ der Fälle unmittelbar nach dem Ca^{2+} -Transienten im piriformen Kortex ein Transient in der Amygdala zu beobachten (**Abb. 31**; [3] blauer Balken). Für die Analyse wurden hierbei Transienten berücksichtigt, die in der Amygdala innerhalb von 2100 ms nach dem Transienten im piriformen Kortex auftraten. Dies entspricht etwa dem Vierfachen der in Kontrollexperimenten beobachteten Latenz und ist ähnlich der von Onimaru und Homma (2007) beschriebenen Latenz der korrelierten spontanen Oszillationen im piriformen Kortex und in der Amygdala. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass induzierte Netzwerkoszillationen mit hoher Wahrscheinlichkeit vom piriformen Kortex in die Amygdala übertragen werden können.

¹⁶ in einer Tiefe von ca. 100 μm

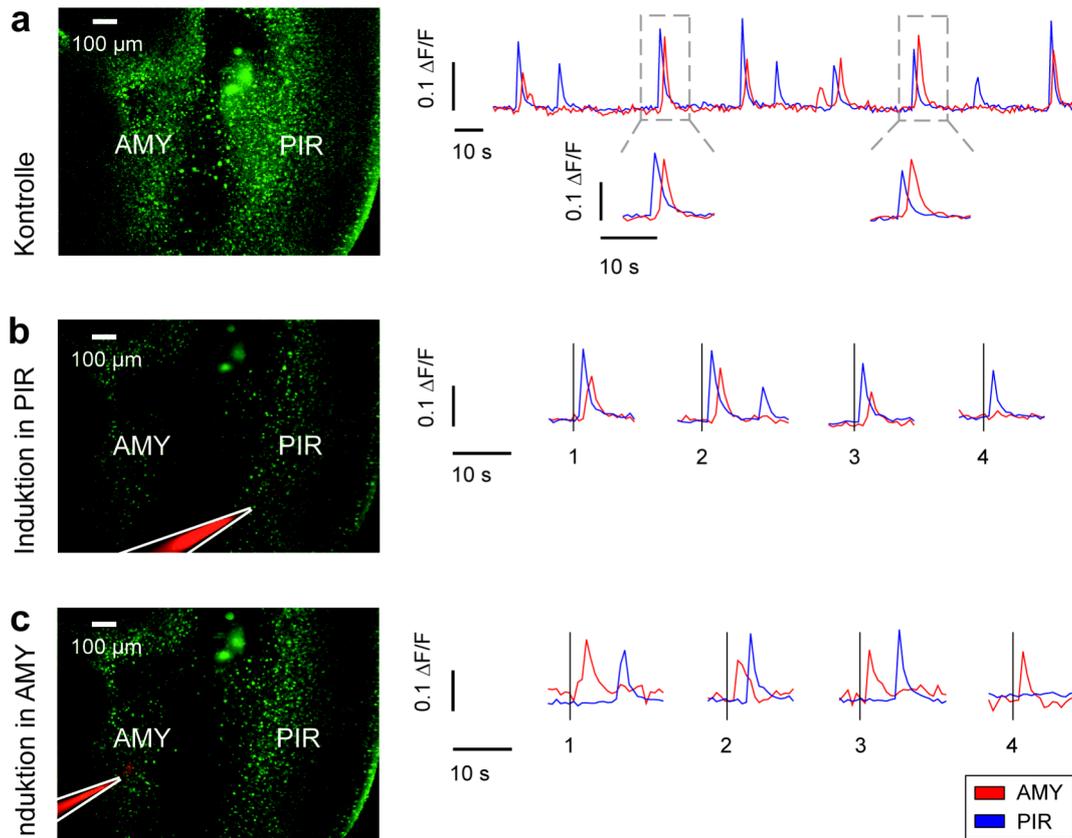


Abb. 30: Netzwerkaktivität lässt sich mit den lokal applizierten Neurotransmittern GABA und Glutamat induzieren.

a: Links: Mit einem Zwei-Photonen-System und ×10-Nikon-Objektiv erstellte Aufnahme des piriformen Kortex (PIR) und der lateralen Amygdala (AMY) (Aufnahmefrequenz ~1.4 Hz). Die Fluoreszenz von OG-1 AM ist grün, jene von AF594 rot dargestellt. Rechts: Spontane Ca²⁺-Transienten im piriformen Kortex (blau) und in der Amygdala (rot). Zwei Transienten sind vergrößert dargestellt. Die Transienten in der Amygdala folgen jenen im piriformen Kortex jeweils innerhalb von max. 1–2 Einzelbildern (700–1400 ms).

b: Links: Ausschnitt aus derselben Hirnregion wie in (a). Applikationspipette im piriformen Kortex. Rechts: Induzierte Ca²⁺-Transienten im piriformen Kortex und in der Amygdala. Schwarze senkrechte Linien zeigen die Zeitpunkte der Applikation von GABA/Glutamat an. 1 bis 3: Erfolgreiche lokale Induktionen im piriformen Kortex mit nachfolgenden Transienten in der Amygdala (jeweils mit einer Latenz von max. 1400 ms). 4: Lokal erfolgreiche Induktion ohne Übertragung in die Amygdala.

c: Links: Applikationspipette in derselben Hirnregion wie in (a) und (b) in der Amygdala positioniert. Rechts: Induzierte Ca²⁺-Transienten in der Amygdala und im piriformen Kortex. 1 bis 3: Erfolgreiche lokale Induktionen in der Amygdala. Nachfolgende Transienten im piriformen Kortex mit langer Latenz hoher Variabilität. 4: Lokal erfolgreiche Induktion ohne Übertragung in den piriformen Kortex.

Für die Untersuchung, ob ENOs in die Gegenrichtung, also von der Amygdala in den piriformen Kortex, mit ebenso hoher Wahrscheinlichkeit übertragen werden können, wurde das Experiment auf die gleiche Weise im basolateralen Nukleus der Amygdala durchgeführt, welcher an Schicht III des PIR grenzt ($n = 4$ Schnitte). Lokal induzierte Ca^{2+} -Transients unmittelbar bei der Applikationspipette waren mit $92.4 \pm 4.4\%$ beinahe gleich häufig wie im piriformen Kortex zu beobachten (**Abb. 31**; [1] roter Balken). Eine lokale Ausbreitung in der lateralen Amygdala geschah in $59.9 \pm 22.8\%$ der erfolgreichen Induktionen (**Abb. 31**; [2] roter Balken). Dieses Ergebnis unterscheidet sich nicht signifikant von der gleichen Bedingung im piriformen Kortex ($p(t) = 0.53$). Bei lokaler Ausbreitung in der Amygdala war jedoch nur in $14.2 \pm 9.5\%$ der Fälle unmittelbar danach (Latenz: max. 2100 ms) ein Ca^{2+} -Transient im piriformen Kortex zu beobachten (**Abb. 31**; [3] roter Balken). Dies ist eine signifikant niedrigere Übertragungsrate als vom piriformen Kortex in die Amygdala ($p(t) = 0.014$). Bei im piriformen Kortex entstehenden ENOs ist eine Ausbreitung in die Amygdala somit wesentlich wahrscheinlicher als umgekehrt. Das begründet vermutlich neben der höheren Frequenz der intrinsischen ENOs des piriformen Kortex seine Rolle als Schrittmacher für die Amygdala.

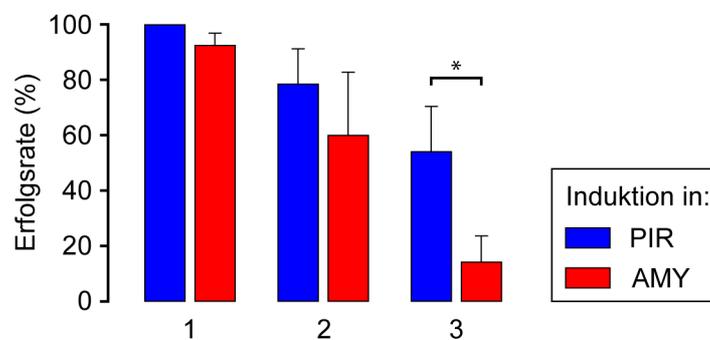


Abb. 31: Lokal induzierte Netzwerkaktivität wird häufiger vom piriformen Kortex in die Amygdala als in umgekehrter Richtung übertragen. 1: Erfolgsraten für das Auftreten von lokalen Ca^{2+} -Transients nach dem gleichzeitigen Applizieren von GABA ($50 \mu\text{M}$) und Glutamat ($50 \mu\text{M}$) unmittelbar bei der Applikationspipette relativ zu allen Applikationsversuchen. Piriformer Kortex (PIR, blau): 100%; Amygdala (AMY, rot): 92.4%. 2: Erfolgsraten für das Auftreten von Ca^{2+} -Transients im gesamten jeweiligen Hirnareal (piriformer Kortex bzw. Amygdala) nach lokaler Induktion relativ zu allen erfolgreichen lokalen Induktionen eines Ca^{2+} -Transients (1). PIR: 78.4%; AMY: 59.9%. 3: Erfolgsraten für das Auftreten von Ca^{2+} -Transients im jeweils anderen Hirnareal innerhalb von 2100 ms nach erfolgreicher Induktion von Ca^{2+} -Transients im Applikationsareal relativ zu erfolgreichen Induktionen im gesamten Applikationsareal (2). Auf induzierte Ca^{2+} -Transients im piriformen Kortex folgen in 54.0% der Fälle Ca^{2+} -Transients in der Amygdala. Umgekehrt folgen auf induzierte Ca^{2+} -Transients in der Amygdala in 14.2% der Fälle Ca^{2+} -Transients im piriformen Kortex. Der Unterschied zwischen beiden Bedingungen ist signifikant (* $p(t) = 0.02$).

4 DISKUSSION

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- In verschiedenen kortikalen und subkortikalen Arealen des unreifen Gehirns der Maus tritt spontane oszillatorische neuronale Aktivität auf, welche den im Hippocampus und im Kortex der Ratte beobachteten Frühen Netzwerkoszillationen („*Early Network Oscillations*“, ENOs) entspricht.
- Der piriforme Kortex generiert als Schrittmacher intrinsische ENOs mit einer höheren Frequenz als die anderen untersuchten Hirnareale.
- Die intrinsischen ENOs des piriformen Kortex werden aktiv in die Amygdala und in den Neokortex übertragen.

4.1 Frühe Netzwerkoszillationen im Mäusehirn

Im koronalen Schnittpräparat des unreifen Mäusehirns wurde spontane oszillatorische neuronale Aktivität in Form von intrazellulären Ca^{2+} -Transienten gefunden, die insbesondere im Kortex und in den subkortikalen Arealen Amygdala und Hippocampus auftrat. Verschiedene Eigenschaften der hier beschriebenen Aktivität ähneln den Charakteristika der bereits bekannten Frühen Netzwerkoszillationen („*Early Network Oscillations*“, ENOs) im Hippocampus und im Kortex junger Ratten (Garaschuk et al. 1998; Garaschuk et al. 2000).

In dieser Arbeit wurden im Kortex zeitlich korrelierte oszillatorische Ca^{2+} -Transienten mit einer Frequenz von 0.3/min. bis 3.1/min. beobachtet, wobei im piriformen Kortex die höchste Frequenz gemessen wurde. Mit steigender dorsaler Entfernung vom piriformen Kortex nahm die Frequenz der Transienten ab. In der Größenordnung entspricht ihre Frequenz damit jener der im Hippocampus (Garaschuk et al. 1998) und im Kortex (Garaschuk et al. 2000) von Ratten beschriebenen ENOs. Ebenso zeigen die im unreifen Mäusekortex bereits charakterisierte sogenannte synchrone spontane Aktivität (SSA) im Hirnschnitt (Corlew et al. 2004) sowie *in vivo* beobachtete spontane neuronale Oszillationen (Adelsberger et al. 2005) vergleichbare Frequenzen. Auch die in der Amygdala gemessene Frequenz der Ca^{2+} -

Transienten war mit 2.5/min. ähnlich der in einem anderen Schnittpräparat des unreifen Mauskortex gezeigten Frequenz spontaner oszillatorischer Aktivität mit 2.0/min. (Onimaru und Homma 2007).

Über 90% der Neuronen im piriformen Kortex und in der Amygdala nahmen an den ENOs teil. Das ist vergleichbar mit den Anteilen der Neuronen, die an den ENOs im Rattenkortex (Garaschuk et al. 2000) und an der SSA im Mäusekortex (Corlew et al. 2004) beteiligt sind.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene neuronale Aktivität breitete sich wellenähnlich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1.3 mm/s in dorsaler Richtung vom piriformen Kortex über den Neokortex aus. Eine vergleichbare Wellengeschwindigkeit wurde auch vom Rattenkortex berichtet (Garaschuk et al. 2000).

Abhängig vom Präparat kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit neuronaler Netzwerkaktivität sehr unterschiedlich sein. Im Kortex anästhesierter Katzen wurde ein Mittelwert von 10.9 mm/s beschrieben (Sanchez-Vives und McCormick 2000), im horizontalen Hirnschnittpräparat des piriformen Kortex von Frettchen liegt dieser Wert bei 114 mm/s (Sanchez-Vives et al. 2008). Im Elektroencephalogramm (EEG) schlafender Menschen wurde eine sehr hohe Ausbreitungsgeschwindigkeit für *slow oscillations* von 1.2–7.0 m/s beobachtet (Massimini et al. 2004). Eine Erklärung für die verschiedenen Geschwindigkeitswerte ist die im intakten Gehirn vorhandene weitreichende Vernetzung (engl. „*long-range connections*“) im Unterschied zum Schnittpräparat.

Die in dieser Arbeit untersuchte oszillatorische Netzwerkaktivität ist auf die frühe Hirnentwicklung während der ersten zwei postnatalen Wochen beschränkt. Das frühe Sistieren der Aktivität spiegelt eine bereits beschriebene Eigenschaft der ENOs wider (Garaschuk et al. 2000). Im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen, die keine synchrone Netzwerkaktivität im Mäusekortex nach P3 zeigen (Corlew et al. 2004), war in dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Hirnschnittpräparat oszillatorische Netzwerkaktivität bis zu einem Alter von P10 nachweisbar.

Die hier beschriebene frühe oszillatorische Netzwerkaktivität gleicht bereits bekannten Formen spontaner synchroner neuronaler Aktivität im unreifen Gehirn in mehreren Punkten. Aktivitätsmuster wie ENOs (Garaschuk et al. 1998; Garaschuk et al. 2000; Adelsberger et al. 2005), SSA (Corlew et al. 2004) und sogenannte „*Giant Depolarizing Potentials*“ (GDPs)

(Ben-Ari et al. 1989; Ben-Ari et al. 2007) treten in einem begrenzten Zeitraum der Hirnentwicklung auf, der mit intensiver Synaptogenese und neuronaler Proliferation einhergeht, und stellen das erste Beispiel synaptischer Aktivität im sich entwickelnden Gehirn dar. Zudem sind sie durch sich vergleichsweise langsam ausbreitende, rekurrente Wellen von Aktivität gekennzeichnet, die in ähnlicher Weise in unterschiedlichen Strukturen des Nervensystems zu beobachten sind. Sie breiten sich innerhalb dieser Strukturen und zwischen Regionen aus, die funktionell gekoppelt sind. Auch sind sie stets mit $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen assoziiert (Ben-Ari 2001).

4.2 Frühe Netzwerkoszillationen im piriformen Kortex

In der piriform-amygdaloiden Region in horizontalen Hirnschnitten neugeborener Ratten (P0–P1) wurde spontane oszillatorische Aktivität beobachtet, die mit respiratorischer neuronaler Aktivität in der ventralen Nervenwurzel des Rückenmarksegments C4 korreliert war (Onimaru und Homma 2007). Allerdings war bisher noch unklar, ob es sich dabei um ENOs handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass der piriforme Kortex intrinsische ENOs zu generieren vermag (siehe 3.2.1). Dass der piriforme Kortex selbst Schrittmacher dieser ENOs ist, zeigte sich aus der Tatsache, dass sie im isolierten piriformen Kortex mit der gleichen Frequenz wie im intakten Hirnschnitt oszillierten. Dabei ist die Frequenz an P1 mit $1.7 \pm 0.3/\text{min.}$ der von Onimaru und Homma (2007) berichteten Frequenz ($2.0 \pm 0.8/\text{min.}$) ähnlich.

In früheren Studien wurde berichtet, dass epileptiforme Aktivität und sogenannte *slow oscillations* zuerst im endopiriformen Nukleus auftraten (Demir et al. 1998; Sanchez-Vives et al. 2008), der jedoch nicht in der Schnittebene der für die vorliegende Arbeit verwendeten Präparate lag. Die meisten Ca^{2+} -Transienten in den hier beschriebenen Experimenten entstanden in Schicht II, etwas weniger als die Hälfte war zuerst in Schicht III zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass die zellreichen Schichten II und III des piriformen Kortex auch in Abwesenheit des endopiriformen Nukleus befähigt sind, spontane Netzwerkoszillationen zu erzeugen. Die Pyramidenzellen in diesen Schichten sind Bestandteil eines stark verknüpften Netzwerks aus intrinsischen Assoziationsfasern (Haberly und Price 1978a; Datiche et al. 1996). Hohe synaptische Konnektivität begünstigt die Entstehung spontaner neuronaler Akti-

vität (Buzsáki 2006). Daher ist der piriforme Kortex aufgrund seines anatomischen Aufbaus mit dem dichten Netzwerk intrinsischer Assoziationsfasern und den reziproken Verbindungen in andere Regionen des Kortex sowie in subkortikale Areale besonders geeignet zur Erzeugung spontaner oszillatorischer Aktivität (Löscher und Ebert 1996; Behan und Haberly 1999).

Die Tatsache, dass in dem hier verwendeten Schnittpräparat intrinsische ENOs im piriformen Kortex entstehen, könnte zudem mit der relativ frühen Entwicklung des olfaktorischen Systems, dessen Bestandteil der piriforme Kortex ist, in Zusammenhang stehen (Crepes 1974; Bossy 1980; Valverde und Santacana 1994). Das olfaktorische System ist für das Überleben nach der Geburt von entscheidender Bedeutung, da die Diskriminierung des Geruchs der Mutter wichtig für die Mutterbindung ist (Leon 1992; Brunet et al. 1996). Die Korrelation der Spontanaktivität in der piriform-amygdaloiden Region mit respiratorischer Aktivität in C4 spricht für die Vermutung, dass die Tendenz des piriformen Kortex, ENOs zu generieren, die frühe olfaktorische Hirnentwicklung unterstützt (Onimaru und Homma 2007). Die in dieser Region beobachtete Spontanaktivität wanderte vom piriformen Kortex in die Amygdala.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der piriforme Kortex als Taktgeber für ENOs in der Amygdala fungiert. Eine Korrelationsanalyse der Ca^{2+} -Transienten in beiden Arealen zeigte, dass im intakten Hirnschnitt die Aktivität im piriformen Kortex und in der Amygdala zeitlich korreliert war, und ergab eine zeitliche Verzögerung der Aktivität in der Amygdala relativ zum piriformen Kortex von etwa 500 ms. Nach der Durchtrennung der Verbindung beider Areale war keine zeitliche Korrelation der Aktivitäten mehr festzustellen (siehe 3.2.1). Bestätigt wurde die Bedeutung des piriformen Kortex für die Oszillationen in der Amygdala durch eine Regressionanalyse, die einen signifikanten linearen Zusammenhang der Frequenzwerte beider Areale zeigte, der nach der Trennung der Verbindung zwischen piriformem Kortex und Amygdala nicht mehr gegeben war (siehe 3.6). Während nach der Trennung der Verbindung die durchschnittliche Frequenz der ENOs im piriformen Kortex gleich blieb, sank die Frequenz in der Amygdala signifikant. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Amygdala zwar eigenständig ENOs erzeugen kann, diese allerdings eine niedrige Eigenfrequenz haben und in Kontrollexperimenten von der wesentlich höheren Frequenz der ENOs im piriformen Kortex getrieben werden. Gestützt wird diese Hypothese zudem durch die Experimente, bei welchen die ENOs des piriformen Kortex mit TTX blockiert wurden (siehe 3.6.1). Auch hier treten weiterhin ENOs in der Amygdala auf, jedoch mit geringerer Frequenz als unter Kontrollbedingungen. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit

gezeigt, dass eine Übertragung der ENOs vom piriformen Kortex in die Amygdala wesentlich wahrscheinlicher ist als umgekehrt (siehe 3.6.2), was für eine stärkere erregende Afferenz aus dem piriformen Kortex in die Amygdala spricht.

Auf eine ähnliche Rolle des piriformen Kortex als Taktgeber für die ENOs im Neokortex in diesem Schnittpräparat weist die zeitlich korrelierte Aktivität im piriformem Kortex und im perirhinalen Kortex als ein dem piriformen Kortex unmittelbar benachbartes Areal des Neokortex hin. Eine Korrelationsanalyse der Ca^{2+} -Transienten in diesen beiden Arealen zeigte eine zeitlich korrelierte Aktivität im piriformen und im perirhinalen Kortex mit einer zeitlichen Verzögerung der Aktivität im perirhinalen relativ zum piriformen Kortex von 650 ms. Nach Durchtrennung der Verbindung beider Areale war ihre Aktivität nicht mehr korreliert (siehe 3.2.1).

Eine Aussage über einen generellen Schrittmacher der ENOs lässt sich hingegen wegen der Einschränkung durch die Schnittebene und Position des Präparats in Relation zum intakten Gehirn nicht treffen. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass ENOs an unterschiedlichen Orten des Neokortex entstehen können, wobei die Mehrzahl der Ca^{2+} -Wellen im horizontalen Hirnschnitt im entorhinalen Kortex entstand (Garaschuk et al. 2000). In einem anderen kultivierten Hirnschnittpräparat wurde eine Region des temporalen Kortex als Schrittmacher für spontane synchrone Aktivität identifiziert (Lischalk et al. 2009). Die Fähigkeit, ENOs zu generieren, ist wahrscheinlich eine inhärente Eigenschaft unreifer neuronaler Netzwerke im sich entwickelnden Gehirn, insbesondere im Kortex.

4.3 Synaptische Mechanismen der Netzwerkoszillationen

In bisherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass spontane oszillatorische neuronale Aktivität im unreifen Gehirn, an der ein großer Teil des Netzwerks beteiligt ist, auf dem Zusammenspiel der erregenden Wirkung von GABA und Glutamat beruht. Im unreifen Hippocampus werden ENOs durch TTX blockiert, was zeigt, dass zelluläre elektrische Aktivität in Form von Aktionspotentialen für die Entstehung von ENOs notwendig ist (Garaschuk et al. 1998). Zudem werden Netzwerkoszillationen (ENOs bzw. GDPs) im Hippocampus durch die GABA_A -Rezeptor-Antagonisten Bicucullin und Picrotoxin blockiert (Ben-Ari et al. 1989; Garaschuk et al. 1998). Die Applikation des NMDA-Rezeptor-Antagonisten AP5 und des

AMPA-Rezeptor-Antagonisten CNQX führte in diesen Arbeiten zu einer starken Reduktion bzw. Blockade der Netzwerkoszillationen.

Im Neokortex scheinen nur zum Teil dieselben Mechanismen eine Rolle zu spielen. So ist neben einer Übertragung der Aktivität über *gap junctions* (Corlew et al. 2004) zelluläre elektrische Aktivität ebenfalls von Bedeutung, wie TTX-Experimente gezeigt haben (Garaschuk et al. 2000; Corlew et al. 2004). ENOs werden auch jeweils durch CNQX und AP5 blockiert. Vermutlich sind AMPA-Rezeptoren für die Generierung der Netzwerkoszillationen wichtig, wohingegen NMDA-Rezeptor-Aktivität die Dauer und Struktur der einzelnen Transienten beeinflusst, jedoch unter AMPA-Blockade auch eine Rolle bei der Generierung der Oszillationen spielt (McCabe et al. 2007).

Widersprüchliche Resultate gibt es jedoch hinsichtlich der Rolle von GABA. Im Gegensatz zum im Hippocampus beschriebenen Effekt führte Bicucullin in einer Studie zwar zu einer Reduktion der Frequenzen der ENOs um ca. 60%, aber nicht zu einer vollständigen Blockade (Garaschuk et al. 2000). Andere Autoren allerdings berichten, dass Bicucullin die Frequenz der synchronen Oszillationen im kultivierten Hirnschnitt der Maus nicht verändert, wohingegen der GABA_A-Rezeptor-Agonist Muscimol zu einer kompletten Blockade führt (McCabe et al. 2006).

Ähnliche pharmakologische Profile konnten in der vorliegenden Arbeit auch für die oszillatorische Netzwerkaktivität im Gehirn junger Mäuse bestimmt werden. Sowohl im Kortex als auch in der Amygdala wurden ENOs durch TTX, einen Blocker von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen, komplett und reversibel blockiert. Die gemeinsame Applikation von CNQX und AP5, Antagonisten der ionotropen Glutamat-Rezeptoren vom AMPA- bzw. NMDA-Typ, führte ebenfalls zu einer kompletten Blockade der ENOs. Jeweils allein appliziert, reduzierten sie die Frequenz der ENOs um ca. 70–90%. In der ersten postnatalen Woche verursachte Bicucullin, ein kompetitiver Antagonist von GABA_A-Rezeptoren, eine Reduktion der Frequenzen der ENOs um etwa den gleichen Anteil.

Die Wirkung von GABA und Glutamat in der Gehirnentwicklung beruht auf einer sequentiellen Ausbildung von GABAergen und glutamatergen Synapsen. Eine Reihe von Studien erbrachte Hinweise auf eine derartige GABA-Glutamat-Sequenz bei der Entstehung neuronaler Aktivität. Im neonatalen Gehirn ist GABA zunächst der wichtigste erregende Neurotransmitter (Cherubini et al. 1991b; Ben-Ari et al. 1997; Ben-Ari et al. 2007). Bei der Ent-

wicklung glutamaterger synaptischer Übertragung sind NMDA-Rezeptoren als erste exprimiert und wegen einer spannungsabhängigen Blockade mit Mg^{2+} weitgehend auf sogenannten „stillen“ Synapsen zu finden (Durand et al. 1996; Petralia et al. 1999). Der Anteil der stillen Synapsen sinkt im Lauf der Entwicklung, während den NMDA-Rezeptoren der glutamatergen Synapsen zunehmend AMPA-Rezeptoren hinzugefügt werden (Durand et al. 1996; Hsia et al. 1998), wobei neuronale Aktivität eine Rolle spielt (Malenka und Nicoll 1997). Im Hippocampus von Ratten wurde gezeigt, dass GABAerge Synapsen vor glutamatergen Synapsen entstehen (Tyzio et al. 1999). Auch in fetalen Hirnschnitten von Primaten wurde diese GABA-Glutamat-Sequenz in Pyramidenzellen des Hippocampus beobachtet (Khazipov et al. 2001b). Demselben Entwicklungsmuster wie Pyramidenzellen, jedoch zu einem früheren Zeitpunkt, folgen in dieser Hinsicht Interneurone im Hippocampus (Hennou et al. 2002) und im Neokortex (Köllner et al. 1990). Es wird daher vermutet, dass in der frühen Hirnentwicklung Interneurone ein Netzwerk stiller Pyramidenzellen mittels primär GABAerger Aktivität kontrollieren und so die Reifung der Pyramidenzellen modulieren (Ben-Ari et al. 2004). In Untersuchungen an kultivierten kortikalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass synchrone oszillatorische Aktivität auf die Anwesenheit eines bestimmten Typs von Interneuronen, sogenannten großen GABAergen Neuronen, angewiesen ist, die verhältnismäßig früh in der Entwicklung ein stark verzweigtes Netzwerk bilden (Voigt et al. 2001). In Hirnschnitten junger Mäuse wurde die Bedeutung von depolarisierend wirkender GABA für das Entstehen kortikaler neuronaler Oszillationen bestätigt (Rheims et al. 2008).

In Einklang mit anderen Studien (Garaschuk et al. 2000; Corlew et al. 2004; Adelsberger et al. 2005) zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch, dass im Kortex GABA zwar an der Entstehung von ENOs beteiligt, aber nicht entscheidend verantwortlich ist. Synapsen mit Glutamatrezeptoren haben im unreifen Kortex somit vermutlich eine größere Bedeutung für die Generierung von ENOs als im Hippocampus desselben Alters und reifen zu einem früheren Zeitpunkt.

Die Ergebnisse der hier dargestellten pharmakologischen Experimente können angesichts des bisher Bekannten zur Rolle von GABA und Glutamat im unreifen Kortex folgendermaßen interpretiert werden: Im piriformen Kortex und in der Amygdala führt erregende synaptische Übertragung zur Entstehung von ENOs. Sowohl GABA als auch Glutamat haben zu diesem Zeitpunkt erregende Wirkung. Die Übertragung der Glutamat-Wirkung über AMPA- und NMDA-Rezeptoren ist eine notwendige Bedingung für das Auftreten von ENOs.

Die zusätzliche erregende Wirkung von GABA führt zu einer Erhöhung der Frequenz der ENOs. Bei der Blockade eines der beiden ionotropen Glutamaterezeptor-Typen (NMDA oder AMPA) reicht die Erregung durch GABA und die restliche glutamaterge Erregung aus, ENOs zu generieren, wenn auch mit geringerer Frequenz. Unter Blockade der Wirkung von GABA führt die glutamaterge Erregung über AMPA- und NMDA-Rezeptoren weiterhin zu ENOs, auch hier allerdings mit verringerter Frequenz. Über eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit limitiert GABA eine Depolarisierung der Zelle, die über das Gleichgewichtspotential von GABA hinausgeht, und hat auf diese Weise auch eine hemmende Wirkung selbst im unreifen Gehirn (Ben-Ari et al. 2007). Die veränderte salvenähnliche Form der Transienten unter GABA-Blockade (siehe 3.5.5) kann dadurch erklärt werden, dass beim Wegfall der GABA-Wirkung durch ENOs bereits erregte Neurone stärker depolarisiert werden und vermutlich über eine Häufung von Aktionspotentialsalven zu dieser Form der Ca^{2+} -Transienten führen.

Die bisher beschriebenen unterschiedlichen Wirkungen von GABA und Glutamat auf synchrone oszillatorische Aktivität im unreifen Gehirn könnten ihre Ursache auch in der Tatsache haben, dass es möglicherweise verschiedene Formen dieser Aktivität gibt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der postnatalen Entwicklungsperiode auftreten und unterschiedliche Abhängigkeiten von GABAergem und glutamatergem Einfluss zeigen. So wurde berichtet, dass ENOs von AMPA- und NMDA-Rezeptoren abhängig sind und insbesondere zwischen P0 und P5 auftreten. Dagegen sind GDPs ab P3–P5 nachweisbar und – wie die komplette Blockade durch Bicucullin zeigt – abhängig von erregender GABA (Allène et al. 2008). Dem stehen allerdings die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entgegen, die keine Änderung der Frequenz der Netzwerkoszillationen während Bicucullin-Applikation in einem Alter von P7–P8 zeigen, wohl aber eine Zunahme der Amplitude und eine salvenähnliche Veränderung der Transienten. Eine vergrößerte Amplitude und eine breitere salvenähnliche Form der Ca^{2+} -Transienten von spontanen Netzwerkoszillationen in kortikalen Neuronen wurde unter GABA_A -Blockade ebenso in Zellkultur gefunden (Opitz et al. 2002). Im Hippocampus von Ratten wurden zudem in der zweiten postnatalen Woche salvenähnliche Transienten unter GABA_A -Blockade als interiktale Entladungen beschrieben (Ben-Ari et al. 1989). Das spricht für eine fortgeschrittene Reifung der Glutamat-Rezeptoren, die zu diesem Zeitpunkt auch ohne GABA-Wirkung ENOs mit hoher Frequenz auslösen können. GABA hingegen könnte zum Teil bereits verstärkt hemmende Wirkung haben.

Die Transmitterwirkung von GABA wechselt in der zweiten Woche der postnatalen Hirnentwicklung von primär erregend zu hemmend (Tyzio et al. 2007). Das wird durch eine verminderte Expression des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporters NKCC1, welcher Cl^- in die Zelle transportiert und auf diese Weise eine Rolle bei der Entstehung von Netzwerkoszillationen spielt (Sipilä et al. 2006), und eine Hochregulierung der Expression des K^+/Cl^- -Kotransporters KCC2, der Cl^- aus der Zelle befördert, verursacht wodurch die $[\text{Cl}^-]_i$ gesenkt und das Cl^- -Gleichgewichtspotential in Richtung des Ruhemembranpotentials verschoben wird (Rivera et al. 1999; Balakrishnan et al. 2003; Stein et al. 2004; Yamada et al. 2004). Die inhibitorische Komponente im neuronalen Netzwerk wird somit gestärkt, was vermutlich bewirkt, dass ENOs ab der Mitte der zweiten postnatalen Woche nicht mehr generiert werden (Garaschuk et al. 1998; Khazipov et al. 2004; Ben-Ari et al. 2007; McCabe et al. 2007). Möglicherweise ist für den Wechsel der GABA-Wirkung spontane oszillatorische Aktivität vonnöten, sodass ENOs ihr zeitliches Auftreten in der Hirnentwicklung eventuell selbst regulieren (McCabe et al. 2006).

Die Ergebnisse einer jüngeren Publikation zogen zwar die Existenz bzw. den Zeitpunkt des Wechsels der GABA-Wirkung in Zweifel. Das Hinzufügen von Ketonkörpern, die in jungen Ratten und Mäusen am Metabolismus des Gehirns beteiligt sind, zur Perfusionslösung führte hier in Hirnschnitten von jungen Mäusen zu einer Erniedrigung des Gleichgewichtspotentials von GABA zu hyperpolarisierten Werten (Rheims et al. 2009). GABA hatte also inhibitorische und keine erregende Wirkung bereits im jungen Mäusehirn. Die Bedeutung dieser Beobachtung für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen ENOs muss jedoch angesichts der Tatsache kritisch gesehen werden, dass ENOs *in vivo* im Kortex junger Mäuse unter physiologischen metabolischen Bedingungen gemessen wurden (Adelsberger et al. 2005). Sie zeigten gleiche Amplituden und Frequenzen wie in Hirnschnitten auftretende ENOs, deren Entstehung zwar nicht von GABA abhängig war, die jedoch bei GABA-Blockade eine Frequenzminderung zeigten. Diese Ergebnisse spiegeln die Resultate der vorliegenden Arbeit wider. Zudem bestätigten jüngste Daten die depolarisierende Wirkung von GABA auf Neuronen im unreifen Mäusekortex (Kirmse et al. 2010).

4.4 Bedeutung Früher Netzwerkoszillationen in der Hirnentwicklung

Spontane neuronale Aktivität ist in der Hirnentwicklung von großer Bedeutung. Proliferation, Migration und Differenzierung von Neuronen werden bereits in der frühen Phase der Hirnentwicklung durch Spontanaktivität beeinflusst, noch bevor Synapsenbildung stattgefunden hat (Spitzer 2006). Es folgen die Reifung der Synapsen sowie ein extensives Wachstum von Dendriten und Axonen, die gegen Ende der zweiten postnatalen Woche Eigenschaften wie bei erwachsenen Tieren aufweisen. In dieser Periode stellen Netzwerkoszillationen das vorherrschende Muster neuronaler Aktivität dar (Ben-Ari 2001).

Zelluläre elektrische Aktivität kann über verschiedene Mechanismen Vorgänge in Neuronen beeinflussen. Sie induziert beispielsweise über das Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Präsynaptisch führt der Ca^{2+} -Einstrom zur Sekretion von Transmittern und Neuropeptiden (Zhang und Poo 2001). Eine postsynaptische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung aufgrund Aktivierung von Transmitterrezeptoren oder Membrandepolarisierung löst die Sekretion von retrograd oder autokrin wirksamen Faktoren aus. Über sekundäre Botenstoffe wie cAMP werden Genexpression, Proteinsynthese oder die posttranslationale Modifizierung von Proteinen beeinflusst (Nestler und Greengard 1983; Ghosh und Greenberg 1995; Nedivi 1999).

Die oben genannten Mechanismen spielen in der Entwicklung des Gehirns eine große Rolle. So wird in vielen Hirnregionen die Expression von Neurotrophinen durch elektrische Aktivität hochreguliert (Bonhoeffer 1996; Zhang und Poo 2001). Zum Beispiel wird die Transkription von BDNF¹⁷ durch spontane Aktivitätsmuster ausgelöst (Lu et al. 1991). Parallel zum Auftreten von ENOs kann ein verändertes Muster der Expression von Ionenkanälen beobachtet werden. Spannungsabhängige und Liganden-aktivierte Ionenkanäle im Kortex scheinen in diesem frühen Zeitraum für Spontanaktivität und den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle optimiert zu sein (Moody und Bosma 2005). AMPA-Rezeptoren beispielsweise sind in diesem jungen Entwicklungsstadium des Gehirns sogar bei negativem Membranpotential für Ca^{2+} permeabel (Dingledine et al. 1999). Hierbei beeinflussen sich neuronale Spontanaktivität und Entwicklung der Ionenkanäle möglicherweise wechselseitig. Bestimmte Ionenkanäle

¹⁷ *brain-derived neurotrophic factor* (dt. etwa „aus dem Gehirn stammender neurotrophischer Faktor“)

erhöhen die Erregbarkeit der Neurone und begünstigen somit spontane Aktivität, welche wiederum die Expression von Ionenkanälen beeinflusst. Dieser Prozess verstärkt vermutlich auch die Synchronität der neuronalen Aktivität und fördert dadurch das Auftreten von synchronen Netzwerkoszillationen (Moody und Bosma 2005).

Die intrazellulär hervorgerufenen Effekte transienter $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen werden unter anderem durch deren Amplitude und Frequenz bestimmt. Abhängig von der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten wird zum Beispiel das Ausmaß der Translokation von Calmodulin in den Zellkern (Liao et al. 1999) reguliert, die für aktivitätsabhängige Genexpression wichtig ist (Mermelstein et al. 2001). Durch verschiedene Mechanismen können Neuronen zudem die niedrige Frequenz der Ca^{2+} -Transienten der frühen Netzwerkoszillationen integrieren. Dafür ist zum einen die elektrische Zeitkonstante der Zellmembran wichtig, die in unreifen Zellen wegen ihres hohen Eingangswiderstands lang ist (Moody und Bosma 2005). Zweitens überdauert die Reaktion von sekundären Botenstoffen die eigentlichen Transienten bei weitem und kann somit wie eine zeitliche Verstärkung des ursprünglichen Ca^{2+} -Signals wirken (Wu et al. 2001). Drittens wirkt die Aktivität von Proteasen, Kinasen und Phosphatasen als eine Verlängerung der primären Dauer der Spontanaktivität (Suzuki et al. 1992). Dadurch besitzen sich entwickelnde Neuronen Möglichkeiten der intrazellulären Signalverarbeitung und -weiterleitung, die auf die Frequenz und die zeitlichen Muster spontaner neuronaler Aktivität in der Entwicklung fein abgestimmt sind. In vielen Systemen wurden zelluläre Antworten beobachtet, die auf Frequenzen um 1/min. optimal ausgerichtet sind (Moody und Bosma 2005). Die Ausschüttung von BDNF durch hippocampale Neuronen beispielsweise wird bestmöglich durch kurze hochfrequente Entladungen ausgelöst, die in Intervallen von 20 s stattfinden (Balkowiec und Katz 2000). Dieser Frequenzbereich von einem bis wenigen Transienten pro Minute entspricht genau den Frequenzen, die bei spontanen Netzwerkoszillationen in verschiedenen Bereichen des ZNS – wie Kortex, Hippocampus, Retina und Rautenhirn – gemessen wurden.

Konkrete Wirkungen von spontanen Netzwerkoszillationen wurden zudem in kultivierten kortikalen Neuronen beobachtet: Unter dem Einfluss dieser Form der Spontanaktivität werden AMPA-Rezeptoren in unreife Synapsen eingebaut. Dieser Vorgang verhindert, dass später ankommende Axone afferente Verbindungen bilden können. ENOs könnten mittels dieses aktivitätsabhängigen Prozesses die Ausbreitung kortikokortikaler Verbindungen in der frühen Entwicklung des neuronalen Netzwerks festlegen (Voigt et al. 2005). Auch das Über-

leben von unreifen Neuronen scheint von Netzwerkoszillationen abhängig zu sein. So wurde gezeigt, dass Neuronen, die sich nicht an der oszillatorischen Spontanaktivität beteiligen, eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit haben (Voigt et al. 1997). Des Weiteren liefern neuere Ergebnisse Hinweise darauf, dass ENOs die Migration von Interneuronen kontrollieren, welche durch ihre frühe sequentielle Ausbildung von GABA- und Glutamat-Rezeptoren selbst ein wichtiger Bestandteil des an den Oszillationen teilnehmenden Netzwerks sind (Ben-Ari et al. 2004). Sobald migrierende Interneurone während der frühen Hirnentwicklung nämlich den Kortex erreichen, werden spontane Ca^{2+} -Transienten durch Depolarisierung mittels Aktivierung von GABA_A - und NMDA-/AMPA-Rezeptoren induziert, welche die Motilität der Interneurone stimulieren. Gegen Ende der ersten postnatalen Woche exprimieren die Interneurone verstärkt den K^+/Cl^- -Kotransporter KCC2. Das führt dazu, dass GABA als Stoppsignal wirkt, indem durch den nunmehr hemmenden Effekt die Frequenz der spontanen Ca^{2+} -Transienten verringert wird (Bortone und Polleux 2009).

Aufgrund des relativ langen Zeitfensters ihrer einzelnen Transienten (im Sekundenbereich) und der geringen Ausbreitungsgeschwindigkeit (wenige Millimeter pro Sekunde) sind ENOs für schnelle Informationsverarbeitung nicht geeignet. Ihre Bedeutung hängt vermutlich vom Reifegrad des neuronalen Netzwerks ab. Demnach erfüllen sie initial eine „nonselektive metabolische“ Rolle, indem sie durch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen hoher Amplitude ein Signal für neuronales Wachstum und Reifung darstellen. Mit der zunehmenden Reifung der Dendriten und der Ausbildung einer großen Anzahl glutamaterger Synapsen üben ENOs einen selektiveren Einfluss auf die Synapsenbildung und -reifung aus (Ben-Ari 2001).

4.5 Mögliche klinische Implikationen

Für die Frage nach einer möglichen klinischen Relevanz der ENOs ist es von Bedeutung, ob dieses Phänomen der frühen Hirnentwicklung ebenfalls beim Menschen zu beobachten ist. Tatsächlich ist in EEG-Untersuchungen an Frühgeborenen langsame, korrelierte Spontanaktivität entdeckt worden (Vanhatalo et al. 2002; Thordstein et al. 2005). Diese EEG-Wellen, von den Autoren als *spontaneous activity transients* (SAT, dt. „spontane Aktivitätstransienten“) bezeichnet, treten im Schlaf Frühgeborener in einem Alter auf, welches dem letzten Trimenon der Schwangerschaft entspricht. Mit einer Dauer der einzelnen Wellen von

1–5 Sekunden und einer Frequenz von 3–8/min. weisen sie Ähnlichkeiten zu den bei Nagern beobachteten ENOs auf. In diesem Alter stellen die SAT die hauptsächliche im EEG zu findende Aktivität dar, bevor ihre Häufigkeit um das normale Geburtsalter abnimmt (Vanhatalo et al. 2005). Sie werden von sonstiger kortikaler Aktivität im EEG abgegrenzt, die zunächst selten auftritt, gegenläufig zu den seltener werdenden SAT um den Geburtszeitpunkt jedoch häufiger zu beobachten ist (Tolonen et al. 2007). Zunächst entstehen SAT temporo-okzipital fokal über den primären sensorischen Kortextbereichen zu einem Zeitpunkt, wenn thalamo-kortikale Assoziationsfasern diese Gebiete erreichen. Später sind SAT korreliert über beiden Hemisphären zu beobachten, und entsprechend dem okzipito-frontalen Reifungsgradienten des Gehirns breiten sie sich mit wachsenden kortikokortikalen Verbindungen aus (Vanhatalo und Kaila 2006). Der Befund, dass im menschlichen Gehirn die Ionen-Transporter NKCC1 und KCC2 im zeitlichen Verlauf ähnliche Expressionsmuster zeigen wie bei Nagern, indem sie gegen Ende der frühen Hirnentwicklung runter- bzw. hochreguliert werden (Dzhala et al. 2005; Vanhatalo et al. 2005), legt nahe, dass vergleichbare Mechanismen wie bei ENOs bei der Entstehung der SAT eine Rolle spielen.

Der Zeitraum, in welchem SAT beim Menschen auftreten, entspricht der Entwicklungsperiode bei Nagern, während der ENOs entstehen (Clancy et al. 2001) und ist eine Phase intensiver Entwicklung kortikokortikaler und thalamokortikaler Verbindungen (Molliver et al. 1973; Burkhalter 1993; Kostovic und Judas 2002). Dem Ausmaß und Reifungsgrad dieser Verbindungen entspricht vermutlich die Ausbreitung der SAT zu einem gegebenen Entwicklungszeitpunkt (Tolonen et al. 2007). In der Diagnostik von Hirnerkrankungen, die mit pathologischen Aktivitätsmustern einhergehen, kann die Erfassung der frühen spontanen oszillatorischen Aktivität im EEG von Bedeutung sein (Vanhatalo et al. 2002; Tolonen et al. 2007).

Die Rolle spontaner neuronaler Aktivität bei der Entstehung neurologischer Erkrankungen ist bislang wenig untersucht. Abnorme neuronale Aktivitätsmuster werden mit unterschiedlichen neurologischen Symptomen in Verbindung gebracht, wie z. B. Entwicklungsverzögerung (Huttenlocher 1991), Autismus (Baumann et al. 1997), Epilepsie (Penn und Shatz 1999) und subtileren Lerndefiziten wie Dyslexie (Shaywitz et al. 1998). Insbesondere für epileptische Syndrome gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang mit Spontanaktivität in der frühen Hirnentwicklung. So treten bei Tieren und Menschen mit noch unreifem Gehirn Krampfanfälle wahrscheinlicher auf als bei Erwachsenen (Holmes und Ben-Ari 1998; Jensen

1999). Das hängt wahrscheinlich mit der frühen erregenden Wirkung von GABA zusammen. Bei Ratten zeigte sich eine glockenförmige Verteilung der Anfälligkeit für epileptiforme Aktivität im Zeitraum zwischen P6 und P16 mit einem Maximum an P11 (Khazipov et al. 2004). Dieser Zeitraum fällt mit dem Ende der bisher beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit beobachteten spontanen oszillatorischen Netzwerkaktivität zusammen, die durch epileptiforme Entladungen gestört wird (Khalilov et al. 1999). Eine Störung der physiologischen spontanen oszillatorischen Netzwerkaktivität im unreifen Gehirn könnte somit eine erhöhte Anfälligkeit des Hirngewebes für epileptiforme neuronale Entladungen nach sich ziehen. Dies ist auch deshalb interessant, weil der piriforme Kortex als besonders epileptogenes Hirnareal (Piredda und Gale 1985; Racine et al. 1988; McIntyre und Plant 1989) in der Lage ist, intrinsische ENOs zu generieren, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Die Fähigkeit neuronaler Netzwerke, in der Hirnentwicklung ENOs zu erzeugen, bringt offenbar die Gefahr einer erhöhten Anfälligkeit für epileptiforme Aktivität mit sich.

Unterbrechungen der Spontanaktivität in der Hirnentwicklung haben sehr wahrscheinlich Auswirkungen auf die Ausbildung des neuronalen Netzwerks (Penn und Shatz 1999). Zur Prävention und Behandlung daraus resultierender neurologischer Erkrankungen sind weitere Erkenntnisse über deren Art und Entstehung notwendig. Zukünftige Herausforderung wird es sein, die Auswirkungen spontaner Aktivität in der Hirnentwicklung auf die Bildung neuronaler Schaltkreise besser zu verstehen und mögliche Therapieansätze zu identifizieren.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adelsberger, H., Garaschuk, O. und Konnerth, A.** (2005). *Cortical calcium waves in resting newborn mice*. *Nat Neurosci* 8(8): 988-90.
- Allendoerfer, K. L. und Shatz, C. J.** (1994). *The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex*. *Annu Rev Neurosci* 17: 185-218.
- Allène, C., Cattani, A., Ackman, J. B., Bonifazi, P., Aniksztejn, L., Ben-Ari, Y. und Cossart, R.** (2008). *Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex*. *J Neurosci* 28(48): 12851-63.
- Angevine, J. B.** (1964). *Autoradiographic study of histogenesis in the area dentata of the cerebral cortex in the mouse*. *Anat Rec* 148(2).
- Balakrishnan, V., Becker, M., Lohrke, S., Nothwang, H. G., Guresir, E. und Friauf, E.** (2003). *Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem*. *J Neurosci* 23(10): 4134-45.
- Balkowiec, A. und Katz, D. M.** (2000). *Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ*. *J Neurosci* 20(19): 7417-23.
- Baumann, M. L., Filipek, P. A. und Kemper, T. L.** (1997). *Early infantile autism*. *Int Rev Neurobiol* 41: 367-86.
- Behan, M. und Haberly, L. B.** (1999). *Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat*. *J Comp Neurol* 408(4): 532-48.
- Ben-Ari, Y.** (2001). *Developing networks play a similar melody*. *Trends Neurosci* 24(6): 353-60.
- Ben-Ari, Y.** (2002). *Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture*. *Nat Rev Neurosci* 3(9): 728-39.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. und Gaiarsa, J. L.** (1989). *Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones*. *J Physiol* 416: 303-25.
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R. und Khazipov, R.** (2007). *GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations*. *Physiol Rev* 87(4): 1215-84.
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Represa, A. und Gozlan, H.** (2004). *Interneurons set the tune of developing networks*. *Trends Neurosci* 27(7): 422-7.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O. und Gaiarsa, J. L.** (1997). *GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'*. *Trends Neurosci* 20(11): 523-9.
- Bonhoeffer, T.** (1996). *Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex*. *Curr Opin Neurobiol* 6(1): 119-26.

- Bortone, D. und Polleux, F.** (2009). *KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner.* *Neuron* 62(1): 53-71.
- Bossy, J.** (1980). *Development of olfactory and related structures in staged human embryos.* *Anat Embryol (Berl)* 161(2): 225-36.
- Brunet, L. J., Gold, G. H. und Ngai, J.** (1996). *General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel.* *Neuron* 17(4): 681-93.
- Bureau, I., Shepherd, G. M. und Svoboda, K.** (2004). *Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex.* *Neuron* 42(5): 789-801.
- Burkhalter, A.** (1993). *Development of forward and feedback connections between areas V1 and V2 of human visual cortex.* *Cereb Cortex* 3(5): 476-87.
- Buzsáki, G.** (2006). *Rhythms of the brain,* Oxford University Press.
- Caviness, V. S., Jr. und Sidman, R. L.** (1973). *Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis.* *J Comp Neurol* 148(2): 141-51.
- Cecchi, C. und Boncinelli, E.** (2000). *Emx homeogenes and mouse brain development.* *Trends Neurosci* 23(8): 347-52.
- Cherubini, E., Ben-Ari, Y., Ito, S. und Krnjevic, K.** (1991a). *Persistent pulsatile release of glutamate induced by N-methyl-D-aspartate in neonatal rat hippocampal neurones.* *J Physiol* 436: 531-47.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. und Ben-Ari, Y.** (1991b). *GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life.* *Trends Neurosci* 14(12): 515-9.
- Cherubini, E., Rovira, C., Gaiarsa, J. L., Corradetti, R. und Ben Ari, Y.** (1990). *GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons.* *Int J Dev Neurosci* 8(4): 481-90.
- Clancy, B., Darlington, R. B. und Finlay, B. L.** (2001). *Translating developmental time across mammalian species.* *Neuroscience* 105(1): 7-17.
- Collins, D. R., Pelletier, J. G. und Pare, D.** (2001). *Slow and fast (gamma) neuronal oscillations in the perirhinal cortex and lateral amygdala.* *J Neurophysiol* 85(4): 1661-72.
- Corlew, R., Bosma, M. M. und Moody, W. J.** (2004). *Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones.* *J Physiol* 560(Pt 2): 377-90.
- Creps, E. S.** (1974). *Time of neuron origin in the anterior olfactory nucleus and nucleus of the lateral olfactory tract of the mouse: an autoradiographic study.* *J Comp Neurol* 157(2): 139-59.
- Curley, P. F., Ferguson, A. I., White, J. G. und Amos, W. B.** (1992). *Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked Ti:sapphire laser to the field of laser scanning confocal microscopy.* *Opt Quant Electr* 24: 851-9.

- Datiche, F., Litaudon, P. und Cattarelli, M.** (1996). *Intrinsic association fiber system of the piriform cortex: a quantitative study based on a cholera toxin B subunit tracing in the rat.* J Comp Neurol 376(2): 265-77.
- Delaney, K. R., Zucker, R. S. und Tank, D. W.** (1989). *Calcium in motor nerve terminals associated with posttetanic potentiation.* J Neurosci 9(10): 3558-67.
- Demir, R., Haberly, L. B. und Jackson, M. B.** (1998). *Voltage imaging of epileptiform activity in slices from rat piriform cortex: onset and propagation.* J Neurophysiol 80(5): 2727-42.
- Denk, W.** (1996). *Two-photon excitation in functional biological imaging.* J Biomed Optics 1(3): 296-304.
- Denk, W.** (2005). *Principles of multiphoton-excitation fluorescence microscopy.* In: Imaging in neuroscience and development: a laboratory manual (Yuste, R. und Konnerth, A., Eds.). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: xvi, 854 p.
- Denk, W., Strickler, J. H. und Webb, W. W.** (1990). *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.* Science 248(4951): 73-6.
- Denk, W. und Svoboda, K.** (1997). *Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick.* Neuron 18(3): 351-7.
- Derer, P., Caviness, V. S., Jr. und Sidman, R. L.** (1977). *Early cortical histogenesis in the primary olfactory cortex of the mouse.* Brain Res 123(1): 27-40.
- Diaspro, A., Bianchini, P., Vicidomini, G., Faretta, M., Ramoino, P. und Usai, C.** (2006). *Multi-photon excitation microscopy.* Biomed Eng Online 5: 36.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. und Traynelis, S. F.** (1999). *The glutamate receptor ion channels.* Pharmacol Rev 51(1): 7-61.
- Durand, G. M., Kovalchuk, Y. und Konnerth, A.** (1996). *Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus.* Nature 381(6577): 71-5.
- Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Mathews, G. C., Benke, T. A., Delpire, E., Jensen, F. E. und Staley, K. J.** (2005). *NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain.* Nat Med 11(11): 1205-13.
- Faulkner, B. und Brown, T. H.** (1999). *Morphology and physiology of neurons in the rat perirhinal-lateral amygdala area.* J Comp Neurol 411(4): 613-42.
- Feldman, D. E., Nicoll, R. A. und Malenka, R. C.** (1999). *Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD, and silent synapses.* J Neurobiol 41(1): 92-101.
- Feller, M. B.** (1999). *Spontaneous correlated activity in developing neural circuits.* Neuron 22(4): 653-6.
- Feller, M. B., Wellis, D. P., Stellwagen, D., Werblin, F. S. und Shatz, C. J.** (1996). *Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves.* Science 272(5265): 1182-7.
- Finlay, B. L. und Darlington, R. B.** (1995). *Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains.* Science 268(5217): 1578-84.

- Fontanini, A., Spano, P. und Bower, J. M.** (2003). *Ketamine-xylazine-induced slow (< 1.5 Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration.* J Neurosci 23(22): 7993-8001.
- Furtak, S. C., Wei, S. M., Agster, K. L. und Burwell, R. D.** (2007). *Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices.* Hippocampus 17(9): 709-22.
- Garaschuk, O., Hanse, E. und Konnerth, A.** (1998). *Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus.* J Physiol 507 (Pt 1): 219-36.
- Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. und Konnerth, A.** (2000). *Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex.* Nat Neurosci 3(5): 452-9.
- Ghosh, A. und Greenberg, M. E.** (1995). *Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences.* Science 268(5208): 239-47.
- Goodman, C. S. und Shatz, C. J.** (1993). *Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity.* Cell 72 Suppl: 77-98.
- Gust, J., Wright, J. J., Pratt, E. B. und Bosma, M. M.** (2003). *Development of synchronized activity of cranial motor neurons in the segmented embryonic mouse hindbrain.* J Physiol 550(Pt 1): 123-33.
- Göppert-Mayer, M.** (1931). *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.* Ann Phys 9: 273-94.
- Haberly, L. B.** (1985). *Neuronal circuitry in olfactory cortex: anatomy and functional implications.* Chem Senses 10(2): 219-38.
- Haberly, L. B.** (2001). *Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry.* Chem Senses 26(5): 551-76.
- Haberly, L. B. und Price, J. L.** (1978a). *Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat.* J Comp Neurol 178(4): 711-40.
- Haberly, L. B. und Price, J. L.** (1978b). *Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle.* J Comp Neurol 181(4): 781-807.
- Hanse, E., Durand, G. M., Garaschuk, O. und Konnerth, A.** (1997). *Activity-dependent wiring of the developing hippocampal neuronal circuit.* Semin Cell Dev Biol 8(1): 35-42.
- Haugland, R. P., Spence, M. T. Z., Johnson, I. D. und Basey, A.** (2005). *The handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies.* [Eugene, OR], Molecular Probes.
- Helmchen, F. und Denk, W.** (2005). *Deep tissue two-photon microscopy.* Nat Methods 2(12): 932-40.
- Hennou, S., Khalilov, I., Diabira, D., Ben-Ari, Y. und Gozlan, H.** (2002). *Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus.* Eur J Neurosci 16(2): 197-208.

- Hinds, J. W. und Angevine, J. B.** (1965). *Autoradiographic study of histogenesis in the area pyriformis and claustrum in the mouse.* Anat Rec 151(3): 456-7.
- Holmes, G. L. und Ben-Ari, Y.** (1998). *Seizures in the developing brain: perhaps not so benign after all.* Neuron 21(6): 1231-4.
- Hsia, A. Y., Malenka, R. C. und Nicoll, R. A.** (1998). *Development of excitatory circuitry in the hippocampus.* J Neurophysiol 79(4): 2013-24.
- Huttenlocher, P. R.** (1991). *Dendritic and synaptic pathology in mental retardation.* Pediatr Neurol 7(2): 79-85.
- Hönack, D., Wahnschaffe, U. und Löscher, W.** (1991). *Kindling from stimulation of a highly sensitive locus in the posterior part of the piriform cortex. Comparison with amygdala kindling and effects of antiepileptic drugs.* Brain Res 538(2): 196-202.
- Illig, K. R.** (2007). *Developmental changes in odor-evoked activity in rat piriform cortex.* Neuroscience 145(1): 370-6.
- Inoue, S. und Inoue, T.** (2002). *Direct-view high-speed confocal scanner: the CSU-10.* Methods Cell Biol 70: 87-127.
- Isaac, J. T., Crair, M. C., Nicoll, R. A. und Malenka, R. C.** (1997). *Silent synapses during development of thalamocortical inputs.* Neuron 18(2): 269-80.
- Isaac, J. T., Nicoll, R. A. und Malenka, R. C.** (1995). *Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP.* Neuron 15(2): 427-34.
- Jensen, F. E.** (1999). *Acute and chronic effects of seizures in the developing brain: experimental models.* Epilepsia 40 Suppl 1: S51-8; discussion S64-6.
- Kater, S. B., Mattson, M. P., Cohan, C. und Connor, J.** (1988). *Calcium regulation of the neuronal growth cone.* Trends Neurosci 11(7): 315-21.
- Katerinopoulos, H. E. und Foukaraki, E.** (2002). *Polycarboxylate fluorescent indicators as ion concentration probes in biological systems.* Curr Med Chem 9(2): 275-306.
- Katz, L. C. und Shatz, C. J.** (1996). *Synaptic activity and the construction of cortical circuits.* Science 274(5290): 1133-8.
- Khalilov, I., Dzhala, V., Medina, I., Leinekugel, X., Melyan, Z., Lamsa, K., Khazipov, R. und Ben-Ari, Y.** (1999). *Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures in vitro.* Eur J Neurosci 11(10): 3468-80.
- Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhala, V., Berger, B. und Ben Ari, Y.** (2001a). *Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero.* J Neurosci 21(24): 9770-81.
- Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhala, V., Berger, B. und Ben-Ari, Y.** (2001b). *Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero.* J Neurosci 21(24): 9770-81.
- Khazipov, R., Khalilov, I., Tyzio, R., Morozova, E., Ben-Ari, Y. und Holmes, G. L.** (2004). *Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus.* Eur J Neurosci 19(3): 590-600.

- Kirmse, K., Witte, O. W., Holthoff, K.** (2010). *GABA depolarizes immature neocortical neurons in the presence of the ketone body β -hydroxybutyrate*. *J Neurosci* 30(47): 16002-7.
- Kirsch, J. und Betz, H.** (1998). *Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons*. *Nature* 392(6677): 717-20.
- Komuro, H. und Rakic, P.** (1996). *Intracellular Ca^{2+} fluctuations modulate the rate of neuronal migration*. *Neuron* 17(2): 275-85.
- Komuro, H. und Rakic, P.** (1998). *Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca^{2+} fluctuations*. *J Neurobiol* 37(1): 110-30.
- Kostovic, I. und Judas, M.** (2002). *Correlation between the sequential ingrowth of afferents and transient patterns of cortical lamination in preterm infants*. *Anat Rec* 267(1): 1-6.
- Krettek, J. E. und Price, J. L.** (1977a). *The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat*. *J Comp Neurol* 171(2): 157-91.
- Krettek, J. E. und Price, J. L.** (1977b). *Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat*. *J Comp Neurol* 172(4): 723-52.
- Köller, H., Siebler, M., Schmalenbach, C. und Müller, H. W.** (1990). *GABA and glutamate receptor development of cultured neurons from rat hippocampus, septal region, and neocortex*. *Synapse* 5(1): 59-64.
- Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y. und Buzsaki, G.** (2002). *Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo*. *Science* 296(5575): 2049-52.
- Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. und Khazipov, R.** (1997). *Ca^{2+} oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus*. *Neuron* 18(2): 243-55.
- Leitch, E., Coaker, J., Young, C., Mehta, V. und Sernagor, E.** (2005). *GABA type-A activity controls its own developmental polarity switch in the maturing retina*. *J Neurosci* 25(19): 4801-5.
- Leon, M.** (1992). *The neurobiology of filial learning*. *Annu Rev Psychol* 43: 377-98.
- Liao, B., Paschal, B. M. und Luby-Phelps, K.** (1999). *Mechanism of Ca^{2+} -dependent nuclear accumulation of calmodulin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6217-22.
- Lichtman, J. W. und Conchello, J. A.** (2005). *Fluorescence microscopy*. *Nat Methods* 2(12): 910-9.
- Lischalk, J. W., Easton, C. R. und Moody, W. J.** (2009). *Bilaterally propagating waves of spontaneous activity arising from discrete pacemakers in the neonatal mouse cerebral cortex*. *Dev Neurobiol* 69(7): 407-414.
- Litaudon, P., Datiche, F. und Cattarelli, M.** (1997a). *Optical recording of the rat piriform cortex activity*. *Prog Neurobiol* 52(6): 485-510.

- Litaudon, P., Mouly, A. M., Sullivan, R., Gervais, R. und Cattarelli, M.** (1997b). *Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye.* Eur J Neurosci 9(8): 1593-602.
- Lopez-Bendito, G. und Molnar, Z.** (2003). *Thalamocortical development: how are we going to get there?* Nat Rev Neurosci 4(4): 276-89.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B. und Kriegstein, A. R.** (1995). *GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis.* Neuron 15(6): 1287-98.
- Lu, B., Yokoyama, M., Dreyfus, C. F. und Black, I. B.** (1991). *Depolarizing stimuli regulate nerve growth factor gene expression in cultured hippocampal neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A 88(14): 6289-92.
- Luskin, M. B. und Price, J. L.** (1983a). *The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat.* J Comp Neurol 216(3): 292-302.
- Luskin, M. B. und Price, J. L.** (1983b). *The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb.* J Comp Neurol 216(3): 264-91.
- Löscher, W. und Ebert, U.** (1996). *The role of the piriform cortex in kindling.* Prog Neurobiol 50(5-6): 427-81.
- Malenka, R. C. und Nicoll, R. A.** (1997). *Silent synapses speak up.* Neuron 19(3): 473-6.
- Mao, B. Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R. C. und Yuste, R.** (2001). *Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices.* Neuron 32(5): 883-98.
- Marin-Padilla, M.** (1971). *Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (Felis domestica). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization.* Z Anat Entwicklungsgesch 134(2): 117-45.
- Martinez, M. C., Blanco, J., Bullon, M. M. und Agudo, F. J.** (1987). *Structure of the piriform cortex of the adult rat. A Golgi study.* J Hirnforsch 28(3): 341-8.
- Martinez, S. und Puelles, L.** (2000). *Neurogenetic compartments of the mouse diencephalon and some characteristic gene expression patterns.* In: Mouse brain development: Results and problems in cell differentiation, 30 (Goffinet, A. und Rakic, P., Eds.). Berlin; New York, Springer: xiv, 339 p.
- Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S. und Tononi, G.** (2004). *The sleep slow oscillation as a traveling wave.* J Neurosci 24(31): 6862-70.
- McCabe, A. K., Chisholm, S. L., Picken-Bahrey, H. L. und Moody, W. J.** (2006). *The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones.* J Physiol 577(Pt 1): 155-67.
- McCabe, A. K., Easton, C. R., Lischalk, J. W. und Moody, W. J.** (2007). *Roles of glutamate and GABA receptors in setting the developmental timing of spontaneous synchronized activity in the developing mouse cortex.* Dev Neurobiol 67(12): 1574-88.
- McConnell, J. A.** (1975). *Time and origin of amygdaloid neurons in the mouse: an autoradiographic study.* Anat Rec 181(2): 418.

- McDonald, A. J.** (1992). *Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study*. Brain Res Bull 28(2): 179-85.
- McDonald, A. J.** (1998). *Cortical pathways to the mammalian amygdala*. Prog Neurobiol 55(3): 257-332.
- McDonald, A. J.** (2003). *Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective*. Ann N Y Acad Sci 985: 1-21.
- McIntyre, D. C. und Plant, J. R.** (1989). *Pyramidal cortex involvement in kindling*. Neurosci Biobehav Rev 13(4): 277-80.
- Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A. und Shatz, C. J.** (1991). *Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina*. Science 252(5008): 939-43.
- Mellors, R. C. und Silver, R.** (1951). *A micro-fluorometric scanner for the differential detection of cells; application of exfoliative cytology*. Science 114(2962): 356-60.
- Menendez de la Prida, L., Bolea, S. und Sanchez-Andres, J. V.** (1998). *Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus*. Eur J Neurosci 10(3): 899-906.
- Mermelstein, P. G., Deisseroth, K., Dasgupta, N., Isaksen, A. L. und Tsien, R. W.** (2001). *Calmodulin priming: nuclear translocation of a calmodulin complex and the memory of prior neuronal activity*. Proc Natl Acad Sci U S A 98(26): 15342-7.
- Molliver, M. E., Kostovic, I. und van der Loos, H.** (1973). *The development of synapses in cerebral cortex of the human fetus*. Brain Res 50(2): 403-7.
- Molnar, Z. und Hannan, A. J.** (2000). *Development of thalamocortical projections in normal and mutant mice*. In: Mouse brain development: Results and problems in cell differentiation, 30 (Goffinet, A. und Rakic, P., Eds.). Berlin; New York, Springer: xiv, 339 p.
- Moody, W. J. und Bosma, M. M.** (2005). *Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells*. Physiol Rev 85(3): 883-941.
- Nagerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. und Bonhoeffer, T.** (2004). *Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons*. Neuron 44(5): 759-67.
- Nakano, A.** (2002). *Spinning-disk Confocal Microscopy - A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic*. Cell Struct Funct 27(5): 349-55.
- Nedivi, E.** (1999). *Molecular analysis of developmental plasticity in neocortex*. J Neurobiol 41(1): 135-47.
- Nestler, E. J. und Greengard, P.** (1983). *Protein phosphorylation in the brain*. Nature 305(5935): 583-8.
- O'Donovan, M. J., Chub, N. und Wenner, P.** (1998). *Mechanisms of spontaneous activity in developing spinal networks*. J Neurobiol 37(1): 131-45.

- Onimaru, H. und Homma, I.** (2007). *Spontaneous oscillatory burst activity in the piriform-amygdala region and its relation to in vitro respiratory activity in newborn rats.* Neuroscience 144(1): 387-94.
- Opitz, T., De Lima, A. D. und Voigt, T.** (2002). *Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro.* J Neurophysiol 88(5): 2196-206.
- Owens, D. F. und Kriegstein, A. R.** (2002). *Is there more to GABA than synaptic inhibition?* Nat Rev Neurosci 3(9): 715-27.
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W. Y. und Haugland, R. P.** (1999). *Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates.* J Histochem Cytochem 47(9): 1179-88.
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W. und Lechleiter, J. D.** (2008). *Chemical calcium indicators.* Methods 46(3): 143-51.
- Paxinos, G. und Franklin, K. B. J.** (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* San Diego, Academic Press.
- Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J. und Kaila, K.** (2003). *Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma.* Trends Neurosci 26(4): 199-206.
- Penn, A. A. und Shatz, C. J.** (1999). *Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development.* Pediatr Res 45(4 Pt 1): 447-58.
- Petralia, R. S., Esteban, J. A., Wang, Y. X., Partridge, J. G., Zhao, H. M., Wenthold, R. J. und Malinow, R.** (1999). *Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses.* Nat Neurosci 2(1): 31-6.
- Piredda, S. und Gale, K.** (1985). *A crucial epileptogenic site in the deep prepiriform cortex.* Nature 317(6038): 623-5.
- Price, D. J., Kennedy, H., Dehay, C., Zhou, L., Mercier, M., Jossin, Y., Goffinet, A. M., Tissir, F., Blakey, D. und Molnar, Z.** (2006). *The development of cortical connections.* Eur J Neurosci 23(4): 910-20.
- Racine, R. J., Mosher, M. und Kairiss, E. W.** (1988). *The role of the pyriform cortex in the generation of interictal spikes in the kindled preparation.* Brain Res 454(1-2): 251-63.
- Regehr, W. G.** (2005). *Monitoring presynaptic calcium dynamics with membrane-permeant indicators.* In: Imaging in neuroscience and development: a laboratory manual (Yuste, R. und Konnerth, A., Eds.). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: xvi, 854 p.
- Rheims, S., Holmgren, C. D., Chazal, G., Mulder, J., Harkany, T., Zilberter, T. und Zilberter, Y.** (2009). *GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies.* J Neurochem 110(4): 1330-8.
- Rheims, S., Minlebaev, M., Ivanov, A., Represa, A., Khazipov, R., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y. und Zilberter, Y.** (2008). *Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro.* J Neurophysiol 100(2): 609-19.

- Rickmann, M., Chronwall, B. M. und Wolff, J. R.** (1977). *On the development of non-pyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as a pallial anlage.* *Anat Embryol (Berl)* 151(3): 285-307.
- Rigas, P. und Castro-Alamancos, M. A.** (2004). *Leading role of the piriform cortex over the neocortex in the generation of spontaneous interictal spikes during block of GABA(A) receptors.* *Neuroscience* 124(4): 953-61.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. und Kaila, K.** (1999). *The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation.* *Nature* 397(6716): 251-5.
- Russchen, F. T.** (1982). *Amygdalopetal projections in the cat. I. Cortical afferent connections. A study with retrograde and anterograde tracing techniques.* *J Comp Neurol* 206(2): 159-79.
- Sanchez-Vives, M. V., Descalzo, V. F., Reig, R., Figueroa, N. A., Compte, A. und Gallego, R.** (2008). *Rhythmic spontaneous activity in the piriform cortex.* *Cereb Cortex* 18(5): 1179-92.
- Sanchez-Vives, M. V. und McCormick, D. A.** (2000). *Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex.* *Nat Neurosci* 3(10): 1027-34.
- Santacana, M., Heredia, M. und Valverde, F.** (1992). *Development of the main efferent cells of the olfactory bulb and of the bulbar component of the anterior commissure.* *Brain Res Dev Brain Res* 65(1): 75-83.
- Schwabe, K., Ebert, U. und Loscher, W.** (2004). *The central piriform cortex: anatomical connections and anticonvulsant effect of GABA elevation in the kindling model.* *Neuroscience* 126(3): 727-41.
- Shatz, C. J.** (1990). *Impulse activity and the patterning of connections during CNS development.* *Neuron* 5(6): 745-56.
- Shaywitz, S. E., Shaywitz, B. A., Pugh, K. R., Fulbright, R. K., Constable, R. T., Mencl, W. E., Shankweiler, D. P., Liberman, A. M., Skudlarski, P., Fletcher, J. M., Katz, L., Marchione, K. E., Lacadie, C., Gatenby, C. und Gore, J. C.** (1998). *Functional disruption in the organization of the brain for reading in dyslexia.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2636-41.
- Sidman, R. L. und Angevine, J. B.** (1962). *Autoradiographic analysis of time of origin of nuclear versus cortical components of mouse telencephalon.* *Anat Rec* 142(2): 326-7.
- Sidman, R. L. und Rakic, P.** (1973). *Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review.* *Brain Res* 62(1): 1-35.
- Sipilä, S. T., Huttu, K., Soltesz, I., Voipio, J. und Kaila, K.** (2005). *Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus.* *J Neurosci* 25(22): 5280-9.
- Sipilä, S. T., Schuchmann, S., Voipio, J., Yamada, J. und Kaila, K.** (2006). *The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus.* *J Physiol* 573(Pt 3): 765-73.
- Smetters, D., Majewska, A. und Yuste, R.** (1999). *Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging.* *Methods* 18(2): 215-21.

- Spitzer, N. C.** (1994). *Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurons: signaling systems for differentiation.* Trends Neurosci 17(3): 115-8.
- Spitzer, N. C.** (2002). *Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients.* J Physiol Paris 96(1-2): 73-80.
- Spitzer, N. C.** (2006). *Electrical activity in early neuronal development.* Nature 444(7120): 707-12.
- Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J. und Hubner, C. A.** (2004). *Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride.* J Comp Neurol 468(1): 57-64.
- Steriade, M., Amzica, F. und Nunez, A.** (1993c). *Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow (approximately 0.3 Hz) oscillation in neocortical cells.* J Neurophysiol 70(4): 1385-400.
- Steriade, M., Nunez, A. und Amzica, F.** (1993a). *A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components.* J Neurosci 13(8): 3252-65.
- Steriade, M., Nunez, A. und Amzica, F.** (1993b). *Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram.* J Neurosci 13(8): 3266-83.
- Suzuki, T., Okamura-Noji, K., Ogura, A., Tanaka, R., Nakamura, K. und Kudo, Y.** (1992). *Calpain may produce a Ca²⁺-independent form of kinase C in long-term potentiation.* Biochem Biophys Res Commun 189(3): 1515-20.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. und Tank, D. W.** (1997). *In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons.* Nature 385(6612): 161-5.
- Svoboda, K. und Yasuda, R.** (2006). *Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience.* Neuron 50(6): 823-39.
- Taber, E.** (1963). *Histogenesis of brain stem neurons studied autoradiographically with thymidine-H3 in the mouse.* Anat Rec 145(2): 291.
- Taber Pierce, E.** (1967). *Histogenesis of the dorsal and ventral cochlear nuclei in the mouse. An autoradiographic study.* J Comp Neurol 131(1): 27-54.
- Taber Pierce, E.** (1970). *Histogenesis of the sensory nuclei of the trigeminal nerve in the mouse. An autoradiographic study.* Anat Rec 166(2): 388.
- Tanaami, T., Otsuki, S., Tomosada, N., Kosugi, Y., Shimizu, M. und Ishida, H.** (2002). *High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks.* Applied Optics 41(22): 4704-8.
- Tank, D. W., Sugimori, M., Connor, J. A. und Llinas, R. R.** (1988). *Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice.* Science 242(4879): 773-7.
- Theer, P., Hasan, M. T. und Denk, W.** (2003). *Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier.* Opt. Lett. 28(12): 1022-4.

- Thomas, D., Tovey, S. C., Collins, T. J., Bootman, M. D., Berridge, M. J. und Lipp, P.** (2000). *A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals*. *Cell Calcium* 28(4): 213-23.
- Thordstein, M., Lofgren, N., Flisberg, A., Bagenholm, R., Lindecrantz, K. und Kjellmer, I.** (2005). *Infraslow EEG activity in burst periods from post asphyctic full term neonates*. *Clin Neurophysiol* 116(7): 1501-6.
- Tolonen, M., Palva, J. M., Andersson, S. und Vanhatalo, S.** (2007). *Development of the spontaneous activity transients and ongoing cortical activity in human preterm babies*. *Neuroscience* 145(3): 997-1006.
- Tsien, R. Y.** (1980). *New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures*. *Biochemistry* 19(11): 2396-404.
- Tsien, R. Y.** (1981). *A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells*. *Nature* 290(5806): 527-8.
- Tyzio, R., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y. und Khazipov, R.** (2007). *Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings*. *Epilepsia* 48 Suppl 5: 96-105.
- Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H. und Aniksztejn, L.** (1999). *The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite*. *J Neurosci* 19(23): 10372-82.
- Valverde, F.** (1998). *Golgi atlas of the postnatal mouse brain*. Wien; New York, Springer-Verlag.
- Valverde, F. und Santacana, M.** (1994). *Development and early postnatal maturation of the primary olfactory cortex*. *Brain Res Dev Brain Res* 80(1-2): 96-114.
- Vanhatalo, S. und Kaila, K.** (2006). *Development of neonatal EEG activity: from phenomenology to physiology*. *Semin Fetal Neonatal Med* 11(6): 471-8.
- Vanhatalo, S., Palva, J. M., Andersson, S., Rivera, C., Voipio, J. und Kaila, K.** (2005). *Slow endogenous activity transients and developmental expression of K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 in the immature human cortex*. *Eur J Neurosci* 22(11): 2799-804.
- Vanhatalo, S., Tallgren, P., Andersson, S., Sainio, K., Voipio, J. und Kaila, K.** (2002). *DC-EEG discloses prominent, very slow activity patterns during sleep in preterm infants*. *Clin Neurophysiol* 113(11): 1822-5.
- Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J. und Sudhof, T. C.** (2000). *Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion*. *Science* 287(5454): 864-9.
- Voigt, T., Baier, H. und Dolabela de Lima, A.** (1997). *Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development*. *Eur J Neurosci* 9(5): 990-9.

- Voigt, T., Opitz, T. und de Lima, A. D.** (2001). *Synchronous oscillatory activity in immature cortical network is driven by GABAergic preplate neurons*. J Neurosci 21(22): 8895-905.
- Voigt, T., Opitz, T. und de Lima, A. D.** (2005). *Activation of early silent synapses by spontaneous synchronous network activity limits the range of neocortical connections*. J Neurosci 25(18): 4605-15.
- Wahnschaffe, U., Ebert, U. und Löscher, W.** (1993). *The effects of lesions of the posterior piriform cortex on amygdala kindling in the rat*. Brain Res 615(2): 295-303.
- White, H.** (1980). *A heteroskedasticity-consistent covariance matrix estimator and a direct test for heteroskedasticity*. Econometrica 48(4): 817-38.
- Williams, R. M., Piston, D. W. und Webb, W. W.** (1994). *Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry*. Faseb J 8(11): 804-13.
- Wise, F. W.** (2005). *Lasers for multiphoton microscopy*. In: Imaging in neuroscience and development: a laboratory manual (Yuste, R. und Konnerth, A., Eds.). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: xvi, 854 p.
- Wong, R. O., Chernjavsky, A., Smith, S. J. und Shatz, C. J.** (1995). *Early functional neural networks in the developing retina*. Nature 374(6524): 716-8.
- Wu, G. Y., Deisseroth, K. und Tsien, R. W.** (2001). *Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology*. Nat Neurosci 4(2): 151-8.
- Xu, C., Zipfel, W., Shear, J. B., Williams, R. M. und Webb, W. W.** (1996). *Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(20): 10763-8.
- Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H. J. und Fukuda, A.** (2004). *Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1*. J Physiol 557(Pt 3): 829-41.
- Yuste, R.** (2005). *Fluorescence microscopy today*. Nat Methods 2(12): 902-4.
- Yuste, R., Nelson, D. A., Rubin, W. W. und Katz, L. C.** (1995). *Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation*. Neuron 14(1): 7-17.
- Yuste, R., Peinado, A. und Katz, L. C.** (1992). *Neuronal domains in developing neocortex*. Science 257(5070): 665-9.
- Zhang, L. I. und Poo, M. M.** (2001). *Electrical activity and development of neural circuits*. Nat Neurosci 4 Suppl: 1207-14.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Der Piriforme Kortex als Schrittmacher

Früher Netzwerkoszillationen im unreifen Mauskortex

im Institut für Neurowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch

Prof. Dr. med. Arthur Konnerth und Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den

.....

Bastian Fatke

DANK

Bei Konzeption, Durchführung und Beendigung dieser Arbeit erhielt ich wertvolle Unterstützung von vielen Menschen. An dieser Stelle möchte ich einigen von ihnen besonders danken.

Ich danke Prof. Dr. Arthur Konnerth für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die verlässliche Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand. Prof. Dr. Knut Holthoff danke ich ebenfalls für die Betreuung und für sein stets offenes Ohr. Dr. Nima Marandi betreute mich zu Beginn des Projekts und war ein wichtiges Vorbild als Wissenschaftler mit Spaß und Elan. Dafür möchte ich ihm danken. Außerdem danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Neurowissenschaften für ihre Hilfe und die gute Laune.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich dafür, dass sie mir in den Jahren meiner Ausbildung den Rücken stärkten, und natürlich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit hinsichtlich einfacher Tippfehler und waghalsiger grammatikalischer Konstruktionen.

Schließlich danke ich meiner Verlobten Carolin dafür, dass sie in meinem Leben ist.