

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Neurowissenschaften

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth)

Neuronale Netzwerkanalyse mittels Fluoreszenz-Mikroendoskopie *in vivo*

Christine Maria Grienberger

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. C. Zimmer

3. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 26.09.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014 angenommen.

Zusammenfassung

Neuronale Netzwerkanalyse mittels Fluoreszenz- Mikroendoskopie *in vivo*

Die Aktivität von neuronalen Netzwerken ist für die verschiedensten Verarbeitungsvorgänge im Gehirn von entscheidender Bedeutung. So stellt die Aktivierung solcher Netzwerke einen Schlüsselmechanismus für die Verarbeitung von Umweltreizen und die anschließende Auslösung einer Verhaltensreaktion dar.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein mikroendoskopischer Ansatz entwickelt, um nach Anfärbung mit einem Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff überschwellige Aktivität lokaler Nervenzell-Netzwerke im Gehirn von anästhesierten und nicht-anästhesierten Mäusen zu detektieren und mittels Optogenetik zu beeinflussen.

So wurden nun zum ersten Mal spontane und sensorisch-evozierte Netzwerkaktivität, in Form von Netzwerk-Kalzium-Transienten, in den Kernfeldern des auditorischen Kortex von 1-2 Monate-alten Mäusen charakterisiert. Kalzium-Signalmessungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie zeigten, dass Nervenzellen und Neuropil zu gleichen Teilen zu diesem Populationssignal beitrugen. Die Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten bestanden aus zwei Komponenten, aus einem frühen, schnell-ansteigenden und einem späten, langsam-ansteigenden Kalzium-Transienten. Die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten, welche eine Dauer von bis zu 1.5 Sekunden hatten, unterschieden sich in ihrer zeitlichen Struktur nicht von den spontan-auftretenden Kalzium-Signalen. Weiterhin traten sie mit einer Verzögerung auf, die beträchtlich länger war, als diejenige, welche bisher für sensorische Antworten im primären auditorischen Kortex beschrieben worden war. Im Vergleich zur schnellen Antwortkomponente hatten sie tendenziell eine größere Amplitude und waren durch ein weniger spezifisches Antwortverhalten nach Stimulation mit reinen Tönen gekennzeichnet. Die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten waren stark mit global-nachweisbaren elektrischen langsamen Wellen korreliert und konnten durch

optogenetische Stimulation von Pyramidenzellen der kortikalen Schicht 5 ausgelöst werden.

Zusammenfassend identifizieren diese Ergebnisse die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten als wichtigen Bestandteil der neuronalen Signalgebung im auditorischen Kortex der Maus und tragen dazu bei, die großflächige Dynamik von spontaner und sensorisch-evozierter kortikaler Netzwerkaktivität besser zu verstehen.

Abstract

Analysis of neuronal network activity using fluorescence microendoscopy *in vivo*

The activity of neuronal networks is essential for information processing in the brain. Thus, the activation of these networks represents a key mechanism for the perception of sensory stimuli and the resulting behavioural response.

Here, network activity has been analysed in the mouse brain using a newly developed optical fibre-based microendoscopy approach. In conjunction with multi cell bolus loading of a calcium-sensitive fluorescent dye this method is suitable to detect the action potential activity of local clusters of neurons in anesthetized and non-anesthetized mice. Moreover, this technique was combined with optogenetics in order to influence the activity on the level of neuronal networks.

Now, for the first time, spontaneous and sensory-evoked network activity has been recorded in the core fields of the mouse auditory cortex as network calcium transients (NCaTs). Two-photon calcium imaging experiments suggested that neurons and neuropil contributed about equally to the NCaTs. Sound-evoked NCaTs had two components: an early, fast increase in calcium concentration, which corresponds to the short-latency spiking responses observed in electrophysiological experiments, and a late, slow calcium transient. The latency of the sound-evoked slow NCaTs was considerably longer than the one previously described for sound-evoked responses in the mouse auditory cortex. The sound-evoked slow NCaTs could last for up to 1.5 s and were essentially identical to spontaneous NCaTs. Their sizes were dependent on the spontaneous activity level at sound onset. When using pure tone stimulation, the early evoked calcium transients were more narrowly tuned than the slow NCaTs. The slow NCaTs were correlated with global 'up states' recorded with epidural potentials, and sound presented during an epidural 'down state' triggered a calcium transient that was associated with an epidural 'up state'. Essentially indistinguishable calcium transients were evoked by optogenetic activation of local clusters of layer 5 pyramidal neurons in the auditory cortex,

indicating that these neurons played an important role in the generation of the calcium signal.

Taken together, these results identify sound-evoked slow NCaTs as an integral component of neuronal signalling in the mouse auditory cortex, reflecting the prolonged network activity of local clusters of neurons that can be activated even by brief stimuli.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen	9
1 Einleitung	12
1.1 <i>Methoden der Fluoreszenzmessung in vivo</i>	12
1.1.1 Ziele.....	12
1.1.2 Prinzip der Fluoreszenzmessung	13
1.2 <i>Messung der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz</i>	16
1.2.1 Fluoreszierende Kalzium-Indikatoren	17
1.2.2 Anfärbung mit chemischen Kalzium-Indikatoren <i>in vivo</i>	19
1.2.3 Systeme zur Detektion der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz <i>in vivo</i> ..	21
1.3 <i>Sensorische Systeme der Maus</i>	31
1.3.1 Das auditorische System der Maus	32
2 Ausgangspunkt und Fragestellung	35
3 Material und Methoden	37
3.1 <i>Versuchstiere</i>	37
3.2 <i>Lichtleiter-basierte Fluoreszenz-Mikroendoskopie in vivo</i>	37
3.2.1 Vorbereitung der Glasfaser	37
3.2.2 Narkose und deren Überwachung.....	38
3.2.3 Präparation	39
3.2.4 Färbung und Implantation des Lichtleiters	41
3.2.5 Messung in nicht-anästhesierten Mäusen	44
3.2.6 Das Aufnahmesystem	45
3.2.7 Aktivierung des Channelrhodopsins-2	48
3.2.8 Datenerfassung	48

3.3	<i>Kombinierte Experimente aus Zwei-Photonen-Mikroskopie und mikroendoskopischer Detektion von Netzwerkaktivität</i>	49
3.4	<i>Anwendung von pharmakologisch wirksamen Substanzen</i>	51
3.5	<i>Elektrokortikogramm</i>	52
3.6	<i>Sensorische Stimulation</i>	52
3.6.1	<i>Auditorische Stimulation</i>	52
3.7	<i>Datenauswertung</i>	53
3.8	<i>Dokumentation der Messposition nach dem Experiment</i>	55
4	Ergebnisse	58
4.1	<i>Mikroendoskopische Kalzium-Messungen im Gehirn von Mäusen</i>	58
4.1.1	Messung von Spontanaktivität in der Großhirnrinde der Maus	58
4.1.2	Messung der hippokampalen Spontanaktivität	61
4.1.3	Messungen im nicht-anästhesierten Tier	64
4.2	<i>Methodische Charakterisierung der Lichtleiter-basierten Mikroendoskopie</i> ...	66
4.2.1	Überwachung der Präparation mittels Elektrokortikogramm.....	66
4.2.2	Bestimmung der Anfärbungsstabilität	68
4.2.3	Verwendung von Lichtleitern mit verschiedenen Durchmessern	69
4.3	<i>Analyse der Netzwerkaktivität im auditorischen Kortex der Maus</i>	72
4.3.1	Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten in den Kernfeldern des auditorischen Kortex	72
4.3.2	Spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten in den Kernfeldern des auditorischen Kortex.....	74
4.3.3	Ursprung der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten	76
4.3.4	Sensitivität der mikroendoskopischen Kalzium-Messungen	81
4.3.5	Verhältnis zwischen spontanen und Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten.....	84
4.3.6	Netzwerk-Kalzium-Transienten nach reiner Ton-Stimulation.....	89
4.3.7	Verhältnis zwischen Netzwerk-Kalzium-Transienten und Elektrokortikogramm.....	91
4.3.8	Optogenetische Auslösung der langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten	95

5	Diskussion	97
5.1	<i>Neuronale Aktivität als Grundlage der Netzwerk-Kalzium-Transienten</i>	98
5.2	<i>Eigenschaften der Fluoreszenz-Mikroendoskopie in vivo</i>	99
5.3	<i>Vergleich mit anderen Methoden zur Netzwerkanalyse in vivo</i>	101
5.3.1	Intrinsisch optische Signale	101
5.3.2	Verwendung von spannungsabhängigen Farbstoffen	102
5.3.3	Elektrische extrazelluläre Messungen	103
5.4	<i>Charakterisierung der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten</i>	106
5.4.1	Zellulärer Ursprung der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten	106
5.4.2	Bedeutung der Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten	107
5.4.3	Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten und elektrische langsame Wellen	108
5.4.4	Netzwerk-Kalzium-Transienten als sich ausbreitende Wellen	109
5.5	<i>Ausblick</i>	110
6	Literaturverzeichnis	113
7	Eigene Publikationen	134
7.1	<i>Publikationen, die Teile dieser Dissertation enthalten</i>	134
7.2	<i>Weitere Publikationen</i>	134
7.3	<i>Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen</i>	135
8	Danke	136
9	Eidesstattliche Erklärung	137
10	Lebenslauf	138

Abkürzungen

ΔF	Fluoreszenzänderung
Φ	Durchschnittliche Photonenflussdichte
λ	Wellenlänge
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
τ	Abfallszeitkonstante
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\text{M}\Omega$	Megaohm
A1	primärer auditorischer Kortex
AAF	anteriores auditorisches Feld
Abb	Abbildung
AM	Acetoxymethyl-Gruppe
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
BAPTA	1,2-bis-(2-amiophenoxy)ethan-N,N,N,N-tetraacetat
Bic	Bicucullin
CA1	Cornu ammonis (Region 1)
CaCl_2	Kalziumchlorid
CCD	<i>charge-coupled device</i> (dt. etwa „ladungsgekoppeltes Bauteil“)
ChR2	Channelrhodopsin-2
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
dB SPL	<i>decibel sound pressure level</i> (dt. „Dezibel Schalldruckpegel“, Einheit der Lautstärke)
DMSO	Dimethylsulfoxid

ECoG	Elektrokortikogramm
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F	Fluoreszenzlevel
F ₀	Fluoreszenzgrundwert
F ₁ (t)	Fluoreszenzlevel zum Zeitpunkt t
fl	Femtoliter
fs	Femtosekunde(n)
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GECI	<i>genetically encoded calcium indicator</i> (dt. „genetisch-kodierte Kalzium-Indikatoren“)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (dt. grün fluoreszierendes Protein)
Glu	Glutamat
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HP	Hippokampus
Hz	Hertz
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde(n)
mW	Milliwatt

n	Anzahl
nA	Nanoampere
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenbicarbonat
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
OGB-1	Oregon Green BAPTA-1
PMT	<i>photon multiplier tube</i> (dt. „Photonenverstärkerröhre“)
ROI(s)	<i>region(s) of interest</i> (dt. „interessierender Bereich“, Messregion zur Fluoreszenzsignal-Auswertung)
s	Sekunde(n)
S	Streuung
S ₀	energetischer Grundzustand eines Moleküls
S ₁	energetisch angeregter Zustand eines Moleküls
SR101	Sulforhodamin 101
UV	ultraviolett
V1	primärer visueller Kortex
vol	Volumen
W ₁	Ein-Photon-Absorptionsrate
W ₂	Zwei-Photonen-Absorptionsrate

1 Einleitung

Gegenstand dieser Dissertation ist die Charakterisierung von Netzwerkaktivität mittels Fluoreszenz-Mikroendoskopie im Gehirn von Mäusen *in vivo*. Diese Aktivitätsform, erzeugt in Ensembles von gleichzeitig aktiven Nervenzellen, ist für die verschiedensten Verarbeitungsprozesse im zentralen Nervensystem von Bedeutung (Buzsaki und Draguhn, 2004; Engel et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wird nun der Frage nachgegangen, welche Funktion Netzwerkaktivität im auditorischen Kortex von Mäusen im Rahmen der dort stattfindenden Verarbeitung sensorischer Informationen besitzt.

1.1 Methoden der Fluoreszenzmessung *in vivo*

1.1.1 Ziele

Auch in Abwesenheit von Umwelteindrücken, die von den Sinnesorganen über das periphere Nervensystem an das Gehirn weitergeleitet werden, ist das Gehirn spontan aktiv. Um die Mechanismen dieser Spontanaktivität und ihre Beeinflussung durch Umwelteindrücke zu verstehen, ist es von großer Wichtigkeit, das intakte Gehirn untersuchen zu können. Denn nur unter dieser Bedingung sind die Verbindungen zwischen den unterschiedlichen Teilen des Gehirns, sowie die afferenten und efferenten Nervenbahnen erhalten.

Die Aktivität des Gehirns hängt einerseits von intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften der einzelnen Nervenzellen ab (Llinas, 1988). Andererseits spielen auch die Wechselwirkungen der Nervenzellen untereinander im Rahmen neuronaler Netzwerke eine wichtige Rolle (Steriade, 2000). Darüber hinaus gibt es neben den Nervenzellen verschiedene Typen von Gliazellen, von denen besonders die Astrozyten in Interaktion mit den Nervenzellen treten und dadurch neuronale Aktivität beeinflussen können (Ben Achour und Pascual, 2012; Winship et al., 2007).

Um das Gehirn als Ganzes zu verstehen, verwendet die Neurowissenschaft unterschiedliche Techniken. Neben der Analyse elektrischer Signal auf

Einzelzellebene mittels der Patch-Clamp-Technik (Edwards et al., 1989; Hamill et al., 1981) ist es zunehmend in den Fokus gerückt, *in vivo* die Aktivität von Populationen von Nervenzellen als Teil des Gesamt-Netzwerkes des Gehirns zu analysieren. Dafür verwendete Techniken sind z.B. die funktionelle Magnetresonanztomographie (Logothetis, 2008), die Positronenemissionstomographie (Drzezga et al., 2011), die Elektroenzephalographie sowie die Messungen des lokalen Feldpotentials (Buzsaki et al., 2012), der Multiunit-Aktivität (Buzsaki, 2004) und der intrinsisch optischen Signale (Bonhoeffer und Grinvald, 1991; Grinvald et al., 1986). Fluoreszenzmessungen unter Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe, Anregungsarten und Mikroskope erweitern beträchtlich dieses Spektrum an Methoden (Scanziani und Häusser, 2009). Denn sie erlauben die selektive und spezifische Detektion von Molekülen in geringer Konzentration und mit einem guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Yuste, 2005).

1.1.2 Prinzip der Fluoreszenzmessung

Das Phänomen der Fluoreszenz beruht auf der Absorption von Photonen einer bestimmten Energie (somit Licht einer spezifischen Wellenlänge) durch Moleküle eines Fluorophors (Lichtman und Conchello, 2005). Dies resultiert in der Emission von Photonen niedrigerer Energie, d.h. Licht einer längeren Wellenlänge. Dieser Vorgang kann anhand des Jablonski-Diagramms (benannt nach dem polnischen Physiker Alexander Jablonski, 1898-1980) nachvollzogen werden (Abb. 1). Absorbiert ein Fluorophor nämlich ein Photon mit der Energie $h \cdot \nu$ (mit h Planck'sches Wirkungsquantum und ν Frequenz des Lichtes), so wird alle Energie des Photons auf den Fluorophor übertragen. Falls diese Energie größer ist als diejenige, die für den Übergang von seinem energetischen Grundzustand S_0 in seinen energetisch angeregten Zustand S_1 benötigt wird, wird der Fluorophor diesen Übergang durchführen. Das angeregte Fluorophor-Molekül fällt dann innerhalb von Picosekunden auf den niedrigsten Schwingungszustand innerhalb des angeregten Zustandes herab. Da der angeregte Zustand jedoch energetisch nicht stabil ist, kehrt das Molekül innerhalb von Nanosekunden in seinen Grundzustand zurück. Dabei

wird Energie in Form eines Photons emittiert. Da zuvor der niedrigste Schwingungszustand innerhalb des angeregten Zustandes erreicht und dieser Prozess mit Energieverlust verbunden war, entspricht die Energie des emittierten Photons dem Unterschied zwischen dem untersten Schwingungszustand des angeregten Zustandes und dem Grundzustand. Somit hat das emittierte Photon im Vergleich zur Anregung eine niedrigere Energie, d.h. eine längere Wellenlänge. Dieses Phänomen wird „Stokes-Shift“ genannt (Resch-Genger et al., 2008).

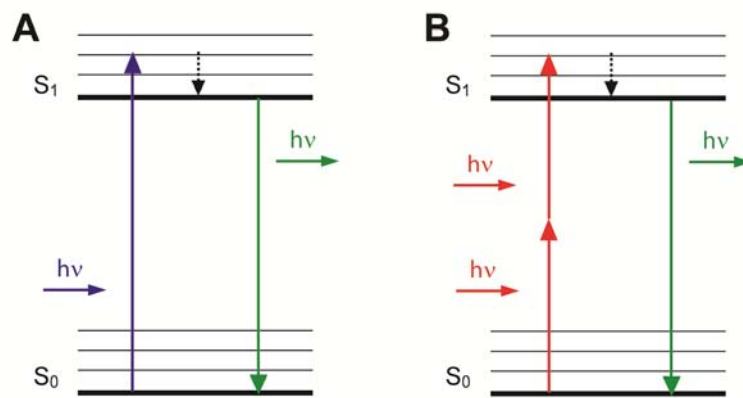


Abb. 1: Jablonski-Diagramm zur schematischen Darstellung der Ein-Photonen- (A) und Zwei-Photonen-Anregung (B) eines Fluorophor-Moleküls.

(modifiziert nach Helmchen und Denk, 2005; Lichtman und Conchello, 2005)

Die Ein-Photonen-Anregung, verwendet beispielsweise in konfokalen Mikroskopen, beruht auf der Absorption eines einzelnen Photons durch ein fluoreszierendes Molekül (Abb. 1 links, blau). Das Photon besitzt dabei alleine ausreichend Energie, um den Übergang des fluoreszierenden Moleküls vom Grundzustand in den angeregten Zustand auszulösen. Dies wird auch als lineare Absorption bezeichnet. Im Gegensatz dazu stehen die Techniken, die sich nicht-lineare Absorption zunutze machen, z.B. die Zwei-Photonen-Mikroskopie (Svoboda und Yasuda, 2006). Bei dieser wird für den Übergang vom Grundzustand in den angeregten Zustand die Energie von mindestens zwei Photonen benötigt, welche im „gleichen“ Moment (nach Helmchen und Denk (2005) beträgt das Zeitfenster ungefähr 0.5 fs) das gleiche Fluorophor-Molekül treffen (Abb. 1 rechts, rot). Diese zwei Photonen befördern dieses Molekül durch ihre Addition in den angeregten

Zustand, ein Vorgang, der andernfalls ein Photon mit ungefähr der doppelten Energie benötigen würde.

Die Wahrscheinlichkeit der Ein-Photonen-Absorption pro Fluorophor W_1 ist linear von der durchschnittlichen Photonenflussdichte Φ , die durch die Stärke des Anregungslichtes und die Lichtquelle bestimmt wird, abhängig.

$$W_1 \sim \Phi$$

Die Zwei-Photonen-Absorptionsrate W_2 ist dagegen proportional zum Quadrat der durchschnittlichen Photonenflussdichte Φ , da Photonenpaare zur effizienten Anregung benötigt werden:

$$W_2 \sim \Phi^2$$

Zwei-Photonen-Absorption, ein nicht-linearer Vorgang, findet also nur dann statt, wenn sich Photonenpaare zur fast gleichen Zeit am gleichen Molekül treffen. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist am höchsten am Fokuspunkt (Abb. 2, rechts). Bei der Ein-Photonen-Absorption hingegen findet Anregung im Gebiet des gesamten Anregungskegels statt, was vor allem für Experimente *in vivo* wichtige Konsequenzen hat (Abb. 2, links).

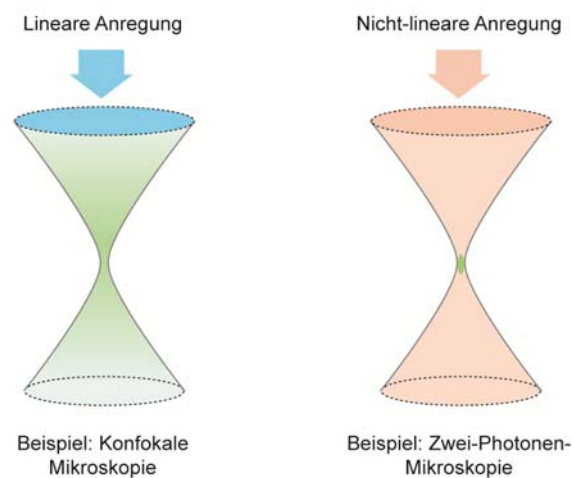


Abb. 2: Schematische Darstellung der linearen und nicht-linearen Anregung.

(modifiziert nach Helmchen und Denk, 2005)

1.2 Messung der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz

Kalzium spielt eine wichtige Rolle für unterschiedlichste zelluläre Prozesse (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000). Dies beinhaltet beispielsweise die Regulation der Herzmuskelkontraktion oder des Zellzyklus (Dulhunty, 2006; Orrenius et al., 2003). Im Nervensystem ist Kalzium an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt, z.B. der Wanderung von Nervenzellen (Zheng und Poo, 2007) oder dem Wachstum von Nervenzellfortsätzen (Lohmann et al., 2005). Es ist außerdem für intrazelluläre Vorgänge, z.B. für die Regulation von Genexpression, unerlässlich (Lyons und West, 2011). Kalzium ist darüber hinaus essentiell für synaptische Plastizität (Zucker, 1999) und die Kommunikation zwischen Nervenzellen im Rahmen der synaptischen Übertragung (Neher und Sakaba, 2008). Wenn das Kalzium-Gleichgewicht in Nervenzellen gestört ist, kann es zu schweren Krankheitsbildern kommen. So werden die Alzheimer'sche Erkrankung (Green und LaFerla, 2008), die Huntington'sche Erkrankung (Bezprozvanny und Hayden, 2004) und Krankheitsbilder aus dem autistischen Formenkreis (Krey und Dolmetsch, 2007) mit gestörter Kalzium-Homöostase in Verbindung gebracht.

Um Kalzium-Signale in Nervenzellen mittels optischer Techniken nachzuweisen, wurden in der Vergangenheit das biolumineszierende Protein Aequorin (Ashley und Ridgway, 1968; Shimomura et al., 1962) oder Absorptionsfarbstoffe, z.B. Arsenazo III (Brown et al., 1975), verwendet. Diese Farbstoffe ermöglichten wichtige frühe Einblicke in die Kalzium-Signalgebung in Nervenzellen (Hallett und Carbone, 1972; Llinas und Nicholson, 1975; Stinnakre und Tauc, 1973). Allerdings war ihre Benutzung oft schwierig, vor allem aufgrund von Problemen mit der Proteinexpression bzw. der Anfärbung. Deswegen war die Entwicklung von Kalzium-abhängigen Fluoreszenz-Farbstoffen für funktionelle Aktivitätsmessungen im Gehirn, geprägt und maßgeblich vorangetrieben durch Roger Tsien und Kollegen (Tsien, 1980), ein wichtiger Meilenstein.

Kalzium-Messungen machen sich das Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Kalzium-Konzentration im Gehirn zunutze. Im Ruhezustand ist die Kalzium-Konzentration in der Zelle sehr niedrig, typischerweise 50–100 nM, während die Kalzium-Konzentration außerhalb der Nervenzellen ungefähr 10000fach höher ist (Purves und Williams, 2001). Sowohl im Fall einer unterschwelligeren als auch einer überschwelligeren Nervenzell-Aktivierung kommt es zu einem Einstrom von Kalzium-

Ionen, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration um das zehnfache bis hundertfache führen kann (Berridge et al., 2000). Dafür sind hauptsächlich verschiedene Formen spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle und NMDA-Rezeptoren verantwortlich (Bloodgood und Sabatini, 2007; Catterall, 2000; Tsien und Tsien, 1990). Darüber hinaus können Kalzium-permeable AMPA-Rezeptoren in spezifischen Zelltypen, vor allem in Interneuronen, Kalzium-Einstrom vermitteln (Liu und Zukin, 2007). Der vorübergehende intrazelluläre Anstieg der Kalzium-Konzentration kann weiter durch Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, z.B. dem endoplasmatischen Retikulum, verstärkt werden (Verkhratsky, 2005). Es besteht insgesamt also eine enge Beziehung zwischen elektrischer Aktivierung der Nervenzellen und Änderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Kwan, 2008). Deswegen erlauben es Messungen Kalzium-abhängiger Fluoreszenzänderungen, Nervenzell-Aktivität zu untersuchen. Als limitierender Faktor ist jedoch zu erwähnen, dass Kalzium-Messungen oft keine inhibitorische synaptische Aktivität nachweisen können, da diese ohne Änderung der Kalzium-Konzentration vonstattengehen kann (Palmer et al., 2012).

1.2.1 Fluoreszierende Kalzium-Indikatoren

Fluoreszierende Kalzium-Indikatoren haben aufgrund ihrer molekularen Struktur die Fähigkeit, Änderungen der freien Kalzium-Konzentration in der Nervenzelle nachzuweisen (Tsien, 1989). Sie bestehen aus einer oder mehrerer Bindungsstellen für Kalzium sowie einem Fluorophor und befinden sich meistens im Zytosol. Es gibt auch Ansätze, Indikator-Moleküle in subzelluläre Kompartimente, z.B. das endoplasmatische Retikulum, zu befördern, um dort Änderungen der freien Kalzium-Konzentration nachweisen zu können (Rehberg et al., 2008). Mittlerweile steht eine große Anzahl an Kalzium-Indikatoren zur Verfügung, welche prinzipiell in zwei Kategorien eingeteilt werden können (Looger und Griesbeck, 2012; Paredes et al., 2008).

Zum einen gibt es die chemischen (oder synthetischen) Kalzium-abhängigen Fluoreszenz-Farbstoffe, deren Struktur auf derjenigen der Kalzium-bindenden

Moleküle Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) oder 1,2-bis-(2-amiophenoxy)ethan-N,N,N,N-tetraacetat (BAPTA) beruht (Tsien, 1980, 1989). Zusätzlich zu den Kalzium-bindenden Molekülen bestehen diese Farbstoffe aus Fluorophoren, deren Struktur für die spektralen Eigenschaften des Indikators verantwortlich ist. Zum anderen gibt es die genetisch-kodierten Kalzium-Indikatoren (*engl. genetically encoded calcium indicators*, GECIs), deren Kalzium-Bindung über endogene Kalzium-bindende Proteine vermittelt wird. Beispiele für solche Proteine sind das in Nervenzellen vorkommende Calmodulin (Miyawaki et al., 1997; Nakai et al., 2001; Tian et al., 2009) oder das in Herzmuskelzellen vorhandene Troponin C (Mank et al., 2006; Mank et al., 2008). Als Fluorophor dienen stets ein bzw. zwei fluoreszierende Proteine, deren Struktur auf das ursprünglich in Quallen entdeckte grün fluoreszierende Protein (GFP) zurückgeht und deren Eigenschaften mittels molekularbiologischen Methoden für eine Verwendung in GECIs optimiert wurden (Shaner et al., 2005; Tian et al., 2009).

Kalzium-abhängige Fluoreszenzfarbstoffe verändern nach Kalzium-Bindung ihre Eigenschaften auf drei unterschiedliche Arten. Diese sind (1) eine Verschiebung des Anregungs- bzw. das Emissionsspektrums (z.B. Fura-2 bzw. Indo-1), (2) eine Änderung der Fluoreszenzstärke (z.B. Farbstoffe der Fluo-Familie) oder (3) eine Änderung des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (z.B. GECIs der Yellow-Cameleon-Familie) (Grynkiewicz et al., 1985; Jares-Erijman und Jovin, 2003; Johnson und Spence, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich der chemische Kalzium-Indikator Oregon Green BAPTA-1 verwendet. Dieser Indikator kann mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden. Das Emissionsspektrum hat ein Maximum bei 520 nm (Paredes et al., 2008). Bei diesem Farbstoff steigt, wie bei Vertretern der Fluo-Farbstoff-Familie, mit zunehmender Kalzium-Bindung die Intensität der emittierten Fluoreszenz an. Dies ist auf eine Konformationsänderung innerhalb des Moleküls zurückzuführen. Somit spiegelt sich ein aktivitätsassoziierter Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration in einer Fluoreszenz-Änderung mit charakteristischer Anstiegs- und Abfallsphase wieder. Dieser Farbstoff wurde für diese Experimente ausgewählt, da er zum einen sehr große Fluoreszenzintensitäts-Änderungen nach Kalzium-Bindung aufweist und er zum anderen äußerst effizient mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden kann (Johnson und

Spence, 2010). Letzteres ist deswegen von Vorteil, da dies einer Laserlinie des in dem Aufnahmesystem verwendeten Lasers entsprach.

1.2.2 Anfärbung mit chemischen Kalzium-Indikatoren *in vivo*

Für die Untersuchung von Netzwerkaktivität ist es erforderlich, gleichzeitig eine große Population von Nervenzellen anzufärben. In der Vergangenheit war dies problematisch, da chemische Kalzium-Indikatoren zunächst ausschließlich als polare, also geladene, Moleküle verfügbar waren. Diese waren nicht membrangängig und so konnte eine effiziente Nervenzell-Anfärbung *in vivo* lange Zeit nur mittels scharfer Mikroelektroden (Jaffe et al., 1992; Svoboda et al., 1997) oder durch Verwendung des Patch-Clamp-Verfahrens (Eilers und Konnerth, 2009; Margrie et al., 2002) erreicht werden. Der erhebliche Nachteil dieser Methoden war jedoch, dass nur jeweils eine einzelne Zelle gleichzeitig angefärbt werden konnte. Das Problem der fehlenden Membrangängigkeit wurde durch die Synthese der Acetoxymethyl (AM)-Ester-Formen der chemischen Farbstoffe gelöst. Diese sind lipophil und können dadurch aus dem Extrazellulärraum durch die Zellmembran in die Zelle gelangen (Tsien, 1981). Dort werden dann die AM-Ester-Reste durch Enzyme, die Esterasen, abgetrennt, die Farbstoff-Moleküle verlieren so ihre Lipophilität und sind im Zytosol gefangen. Dort reichern sich folglich Farbstoff-Moleküle an und können zur Detektion von freien Kalzium-Ionen verwendet werden (Feller et al., 1996; Garaschuk et al., 1998; Yuste und Katz, 1991; Yuste et al., 1992).

Doch wie wird *in vivo* der Farbstoff in den Extrazellulärraum gebracht? Eine Möglichkeit besteht in der AM-Beladungstechnik (Stosiek et al., 2003). Diese beruht auf einer Druck-Injektion (für 1-5 Minuten) der AM-Form des Kalzium-Indikators, welcher sich in einer Glas-Pipette befindet, in den Extrazellulärraum der jeweiligen Hirnregion (Garaschuk et al., 2006b). Sie kann für eine große Anzahl von Farbstoffen benutzt werden (z.B. Oregon Green 488 BAPTA-1 AM, Fura-PE3 AM, Indo-1 AM, Calcium Green-1 AM, Fluo-4 AM) und wurde in Tieren unterschiedlichen Alters (Grienberger et al., 2012b; Rochefort et al., 2011b) sowie in unterschiedlichen Spezies (z.B. Maus, Ratte, Katze, Frettchen, Zebrafisch) verwendet (Kerr et al.,

2007; Li et al., 2006; Mrcic-Flogel et al., 2007; Ohki et al., 2006; Sumbre et al., 2008). Neben unterschiedlichen Großhirnrindenarealen konnten mittels dieser Methode weitere Hirnregionen, z.B. das Kleinhirn der Ratte oder der Riechkolben der Maus, angefärbt werden (Sullivan et al., 2005; Wachowiak et al., 2004). Darüber hinaus ist die AM-Beladung zur Untersuchung von Netzwerkaktivität in wachen Tieren verwendet worden (Dombeck et al., 2009; Greenberg et al., 2008; Komiyama et al., 2010).

Diese Methode ermöglicht *in vivo* die gleichzeitige Anfärbung von vielen Zellen in einem Bereich mit ungefähr 300-400 μm Durchmesser (Stosiek et al., 2003). Es werden die Zellkörper der Nervenzellen, die Astrozyten sowie das Neuropil, das aus dendritischen und axonalen Nervenzell-Fortsätzen besteht, angefärbt. Wie kann also das gemessene Signal interpretiert werden? Die Amplitude der Kalzium-Transienten in den Nervenzellkörpern, der somatischen Kalzium-Transienten, ist bei dieser Art der Anfärbung linear von der überschwelligeren Aktionspotential-Aktivität der Nervenzellen abhängig. Diese somatischen Kalzium-Signale reflektieren also die Anzahl der gefeuerten Aktionspotentiale, die mittels der „Cell-attached“-Konfiguration elektrisch gemessen werden können (Garaschuk et al., 2006a; Kerr et al., 2005; Rochefort et al., 2009; Smetters et al., 1999). Dies beruht auf der Tatsache, dass durch Aktionspotentiale spannungsabhängige Kalzium-Kanäle, welche sich in der Plasmamembran des Zellkörpers befinden, geöffnet werden, und es somit zu einem Kalzium-Einstrom kommt (Grienberger und Konnerth, 2012). Die Kalzium-Signale im Neuropil sind ein Summen-Signal und vor allem Ausdruck der Aktionspotentiale in den axonalen Anteilen des Neuropils, d.h. diese Signale spiegeln ebenfalls Aktionspotential-Aktivität von Nervenzellen wieder (Kerr et al., 2005). Die Kalzium-Signale, welche in Astrozyten nachgewiesen können, haben vielfältige Quellen, von denen wohl Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, vermittelt durch Inositoltrisphosphat, die wichtigste Rolle spielt (Nimmerjahn, 2009; Wang et al., 2006). Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die AM-Beladung neben der Analyse der Kalzium-Signale in Astrozyten vor allem die Messung der Aktionspotential-Aktivität einer lokalen Population von Nervenzellen erlaubt (siehe z.B. Kerr et al., 2005; Stosiek et al., 2003).

Weitere Ansätze zur Anfärbung einer größeren Zellpopulation sind die topische Applikation eines Kalzium-Indikators auf die Hirnoberfläche sowie die Elektroporation. Bei der zuerst erwähnten Methode wird der chemische Kalzium-

Indikator Fluo-4 in seiner AM-Ester-Form lokal auf die Hirnoberfläche gegeben. Diese Prozedur färbt ausschließlich Astrozyten an und erlaubt, im Gegensatz zur AM-Beladung, eine selektive Analyse der astrozytären Kalzium-Signalgebung über einen größeren räumlichen Bereich hinweg (Hirase et al., 2004; Takano et al., 2006). Eine weitere Methode, die zur Anfärbung einer lokalen Population von Nervenzellen benutzt werden kann, ist die Elektroporation (Nagayama et al., 2007). Der Kalzium-Indikator ist dafür in seiner hydrophilen, z.B. Dextran-konjugierten, Form. Es wird eine mit dem Indikator gefüllte Mikropipette, welche eine Elektrode enthält, in der gewünschten Hirnregion positioniert. Die Anfärbung von Zellen wird durch Anwendung kurzer elektrischer Pulse vermittelt (De Vry et al., 2010). Die elektrischen Pulse führen zu einer vorübergehenden Porenbildung in der Zellmembran, durch welche die Farbstoff-Moleküle in die Zelle diffundieren können. Weiterhin besitzen die elektrischen Pulse eine Ladung (positiv oder negativ), welche die ebenfalls geladenen Farbstoff-Moleküle in die Zelle „drücken“. Insgesamt führt dieser Ansatz, im Vergleich zur vorher beschriebenen AM-Beladung, zu einer geringeren Anzahl von angefärbten Zellen (Nagayama et al., 2007).

Da die Zielsetzung dieser Arbeit die Untersuchung von Kalzium-Signalen in einer ausgedehnten Population von Nervenzellen beinhaltete, war in meinem Fall die AM-Beladung die Färbemethode der Wahl. Denn sie ermöglichte, im Gegensatz zur topischen Applikation oder der Elektroporation von Kalzium-Indikator-Molekülen, eine dichte Anfärbung einer großen Anzahl an Nervenzellen in einem Bereich von mehreren hundert Mikrometern.

1.2.3 Systeme zur Detektion der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz *in vivo*

Es werden im folgenden Abschnitt zwei unterschiedliche Methoden dargestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion von Kalzium-abhängiger Fluoreszenz verwendet wurden. Dies sind die Zwei-Photonen-Mikroskopie sowie Lichtleiter-basierte Detektionssysteme. Besondere Betonung soll dabei auf deren Anwendung *in vivo* gelegt werden.

1.2.3.1 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Das Gehirn ist ein hoch streuendes Medium. Dies führt bei Benutzung jeglicher Mikroskopie-Technik mit zunehmender Aufnahmetiefe zu einem Verlust an Auflösungsvermögen und Kontrast. Diese Eigenschaft kann mittels der „Streuungslänge“ quantifiziert werden. Dieser Begriff bezeichnet die Distanz, über welche die Lichtintensität durch Lichtstreuung um den Faktor e^{-1} reduziert wird. In Hirngewebe ist diese für Wellenlängen im sichtbaren Bereich ungefähr 25-100 μm (Yaroslavsky et al., 2002).

Vor allem in der Ein-Photonen-Mikroskopie sind deswegen die Möglichkeiten zur Darstellung tieferer Hirnstrukturen erheblich eingeschränkt (Denk und Svoboda, 1997). Ein weiterer Nachteil der Ein-Photonen-Mikroskopie besteht aus der steten Illumination des Bereiches ober- und unterhalb der Fokusebene innerhalb des vorher bereits erwähnten Anregungskegels (Lichtman und Conchello, 2005). Diese kontinuierliche Beleuchtung ist die Ursache für ein Ausbleichen des Farbstoffes, Phototoxizität und für eine direkte thermische Schädigung des Gewebes (Fine, 2005). Phototoxizität bezeichnet dabei den Prozess, bei dem der Fluorophor nach Lichtabsorption toxische Substanzen, beispielsweise Sauerstoffradikale, freisetzt, welche dann das Hirngewebe schädigen können (Fischer et al., 2011; Stephens und Allan, 2003). *In vivo* lässt sich außerdem bei Benutzung der Ein-Photonen-Mikroskopie eine optische Schnittbildung, d.h. eine Zuordnung der Fluoreszenz zu einer bestimmten Fokusebene, nur mit Hilfe einer Lochblende, wie sie im Rahmen der konfokalen Laser-Fluoreszenzmikroskopie benutzt wird, erreichen (Conchello und Lichtman, 2005). Durch den Einbau einer Lochblende in den Strahlenweg wird alle Fluoreszenz, die ober- oder unterhalb der Fokusebene entsteht, verworfen (Fine, 2005). Zusätzlich werden diejenigen Photonen, welche zwar in der Fokusebene entstanden sind, aber auf ihrem Weg von ihrem Entstehungsort zum Detektor gestreut werden, nicht verwertet. Schätzungen nach werden in der konfokalen Mikroskopie, beispielsweise bei Untersuchung eines Hirnschnittes von mehreren 100 μm Dicke, ungefähr 99 % der Fluoreszenz nicht genutzt (Denk, 2005). In der praktischen Anwendung sind also Messungen an Nervenzellen mit konfokaler Mikroskopie im intakten Gehirn nur schwer möglich und auf den oberflächlichsten Teil des Gehirnes beschränkt.

Deswegen war die Zwei-Photonen-Mikroskopie, entwickelt von Winfried Denk und Kollegen (Denk et al., 1990), ein Meilenstein für die Neurowissenschaft. Diese Technik ist, wie die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, eine Laser-basierte Methode, bei der durch das Punkt-für-Punkt-Abstrahieren des Gewebes („Scannen“) mittels eines durch ein Objektiv fokussierten Laserstrahls die Fluoreszenzmoleküle angeregt werden. Bei dieser Form der Mikroskopie entsteht Fluoreszenz beinahe ausschließlich im Bereich hoher Energiedichte, dem Fokuspunkt. Nur dort ist die Dichte der Photonen hoch genug, um den Fluorophor durch exaktes örtliches und zeitliches Zusammentreffen zweier Photonen anzuregen. Genau genommen handelt es sich dabei nicht um einen Fokuspunkt, sondern um ein Fokusbild, das auf ungefähr 1 fl geschätzt werden kann (Denk, 2005). Die dafür notwendige außerordentlich hohe Photonendichte wurde erst durch die Entwicklung von gepulsten Lasern möglich, welche ultra-kurze, ungefähr 100 fs-lange, energiereiche Pulse erzeugen (Zipfel et al., 2003). Die Zwei-Photonen-Mikroskopie löst das Problem der Darstellung tieferer Hirnstrukturen auf zwei Arten (Svoboda und Yasuda, 2006). Einerseits erlaubt die hoch lokale Anregung eine effiziente Detektion der Fluoreszenz, da alle, auch die gestreuten, Fluoreszenz-Photonen einem Entstehungsort zugewiesen werden können. Andererseits hat das Anregungslicht einer längeren Wellenlänge, wie es typischerweise in der Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet wird (typischerweise zwischen 700 und 1000 nm), eine höhere mögliche Eindringtiefe. Im Vergleich zu Licht kürzerer Wellenlänge wird es weniger durch das Hirngewebe absorbiert und gestreut. So ist die Streuung S umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge:

$$S \sim \frac{1}{\lambda^4}$$

Aufgrund der eben erwähnten Eigenschaften konnten im Gehirn mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie strukturelle und funktionelle Aufnahmen mit Einzelzellauflösung in bis zu 1 mm Tiefe durchgeführt werden (Mittmann et al., 2011; Theer et al., 2003). Die zeitliche Auflösungsfähigkeit der Zwei-Photonen-Mikroskopie wird durch das Scannen der Fokusebene festgelegt, welches mit Hilfe von galvanometrischen Spiegeln, Resonanzspiegeln („Resonanzscanner“) oder

akustooptischen Deflektoren durchgeführt werden kann (Fan et al., 1999; Lechleiter et al., 2002; Nguyen et al., 2001; Otsu et al., 2008).

Die Einführung der Zwei-Photonen-Mikroskopie leistete einen essentiellen Beitrag für die Erforschung des intakten Gehirns. Denn sie ermöglichte funktionelle Untersuchungen des Dendritenbaumes in kortikalen Pyramidenzellen anästhesierter Mäuse *in vivo* (siehe z.B. Chen et al., 2011; Helmchen et al., 1999; Jia et al., 2010; Svoboda et al., 1999), erleichterte beträchtlich durch die Technik des „Schattenpatchens“ elektrophysiologische Messungen im intakten Gehirn (Kitamura et al., 2008) und erlaubte durch die gleichzeitige Aufnahme der Aktivität vieler Nervenzellen die Analyse neuronaler Netzwerke auf Einzelzellebene (siehe z.B. Dombeck et al., 2010; Li et al., 2012; Rochefort et al., 2011b). Ebenfalls gestattete diese Methode die Forschung an pathologischen Vorgängen, wie Tumoren (Wessels et al., 2007) oder der Alzheimer'schen Erkrankung (Busche et al., 2008; Grienberger et al., 2012b; Kuchibhotla et al., 2008).

1.2.3.2 Lichtleiter-basierte Detektionssysteme

Glasfasern wurden vor mehr als 40 Jahren entwickelt. In der Neurowissenschaft erlangten sie in den 1990er Jahren Bedeutung, als erste Studien Bündel von Glasfasern benutzten, um intrinsische Signale im Hippokampus und Kortex von Katzen zu untersuchen (Poe et al., 1996; Rector und Harper, 1991; Rector et al., 1993). Die damit erzeugten Bilder hatten eine niedrige Auflösung und niedrigen Kontrast. Dennoch wurde die Idee, Glasfasern zur Untersuchung des Gehirns zu verwenden, weiter verfolgt (z.B. Adelsberger et al., 2005; Ferezou et al., 2006; Yamaguchi et al., 2001). Inzwischen sind die Anwendungsmöglichkeiten von Glasfaser-basierten Systemen in der Neurowissenschaft vielfältig (Flusberg et al., 2005). Sie ermöglichen zum einen in der Grundlagenforschung Zugang zu tiefen Hirnarealen, die mittels Lichtmikroskopie nicht leicht erreichbar sind (z.B. LeChasseur et al., 2011). Aufgrund ihrer ausgesprochenen Flexibilität sind sich auch in wachen Tieren anwendbar (z.B. Murayama et al., 2009). Dies eröffnet die Möglichkeit, die Aktivierung bestimmter Hirnareale direkt mit Verhaltensbeobachtungen zu korrelieren. Weiterhin ist es möglich, Glasfasern chronisch über einen längeren Zeitraum zu implantieren und so Langzeitstudien

durchzuführen (z.B. Barretto et al., 2011). Glasfasern können auch als reine Lichtleiter zwischen zwei voneinander entfernten Stellen innerhalb eines Lichtmikroskops dienen (Bird und Gu, 2002b; Delaney et al., 1993; Tai et al., 2004). So können Lichtquellen oder Detektoren räumlich vom eigentlichen Mikroskop getrennt sein. Außerdem sind Lichtleiter Bestandteil von miniaturisierten Mikroskopen, welche Messungen in sich bewegenden Versuchstieren erlauben (Helmchen et al., 2001; Sawinski et al., 2009). Ganz besonders wichtig im Rahmen der klinischen Anwendung beim Menschen sind Glasfasern schließlich für die Entwicklung von minimal-invasiven diagnostischen und therapeutischen Ansätzen (z.B. Kiesslich et al., 2004).

1.2.3.2.1 Die totale interne Reflexion

Die Glasfasertechnologie beruht auf der totalen internen Reflexion. Grundsätzlich wird Licht beim Übergang aus einem Medium mit höheren Brechungsindex n_1 in ein Medium mit einem niedrigeren Brechungsindex n_2 gebrochen (Abb. 3, schwarz) (Saleh und Teich, 2007b). Dabei ist der Brechungswinkel θ_2 stets größer als der Einfallswinkel θ_1 und hängt darüber hinaus von den Brechungsindices n_1 und n_2 ab. Diese Abhängigkeit wird durch das Snelliussche Brechungsgesetz beschrieben:

$$n_1 \cdot \sin \Theta_1 = n_2 \cdot \sin \Theta_2$$

Steigt θ_1 immer weiter an, nimmt θ_2 irgendwann den Wert 90° an (Abb. 3, rot). Dieser Winkel θ_1 , an dem dieser Fall eintritt, wird kritischer Winkel θ_k genannt.

$$\theta_k = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1}$$

Die totale interne Reflexion tritt dann auf, wenn der Einfallswinkel θ_1 größer als der kritische Winkel θ_k ist (Abb. 3, grün). Falls nämlich diese Bedingung erfüllt ist,

kann das Snelliussche Gesetz nicht mehr gelöst werden und es tritt keine Brechung auf. Stattdessen wird der Lichtstrahl an der Grenzzone zwischen den beiden Medien reflektiert. Die totale interne Reflexion ist ein Prozess mit kaum Energieverlust und kann deswegen verwendet werden, um Licht über lange Strecken zu transportieren (Saleh und Teich, 2007b).

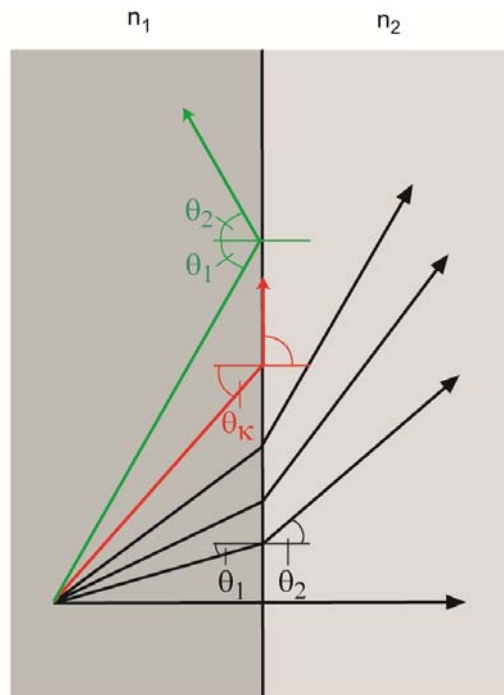


Abb. 3: Schematische Darstellung der totalen internen Reflexion.

(modifiziert nach Saleh und Teich, 2007b)

1.2.3.2.2 Die Glasfaser

Eine Glasfaser ist ein zylindrischer Lichtleiter, deren Durchmesser zwischen einigen Mikrometern und einigen Millimetern betragen kann (Flusberg et al., 2005). Sie besteht prinzipiell aus dem zentralen Licht-führenden Kern und dem Mantel (*engl. cladding*). Kern und Mantel sind darüber hinaus noch von weiteren Schutzschichten (*engl. coating*) umgeben, da die Unversehrtheit der Mantelschicht essentiell für die Funktionalität der Glasfaser als Lichtleiter ist. Als Voraussetzung für das Auftreten der totalen internen Reflexion muss der Brechungsindex des Kernmaterials größer sein als der des Mantels. Falls dann die im vorhergehenden Abschnitt diskutierte

Bedingung $\theta_1 > \theta_k$ erfüllt ist, erfahren Lichtstrahlen, die unter dem Winkel θ_1 auf die Übergangzone zwischen Kern und Mantel auftreffen, totale interne Reflexion. Demzufolge kann das Licht die Glasfaser nicht verlassen und wird im Kern weiter geführt. Glasfasern können durch den Akzeptanzwinkel θ_A und die Numerische Apertur (NA) charakterisiert werden (Saleh und Teich, 2007a). Der Akzeptanzwinkel beschreibt dabei den Kegel von einfallenden Strahlen, die in der Faser totale interne Reflexion erfahren, und ermöglicht somit eine Aussage über den Bereich, der ausgeleuchtet bzw. aus dem Licht eingesammelt werden kann. Die NA wird durch die Brechungsindices des Kerns bzw. des Mantels bestimmt und geht als wichtiger Parameter in die Berechnung des Akzeptanzwinkels θ_A ein.

Ganz grundsätzlich kann zwischen Stufenindex- und Gradientenindexfaser unterschieden werden (Wilt et al., 2009). Bei der Stufenindexfaser hat der Kern einen homogenen Brechungsindex und besteht aus einem Material, welches im Vergleich zum Mantel einen geringfügig höheren Brechungsindex besitzt. So besteht der Mantel beispielsweise aus synthetischem Quarzglas (SiO_2), das einen Brechungsindex von 1.44-1.46 hat. Der höhere Brechungsindex des Kerns wird dann durch Zugabe geringer Mengen eines Dotierungsmaterials, z.B. Titan oder Germanium, zum Quarzglas erreicht. Der Unterschied in den Brechungsindices zwischen Kern und Mantel ist sehr klein, die relative Brechungsindexänderung beträgt normalerweise zwischen 0.1 und 2%. Differenziert wird weiterhin innerhalb der Stufenindexfasern zwischen Ein-Moden- und Viel- (Multi-) Moden-Glasfasern (Flusberg et al., 2005). Der Begriff „Moden“ bezieht sich hierbei auf Anteile des Lichts, welche sich aufgrund der räumlichen Anordnung der elektrischen und magnetischen Feldstärke unterscheiden. Ist der Durchmesser des Glasfaserkerns klein, typischerweise in einem Bereich zwischen 4 und 7 μm , kann nur eine einzige Mode aufgenommen werden. Dies wird dann als Ein-Moden-Glasfaser bezeichnet. Im Gegensatz dazu kann der Kern einer Viel-Moden-Faser gleichzeitig zahlreiche verschiedene Moden transportieren. Besonders geeignet sind sie deswegen für das effiziente Sammeln von Fluoreszenz. Das wichtigste Einsatzgebiet der Ein-Moden-Glasfaser ist die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie, da die einzelne Lichtmode problemlos auf einen Punkt fokussiert werden kann (Bird und Gu, 2002a). In gleicher Weise wirkt die Ein-Moden-Faser als eine Art Lochblende, welche die Weiterleitung von Photonen, die außerhalb der Fokusebene erzeugt werden, verhindert. Stufenindexfasern können auch in Form von Faserbündeln angewendet werden.

Diese Bündel können aus bis zu 100000 individuellen Glasfasern bestehen, welche dicht gepackt nebeneinander angeordnet sind und insgesamt einen Durchmesser von bis zu wenigen Millimetern haben. Diese Faserbündel können dann zur Bilderzeugung genutzt werden, indem jede einzelne Glasfaser innerhalb des Faserbündels einen Bildpixel repräsentiert (Gmitro und Aziz, 1993; Hirano et al., 1996). Die Gradientenindexfaser (GRIN-Faser) ist dadurch charakterisiert, dass der Brechungsindex im Kern nicht wie im Fall der Stufenindexfaser einheitlich ist, sondern quadratisch mit dem Abstand von der zentralen Achse abnimmt (Flusberg et al., 2005). Anders als in konventionellen Stufenindexfasern, bewegen sich die verschiedenen Licht-Moden in GRIN-Fasern mit der gleichen Geschwindigkeit durch die Faser. GRIN-Fasern können also, in Abhängigkeit von ihrer Länge, als Linse verwendet werden (Jung und Schnitzer, 2003). Für spezifische Anwendungen wurden inzwischen besonders angepasste Faserarten entwickelt. So wurde beispielsweise für die verlässliche Übertragung der ultrakurzen energiereichen Lichtpulse, wie sie in der Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet werden, die „hollow-core photonic crystal“ - Faser entwickelt, die aus einem licht-transportierenden Kern aus Luft und einer Mantelschicht aus Quarzglas mit periodisch angeordneten Luftlöchern besteht (Göbel et al., 2004; Knight, 2003). Die Verwendung dieser Faser-Art verringert substantiell chromatische Dispersion und nicht-lineare Effekte, die bei Verwendung einer konventionellen Ein-Moden-Stufenindexfaser zu einer Laserpulsverbreiterung und damit zu einer ineffizienteren Fluoreszenzanregung führen.

1.2.3.2.3 Neurowissenschaftliche Anwendungen der Glasfasertechnologie *in vivo*

Glasfasern haben inzwischen vielfältige Einsatzgebiete innerhalb der Neurowissenschaft. Diese umfassen neben der aktiven Beeinflussung der Hirnaktivität (z.B. English et al., 2012; Liu et al., 2012) die Untersuchung struktureller Veränderungen (z.B. Barretto et al., 2009; Llewellyn et al., 2008) und die funktionelle Messung von Hirnaktivität mittels Kalzium-sensitiver Fluoreszenz-Farbstoffe (z.B. Adelsberger et al., 2005; LeChasseur et al., 2011).

Glasfasern können also zur aktiven Beeinflussung von Hirnaktivität verwendet werden. So konnte beispielsweise die Frage untersucht werden, wie Nervenzellarten innerhalb eines oder mehrerer Hirnareale miteinander verbunden sind (Zhang et al., 2007). Möglich wurde dies durch die Entwicklung von Proteinen, die mittels Licht in ihrer Funktion beeinflusst werden können (Yizhar et al., 2011a). Solche Proteine sind beispielsweise Ionenkanäle, welche lichtabhängig das Membranpotential einer Nervenzelle verändern können (Boyden et al., 2005; Lima und Miesenböck, 2005; Szobota et al., 2007). Diese Proteine können mittels molekularbiologischer Techniken, oft in Kombination mit viraler Transduktion, in einem bestimmten Zelltyp exprimiert werden (Davidson und Breakefield, 2003; Luo et al., 2008; Miyoshi und Fishell, 2006). Das wohl prominenteste Beispiel ist der Kationen-selektive Ionenkanal Channelrhodopsin-2, der sich bei Lichtstimulation öffnet, somit Nervenzellen depolarisiert und dadurch deren Aktivität steigert (Nagel et al., 2003; Petreanu et al., 2007). Um das Stimulations-Licht in das gewünschte Hirnareal zu leiten, sind Glasfasern ein sehr geeignetes Mittel (Aravanis et al., 2007). So können sie leicht an eine Lichtquelle gekoppelt und dazu verwendet werden, in oberflächlichen oder tiefen Hirnregionen Aktivität zu beeinflussen (siehe z.B. Tan et al., 2012). Durch ihre Flexibilität sind sie darüber hinaus auch in wachen Tieren verwendbar (Goshen et al., 2011).

Zur Untersuchung struktureller Veränderungen sind vor allem zwei Glasfaserbasierte Techniken geeignet. Zum einen ist dies die Gradientenindexfaser in ihrer Anwendung als Gradientenindex-Linse (GRIN-Linse) (Mehta et al., 2004). Typischerweise 1-3 GRIN-Linsen, welche einen Durchmesser von 350 μm bis zu 1 mm haben, können zu einem „Mikroendoskop“ verbunden werden (Jung und Schnitzer, 2003). Dies wird in einem Lichtmikroskop direkt nach dem Objektiv in den Lichtweg eingebracht und dient dort als dessen Verlängerung (Jung et al., 2004). Da Mikroendoskope im Vergleich zu üblicherweise verwendeten Objektiven dünner sind, können sie unter geringerer Gewebeschädigung im Hirngewebe positioniert und somit zur bildgebenden Untersuchung tieferer Hirnstrukturen verwendet werden (Barretto et al., 2011). Allerdings sind sie immer noch dicker als Elektroden für elektrische Messungen, so dass ein kritischer Punkt in ihrer Anwendung die Entwicklung von geeigneten Positionierungsmethoden ist. Derartige Ansätze wurden beispielsweise benutzt, um Nervenzellen der kortikalen Schicht 5 oder des Hippokampus, die mit dem einem fluoreszierenden Protein markiert waren,

darzustellen (Jung et al., 2004; Levene et al., 2004). Eine weitere Anwendung war die Messung des kapillaren Blutflusses in der Hörschnecke (Monfared et al., 2006). Verwendet wurden sie auch für die wiederholte Untersuchung von pathologischen Vorgängen im Gehirn. So entwickelten Barretto und Kollegen (2011) eine Präparation, um im Hippokampus wiederholt dynamische Strukturänderungen von Blutgefäßen im Bereich von Gliomen zu untersuchen. Ein wichtiger Nachteil der GRIN-Linsen, vor allem, wenn allein verwendet, ist, dass sie aufgrund von optischer Aberrationen und ihrer niedrigen NA eine relativ schlechte räumliche Auflösungsfähigkeit besitzen. Diese kann jedoch durch eine Kombination mit einer passenden plano-konvexen Linse mit hoher numerischer Apertur verbessert werden (Barretto et al., 2009). Eine weitere Methode zur Bilderzeugung durch Glasfaserbasierte Systeme ist die Verwendung von Faserbündeln. So beschreiben Vincent et al. (2006) die Verwendung eines Faserbündels mit einer seitlichen Auflösungsfähigkeit von 15 μm . Die Aufnahmegeschwindigkeit in dieser Studie waren 12 Hz. Dieses System wurde dazu benutzt, um periphere Nerven zu beobachten sowie Änderungen in der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz nach hippokampaler Bicucullin-Gabe oder nach elektrischer Thalamus-Stimulation nachzuweisen.

Auch für Kalzium-Signal-Messungen mit höherer Aufnahmegeschwindigkeit (bis zu 200 Hz), allerdings ohne Bilderzeugung, kann die Glasfaser-Technologie verwendet werden. So wurde damit eine Asphyxie-bedingte Änderung der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz im Hippokampus von anästhesierten Ratten nachgewiesen (Kudo et al., 1992). Im Striatum von Ratten sowie im Putamen von Totenkopffäffchen wurden mittels einer „Optrode“ (benannt in Anlehnung an elektrische Messungen mit Elektroden) Kaliumchlorid-assoziierte Kalzium-Signale aufgenommen (Duff Davis und Schmidt, 2000). Ein besonders eleganter Ansatz ist das „Periskop“ (Murayama et al., 2007). Es besteht aus einer Glasfaser, verbunden mit einer GRIN-Linse, an deren Spitze sich ein Mikroprisma (500 x 500 μm) befindet. Das Mikroprisma wird invasiv innerhalb der Großhirnrinde positioniert und reflektiert das Anregungslicht horizontal in einem 90° Winkel zu den weitgehend parallel angeordneten apikalen Dendriten der Schicht 5 Pyramidenzellen. Mit dieser Technik konnten im somatosensorischen Kortex wacher Ratten Berührungs-evozierte Kalzium-Signale in einer großen Gruppe von apikalen Schicht 5 Dendriten gemessen werden (Murayama et al., 2009).

Adelsberger und Kollegen (2005) veröffentlichten eine Studie, in der nur eine einzelne in den Kortex implantierte Multimoden-Glasfaser verwendet wurde, um das Anregungslicht zum gefärbten Gebiet und gleichzeitig die dabei entstandene Fluoreszenz zum Detektor, in diesem Fall eine Photonenverstärkerröhre (*engl. photon multiplier tube*, PMT), zu transportieren. Diese Methode wurde mit der Druck-Injektion von Kalzium-sensitiven Farbstoffen in ihrer AM-Ester-Form kombiniert, um in nicht-anästhesierten, 3-4 Tage-alten Mäusen funktionelle Kalzium-Messungen durchzuführen. Diese Kalzium-Signale waren spezifisch in sich nicht-bewegenden Mäusen nachweisbar und verschwanden in Perioden, in denen sich die Mäuse bewegten. Somit repräsentierten sie eine neue Art der Kalzium-Signalgebung im Kortex von neugeborenen Mäusen. Diese Mikroendoskopie-Methode, verwendet in neugeborenen Mäusen (Adelsberger et al., 2005), wurde im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation weiterentwickelt und zum ersten Mal für die Netzwerkanalyse in älteren Mäusen angewendet. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde sie mit funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) kombiniert, um in erwachsenen Ratten die Beziehung zwischen dem im fMRT gemessenen, vom Blut-Sauerstoffgehalt abhängigen, Signal und der Nervenzellaktivität zu untersuchen (Schulz et al., 2012).

1.3 Sensorische Systeme der Maus

Sensorische Systeme haben die Aufgabe, Reize aus der Umwelt wahrzunehmen und diese Wahrnehmungen dann ins zentrale Nervensystem weiterzuleiten. Dort findet dann die weitere Verarbeitung in neuronalen Netzwerken statt, indem der Stimulus mit vergangenen Erfahrungen und gegenwärtigen Eindrücken aus anderen sensorischen Modalitäten zu einem Gesamtbild über die Umwelt zusammengeführt wird (Hudspeth und Logothetis, 2000). Nervenzellen als integraler Teil dieser Netzwerke besitzen die Fähigkeit, spezifisch durch einen sensorischen Stimulus bzw. bestimmte Merkmale des sensorischen Stimulus aktiviert zu werden. So zeigen z.B. Nervenzellen im primären visuellen Kortex der Maus oder Ratte spezifische Antworten in Hinblick auf die Richtung und Orientierung eines sich

bewegenden Reizes (Niell und Stryker, 2008; Ohki et al., 2005). Darüber hinaus zeigt sich oft eine topographische Organisation auf den verschiedenen Ebenen eines sensorischen Systems. Besonders klar wird dies anhand des Barrel-Kortex der Maus, des Teils des primären somatosensorischen Kortex, welcher für die sensorische Repräsentation der Tastaare der Maus zuständig ist (Petersen, 2007). Dort sind die Eingänge aus dem Thalamus in der Schicht 4 in Säulen organisiert. Eine kortikale Säule als eigene anatomische Einheit empfängt dabei stets die sensorische Information eines einzelnen Tastaares.

Es ist mittlerweile klar, dass die Verarbeitung sensorischer Reize durch große neuronale Netzwerke geleistet wird (Harris et al., 2011; Kwan, 2008). Die Position eines einzelnen Neurons innerhalb eines solchen neuronalen Netzwerkes definiert dabei seine grundsätzlichen funktionellen Eigenschaften. Die Aktivität eines Neuronen-Ensembles insgesamt scheint jedoch dazu zu dienen, das Gehirn den Stimulus tatsächlich „erkennen“ zu lassen, Lernprozesse anzustoßen und eine angemessene Verhaltensreaktion auszulösen (Averbeck et al., 2006; Ohl und Scheich, 2005). Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bis heute nicht geklärt. Es ist also äußerst wichtig, neben der Einzelzellanalyse auch die Signale auf der Ebene dieser Nervenzell-Ensembles zu untersuchen, da das Verstehen beider Aktivitätsformen für das Verstehen der sensorischen Verarbeitung notwendig ist.

1.3.1 Das auditorische System der Maus

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Aktivität von Netzwerkaktivität im auditorischen Kortex der Maus. Prinzipiell ist das auditorische System der Maus ein sehr gutes Modell, um sensorische Verarbeitung im zentralen Nervensystem zu studieren. So besitzen Mäuse einige Verhaltensweisen, die ein außergewöhnlich gut funktionierendes auditorisches System voraussetzen. Beispiele sind die Antworten von Muttertieren auf die Rufe ihres Nachwuchses (Ehret, 2005) oder die spezifischen Kommunikationsrufe zwischen Männchen und Weibchen (Holy und Guo, 2005). Der Umfang der gehörten Frequenzen ist vergleichbar mit demjenigen anderer Säugetiere, die im Hochfrequenzbereich hören (z.B. Mäuse, Ratten, Fledermäuse): Frequenzen unter 1 kHz werden schlecht gehört, aber der Hörbereich erstreckt sich ungefähr bis zu einer Frequenz von 100 kHz (Reynolds et

al., 2010). Schließlich erlaubt das auditorische System in experimenteller Hinsicht die Anwendung sehr kurzer und definierter Stimuli, z.B. Töne einer spezifischen Frequenz (Harris et al., 2011).

Neuroanatomisch besteht das auditorische System der Maus aus dem peripheren Sinnesorgan, der Hörschnecke, Kerngebieten im Hirnstamm, welche vor allem für die Lokalisierung von Geräuschquellen zuständig sind, dem Colliculus inferior im Mittelhirn, dem Corpus geniculatum mediale des Thalamus und schließlich aus dem auditorischen Kortex und den höheren auditorischen Arealen (Gonzalez-Lima und Cada, 1994). Die Nervenzellen auf allen Ebenen des auditorischen Systems sind darauf spezialisiert, die Information über den zeitlichen Aufbau eines Geräusches zuverlässig und schnell weiterzuleiten (Hudspeth, 1997). Ein Geräusch aus der Umwelt trifft also auf die Ohrmuschel, gelangt dann über den Gehörgang ins Mittelohr und von dort ins Innenohr. Im Innenohr befindet sich die Hörschnecke mit den Haarzellen, welche die mechanischen Schallwellen in elektrische Signale umwandeln. Die Hörschnecke hat einen tonotopen Aufbau, d.h. die Haarzellen sind so angeordnet, dass die charakteristische Frequenz, auf die eine einzelne Haarzelle am stärksten antwortet, monoton von der Basis bis zur Spitze der Hörschnecke abfällt. An der basolateralen Seite einer Haarzelle gibt es einen synaptischen Kontakt zum achten Hirnnerv, dem Nervus cochlearis, dessen Nervenzellkörper im Ganglion spirale liegen. So gelangt die sensorische Information zum ipsilateralen Nucleus cochlearis ventralis, der ebenfalls eine tonotope Organisation besitzt. Im Hirnstamm spaltet sich die Hörbahn dann in verschiedene Anteile auf, wobei ein Teil zum ipsi- und kontralateralen Nucleus olivaris superior projiziert und ein anderer im kontralateralen Nucleus corporis trapezoidei die Held'sche Calyx formt (Oertel, 1997; Schneggenburger und Forsythe, 2006). Alle Anteile vereinigen sich schließlich wieder im ipsi- bzw. kontralateralen Colliculus inferior und erreichen das Corpus geniculatum mediale des Thalamus und schließlich den auditorischen Kortex.

Der auditorische Kortex der Maus ist in der kaudalen Hälfte des Parietallappens gelegen und besteht aus verschiedenen Anteilen, welche voneinander aufgrund anatomischer und funktioneller Untersuchungen abgegrenzt werden können (Ehret, 1997). Neben den primären Kernfeldern besteht der auditorische Kortex aus mehreren sekundären Bereichen sowie einem Feld, das auf die Verarbeitung von Ultraschallfrequenzen spezialisiert ist. Die Kernfelder, oder auch primäre Felder, die in rostro-kaudaler 2.5 mm und in dorso-ventraler Richtung 1

mm lang sind, beinhalten den eigentlichen primären auditorischen Kortex (A1) und das anteriore auditorische Feld (AAF). Basierend auf Erkenntnissen aus Maus, Ratte und Frettchen, welche in elektrophysiologischen Arbeiten (Bizley et al., 2005; Kilgard und Merzenich, 1999; Polley et al., 2007; Sally und Kelly, 1988; Stiebler et al., 1997), in Studien mit spannungsabhängigen Farbstoffen (Tsytsarev et al., 2009) oder mittels Messung intrinsisch optischer Signale (Mrsic-Flogel et al., 2006; Nelken et al., 2004) gewonnen werden konnten, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die primären Felder eine tonotope Organisation besitzen und somit Zellen, die am besten durch die Stimulation mit der gleichen oder einer ähnlichen Frequenz aktiviert werden können, nebeneinander liegen. Zwei Studien, die den primären auditorischen Kortex der Maus mit Zwei-Photonen-Kalzium-Messungen untersuchten, widersprachen dieser Sichtweise und zeigten, dass direkt benachbarte Nervenzellen eine sehr unterschiedliche Frequenzspezifität zeigen können (Bandyopadhyay et al., 2010; Rothschild et al., 2010). Interessanterweise fanden aber Rothschild und Kollegen (2010) in einer weitergehenden Analyse eine tonotope Organisation in einem räumlichen Bereich mit einem Durchmesser größer als 250 μm . Der entstandene Widerspruch ist somit wohl durch die jeweils verwendeten Methoden erklärbar. Eine Tonotopie in den primären auditorischen Feldern zeigte sich in Studien, in denen Mikroelektroden-Arrays als Aufnahmetechnik verwendet wurden, eine Technik, die Signal aus einem Bereich von bis zu 100-200 μm „aufsammelt“ und somit oft von mehreren Neuronen gleichzeitig aufnimmt (Henze et al., 2000). Dies gilt in ähnlicher Weise für die Untersuchungen mit spannungsabhängigen Farbstoffen oder mit Messung intrinsisch optischer Signale, die *in vivo* nicht die notwendige räumliche oder zeitliche Auflösungsfähigkeit, um das auf Einzelzellebene vorhandene unterschiedliche Antwortverhalten zu detektieren (Peterka et al., 2011; Zepeda et al., 2004). A1 und AAF unterscheiden sich dabei z.B. in der räumlichen Anordnung der tonotopen Felder in rostro-kaudaler Richtung (Stiebler et al., 1997).

2 Ausgangspunkt und Fragestellung

Die Aktivität von neuronalen Netzwerken ist von entscheidender Bedeutung für die verschiedensten Verarbeitungsvorgänge im Gehirn (Engel et al., 2001). So stellt die Aktivierung solcher Netzwerke einen Schlüsselmechanismus dar, um die Verarbeitung von Umweltreizen, Gedächtnisbildung und Auslösung einer Verhaltensreaktion miteinander in Verbindung zu bringen (Engel und Singer, 2001; Pesaran et al., 2002).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde nun der Frage nachgegangen, welche Bedeutung diese Form der Populationsaktivität in den Kernfeldern des auditorischen Kortex der Maus für die Verarbeitung und anschließende Weiterleitung sensorischer Information hat. Um diese Frage zu beantworten, wurde im Detail die Dynamik von spontaner und evozierter Aktivität auf Netzwerk-Ebene charakterisiert.

Im Gegensatz zu vorhergehenden Studien im auditorischen Kortex, in denen elektrophysiologische Methoden zur Anwendung kamen (siehe z.B. Bartho et al., 2009; Curto et al., 2009; Sakata und Harris, 2009), wurde hier eine Lichtleiter-basierte Mikroendoskopie-Technik zur Netzwerkanalyse verwendet. Es wurde eine Glasfaser als Lichtleiter benutzt, um nach Anfärbung mit dem Kalzium-sensitiven Fluoreszenz-Farbstoff Oregon Green BAPTA-1 Kalzium-Signale als Ausdruck einer neuronalen Netzwerkaktivierung im Gehirn von Mäusen zu detektieren. Diese Methodik erlaubte die Messung von Populations-Kalzium-Signalen *in vivo*, welche die integrierte Aktionspotential-Aktivität eines lokalen Nervenzell-Netzwerkes widerspiegeln und deswegen im folgenden Text auch als „Netzwerk-Kalzium-Transienten“ bezeichnet werden. Bis jetzt war diese Technik ausschließlich für Kalzium-Messungen im parietalen Kortex neugeborener, 3-4 Tage-alter, Mäuse verwendet worden (Adelsberger et al., 2005). Im Rahmen dieser Dissertation wurden nun zum ersten Mal Messungen spontaner und sensorisch-evozierter Netzwerk-Kalzium-Transienten im Gehirn älterer Mäuse durchgeführt und mit elektrischen Messungen sowie optogenetischer Manipulation von Hirnaktivität kombiniert.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich demnach folgende Fragestellungen:

- Sind spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten im intakten Gehirn von 1-2 Monate-alten Mäusen nachweisbar?
- Unter welchen experimentellen Bedingungen sind spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten detektierbar?
- Können sensorisch-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten im auditorischen Kortex von Mäusen detektiert werden?
- Was ist die Funktion und der Entstehungsmechanismus dieser sensorisch-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien der Technischen Universität München durchgeführt und wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Als Versuchstiere wurden Balb/c Mäuse beider Geschlechter im Alter von 25 bis zu 63 Tagen verwendet. Außerdem wurden Experimente in einer transgenen Mauslinie durchgeführt, welche Channelrhodopsin-2 (ChR2) unter der Kontrolle des Thy-1 Promotors exprimiert (Arenkiel et al., 2007). Bezugsquellen für die Tiere waren die Firma „Charles River Deutschland“ (Sulzfeld, Deutschland) sowie die institutseigene Einrichtung zur Tierzucht. Alle Mäuse wurden einem 12 Stunden-Wechsel zwischen Helligkeit und Dunkelheit ausgesetzt.

3.2 Lichtleiter-basierte Fluoreszenz-Mikroendoskopie *in vivo*

3.2.1 Vorbereitung der Glasfaser

Für die Experimente wurden in der Regel Multi-Moden-Stufenindex-Glasfasern mit einem Durchmesser von 200 μm und einer numerischen Apertur (NA) von 0.48 (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) verwendet. Die Ausnahme war eine Serie von Experimenten, in denen Multi-Moden-Stufenindex-Glasfasern mit 100 μm Durchmesser und einer NA von 0.22 (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) benutzt wurden. Der lichtführende Kern dieser Glasfasern ist, wie in der Einleitung beschrieben, von einer Mantelschicht umgeben. Diese Mantelschicht umgibt eine weitere Hüllschicht aus Silikon, die vor Beginn des Experimentes auf einer Länge von ungefähr 1-2 mm (gemessen von der Spitze der Faser) entfernt wurde. Dabei wurde besonders darauf geachtet, die Mantelschicht nicht zu verletzen. Danach wurde die Glasfaser mit der Spitze voran durch ein Metallröhrchen von ungefähr 0.9 mm Außendurchmesser und ungefähr 2 cm Länge geführt und das Röhrchen anschließend mit handelsüblichem Klebstoff (UHU, Bühl, Deutschland) derartig

befestigt, dass die freigelegte Spitze der Glasfaser das Metallröhrchen um circa 1-2 mm überragte (Abb. 4). Dieses Röhrchen sollte später dazu dienen, die Glasfaser in der stereotaktischen Halterung einzuspannen und sie vor Beginn der Messung auf dem Schädel der Maus zu befestigen. Um eine optimale optische Oberfläche an der Spitze der Faser zu erzeugen und damit eine homogene Ausleuchtung des Hirngewebes zu gewährleisten, wurde anschließend die Spitze der Glasfaser mit Hilfe eines Diamantschneiders (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) begradigt.

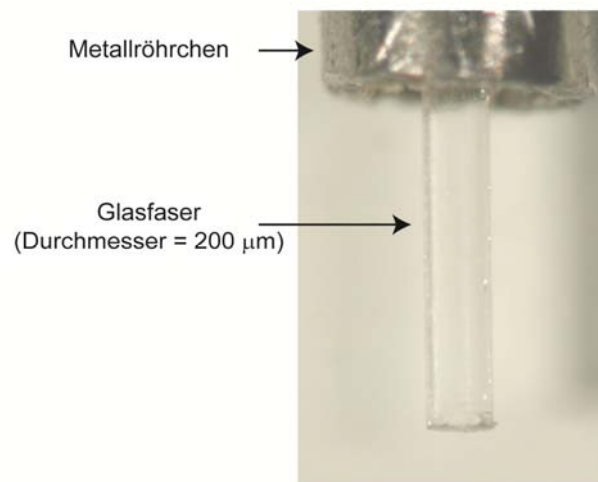


Abb. 4: Für die Messung vorbereitete Glasfaser.

3.2.2 Narkose und deren Überwachung

Alle Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt werden, wurden *in vivo* ausgeführt. Lichtleiter-basierte Messungen wurden an 62 Mäusen durchgeführt. Die Präparation für diese *in vivo* Experimente erfolgte stets unter einer Narkose mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland), das mittels eines speziell für inhalative Anästhetika zugelassenen Verdampfers (Dräger Medical, Lübeck, Deutschland) appliziert wurde. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass der Gasfluss keinerlei Geräusche erzeugte. Nach Narkoseeinleitung mit einer Isofluran-Konzentration von 1.5% (in Sauerstoff, vol/vol) in einer abgeschlossenen Kammer wurde die Maus in eine stereotaktische Halterung transferiert und dort unter

Verwendung der beiden äußeren Gehörgänge fixiert. Gelagert wurde das Tier auf eine Wärmeplatte, welche dazu diente, die Körpertemperatur konstant zu halten. Die Körpertemperatur wurde während des Experiments mittels rektaler Temperaturmessung überwacht. Als Sollwert wurde für alle Altersstufen 37.5°C festgelegt. Besonders wichtig erschien diese Kontrolle bei Jungtieren, die aufgrund ihres ungünstigen Verhältnisses von Körperoberfläche zu Körpergewicht besonders prädestiniert sind, Wärme an die Umwelt abzugeben (Flecknell, 2000). Die Narkosetiefe wurde durch die Reaktion auf Schmerzreize, insbesondere das Kneifen des Schwanzes, durch das Fehlen des Lidschlussreflexes und durch kontinuierliche Kontrolle der Herz- und der Atemfrequenz überprüft. Als Zielparameter für die Herzfrequenz wurde eine Pulsfrequenz von ungefähr 500 Schlägen pro Minute gewählt. Die Atemfrequenz bewegte sich zwischen 80 und 140 Atemzügen pro Minute. Falls Zeichen einer zu tiefen oder zu oberflächlichen Anästhesie auftraten, wurden die Konzentration des Anästhetikums entsprechend angepasst. Für die gesamte Narkoseüberwachung wurden Geräte der Firma AD Instruments (Spechbach, Deutschland) benutzt. Um einem Flüssigkeitsmangel während des Experimentes entgegen zu wirken, wurde auf 37.5°C angewärmte Ringer-Lösung (125 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Glukose) subkutan injiziert. Die Menge wurde auf 10 – 15 ml pro kg Körpergewicht festgelegt (Flecknell, 2000).

3.2.3 Präparation

Mit Hilfe des stereotaktischen Hirnatlasses für Mäuse (Paxinos und Franklin, 2001), der Positionen in Bezug auf zwei Referenzpunkte auf dem Schädel der Maus, „Bregma“ und „Lambda“, angibt, konnten die Koordinaten für die verschiedenen Hirnareale ermittelt werden. Als „Bregma“ wird der Kreuzungspunkt der Sagittal- und der Koronar-Naht bezeichnet, wohingegen der Kreuzungspunkt der Lambda- und der Sagittal-Naht „Lambda“ genannt wird. Mit Hilfe dieser Angaben und der stereotaktischen Halterung wurde zu Beginn jedes Experiments die Messposition markiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten stereotaktischen Koordinaten waren in Bezug auf Bregma für den primären visuellen Kortex 4.0 mm posterior und 2.2 mm lateral, für die Kernfelder des auditorischen Kortex 2.5 mm posterior und 4.5

mm lateral, für den Barrel-Kortex 0.1 mm posterior und 3.5 mm lateral und für den Hippokampus 2.3 mm posterior, 2 mm lateral und 1 mm ventral des Bregmas (Abb. 5).

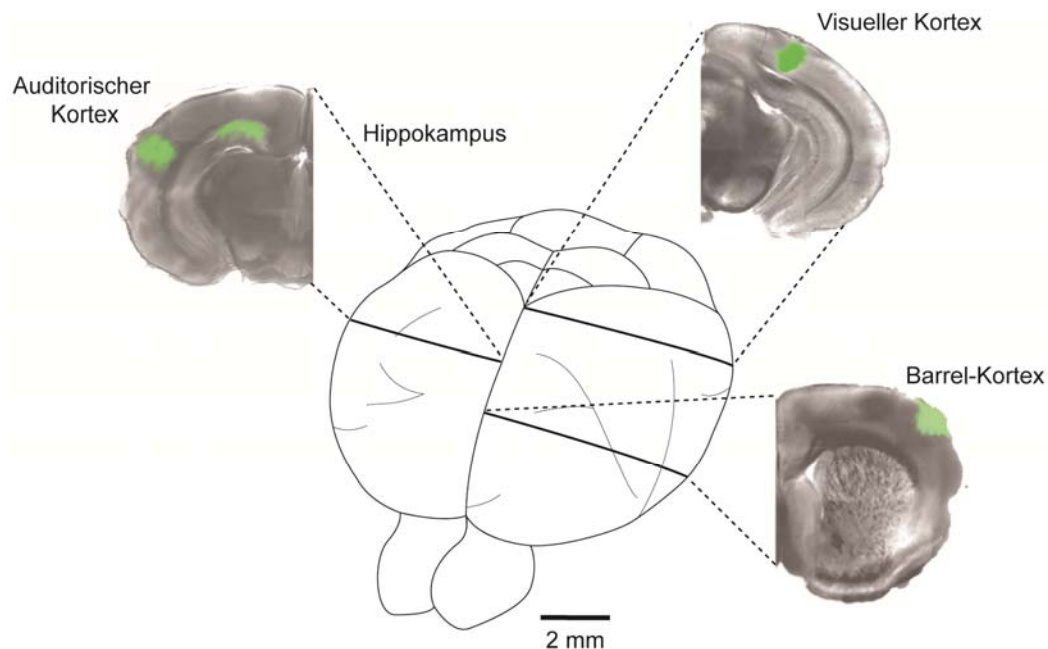


Abb. 5: Lage des Barrel-Kortex, des primären visuellen Kortex, der Kernfelder des auditorischen Kortex sowie des Hippokampus in Bezug zur tatsächlichen Position im Gehirn der Maus.

Gezeigt sind koronare Hirnschnitte, welche nach dem *In vivo*-Experiment angefertigt wurden. Als Fluoreszenz-Farbstoff diente Oregon Green BAPTA-1.

Während des Experimentes wurden die Augen der Maus durch die flächige Anwendung von Isopto-Max Creme (Alcon Pharma, Freiburg, Deutschland) vor Austrocknung und mechanischer Schädigung geschützt. 10 Minuten nach subkutaner Injektion eines Lokalanästhetikums (50 μ l Xylocain 2%, Astra Zeneca, Wedel, Deutschland) wurden der Skalp und in Abhängigkeit von Versuchstier-Alter und Ort der später durchgeführten Messung auch Muskeln reseziert. Vor allem für Messungen im auditorischen Kortex war die Entfernung der darüber liegenden Muskulatur erforderlich. Nach sorgfältigem Trocknen des Schädelknochens wurde dieser behandelt, um eine Fixierung der Glasfaser zu ermöglichen. Benutzt wurde

dafür in der zahnmedizinisch-klinischen Routine verwendetes Material. Zunächst wurde für 15 Sekunden 37%ige Phosphorsäure (Total Etch, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) auf den Schädelknochen aufgebracht. Nach Entfernung der Säure mittels destillierten Wassers wurde der Knochen erneut mit Druckluft getrocknet und anschließend mit einer Mischung von Dentisive I und II (1/1, vol/vol) (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) behandelt. Nach 30 Sekunden wurde ein Adhäsiv (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) aufgebracht und mit UV-Licht für 20 Sekunden gehärtet (UV-Lampe, Megalux, Mega-Physik Dental, Rastatt, Deutschland). Nach dieser vorbereitenden Prozedur wurde der Schädelknochen mit einem Bohrer, der ebenfalls in der zahnmedizinischen Routine verwendet wird (Master C2, Schick Dentalgeräte, Schemmerhofen, Deutschland), dünner gemacht und anschließend eine Injektionskanüle verwendet, um eine Öffnung in die Schädelkalotte zu schneiden und somit die Großhirnrinde freizulegen. Diese Prozedur wurde unter visueller Kontrolle mittels eines Dissektionsmikroskops durchgeführt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, die Hirnoberfläche nicht zu verletzen und, wenn möglich, die Dura Mater, die äußerste Hirnhaut, intakt zu lassen.

3.2.4 Färbung und Implantation des Lichtleiters

Zur Anfärbung wurde der Kalzium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green BAPTA-1 AM verwendet (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Für die Farbstoff-Injektion ins Gehirn *in vivo* wurde die Acetoxymethylester-Beladung (AM-Beladung) (Garaschuk et al., 2006b; Stosiek et al., 2003) abgewandelt, um diese den speziellen Anforderungen der Lichtleiter-Technik anzupassen. Die AM-Beladung beruht darauf, dass die aufgrund von Ester-Resten lipophilen Farbstoff-Moleküle, die in den Extrazellulärraum gespritzt werden, die Plasmamembran der Hirnzellen durchdringen und in die Zellen gelangen können (Tsien, 1981). Innerhalb der Zellen werden die Ester-Reste dann durch intrazelluläre Enzyme, den Esterasen, abgespalten. Somit verbleiben die nunmehr hydrophilen Farbstoff-Moleküle in den Zellen und können für Kalzium-Messungen verwendet werden. Wichtig ist zu betonen, dass diese Methode die gleichzeitige Anfärbung vieler Zellen, und zwar sowohl der Nervenzellen als auch der Astrozyten, im Gehirn erlaubt (siehe Ergebnisse und z.B. Kerr et al., 2005).

Um den Kalzium-Indikator Oregon Green BAPTA-1 AM in Vorbereitung auf die Farbstoffinjektion zu lösen, wurde dieser zunächst in dem als Detergenz eingesetzten 20%igen Pluronic F-127, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO, z.B. 2 g Pluronic F-127 in 10 ml DMSO; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), angesetzt. Diese Lösung hatte eine Konzentration von 10 mM und wurde anschließend in einem Verhältnis von 1 zu 10 in extrazellulärer Pufferlösung (150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM HEPES) verdünnt, was zu einer endgültigen Konzentration des Farbstoffes von 1 mM führte. Vor Injektion wurde die Färbelösung noch mit Hilfe eines Filters mit einem Porendurchmesser von 0.45 μm (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) gefiltert. Um den Farbstoff zu applizieren, wurden reguläre Glas-Patch-Pipetten verwendet. Um diese herzustellen, wurden Borosilikat-Glaskapillaren (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) durch ein Kapillarziehgerät (PP830, Narishige, Japan) in die Pipetten-Form (Widerstand von 2.5 - 3 $\text{M}\Omega$) gezogen. 5 μl des vorbereiteten Farbstoffes wurden in die Injektionspipette gefüllt, welche anschließend mit Hilfe der stereotaktischen Halterung positioniert und in das Gehirn eingeführt wurde (Abb. 6). Bei Bedarf erfolgte dies unter Verwendung eines Winkels. So wurde zur Färbung des auditorischen Kortex ein Winkel von 60° relativ zur Mittellinie zwischen beiden Hemisphären verwendet. Der Farbstoff wurde dann über einen Zeitraum von 1-2 Minuten in die Hirnregion injiziert. Dazu diente ein Injektionssystem (WPI, Berlin, Deutschland), über das Druck von circa 0.5 bar appliziert wurde. Die Injektionstiefe wurde von der Hirnoberfläche aus gemessen und betrug zwischen 300 und 500 μm für die Färbung von kortikalen Regionen, für den Hippokampus wurde eine Tiefe zwischen 1.0 und 1.2 mm gewählt. Sollten zwei Hirnregionen, z.B. visueller Kortex und Hippokampus, in demselben Tier untersucht werden, wurde diese Prozedur zweimal durchgeführt.

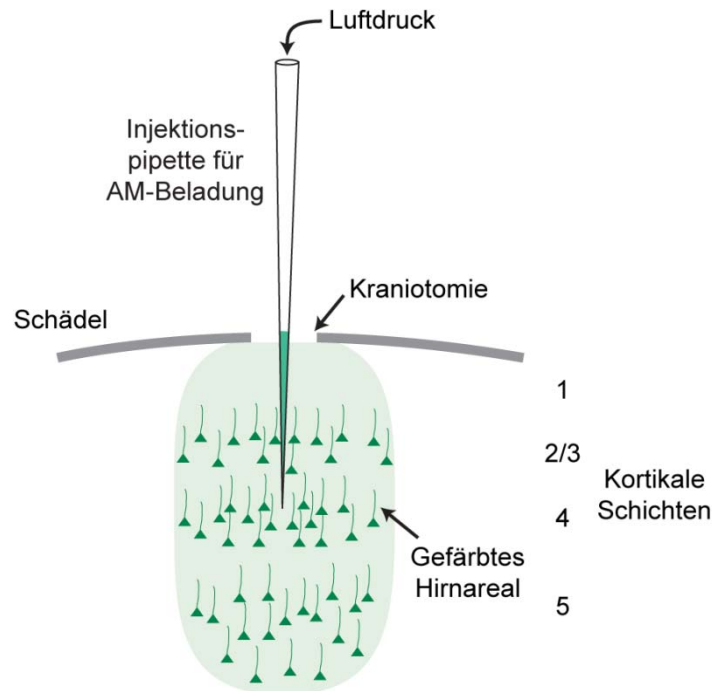


Abb. 6: AM-Beladungstechnik zur kortikalen Anfärbung.

Schematische Darstellung einer kortikalen Anfärbung. Die Injektionspipette, gefüllt mit dem Kalziumsensitiven Farbstoff Oregon Green BAPTA-1 AM, wird in den Kortex eingeführt. Der Farbstoff wird dann mittels Druck von 0.5 bar für 1-2 Minuten in die Hirnregion injiziert.

Nach ungefähr 60 Minuten - diese Zeit ist nötig, um den maximalen Fluoreszenzlevel zu erreichen (Stosiek et al., 2003) - wurde der zuvor vorbereitete Lichtleiter in die gewünschte Hirnregion implantiert (Abb. 7). Dafür wurde die Spitze der Glasfaser mit Hilfe eines Halters zunächst auf der Kortexoberfläche positioniert, dann langsam mittels eines Mikromanipulators ins Gehirn eingeführt und der Punkt der maximalen Fluoreszenz aufgesucht. Dann wurde die endgültige Implantationstiefe mit dem Ziel eines optimalen Signal-zu-Rausch-Abstandes weiter angepasst. Diese betrug für kortikale Messungen gemessen von der Kortexoberfläche zwischen 0 und 100 μm , für Messungen im Hippokampus zwischen 1.0 und 1.2 mm.

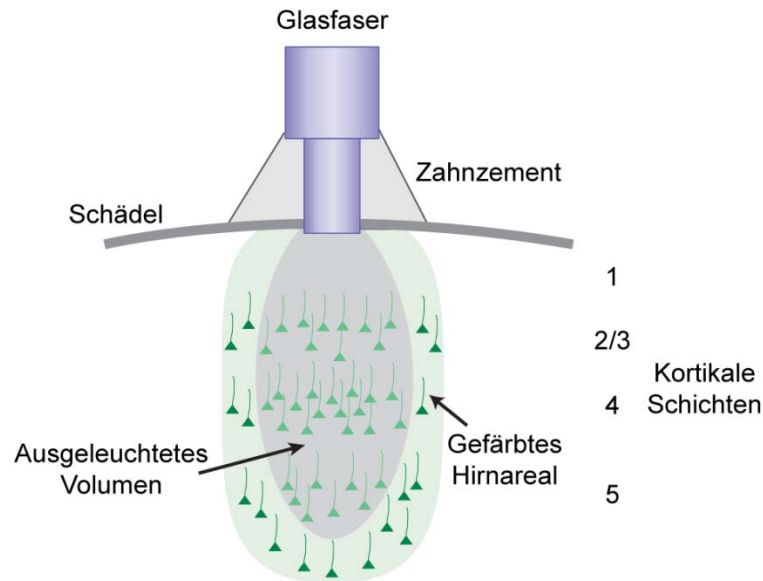


Abb. 7: Schematische Darstellung der implantierten Glasfaser am Beispiel einer kortikalen Kalzium-Messung.

Die Position der Glasfaser wird in jedem Experiment mit dem Ziel einen optimalen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses festgelegt. Die Spitze der Glasfaser befindet sich maximal 100 μm unter der Hirnoberfläche und leuchtet effektiv ein ellipsoides Volumen aus (siehe Abb. 9). Ist die optimale Position gefunden, wird die Glasfaser mit Zahnzement auf dem Schädel fixiert.

Nach Aufsuchen der bestmöglichen Position wurde die Glasfaser mit Hilfe des diese umgebenden Metallröhrchens mit Zahnzement (Charisma, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) auf der Schädeloberfläche fixiert. Danach konnte die Halterung der Glasfaser gelöst und die Messung begonnen werden. Während der Messung wurde besondere Sorgfalt auf die Kontrolle der physiologischen Parameter gelegt. Die Konzentration des Narkosegases wurde reduziert (typischerweise auf 0.8%), um dessen Einfluss auf die kortikale Aktivität zu vermindern.

3.2.5 Messung in nicht-anästhesierten Mäusen

Für die Messungen in nicht-anästhesierten Tieren wurde die Präparation auf die oben beschriebene Weise unter Isofluran-Narkose durchgeführt. Vor Beendigung der Anästhesie wurde dann zur andauernden Analgesie das Lokalanästhetikum Xylocain 2% (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland) erneut auf die Schnittflächen

aufgebracht. Die Messung wurde dann ungefähr 30 Minuten nach Ende der Isofluran-Narkose begonnen, frühestens aber wenn die Tiere starteten, ihre Umwelt zu erkunden. Die Tiere zeigten in Hinblick auf Bewegungen und Fellpflege normale Verhaltensweisen, wobei natürlich ein verbleibender Effekt des Anästhetikums nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. In diesen Experimenten war es besonders wichtig, die Fixierung der Glasfaser mit dem Zahnzement sehr sorgfältig durchzuführen. Das Fehlen einer zusätzlich notwendigen Fixierung machte es nämlich möglich, dass sich die nicht-anästhesierten Mäuse während der Messung frei in einer Box von 10 x 10 cm bewegen konnten. Der Fixierung durch den Zahnzement hatte darüber hinaus zum Ziel, Positionsänderungen der Glasfaser innerhalb des Gehirns zu verhindern. Ein solches Ereignis konnte aufgrund einer mechanischen Schädigung des Gehirngewebes verbunden mit einer Verschlechterung der Messqualität zum Abbruch des Experimentes führen.

3.2.6 Das Aufnahmesystem

Das mikroendoskopische Aufnahmesystem (Abb. 8) beinhaltete zwei Viel-Moden-Glasfasern (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA), die je nach Anwendung einzeln oder in Kombination benutzt werden konnten. Jede Glasfaser diente dabei jeweils sowohl der Anregung des Farbstoffes, als auch der Detektion der Kalzium-abhängigen Fluoreszenz in der zuvor gefärbten Hirnregion. Bei Benutzung beider Glasfasern ermöglichte das System also die simultane Messung in zwei Hirnarealen. Die in diesem System verwendeten Lichtleiter hatten einen Durchmesser von 200 μm oder 100 μm . Als Lichtquelle diente ein Festkörper-Laser (Sapphire, Coherent, Dieburg, Deutschland) mit einer maximalen Leistung von 20 mW, der monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittierte. Da diese Leistung sich als zu hoch erwies, besonders in Hinblick auf die Gefahr des Ausbleichens des Farbstoffes und der Phototoxizität, wurde im Lichtweg unmittelbar auf den Laser folgend ein erster Graufilter eingebaut. Dieser Graufilter (L41-960, Edmond Optics, Karlsruhe, Deutschland) wurde zur Anpassung der Anregungs-Lichtstärke verwendet.

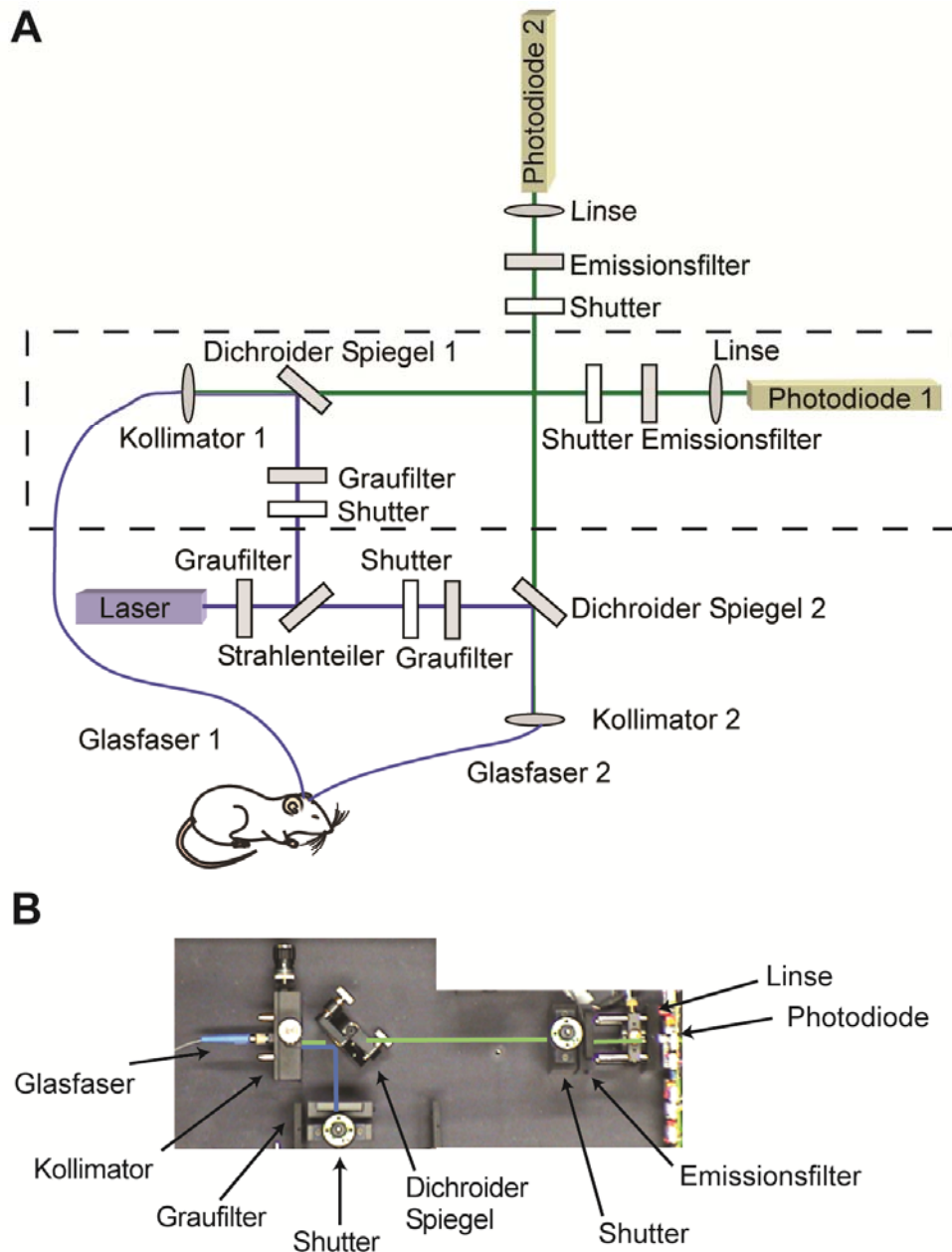


Abb. 8: Lichtleiter-basiertes Mikroendoskopie-System zur Detektion von Kalzium-abhängigen Fluoreszenzsignalen im Gehirn von Mäusen *in vivo*.

(A) Schematische Darstellung des Aufnahmesystems. Als Quelle des Anregungslichtes dient ein Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Das System beinhaltet zwei Glasfasern (Glasfaser 1 und 2), die einzeln oder in Kombination verwendet werden können. Das Anregungslicht wird deswegen durch einen Strahlenteiler in zwei unabhängige Lichtwege aufgeteilt. Besonders wichtig sind die zwei dichroiden Spiegel (Dichroider Spiegel 1 und 2), die in den beiden Lichtwegen jeweils das Anregungslicht und die Kalzium-abhängige Fluoreszenz trennen. Als Fluoreszenzdetektoren dienen zwei Avalanche-Photodioden (Photodiode 1 und 2). **(B)** Photographie mit Komponenten, aus denen der Lichtweg der Glasfaser 1 aufgebaut ist. Gezeigte Komponenten sind in (A) durch gestrichelte Linie eingefasst.

Danach traf das Licht auf einen Strahlenteiler (XF121, Omega Optical, Brattleboro, Vermont, USA), um zwei getrennte Lichtwege zu erzeugen und so die gleichzeitige Verwendung von zwei Lichtleitern zu ermöglichen. Nach dem Strahlenteiler folgte in beiden Lichtwegen jeweils ein dichroider Spiegel (505DRLP, Omega Optical, Brattleboro, Vermont, USA), der Licht einer Wellenlänge kleiner als 505 nm reflektierte, während er für Licht einer Wellenlänge größer als 505 nm durchlässig war. Einerseits reflektierte dieser Spiegel also das Anregungslichts der Wellenlänge 488 nm, welches dann durch einen Kollimator in die entsprechende Glasfaser eingekoppelt wurde, andererseits erlaubte er die Passage des von der Glasfaser ebenfalls gesammelten Fluoreszenzlichtes um eine Wellenlänge von 520 nm herum, das dann durch eine Linse auf die Detektoren, in diesem Versuchsaufbau zwei Avalanche-Photodioden (Si,S5343, Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland), fokussiert wurde. Mehrere speziell am Institut entwickelte Shutter an verschiedenen Positionen im Lichtweg ermöglichten die getrennte Steuerung von Anregungslicht und Fluoreszenzdetektion für beide Glasfasern. Die verwendete Lichtstärke, gemessen an der Spitze des Lichtleiters, betrug zwischen 0.01 – 0.1 mW.

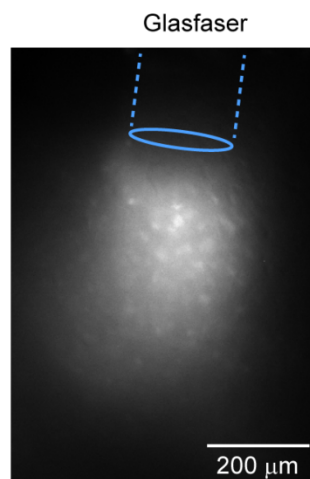


Abb. 9: Fluoreszierender Bereich, der durch eine Glasfaser (Durchmesser: 200 µm) angeregt wird.

Die Zellen wurden mittels AM-Beladung mit dem Kalzium-Indikator Oregon Green BAPTA-1 AM in einem Hirnschnitt angefärbt. Die für die Anregung verwendete Glasfaser ist parallel zum Hirnschnitt positioniert. Das Bild wurde mittels einer CCD-Kamera aufgenommen.

An dieser Stelle soll betont werden, dass diese Methode kein bildgebendes Verfahren ist. Aufgenommen wird ein integriertes Signal, das in der durch das Anregungslicht erreichten Region (Größe abhängig von der NA der Glasfaser und der Lichtstärke) aufgrund einer Änderung der freien Kalzium-Konzentration in den dort angefärbten Hirnstrukturen entsteht. Die Abbildung 9 zeigt den beleuchteten Bereich und bietet somit eine Abschätzung bezüglich der Größe des Hirnareals, von dem das Kalzium-Signal aufgenommen wird.

3.2.7 Aktivierung des Channelrhodopsins-2

In den Experimenten, in denen im Rahmen der Studie im auditorischen Kortex Channelrhodopsin-2 (ChR2, Boyden et al., 2005) angeregt wurde, wurde ein leicht abgewandeltes Aufnahmesystem verwendet. Dies ermöglichte ein äußerst schnelles Umschalten (im Millisekunden-Bereich) zwischen zwei unterschiedlichen Anregungs-Intensitäten. Dafür wurde im Lichtweg der verwendeten Glasfaser ein akustooptischer Modulator (AOM 3080-125, Crystal Technologies, Palo Alto, Kalifornien, USA) hinzugefügt. Somit konnten abwechselnd in schneller Abfolge hohe Intensitäten (ungefähr 2 mW an der Spitze der Glasfaser) zur Aktivierung des ChR2 und niedrige Intensitäten (0.01 – 0.1 mW an der Spitze der Glasfaser) zur Anregung des Kalzium-sensitiven Farbstoffes verwendet werden.

3.2.8 Datenerfassung

Die Erfassung der Spannungssignale, welche von den beiden Photodioden erzeugt wurden, erfolgte über die Spannungserfassungs-Karte NI-PCI 6221 (National Instruments, Austin, Texas, USA), die auch einen Analog-Digital-Wandler enthielt. Die Darstellung in Echtzeit auf einem Computer (DELL Inc., Round Rock, Texas, USA) und die Datenspeicherung für die spätere Analyse wurde durch ein im Institut entworfenes Computerprogramm, welches in der Programmiersprache Labview (National Instruments, Austin, Texas, USA) geschrieben ist, gewährleistet. Die Spannungsdaten wurden mit einer Aufnahmefrequenz von 200 bis zu 2000 Hz

gesammelt. Besonders für die Messungen in den primären Feldern des auditorischen Kortex erwies es sich als wichtig, mit einer hohen Frequenz von 1000 bzw. 2000 Hz aufzunehmen. Das heißt der Abstand zwischen zwei Datenpunkten betrug in diesem Fall 1 ms bzw. 0.5 ms.

3.3 Kombinierte Experimente aus Zwei-Photonen-Mikroskopie und mikroendoskopischer Detektion von Netzwerkaktivität

Diese Experimente wurden in 13 Mäusen und ausschließlich im Rahmen der Studie im auditorischen Kortex durchgeführt. In diesen Experimenten, bestehend aus Zwei-Photonen-Mikroskopie gefolgt von mikroendoskopischer Detektion von Fluoreszenzsignalen, orientierte sich die Präparation vor allem an dem Ablauf, wie er für die Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet wird (Abb. 10, siehe auch Garaschuk et al., 2006b).

Auch hier wurde die Präparation stets unter einer Narkose mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung mit einer Isofluran-Konzentration von 1.5% (vol/vol) in einer abgeschlossenen Kammer wurde die Maus auf eine regulierbare Wärmeplatte transferiert. Die Narkose-Überwachung mittels rektaler Temperaturmessung, kontinuierlicher Messung der Herz- und Atmungsfrequenz sowie regelmäßiger Überprüfung der Reaktion auf Schmerzreize war mit derjenigen vergleichbar, die für die reinen Faser-Experimente beschrieben worden ist. Während des Experimentes wurden die Augen der Maus durch die flächige Anwendung der Isopto-Max Creme (Alcon Pharma, Freiburg, Deutschland) geschützt. 10 Minuten nach subkutaner Injektion eines Lokalanästhetikums (50 µl Xylocain 2%, Astra Zeneca, Wedel, Deutschland) wurde der Skalp und die darunterliegende Muskulatur entfernt. Nach Trocknen des Schädelknochens wurde eine selbst angefertigte Aufnahmekammer mit Klebstoff (UHU Sekundenkleber, Bühl, Deutschland) auf dem Schädelknochen der Maus aufgeklebt (Abb. 10A). Diese Kammer diente in dem hier verwendeten experimentellen Aufbau der Fixierung der

Maus unter dem Objektiv, der kontinuierlichen Bedeckung des Gehirns mit auf 37.5°C vorgewärmten Ringer-Lösung (125 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20 mM Glukose, pH 7.4 bei Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂) und der Bereitstellung des Immersionsmediums für die verwendeten Wasser-Immersion-Objektive (Abb. 10B). Der Ringer-Lösung konnten auch, wenn nötig, Pharmaka zur Beeinflussung der Hirnaktivität beigefügt werden. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten, in der der Klebstoff trocknete, wurde das Tier vom Präparationsplatz unter das Zwei-Photonen-Mikroskop transferiert und dort eine Kraniotomie über dem auditorischen Kortex durchgeführt. Dann erfolgte die Anfärbung mit dem Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) mittels AM-Beladung. 60 Minuten nach der Farbstoffinjektion konnte mit den Messungen von Kalzium-Transienten unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop begonnen werden. Verwendet wurde ein Zwei-Photonen-Mikroskop, welches einen gepulsten Titan:Saphir-Laser (DeepSee, Spectra-Physics, Newport, Irvine, Kalifornien, USA) und ein Resonanzspiegel-System (8 kHz, GSI, Unterschleißheim, Deutschland) als Scan-Apparatur beinhaltet (Sanderson und Parker, 2003). Dieser Scanner war mit einem aufrechten Mikroskop (BX51WI, Olympus, Tokio, Japan) kombiniert. Als Objektive wurden zwei Wasser-Immersion-Objektive verwendet (60x Objektiv, NA 1.0 oder 40x Objektiv, NA 0.8; Nikon, Tokio, Japan). Die Fluoreszenz wurde mittels Photonenverstärkerröhren (*engl. photomultiplier tube*, PMT) gemessen. Gesamt-Gesichtsfelder einer Auflösung von 480 x 400 Pixel konnten mit diesem System mit einer Geschwindigkeit von 30 Hz aufgenommen werden. Als Aufnahme-Programm diente ein Programm, welches in der Programmiersprache Labview (Version 8.2, National Instruments, Austin, Texas, USA) geschrieben war. Für die gleichzeitige Darstellung der Astrozyten wurde Sulforhodamin 101 (SR 101) als spezifischer morphologischer Astrozyten-Marker injiziert (Nimmerjahn et al., 2004). Die Gesamtfluoreszenz wurde dann mittels eines dichroiden Spiegels bei 570 nm aufgeteilt, und die OGB-1- bzw. die SR101-Fluoreszenz in zwei unterschiedlichen PMTs detektiert.

Nach den mit Zwei-Photonen-Mikroskopie ausgeführten Kalzium-Messungen mit Einzelzellauflösung wurde an der gleichen Stelle die Glasfaser positioniert und Lichtleiter-basierte Kalzium-Messungen wie zuvor beschrieben durchgeführt.

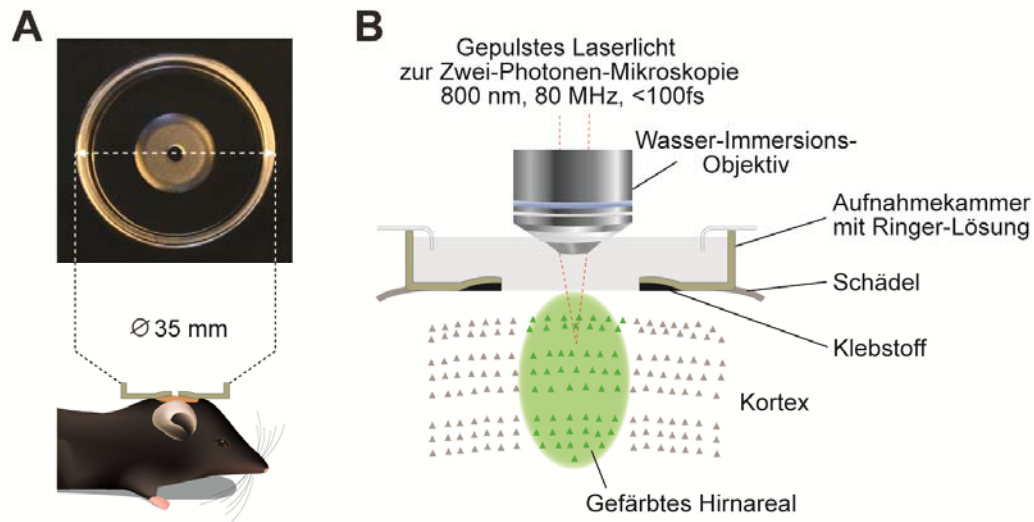


Abb. 10: Experimentelles Arrangement für die Zwei-Photonen-Mikroskopie *in vivo*.

(A) Aufnahme- und Ringer-Lösungskammer für Zwei-Photonen-Mikroskopie. Die Aufnahme- und Ringer-Lösungskammer (oben, Durchmesser 35 mm) wird mit Klebstoff auf dem Schädelknochen der Maus aufgeklebt (unten). **(B)** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. Die auf dem Schädelknochen aufgeklebte Aufnahme- und Ringer-Lösungskammer ist mit Ringer-Lösung, die das Gehirn bedeckt und kontinuierlich ausgetauscht wird, gefüllt. Nach der AM-Beladung wird ein Wasser-Immersionsobjektiv verwendet, um die Kalzium-Messung durchzuführen. (modifiziert nach Rochefort et al., 2011a)

3.4 Anwendung von pharmakologisch wirksamen Substanzen

Glutamat (100 mM) wurde in Kombination mit Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) mittels einer Glaspipette unter Sichtkontrolle in der gewünschten Hirnregion positioniert und anschließend iontophoretisch (-1nA, MVCS-C01, npi electronic, Tamm, Deutschland) lokal injiziert. Bicucullin, ein Antagonist der GABA-Typ A-Rezeptoren, wurde in einer Konzentration von 100 μ M (Sigma, Deutschland) der Ringer-Lösung, welche sich in der Aufnahme- und Ringer-Lösungskammer befand, beigelegt (Garaschuk et al., 2006b).

3.5 Elektrokortikogramm

Um die elektrische Hirnaktivität mittels Elektrokortikogramm zu messen, wurde der Schädel an zwei Stellen eröffnet. Die Position dieser Öffnungen wurde erneut in Bezug auf Bregma festgelegt (Elektrode 1: 1 mm anterior und 1 mm lateral des Bregmas; Elektrode 2: 3 mm posterior und 3 mm lateral des Bregmas). Diese experimentelle Konfiguration war so gewählt, um besonders die globale elektrische Hirnaktivität, nicht die lokale Aktivität in der Nähe der Faser-Messstelle, untersuchen zu können. Zwei Elektroden aus Silberdraht mit einem Durchmesser von 0.25 mm wurden durch diese Öffnungen epidural eingebracht und anschließend ebenfalls mit Zahnzement befestigt (Charisma, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland). Die Erdungselektrode wurde in der Nackenmuskulatur fixiert. Das Spannungssignal wurde über einen differentiellen Verstärker (EXT 10-2F, npi electronic, Tamm, Deutschland) aufgenommen, gefiltert (Hochpassfilter bei 0.1 Hz, Tiefpassfilter bei 1 kHz) und anschließend mittels der Spannungserfassungskarte NI-PCI 6221 (National Instruments, Austin, Texas, USA), welche auch für die Fluoreszenzmessung verwendet wurde, digitalisiert und für die spätere parallele Analyse zusammen mit den Daten aus den Kalzium-Messungen gespeichert.

3.6 Sensorische Stimulation

Neben der Messung spontaner Hirnaktivität wurde ebenso die Hirnaktivität nach sensorischer Stimulation untersucht. Der Beginn des Stimulus und dessen Zeitverlauf wurden zusammen mit den Fluoreszenzmessungen und, falls vorhanden, der Messung der elektrischen Aktivität gespeichert.

3.6.1 Auditorische Stimulation

Für die Tonstimulation im Rahmen der Messungen in den primären Feldern des auditorischen Kortex wurden entweder „weißes Rauschen“ (mehrere Tonfrequenzen zwischen 0 kHz und 50 kHz sind gleich stark repräsentiert) oder reine Töne einer Frequenz im Bereich von 0 kHz bis zu 50 kHz verwendet. Die Töne

wurden durch eine in der Programmiersprache LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) geschriebenes Computerprogramm erzeugt und durch eine Soundkarte (NI-PCI 6731, National Instruments) an den elektrostatischen Lautsprecher (ES1, Tucker Davis Technologies, Gainesville, Florida, USA) weitergeleitet. Dieser Lautsprecher wurde möglichst zentral im Abstand von 10 cm über dem Schädel der Maus platziert, um einen identischen Abstand zu beiden Ohren zu gewährleisten. Die Tonausgabe wurde durch das Computerprogramm gesteuert. Diese Software gestattete die Einstellung der Stimulationslautstärke, des Stimulationsintervalls, der Stimulus-Dauer und der Reihenfolge der reinen Töne. Für die reinen Töne unterschiedlicher Frequenz war nämlich eine randomisierte Abfolge nötig, um eine Gewöhnung der Nervenzellen in den Kernfeldern des auditorischen Kortex an den jeweiligen reinen Ton zu vermeiden. Die Dauer der Stimuli betrug je nach experimenteller Anforderung zwischen 50 und 100 ms und beinhaltete eine Anstiegs- und Abfallszeit von jeweils 10 ms. Die Interstimulus-Intervalle waren zwischen 1 und 10 s gewählt. Die Lautstärke betrug zwischen 40 und 70 dB SPL.

Das Ausmaß der Hintergrundgeräusche, welche im Experimentalraum vorhanden waren, wurde mittels eines Mikrophons (Microtech, Gefell, Deutschland) und eines Verstärkers (Verstärker vom Typ 2636, B&K, Karlsbad, Deutschland) gemessen. Bei hohen Frequenzen (>5 kHz) war der Level der Hintergrundgeräusche niedrig, so dass individuelle Frequenzanteile eine Lautstärke von 20 dB SPL nicht überschritten.

3.7 Datenauswertung

Die Analyse der Faser-Messungen und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit IGOR (Version 5.05A, Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) und MATLAB (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) durchgeführt. Je nach Bedarf wurden die aufgenommenen Signale gefiltert. Dafür wurde ein Gauß-Filter mit einer Tiefpassfrequenz von 50 oder 100 Hz verwendet. Die gemessene Fluoreszenz wurde stets als relative Fluoreszenzänderung $\Delta F/F = F_1(t) - F_0/F_0$ dargestellt. Dabei ist F_1 der Fluoreszenzlevel zu Zeitpunkt t und F_0 der Grundlevel der Fluoreszenz.

Transienten wurden durch einen semi-automatisierten MATLAB-Algorithmus identifiziert. Zunächst wurden ein lokales Minimum und dann das darauffolgende lokale Maximum detektiert und dieses Ereignis als „möglicher“ Transient erkannt. Für die weitere Auswertung wurden dann der Grundlevel der Fluoreszenz sowie die Amplitude und die Anstiegszeit des „möglichen“ Transienten berücksichtigt. Insgesamt konnte dadurch eine gute Übereinstimmung zwischen Transienten, die durch manuelle Inspektion bzw. den Algorithmus identifiziert wurden, erreicht werden. Nach der Identifikation der Transienten erfolgte eine detaillierte Auswertung. Die Zeit zwischen sensorischem Stimulus und Beginn des ausgelösten Kalzium-Transienten, die Latenz, wurde manuell in IGOR ausgemessen. Um die Anstiegszeit eines Transienten zu bestimmen, wurde in IGOR die Zeit bestimmt, die nötig war, um von 10% zu 90% der Gesamtamplitude zu gelangen. Außerdem wurde die Halbwertsbreite, die Dauer des Transienten bei halber Amplitude, in IGOR manuell ausgemessen. Die Abfallszeitkonstante τ schließlich wurde ebenfalls in IGOR berechnet, indem an die abfallende Flanke des Transienten eine exponentielle Funktion angelegt wurde. Diese monoexponentielle Funktion war durch folgende Beziehung definiert:

$$y = y_0 + A \exp\left(\frac{-(x - x_0)}{\tau}\right)$$

Die Abfallszeitkonstante τ kann dabei als objektives Maß zur Quantifizierung des Abfallverlaufs verwendet werden. Sie entspricht dem Zeitraum, in der der Transient von seinem höchsten Punkt kommend auf ungefähr 37% seiner Amplitude abgefallen ist.

Die Analyse der Zwei-Photonen-Mikroskopie-Messungen wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde die Bildverarbeitungssoftware Image J (Internet-Link: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) verwendet, um *regions of interest* (ROIs) zu definieren, welche sowohl das Gesamt-Blickfeld, das Neuropil und einzelne Zellen beinhalteten. Um Astrozyten und Nervenzellen zu unterscheiden, wurden zwei Kriterien angewendet: (1) Astrozyten wurden mit dem für diesen Zelltyp spezifischen Marker-Farbstoff Sulforhodamin 101 (Garaschuk et al., 2006a; Nimmerjahn et al., 2004) angefärbt und (2) Astrozyten und ihre Fortsätze waren nach AM-Beladung mit

Oregon Green BAPTA-1 AM bedeutend heller als Nervenzellen und somit deutlich als solche zu erkennen (Kerr et al., 2005). Nach der ROI-Festlegung wurde in ImageJ ein Durchschnitts-Fluoreszenzwert pro Messpunkt für jeden ROI bestimmt. In einem nächsten Schritt wurden in IGOR (Version 5.05A, Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) Kalzium-Signale detektiert. Ein Kalzium-Transient wurde als solcher akzeptiert, falls seine Amplitude dreimal größer als die Standardabweichung des Rauschens der Grundfluoreszenz war. Auch die Kalzium-Signale, gemessen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie, wurden als relative Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$ dargestellt.

Die nach Analyse entstandenen Abbildungen wurden durch Adobe Illustrator CS5 (Adobe, San Jose, Kalifornien, USA) in eine angemessene Form gebracht.

3.8 Dokumentation der Messposition nach dem Experiment

Nach dem Experiment wurde die Position der Färbung dokumentiert. Dazu wurde eine CCD Kamera (XC10, Olympus, Tokio, Japan) in Kombination mit einem Weitfeld-Mikroskop (MVX 10 Macroview, Olympus, Tokio, Japan) benutzt. Als Bilderfassungs-Software diente das Programm „cell^A“ (Olympus, Tokio, Japan). Das Hirn der Maus wurde dafür entnommen und zunächst im Ganzen fotografiert (Abb. 11, links). Dann wurden koronare bzw. sagittale Hirnschnitte von 300 μm Dicke angefertigt und diese erneut fotografiert (Abb. 11, rechts). Zur Darstellung des mit Oregon Green BAPTA-1 angefärbten Hirnareals wurde eine Quecksilberlampe (x-cite 120, EXFO, Mississauga, Kanada) mit dem entsprechenden Fluoreszein-Filtersets kombiniert.

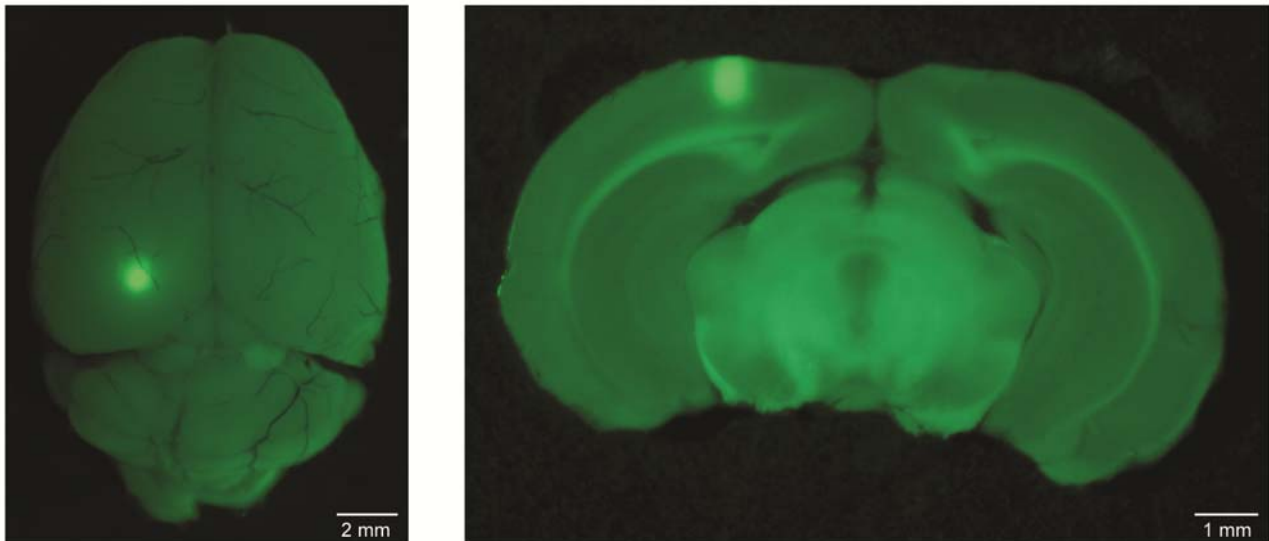


Abb. 11: Dokumentation des angefärbten Hirnareals.

Gezeigt ist hier als Beispiel eine Anfärbung des primären visuellen Kortex. Nach der Entnahme des Gehirnes wurde zunächst ein Übersichtsbild (links) angefertigt. Danach wurden Hirnschnitte hergestellt und diese zur genauen Dokumentation der Färbeposition fotografiert (rechts).

Für die Messungen im auditorischen Kortex wurden zusätzlich zur bildlichen Dokumentation der Färbeposition Kriterien eingeführt, um sicherzustellen, dass sich die Messposition tatsächlich in den Kernfeldern des auditorischen Kortex, bestehend aus dem primären auditorischen Kortex (A1) sowie dem anterioren auditorischen Feld (AAF), befand. Eine genauere Lokalisation der Messposition in A1 bzw. AAF war nämlich nicht möglich, da in diesen Experimenten jeweils nur ein Lichtleiter verwendet wurde. Dieses Vorgehen erschien nötig, da der auditorische Kortex der Maus im Vergleich zum primären visuellen Kortex oder dem Barrel-Kortex sehr klein ist (Stiebler et al., 1997).

Die folgenden physiologischen Kriterien wurden verwendet: (1) Latenz, d.h. Verzögerung, der Ton-evozierten Antworten nach dem Stimulus, (2) Verlässlichkeit dieser Antworten nach Tonstimulation mit einer Häufigkeit von $< 1/\text{Sekunde}$ sowie (3) Frequenzspezifität nach Stimulation mit reinen Tönen. Im Falle einer Messposition in den Kernfeldern des auditorischen Kortex waren die Antworten sehr frequenzspezifisch, verlässlich und wiesen kurze Latenzzeiten auf. War die Messposition hingegen außerhalb der Kernfelder des primären auditorischen Kortex gelegen, zeigten die Antworten eine geringere Frequenzspezifität, lange

Antwortlatenzen und ein geringes Maß an Verlässlichkeit, sogar für den Fall, dass die Stimulation durch lange Intervalle zwischen den einzelnen Tönen gekennzeichnet war.

Diese Kriterien wurden auf die Lichtleiter-Messungen im auditorischen Kortex angewendet und so wurden 17 Mess-Orte als innerhalb und 5 Mess-Orte als außerhalb der primären Felder des auditorischen Kortex liegend zugeordnet. 6 Messpositionen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden, da nicht ausreichend unterschiedliche Stimulationsbedingungen vorhanden waren. Die große Mehrzahl der Experimente wurde also am korrekten Ort durchgeführt. Für die Studie der Netzwerk-Kalzium-Transienten im auditorischen Kortex wurden nur die Experimente verwendet, in denen sich die Messposition eindeutig in den primären Feldern befand ($n = 17$).

4 Ergebnisse

4.1 Mikroendoskopische Kalzium-Messungen im Gehirn von Mäusen

4.1.1 Messung von Spontanaktivität in der Großhirnrinde der Maus

Spontan auftretende Netzwerk-Kalzium-Transienten als Ausdruck einer Aktivierung eines neuronalen Netzwerkes konnten in mit Isofluran anästhesierten 1-2 Monate-alten Mäusen in verschiedenen primären kortikalen Regionen gefunden werden (Abb. 12). In den Abbildungen 12A-C sind Beispiele von Aufnahmen im primären visuellen Kortex, in den Kernfeldern des auditorischen Kortex sowie im Barrel-Kortex, dem Teil des somatosensorischen Kortex, der die sensorischen Eindrücke der Tastaare der Maus verarbeitet, dargestellt. Die Frequenz dieser in den verschiedenen Hirnarealen gemessenen spontanen Transienten war nicht signifikant voneinander verschieden (Mittelwert \pm Standardfehler; visueller Kortex: 0.37 ± 0.03 Hz, auditorischer Kortex: 0.37 ± 0.04 Hz, Barrel-Kortex: 0.45 ± 0.04 Hz; jeweils $n=10$ Mäuse; Mann-Whitney-Test, Visuell-Auditorisch $p=0.974$, Auditorisch-Barrel $p=0.203$, Visuell-Barrel $p=0.089$). Die Auftretswahrscheinlichkeit dieser Kalzium-Transienten war stark von der Anästhesietiefe abhängig. Somit war es wichtig, in den Experimenten auf eine vergleichbare Anästhesietiefe zu achten.

Bezüglich ihrer morphologischen Struktur waren diese Signale ebenfalls nicht zu unterscheiden. Dies bestätigte sich nach Überlagerung von 20 konsekutiven Einzeltransienten (Abb. 12D-F, oben), welche jeweils den in A-C gezeigten Experimenten entnommen wurden, sowie nach Bildung der Mittelwerte dieser 20 Einzeltransienten (Abb. 12D-F, unten). Besonders beim Vergleich dieser drei Mittelwerte zeigt sich deutlich der ähnliche Aufbau der in drei unterschiedlichen kortikalen Regionen aufgenommenen Kalzium-Signale.

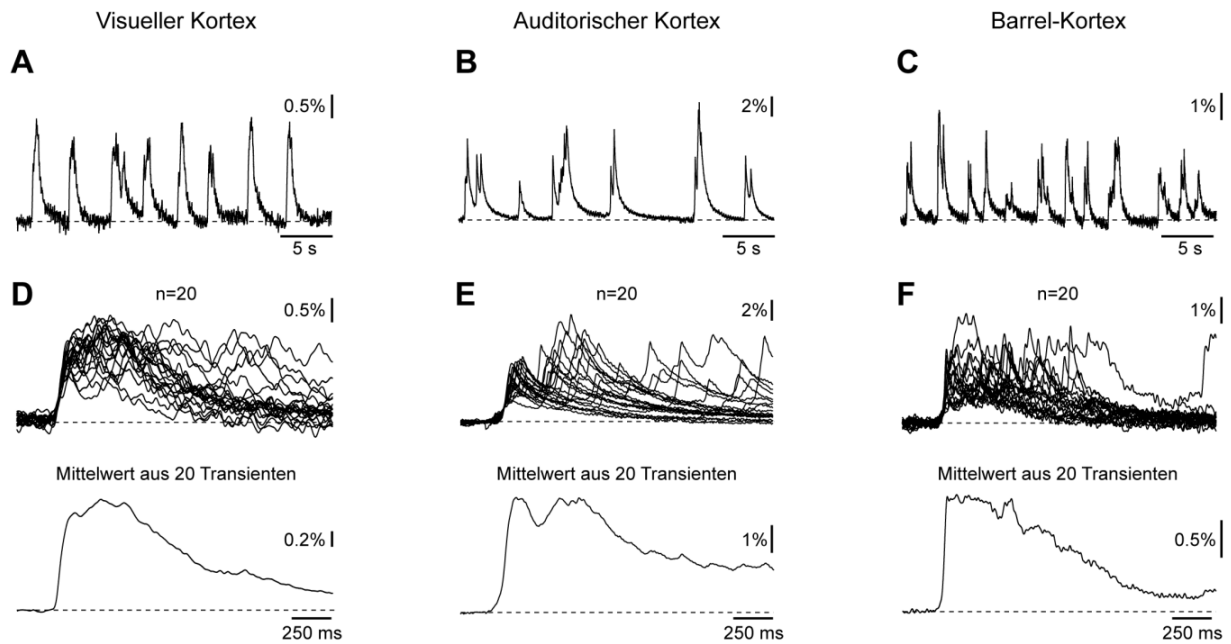


Abb. 12: Spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten in unterschiedlichen primären kortikalen Hirnregionen.

(A-C) 30 s-dauernde Lichtleiter-basierte Aufnahme von Netzwerk-Kalzium-Transienten im primären visuellen Kortex (A), in den Kernfeldern des auditorischen Kortex (B) und im Barrel-Kortex (C). (D-F) 20 Einzeltransienten (oben) und Mittelwert dieser 20 Einzeltransienten (unten), aufgenommen im primären visuellen Kortex (D), in den Kernfeldern des auditorischen Kortex (E) und im Barrel-Kortex (F). Es zeigt sich, dass die Netzwerk-Kalzium-Transienten aus diesen drei Regionen eine äußerst ähnliche Struktur besitzen.

Um diesen Augenschein zu überprüfen, wurden die Anstiegszeiten, die Halbwertsbreiten und die Abfallszeitkonstanten der spontanen Kalzium-Transienten bestimmt (Abb. 13).

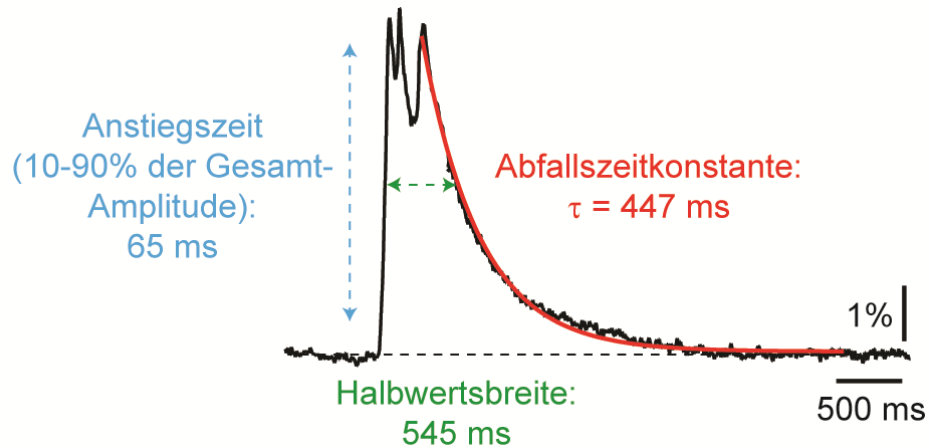


Abb. 13: Beispiel für Analyse der Anstiegszeit (blau), der Halbwertsbreite (grün) und der Abfallszeitkonstante (rot).

Anhand eines spontanen Netzwerk-Kalzium-Transients, aufgenommen im auditorischen Kortex, wird die Bestimmung dieser drei Parameter verdeutlicht.

Diese Analyse ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Es ergab sich für alle drei Messgrößen kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Großhirnrindenarealen (Visueller Kortex n=292 Kalzium-Transienten aus 13 Tieren; Auditorischer Kortex n=253 Kalzium-Transienten aus 12 Tieren; Barrel-Kortex: n=210 Kalzium-Transienten aus 10 Tieren; Mann-Whitney-Test, Anstiegszeit: Visuell-Auditorisch $p=0.535$, Auditorisch-Barrel $p=0.173$, Visuell-Barrel $p=0.454$, Halbwertsbreiten: Visuell-Auditorisch $p=0.239$, Auditorisch-Barrel $p=1.000$, Visuell-Barrel $p=0.193$, Abfallszeitkonstanten: Visuell-Auditorisch $p=0.139$, Auditorisch-Barrel $p=0.734$, Visuell-Barrel $p=0.094$).

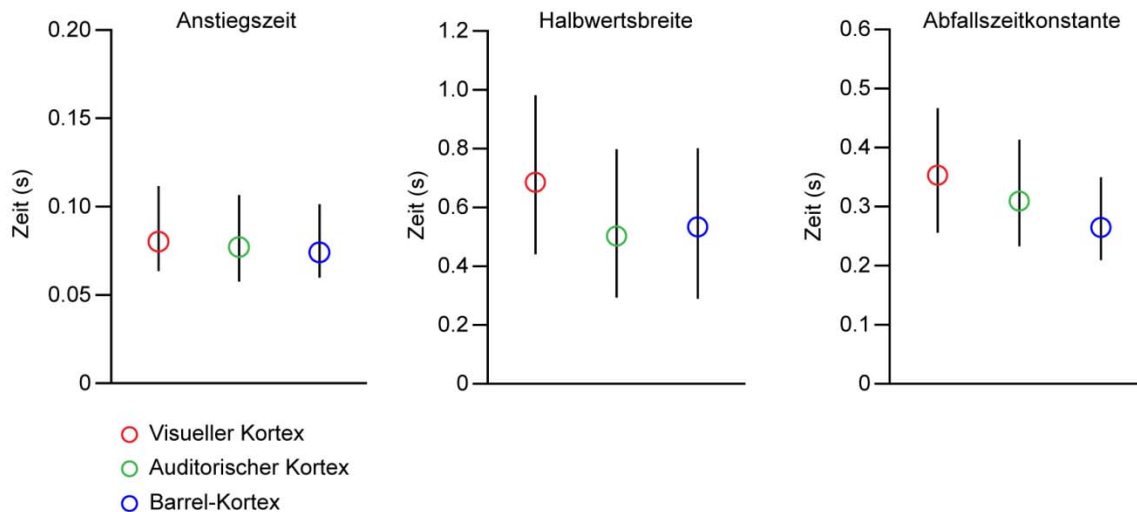


Abb. 14: Anstiegszeiten, Halbwertsbreiten und Abfallszeitkonstanten der spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten, aufgenommen im primären visuellen Kortex (rot), in den Kernfeldern des auditorischen Kortex (grün) und im Barrel-Kortex (blau).

Gezeigt sind Median (Kreise) und Interquartilsabstände (Linien, die die 25%- mit der 75%-Perzentile verbindet). (Visueller Kortex n=292 Kalzium-Transienten aus 13 Tieren, Auditorischer Kortex n=253 Kalzium-Transienten aus 12 Tieren, Barrel-Kortex: n=210 Kalzium-Transienten aus 10 Tieren; Mann-Whitney-Test, Anstiegszeit: Visuell-Auditorisch $p=0.535$, Auditorisch-Barrel $p=0.173$, Visuell-Barrel $p=0.454$, Halbwertsbreite: Visuell-Auditorisch $p=0.239$, Auditorisch-Barrel $p=1.000$, Visuell-Barrel $p=0.193$, Abfallszeitkonstante: Visuell-Auditorisch $p=0.139$, Auditorisch-Barrel $p=0.734$, Visuell-Barrel $p=0.094$).

4.1.2 Messung der hippocampalen Spontanaktivität

Ein bedeutender Vorteil der Lichtleiter-basierten Mikroendoskopie-Messungen ist deren relativ einfache Anwendbarkeit für Aufnahmen in tiefer gelegenen Hirnregionen, die für bildgebende Mikroskopie-Techniken im Moment nicht ohne Entfernung der darüber liegenden Kortexareale zugänglich sind (Helmchen und Denk, 2005; Mizrahi et al., 2004). Hier sollen als Beispiel Experimente in der CA1-Region des Hippokampus gezeigt werden (Abb. 15). Die hippocampalen Nervenzellen können, in gleicher Weise wie die Zellen in der Großhirnrinde, mittels stereotaktisch-kontrollierter Positionierung einer Glaspipette und anschließender Druck-Injektion des Kalzium-sensitiven AM-Farbstoffes angefärbt werden (Abb. 15A). Danach wird die Faser in der optimalen Tiefe, welche aufgrund des Erreichens des maximalen Fluoreszenzgrundlevel als solche identifiziert werden kann, fixiert und die

Messung kann begonnen werden. Die Abbildung 15B zeigt ein Beispiel von Kalzium-Transienten, die über einen Zeitraum von 30 s aufgenommen wurden. Weiterhin sind 20 Einzeltransienten überlagert und der Mittelwert dieser 20 konsekutiv-aufgenommenen Transienten gebildet (Abb. 15C). Es zeigt sich, dass auch im Hippokampus, wie zuvor im Kortex, Netzwerk-Kalzium-Transienten als Ausdruck der Aktivierung eines lokalen neuronalen Netzwerkes vorhanden sind. Diese treten mit einer Frequenz von 0.24 ± 0.021 Hz (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=8$ Tiere) auf. Besonders fällt darüber hinaus auf, dass sich die hippokampalen Signale in Anstiegs- und Abfallszeit von den kortikalen Signalen unterscheiden (zum Vergleich siehe die kortikalen Messungen in Abb. 12).

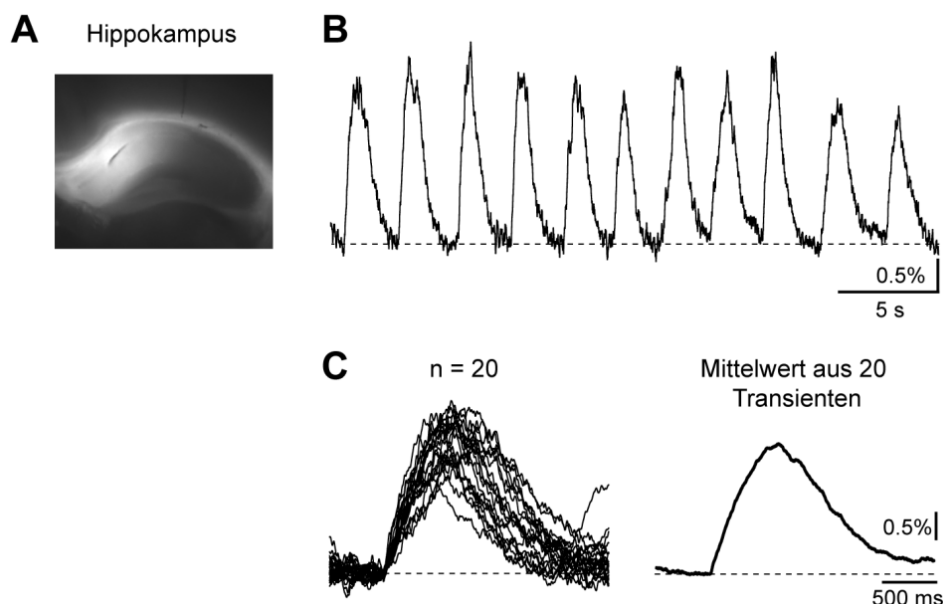


Abb. 15: Spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten in der CA1 Region des Hippokampus.

(A) Hippokampus, der *in vivo* mit dem Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green BAPTA-1 AM angefärbt wurde. Gezeigt ist ein nach dem *In vivo*-Experiment angefertigter Hirnschnitt. (B) Lichtleiter-basierte Aufnahme von spontanen Kalzium-Transienten im Hippokampus. (C) 20 Einzeltransienten (links) und Mittelwert dieser 20 Einzeltransienten (rechts).

Um diesem Phänomen näher auf die Spur zu kommen, wurden Experimente durchgeführt, in denen sich eine Glasfaser im primären visuellen Kortex und eine weitere Faser in der CA1-Region des Hippokampus befand. Aus diesen Doppelfasermessungen konnten zwei Haupterkenntnisse gewonnen werden (Abb. 16). Zum einen zeigte sich, dass sich die Kalzium-Transienten aus dem Kortex und dem

Hippokampus tatsächlich in ihrer Kinetik unterschieden (Abb. 16A-B). Die detaillierte Analyse wies eine langsamere Anstiegszeit, eine längere Halbwertsbreite und eine größere Abfallszeitkonstante nach (Abb. 16C; Visueller Kortex: n=292 Kalzium-Transienten aus 13 Tieren; n=164 Kalzium-Transienten aus 8 Tieren; Kolmogorov-Smirnov-Test, Anstiegszeit $*p<0.001$, Halbwertsbreite $*p<0.05$, Abfallszeitkonstante $*p<0.01$).

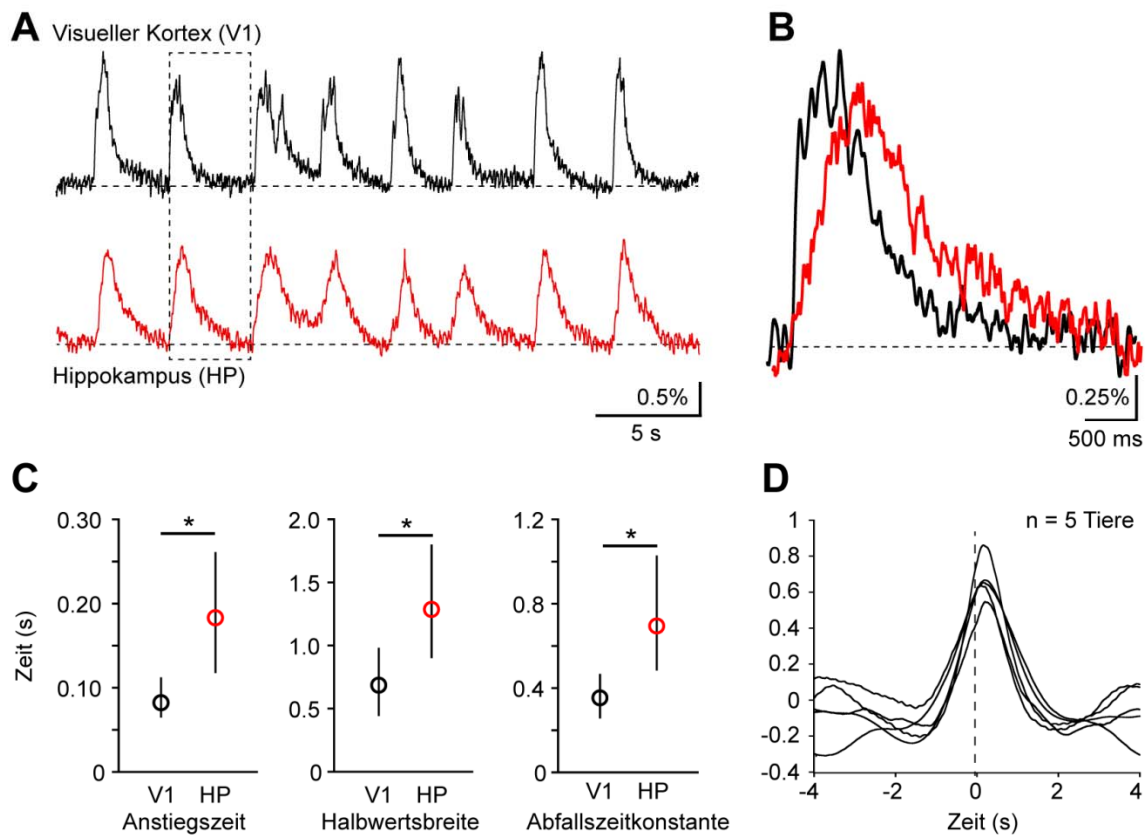


Abb. 16: Doppelfaser-Messung im primären visuellen Kortex und im Hippokampus.

(A) Lichtleiter-basierte Aufnahme von spontanen Kalzium-Transienten im primären visuellen Kortex (schwarz) und im Hippokampus (rot). **(B)** Vergrößerte Darstellung des Zeitabschnittes, der in (A) durch eine Box (gestrichelte Linie) markiert ist. **(C)** Anstiegszeiten, Halbwertsbreiten und Abfallszeitkonstanten der spontanen Kalzium-Transienten, aufgenommen im primären visuellen Kortex (schwarz) und im Hippokampus (rot). (n=118 Kalzium-Transienten aus 5 Tieren; Kolmogorov-Smirnov-Test, Anstiegszeit $*p<0.001$, Halbwertsbreite $*p<0.05$, Abfallszeitkonstante $*p<0.01$) **(D)** Korrelationsanalysen der Kalzium-Signale im primären visuellen Kortex und im Hippokampus. Es sind Graphen für 5 Versuchstiere übereinander gelegt. Die Korrelationskurven haben ein Maximum mit einer positiven Verzögerung gegenüber dem Zeitpunkt $t = 0$ s. Dies bedeutet, dass der Hippokampus dem primären visuellen Kortex mit Verzögerung folgt.

Zum anderen konnte in diesen gleichzeitigen Messungen festgestellt werden, dass die Aktivität in beiden Hirnarealen stark korreliert war. Die Korrelationsanalyse, durchgeführt in fünf Tieren, zeigt ein eindeutiges Maximum mit einer Verschiebung nach rechts im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die hippocampale Aktivität dem Kortex stets mit Verzögerung folgte (Maximum versetzt um $+0.18 \pm 0.02s$, Mittelwert \pm Standardfehler). Dies ist wohl auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Kortex die Hauptquelle für Eingänge des Hippokampus ist (Hahn et al., 2007).

4.1.3 Messungen im nicht-anästhesierten Tier

Mit dem Mikroendoskopie-System ist eine Netzwerkanalyse auch in nicht-anästhesierten Tieren möglich. Für diese Experimente wurde die Färbung und anschließende Glasfaser-Implantation unter Anästhesie durchgeführt. Dann wurde jeweils eine kurze Messung im anästhesierten Tier durchgeführt und anschließend die Isofluran-Gabe beendet. Die Messung im nicht-anästhesierten Tier wurde dann nach ungefähr 30 Minuten, frühestens aber, sobald das Tier startete, seine Umwelt zu erkunden, begonnen.

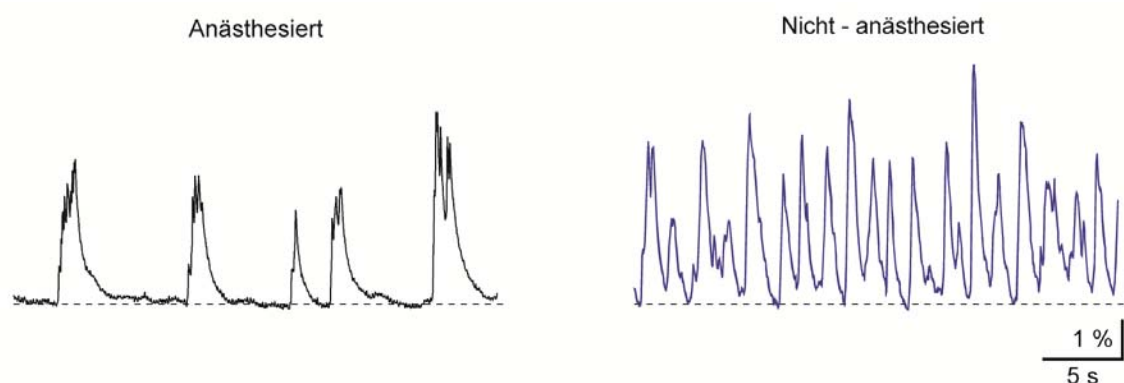


Abb. 17: Spontanaktivität im auditorischen Kortex einer Maus unter Anästhesie (links, schwarz) und nach Beendigung der Anästhesie (rechts, violett).

Gezeigt sind jeweils Messungen von 30 Sekunden Dauer.

In Abbildung 17 ist ein Beispiel einer kortikalen Aktivitätsmessung in einer anästhesierten Maus (links, schwarz) und nach Beendigung der Anästhesie (rechts, violett) dargestellt. Besonders fällt die stark erhöhte Frequenz der Kalzium-Transienten auf. Sie war ungefähr 2.5-fach erhöht (Abb. 18; $n=10$ Tiere, 13.4 ± 1.5 Transienten/Minute bzw. 34.5 ± 3.8 Transienten/Minute, Mittelwert \pm Standardfehler, Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p<0.01$). Um Unsicherheiten in Hinblick auf Bewegungsartefakte zu vermeiden, wurden nur Aufnahmeperioden in diese Analyse aufgenommen, in denen sich die Tiere nicht bewegten. Dies entspricht höchstwahrscheinlich dem in der Literatur beschriebenen Zustand der „ruhigen Wachheit“ (Poulet und Petersen, 2008).

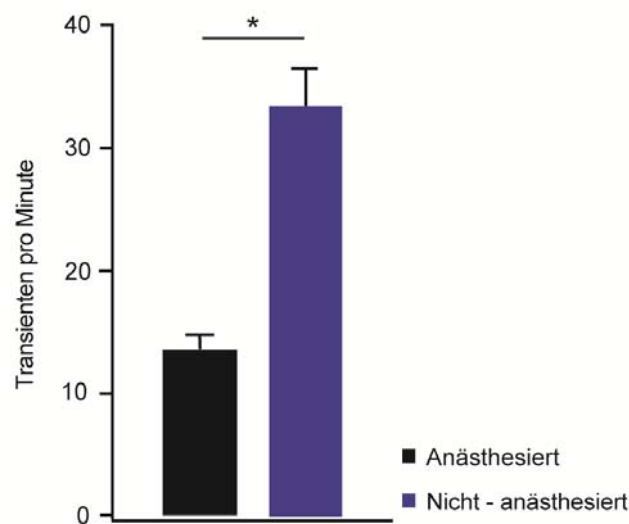


Abb. 18: Frequenzanalyse von Kalzium-Transienten unter Anästhesie (schwarz) und nach Ende der Anästhesie (violett).

Ausgewertet wurden Messungen im auditorischen Kortex von $n=10$ Tieren (13.4 ± 1.5 Transienten/Minute bzw. 34.5 ± 3.8 Transienten/Minute, Mittelwert \pm Standardfehler, Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p<0.01$).

4.2 Methodische Charakterisierung der Lichtleiterbasierten Mikroendoskopie

4.2.1 Überwachung der Präparation mittels Elektrokortikogramm

Um auszuschließen, dass die einzelnen, zum Teil relativ invasiven, Arbeitsschritte hin zur Mikroendoskopie-Messung die Hirnfunktion beeinflussen oder sogar massiv beeinträchtigen, wurde vor und nach der Färbung sowie vor und nach Glasfaser-Fixierung im Bereich des primären visuellen Kortex ein Elektrokortikogramm (*engl. electrocorticogram*, ECoG) über der ipsilateralen Hirnhälfte abgeleitet. Das ECoG, gemessen durch zwei Silberdrähte, die unter den Schädelknochen geschoben und dort mittels Zahnzement fixiert wurden, ist vor allem Ausdruck der Summe aller postsynaptischen Potentiale im Messgebiet (Buzsaki et al., 2012). Dieses Areal umfasste aufgrund der Position der zwei Messelektroden über den frontalen bzw. parietalen Anteilen der Großhirnrinde (Abb. 19A) fast die gesamte ipsilaterale Hirnhemisphäre. Während der Messvorbereitung blieb das ECoG stets stabil und zeigte keinerlei Hinweise auf pathologische Phänomene, wie z.B. epileptische Anfälle, interiktale Spitzen oder kortikale Streudepolarisierung (Abb. 19B). Die Frequenzanalyse durch Fourier-Transformation von Messperioden von jeweils 30 Sekunden Länge zeigte keine Veränderung in den auftretenden Frequenzen (Abb. 19C). Im Gegenteil, während der gesamten Prozedur zeigten sich, wie erwartet, elektrische langsame Wellen, die typischerweise im Frequenzbereich von weniger als 1 Hz auftreten (Steriade et al., 1993c).

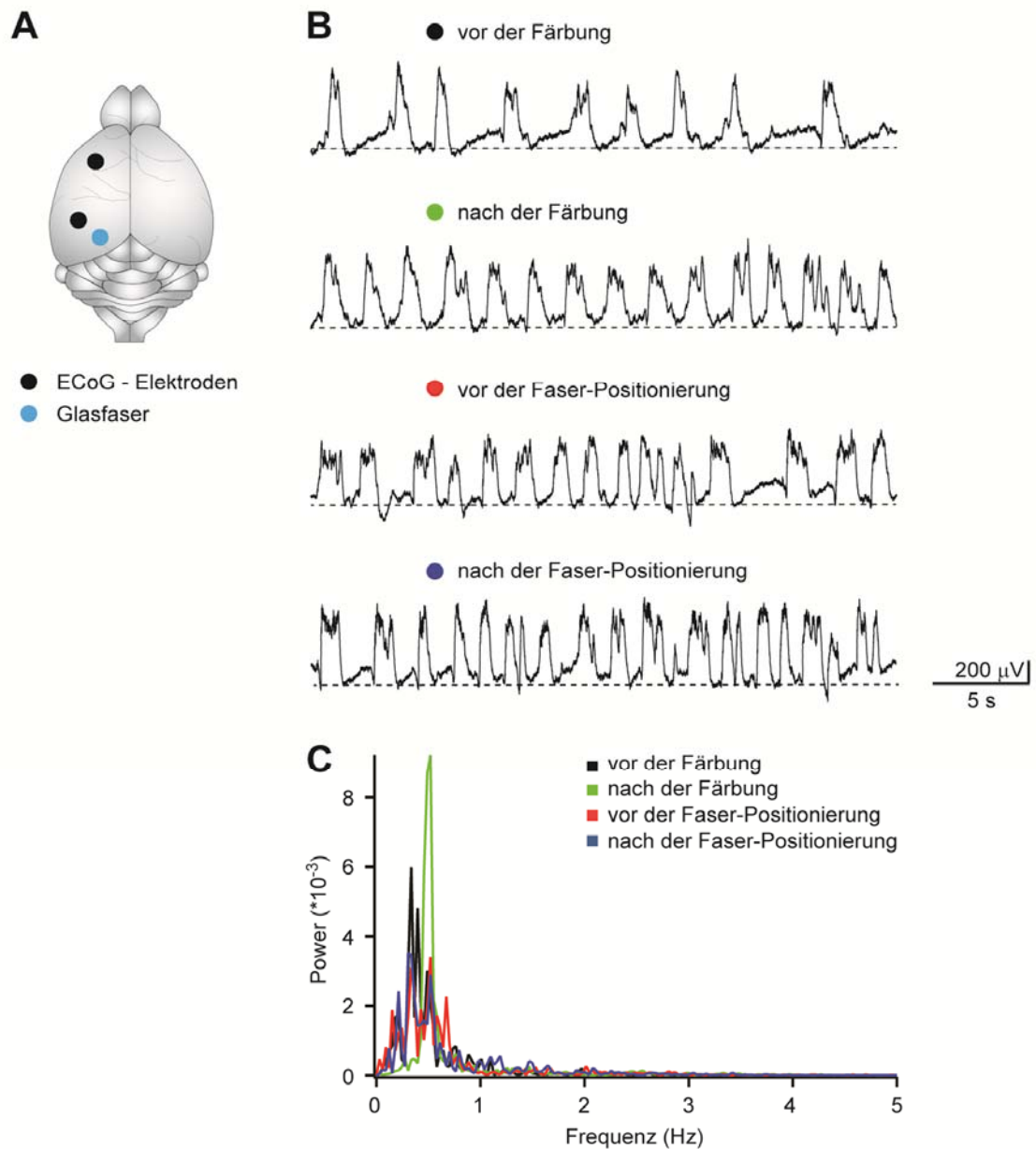


Abb. 19: Elektrische Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Messvorbereitung.

(A) Schematische Darstellung des Gehirns mit Position der zwei ECoG-Elektroden und der Glasfaser. (B) Elektrokortikogramm vor und nach der Färbung sowie vor und nach der Glasfaser-Positionierung im primären visuellen Kortex. (C) Frequenzanalyse mittels Fourier-Transformation. Die an den vier Zeitpunkten auftretenden Frequenzbereiche sind unverändert.

4.2.2 Bestimmung der Anfärbungsstabilität

Es ist bekannt, dass im Falle der AM-Beladung ungefähr 1 Stunde nach der Injektion des lipophilen Kalzium-sensitiven AM-Ester-Farbstoffes in den Extrazellulärraum die maximal erreichbare Grundfluoreszenz erreicht ist (Stosiek et al., 2003). Doch wie lange danach sind mikroendoskopische Kalzium-Messungen möglich? Um diese Frage zu beantworten, wurde folgendes Experiment im primären visuellen Kortex durchgeführt: beginnend 1 Stunde nach Farbstoff-Injektion (Zeitpunkt +1h), wurden alle 30 Minuten Lichtleiter-basierte Messungen von Netzwerk-Kalzium-Transienten von 2-3 Minuten Länge durchgeführt (Abb. 20A). Die Gesamtdauer dieser Experimente betrug 8 Stunden (Zeitpunkt +9h nach Farbstoff-Injektion). In jedem dieser Messabschnitte wurde die Grundfluoreszenz sowie die mittlere Signalamplitude anhand von jeweils 30 Kalzium-Transienten bestimmt. In den Abbildungen 20B und C sind der Grundfluoreszenzlevel bzw. die Amplitude (dargestellt als $\Delta F/F$) in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt dargestellt. Alle Werte sind jeweils zum ersten Messwert, welcher 1 Stunde nach Farbstoff-Injektion vorlag, normalisiert. Es zeigt sich, dass bis zum Zeitpunkt $t=5.5$ h sowohl die Grundfluoreszenz als auch die Amplituden der Kalzium-Transienten stabil sind. Danach zeigt sich, bis 8.5 Stunden nach Injektion, für beide Parameter ein leicht verringerter, aber stets stabiler Wert. Zum Zeitpunkt $t = +9h$ ist dann jedoch ein starker Abfall beider Parameter zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass zumindest bis 5.5 Stunden nach Farbstoffinjektion unter stabilen Bedingungen Kalzium-Messungen mit dem Lichtleiter-basierten System durchgeführt werden können. Danach ist mit einer verringerten Amplitude zu rechnen, was abhängig von der experimentellen Frage von Bedeutung sein kann.

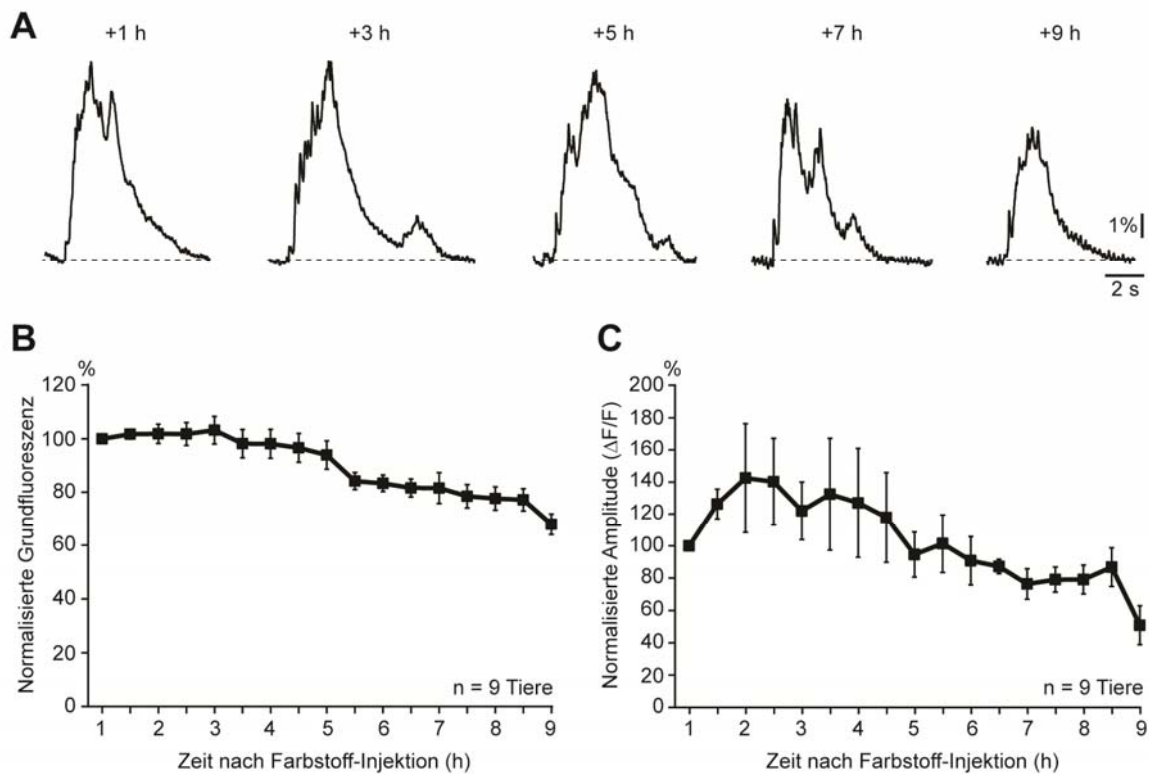


Abb. 20: Anfärungsstabilität nach AM-Beladung im primären visuellen Kortex der Maus.

(A) Netzwerk-Kalzium-Transienten, aufgenommen in demselben Tier zu verschiedenen Zeitpunkten (+1h, +3h, +5h, +7h, +9h nach Farbstoff-Injektion). **(B)** Normalisierter Grundfluoreszenzlevel in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Farbstoff-Injektion. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=9 Tiere). **(C)** Normalisierte Amplitude der Netzwerk-Kalzium-Transienten (dargestellt als $\Delta F/F$) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Farbstoff-Injektion. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=9 Tiere). In jedem Tier wurden für jeden Zeitpunkt jeweils 30 konsekutive Netzwerk-Kalzium-Transienten ausgewertet.

4.2.3 Verwendung von Lichtleitern mit verschiedenen Durchmessern

In der Regel wurden Messungen mit einer Glasfaser mit 200 μm Durchmesser durchgeführt. Es sind jedoch auch Lichtleiter mit anderen Durchmessern verfügbar, z.B. Glasfasern mit einem Durchmesser von 100 μm . Wie in Abbildung 21 anhand einer Messung im primären visuellen Kortex gezeigt ist, konnten auch mit diesen Lichtleitern Kalzium-Signale aufgenommen werden. Die Kinetik der Kalzium-Transienten, dargestellt anhand von 20 überlagerten Einzeltransienten (Abb. 21B,

links) und deren Mittelwert (Abb. 21B, rechts), erschien vergleichbar mit den Kalzium-Signalen, welche mit der 200 μm -Glasfaser detektiert werden konnten.

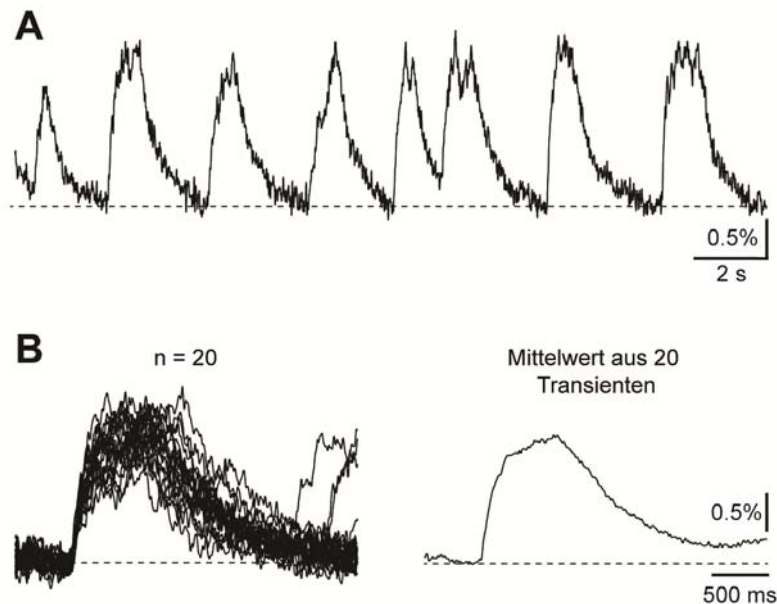


Abb. 21: Korticale spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten, aufgenommen mit einer 100 μm -Durchmesser Glasfaser.

(A) Lichtleiter-basierte Aufnahme von spontanen Kalzium-Transienten im primären visuellen Kortex.
(B) 20 Einzeltransienten (links) und Mittelwert aus diesen 20 Einzeltransienten (rechts).

Um diesen Eindruck zu überprüfen, wurden erneut Anstiegszeiten, Halbwertsbreiten und die Abfallszeitkonstanten der Kalzium-Signale verglichen. Es war kein signifikanter Unterschied in diesen drei Parametern zwischen den beiden verwendeten Glasfaser-Durchmessern vorhanden (Abb. 22). Es soll jedoch erwähnt werden, dass mit der Verwendung der dünneren Faser in der experimentellen Routine oftmals ein etwas schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis einherging. Dies war wahrscheinlich durch das geringere Volumen, vom dem aufgrund des geringeren Durchmessers und der geringeren NA Fluoreszenz gesammelt werden konnte, bedingt. Somit waren weiterhin die 200 μm -dicken Glasfasern die bevorzugte Wahl, da sie einen optimalen Kompromiss zwischen Invasivität und Messqualität darstellten.

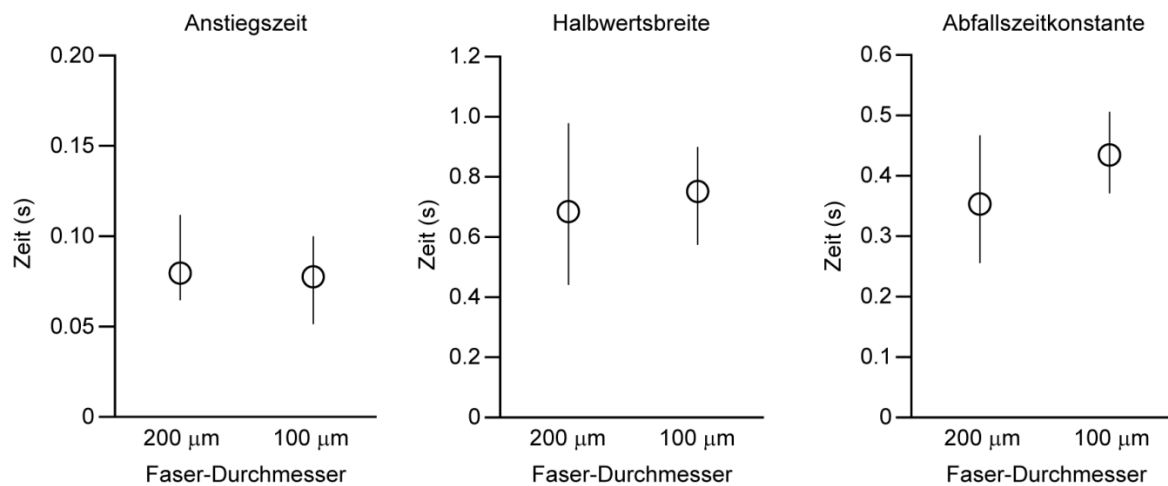


Abb. 22: Anstiegszeiten, Halbwertsbreiten und Abfallszeitkonstanten der Netzwerk-Kalzium-Transienten, aufgenommen mit Glasfasern eines Durchmessers von 200 μm oder 100 μm.

Gezeigt sind Median (Kreise) und Interquartilsabstände (Linien). (200 μm-Durchmesser: n=292 Kalzium Transienten aus 13 Tieren; 100 μm-Durchmesser: n=54 Kalzium-Transienten aus 2 Tieren; Mann-Whitney-Test, Anstiegszeit p=0.865, Halbwertsbreite p=0.865, Abfallszeitkonstante p=0.234).

4.3 Analyse der Netzwerkaktivität im auditorischen Kortex der Maus

4.3.1 Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten in den Kernfeldern des auditorischen Kortex

Die Abbildungen 23A-D zeigen vier Beispiele von Netzwerk-Kalzium-Transienten, die durch auditorische Stimulation mit weißem Rauschen von 100 ms Dauer ausgelöst wurden. Aufgenommen wurden Sie mit dem Lichtleiter-basierten System in den Kernfeldern des auditorischen Kortex anästhesierter Mäuse. Die Versuchstiere waren zwischen 25 und 63 Tage alt. Diese hier dargestellten Netzwerk-Kalzium-Transienten sind Mittelwerte, welche aus jeweils 50 konsekutiven Stimulus-evozierten Einzeltransienten gebildet wurden. Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten bestanden aus zwei Komponenten. Die erste Komponente (23A-D, schwarz) hatte eine kurze Latenzzeit nach dem Stimulus und eine schnelle Anstiegszeit. Die Latenzzeit dieser frühen Komponente ist in Abbildung 23E dargestellt. Diese Graphik zeigt für 17 Tiere die individuelle Verteilung der Latenzzeiten, beschrieben durch Median (Kreis) und die Interquartilsabstände (Linie, die die 25%- mit der 75%-Perzentile verbindet). Die kurze Latenzzeit der ersten Komponente der Netzwerk-Kalzium Transienten ist konsistent mit den Latenzzeiten der elektrischen Antworten auf Tonstimulation, die mittels elektrophysiologischen Methoden beschrieben wurden (Hromadka et al., 2008; Sakata und Harris, 2009). Der ersten, schnellen Komponente nachfolgend, besaßen die Netzwerk-Kalzium-Transienten eine zweite Komponente (Abb. 23A-D, rot). Diese war, im Vergleich zur ersten schnellen Komponente, durch längere Latenzzeiten und eine langsamere Anstiegszeit gekennzeichnet und wird im Folgenden als auch als Ton-evozierter langsamer Netzwerk-Kalzium-Transient bezeichnet (Abb.23F, n=253 Kalzium-Transienten aus 10 Tieren, Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p < 0.001$). Die Anstiegszeit war hierbei definiert als die Zeit, die ein Signal benötigt, um von 10% zu 90% seiner vollständigen Amplitude zu gelangen.

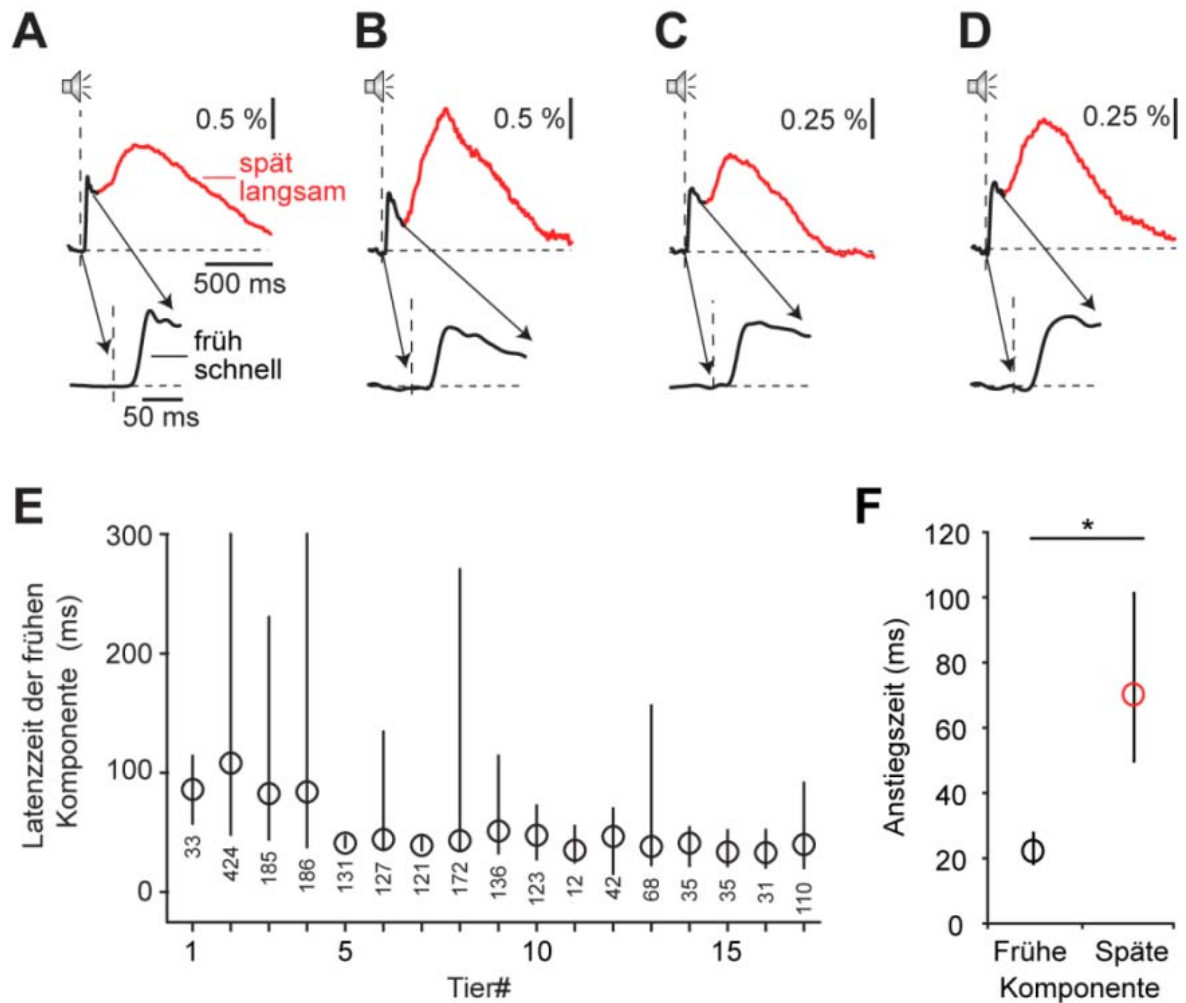


Abb. 23: Ton-evozierter Netzwerk-Kalzium-Transienten.

(A-D) Netzwerk-Kalzium-Transienten (Mittelwerte von 50 konsekutiven Einzeltransienten, gezeigt als $\Delta F/F$) nach Tonstimulation (weißes Rauschen von 100 ms Dauer), gefunden in vier unterschiedlichen Tieren unter Isofluran-Anästhesie. Es konnten zwei Komponenten identifiziert werden: ein früher, schnell-ansteigender (schwarz) und ein später, langsam-ansteigender (rot) Netzwerk-Kalzium-Transient. Die frühe Komponente (schwarz) ist im unteren Teil von A-D vergrößert dargestellt. (E) Median und Interquartilsabstände der Latenzzeiten der frühen Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten, gemessen in 17 verschiedenen Tieren. Kreise: Medianwerte der Latenzzeit-Verteilung. Die Linie umfasst 50% der Latenzzeit-Verteilung. Die Anzahl der ausgewerteten Stimuli ist jeweils unter der Latenzzeit-Verteilung angegeben. (F) Anstiegszeiten der schnellen (frühe Komponente) und der langsamen (späte Komponente) Netzwerk-Kalzium-Transienten (Median und Interquartilsabstände; $n=253$ Ton-evozierter Transienten aus 10 Tieren; Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p<0.001$).

4.3.2 Spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten in den Kernfeldern des auditorischen Kortex

Netzwerk-Kalzium-Transienten traten in den Kernfeldern des auditorischen Kortex auch in Abwesenheit auditorischer Stimulation auf (Abb. 24A). Diese spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten hatten eine mittlere Auftrettsfrequenz von 0.37 ± 0.04 Hz ($n=10$ Tiere). Die Abbildung 24B zeigt jeweils die Mittelwerte 10 spontaner (links, blau) und 10 evozierter (rechts, schwarz: schnelle Komponente; rot: langsame Komponente) Kalzium-Transienten, die an derselben Position aufgenommen worden waren. Es zeigte sich, dass sich die spontanen Kalzium-Transienten und die langsame Komponente der evozierten Transienten bezüglich ihrer Anstiegszeiten, ihrer Halbwertsbreiten und ihrer Abfallszeiten sehr ähnelten.

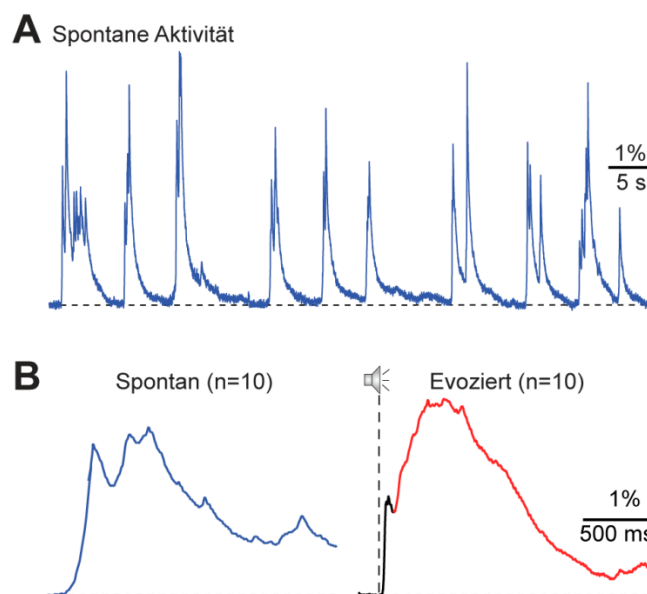


Abb. 24: Spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten ähneln der langsamen Komponente der evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten.

(A) Spontanaktivität im auditorischen Kortex, aufgenommen mit dem Lichtleiter-basierten System. (B) Spontane (links, blau) und Stimulus-evozierte (rechts; schwarz: schnelle Komponente; rot: langsame Komponente) Netzwerk-Kalzium-Transienten, die im Rahmen desselben Experimentes aufgenommen worden waren. Der Stimulus war weißes Rauschen von 100 ms Dauer. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte 10 konsekutiv auftretender Einzeltransienten (dargestellt als $\Delta F/F$). Beachten Sie bitte den Unterschied in der zeitlichen Struktur der spontanen und der evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten.

Der Eindruck aus diesem Einzel-Experiment war tatsächlich generalisierbar. Nach der Quantifizierung der Anstiegszeiten, der Halbwertsbreiten und der Abfallszeitkonstanten der spontanen und der Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten in 10 Tieren ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Formen der Netzwerkaktivität (Abb. 25, $n=253$ Ton-induzierte und 213 spontane Kalzium-Transienten aus 10 Tieren; Mann-Whitney-Test, Anstiegszeit $p=0.07$, Halbwertsbreite $p=0.11$, Abfallszeitkonstante $p=0.57$).

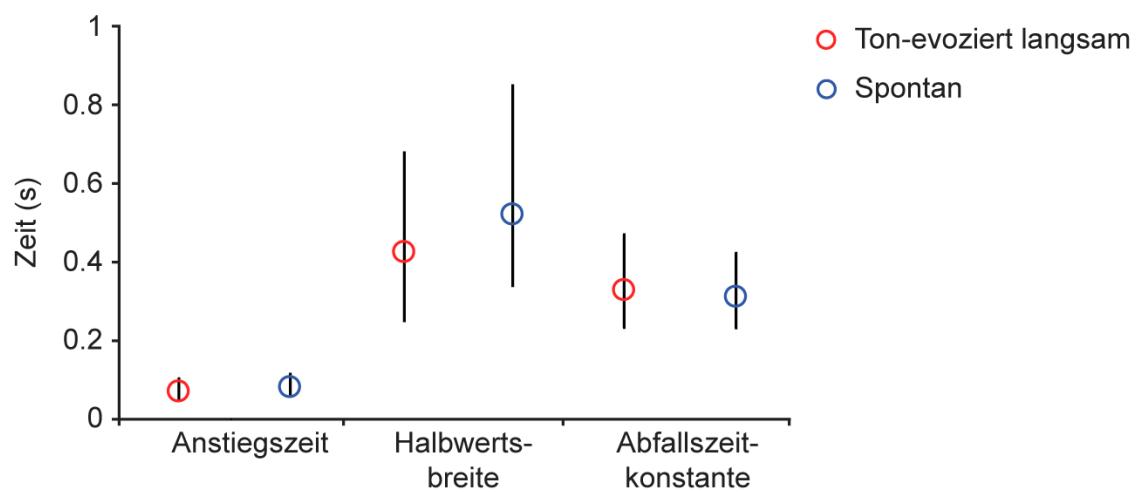


Abb. 25: Anstiegszeiten, Halbwertsbreiten und Abfallszeitkonstanten der sensorisch-evozierten langsamen (rot) und der spontanen (blau) Netzwerk-Kalzium-Transienten.

Gezeigt sind Median (Kreise) und Interquartilsabstände (Linien). ($n=253$ evozierte und 213 spontane Kalzium-Transienten aus 10 Tieren; Mann-Whitney-Test, Anstiegszeit $p=0.07$; Halbwertsbreite $p=0.11$, Abfallszeitkonstante $p=0.57$).

4.3.3 Ursprung der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten

Um eine große Anzahl an Nervenzellen anzufärben und damit die Detektion von evozierten Netzwerk-Kalzium-Signalen zu ermöglichen, wurde eine abgewandelte AM-Beladungstechnik verwendet. Diese Methode färbt gleichzeitig viele Zellen (sowohl Nervenzellen als auch Astrozyten) und die diese umgebenden Zellfortsätze, das Neuropil, mit dem Kalzium-Farbstoff an (z.B. Kerr et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2004). Äußerst wichtig für die korrekte Interpretation des gemessenen Signals ist also eine Abschätzung, welchen Anteil die Nervenzellen, die Astrozyten sowie die zellulären Fortsätze jeweils daran haben.

Um diese Frage zu beantworten, wurden nacheinander im selben Versuchstier (n=7 Tiere) Zwei-Photonen-Mikroskopie und mikroendoskopische Messungen durchgeführt. Die Abbildung 26 stellt beide Methoden zunächst einander schematisch gegenüber.

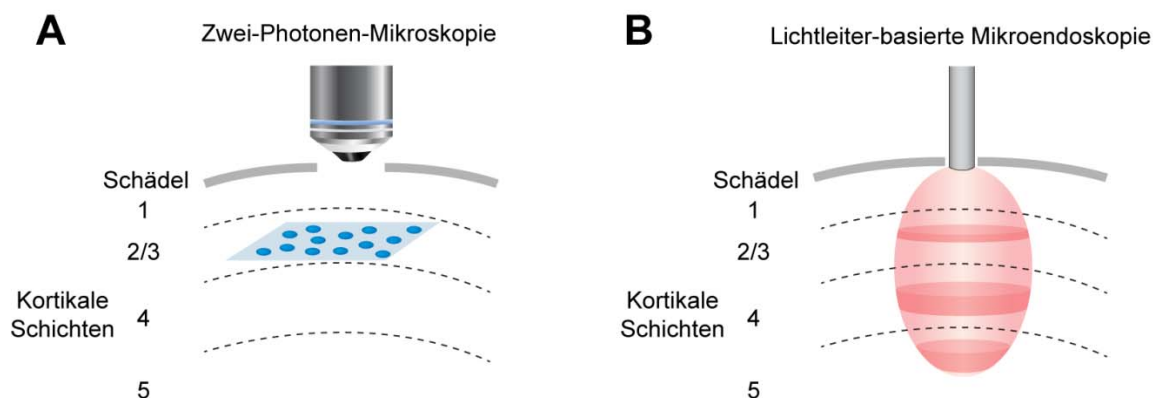


Abb. 26: Schematische Gegenüberstellung der Zwei-Photonen-Mikroskopie (A) und der Lichtleiter-basierten Mikroendoskopie (B).

So ermöglicht die Zwei-Photonen-Mikroskopie die Erfassung der Kalzium-Signale mit Einzelzellauflösung, ist allerdings weitgehend auf die oberflächlichen kortikalen Schichten beschränkt. Dies ist in Abbildung 26A illustriert, in der die blaue Fläche eine typische Aufnahmeebene in Schicht 2/3 des Kortex darstellt. Die Lichtleiter-basierte Mikroendoskopie detektiert hingegen ein integriertes Fluoreszenz-Signal sowohl aus oberflächlichen als auch tiefen kortikalen Schichten. Allerdings

bietet diese Methodik keinerlei Einzelzell-Auflösung. So illustriert das rote Areal in Abbildung 26B schematisch das Volumen, aus welchem effizient Fluoreszenzsignal gesammelt wird.

Um also die Zusammensetzung der mit dem Lichtleiter-basierten System aufgenommenen Signale einzuschätzen, wurden zunächst Kalzium-Signale analysiert, welche mit Zwei-Photonen-Mikroskopie in einem Gesamt-Blickfeld mit Zellen und Neuropil aufgenommen wurden (blauer Rahmen in Abb. 27C). Diese Gesamt-Blickfeld-Kalzium-Signale waren nach Tonstimulation (weißes Rauschen von 100 ms Dauer im Abstand von 5 s) zuverlässig zu finden (Abb. 27A). Mit dem Mikroendoskopie-System konnten dann an derselben Färbestelle Netzwerk-Kalzium-Transienten nachgewiesen werden, welche die beiden klar unterscheidbaren Komponenten besaßen (Abb. 27B). Beim Vergleich beider Signalformen fällt auf, dass die Kalzium-Signale, aufgenommen mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie, keine erste schnelle Komponente besaßen und ihr Zeitverlauf dem der langsamen zweiten Komponente der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten sehr ähnlich war. Dies ist auf ihren vergleichbaren Ursprung als gemischtes Signal, welche in Nervenzellen und in Neuropil-Strukturen entsteht, zurückzuführen. Deswegen konnten die Gesamt-Blickfeld-Kalzium-Signale als „Äquivalent“ der Lichtleiter-Kalzium-Signale verwendet werden, um den Beitrag der Zellen und des Neuropils zu diesem Signal quantifizieren. Dafür wurden Ton-evozierte Kalzium-Signale aus drei unterschiedlichen Regionen ausgewertet: (1) das Gesamt-Blickfeld (blaue durchgezogene Linie), (2) alle Zellen im Gesamt-Blickfeld in einer *region of interest* zusammengefasst (blaue Kreise) und (3) das Neuropil (restlicher Bereich) (Abb. 27C-D). Dann wurde der Anteil der Zellen bzw. des Neuropils an der Gesamtfluoreszenz-Änderung, also der Fluoreszenz aus dem Gesamt-Blickfeld, bestimmt. In diesem Beispiel, welches in Abbildung 27C und D gezeigt wird, wurden 51% der Gesamtfluoreszenz-Änderung durch die Zellen und 49% der Fluoreszenz-Änderung durch das Neuropil beigetragen (Abb. 27E, links). Insgesamt wurden 17 Gesichtsfelder ausgewertet. Diese Analyse ergab, dass im Durchschnitt 43% der Änderung der Gesamtfluoreszenz durch Zellen erzeugt wurden (Abb. 27E, rechts).

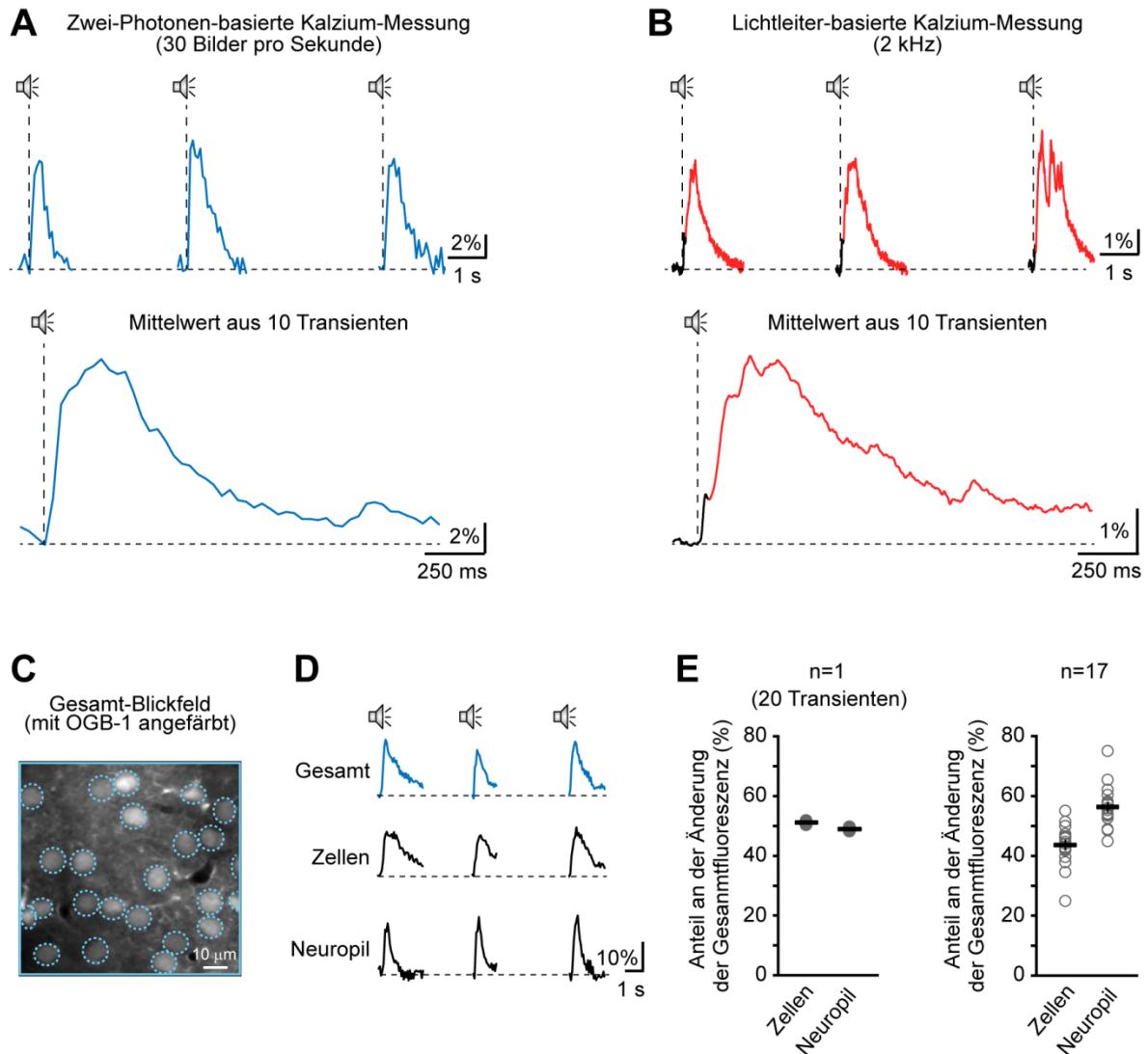


Abb. 27: Anteil des zellulären und des Neuropil-Kalzium-Signals am Gesamt-Kalzium-Signal.

(A) Ton-evozierte Kalzium-Transientes, aufgenommen in einem Gesamt-Blickfeld mit Zwei-Photonen-Mikroskopie (Aufnahmegeschwindigkeit: 30 Bilder pro Sekunde). Oben: drei konsekutive Transientes. Unten: Mittelwert aus 10 Transientes. (B) Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transientes (schwarz: frühe, schnell-ansteigende Komponente; rot: späte, langsam-ansteigende Komponente), aufgenommen mit dem Lichtleiter-basierten System (Aufnahmegeschwindigkeit: 2 kHz). Oben: drei konsekutive Transientes. Unten: Mittelwert aus 10 Transientes. Als Tonstimulus wurde in A und B weißes Rauschen von 100 ms Dauer im Abstand von 5 s verwendet. (C) Gesamt-Blickfeld, aufgenommen mit Zwei-Photonen-Mikroskopie. Zellen und das umgebende Neuropil sind mit dem Kalzium-Farbstoff Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB-1) angefärbt. (D) Ton-evozierte Kalzium-Transientes aus drei unterschiedlichen Regionen. Oben: Gesamt-Blickfeld (blauer Rahmen in C). Mitte: alle Zellen im Gesamt-Blickfeld in einer Region zusammengefasst (blaue gestrichelte Kreise in C). Unten: Neuropil (restlicher Bereich: Gesamt-Blickfeld exklusive der vorhandenen Zellen). (E) Anteil der Zellen und des Neuropils an der Gesamtfluoreszenz-Änderung. Links: Blickfeld aus A. Rechts: Zusammenfassung für 17 Blickfelder. Es wurden pro Blickfeld 20 sensorisch-evozierte Transientes analysiert.

In Hinblick auf die Zusammensetzung der Netzwerk-Kalzium-Transienten kann also, basierend auf den Erkenntnissen aus den hier untersuchten oberflächlichen Schichten des Maus-Kortex, die Schlussfolgerung gezogen werden, dass zelluläre und Neuropil-Kalzium-Signale etwa zu gleichen Teilen repräsentiert sind. Interessanterweise konnte in den Zwei-Photonen-Kalzium-Messungen keine frühe, schnell-ansteigende Komponente identifiziert werden. Dies ist wohl der Tatsache geschuldet, dass diese Komponente ihren Ursprung in der kortikalen Schicht 4 hat, welche ihre Signale direkt aus dem Thalamus erhält und für die Zwei-Photonen-Mikroskopie in der Regel nicht zugänglich ist. Der späte langsam-ansteigende Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transient, hingegen, entsprach dem Kalzium-Signal, welches aus dem Gesamt-Blickfeld aufgenommen wurde. Er spiegelt somit wohl die Netzwerkaktivität einer lokalen Population von Zellen wieder, die (zumindest zum Teil) in der kortikalen Schicht 2/3 gelegen ist und somit im Rahmen der hier durchgeführten Zwei-Photonen-Messungen beobachtet werden konnte. Es ist allerdings wahrscheinlicher, dass diese lokale Zellpopulation über alle Schichten der gefärbten kortikalen Region verteilt zu finden ist und dass somit nur ein Teil dieser Population mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie untersucht werden konnte.

Die AM-Beladungsmethode färbt auch die im Kortex vorhandenen Astrozyten an. Deswegen stellt sich die Frage, ob astrozytäre Kalzium-Signale substantiell zum Lichtleiter-Kalzium-Signal beitragen. Um dies zu beantworten, wurden astrozytäre Kalzium-Signale mit dem Kalzium-Signal aus einzelnen Neuronen und dem Gesamt-Blickfeld, was, wie oben gezeigt, stark dem Faser-Signal ähnelt, verglichen (Abb. 28).

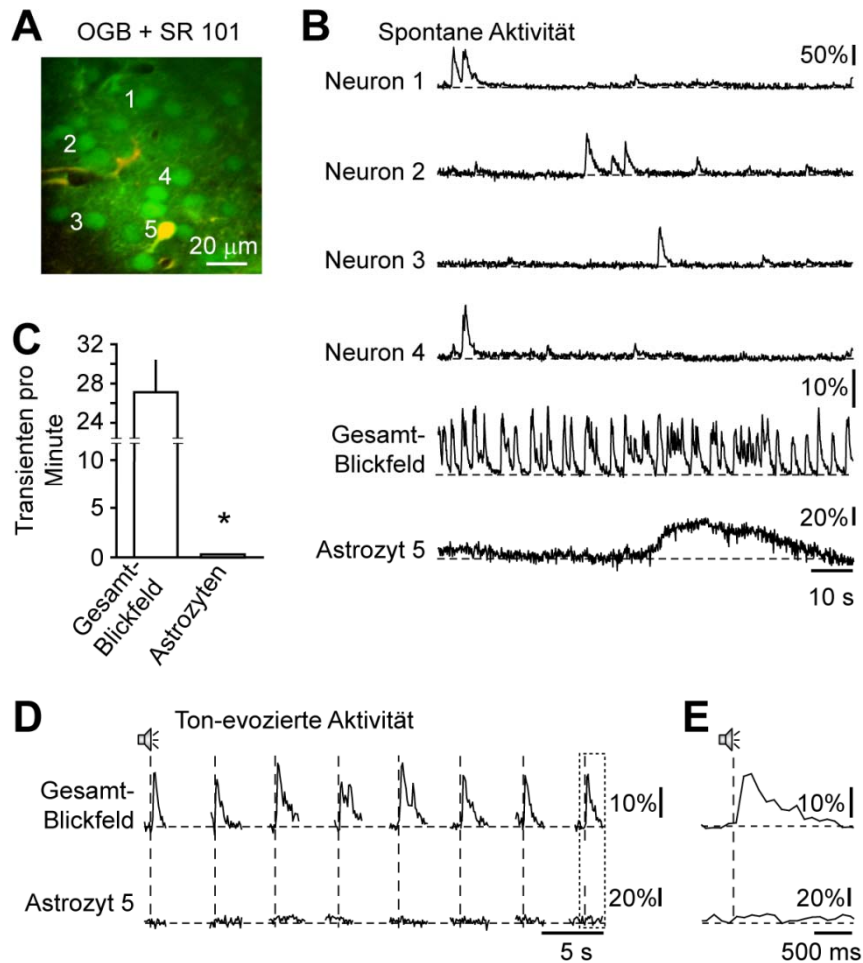


Abb. 28: Niedrige Auftretswahrscheinlichkeit und langsamer Zeitverlauf astrozytärer Kalzium-Signale.

(A) Gesamt-Blickfeld, aufgenommen mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop. Zellen und das umgebende Neuropil sind mit dem Kalzium-Farbstoff Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB-1) angefärbt. Astrozyten sind selektiv mit Sulforhodamin 101 (SR101) angefärbt. (B) Spontanaktivität in den Neuronen 1-4, im Gesamt-Blickfeld und in Astrozyt 5 (siehe Beschriftung in A). (C) Auftretswahrscheinlichkeit der Kalzium-Transienten im Gesamt-Blickfeld und in den Astrozyten (durchschnittliche Auftretswahrscheinlichkeit \pm Standardfehler: 27.1 ± 3.3 Transienten/Minute bzw. 0.33 ± 0.09 Transienten/Minute, $n=17$ Blickfelder in 8 Tieren, Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p<0.001$). (D) Ton-evozierter Aktivität (weißes Rauschen, Dauer 100ms, Intervall 5 s) im Gesamt-Blickfeld und in Astrozyt 5. (E) Vergrößerte Darstellung des Zeitabschnittes, der durch die Box in D gekennzeichnet ist.

Die Astrozyten konnten entweder aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie oder ihrer Anfärbbarkeit mit dem Farbstoff Sulforhodamin 101 (Nimmerjahn et al., 2004) identifiziert werden (Abb. 28A). Unter den hier gewählten

experimentellen Bedingungen zeigten Astrozyten überhaupt keine (n=11/19 Astrozyten) oder ausgesprochen selten spontane Kalzium-Transienten (n=8/19 Astrozyten). Die Dauer dieser Transienten lag im Bereich von 10 - 40 s. Dies steht im starken Kontrast zu den Kalzium-Signalen in Neuronen oder im Gesamt-Blickfeld (Abb. 28B). Die durchschnittliche Frequenz von Kalzium-Transienten in Astrozyten lag bei 0.33 ± 0.09 Transienten pro Minute, während im Gesamt-Blickfeld Kalzium-Signale mit einer Frequenz von 27.1 ± 3.3 Transienten/Minute aufgenommen werden konnten (Abb. 28C, Mittelwert \pm Standardfehler, n=7 Tiere, Kolmogorov-Smirnov-Test, *p<0.001). Ebenso selten wurden astrozytäre Kalzium-Signale während der Tonstimulation beobachtet (Durchschnittsfrequenz von 0.10 ± 0.04 Transienten pro Minute). Darüber hinaus konnte kein zeitlicher Zusammenhang zwischen Stimulation und Kalzium-Transient hergestellt werden (Abb. 28D-E). Zusammenfassend ist also festzustellen, dass unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen Astrozyten nicht zu der Netzwerk-Kalzium-Transienten beitragen.

4.3.4 Sensitivität der mikroendoskopischen Kalzium-Messungen

Um zu bestimmen, wie viele aktive Nervenzellen notwendig sind, um mit dem Lichtleiter-basierten Mikroendoskopie-System Kalzium-Signale zu messen, wurde ein weiteres kombiniertes Experiment aus Zwei-Photonen-Mikroskopie und Faser-Messung ausgeführt (Experimente durchgeführt von Prof. Helmut Adelsberger, Prof. Olga Garaschuk und Dr. Ruxandra-lulia Milos) (Abb. 29). Dafür wurden kortikale Zellen mit dem Kalzium-Farbstoff Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) angefärbt und dann die Anzahl der kortikalen Zellen bestimmt, welche durch eine lokale Glutamat-Applikation aktiviert werden konnten. Zu diesem Zweck wurde eine Glaspipette, welche mit 100 mM Glutamat und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 594 (beides gelöst in extrazellulärer Pufferlösung) gefüllt war, in der Mitte des zuvor gefärbten Areal (typischerweise 100–150 μm unter der Kortexoberfläche) positioniert (Abb. 29A). Die Position der Glaspipette konnte unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop mit Hilfe des Alexa-Farbstoffes verifiziert werden. War diese korrekt, wurde diese während des gesamten Experimentes nicht mehr verändert. Dann wurden mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie Kalzium-Transienten, die durch die iontophoretische

Applikation von Glutamat für 50–100 ms in den Nervenzellen hervorgerufen wurden, in unterschiedlichen Fokusebenen des gefärbten Bereiches aufgenommen. Besonders wichtig war es dabei, jede Zelle zu testen und jede Zelle nur einer einzigen Fokusebene zuzuordnen. Insgesamt hatte der Bereich, welcher vom Glutamat betroffen war, eine ellipsoide Form mit einem horizontalen Durchmesser von ungefähr 100 μm und einem vertikalen Durchmesser von ungefähr 170 μm (Abb. 29A, weiße gestrichelte Linie). Die Abbildung 29B zeigt Kalzium-Transienten, wie sie in sieben verschiedenen Nervenzellen und zwei Neuropil-Regionen in einer Fokusebene in einer Tiefe von 155 μm aufgenommen wurden. Nur Nervenzellen und diejenige Neuropil-Region (Nervenzelle 3-5 und Neuropil A), die in dem Bereich lagen, welcher von der Glutamat-Applikation betroffen war, zeigten Antworten auf das Glutamat in Form von verlässlich auftretenden Kalzium-Transienten. In dieser Fokusebene wurden 21 Nervenzellen und das diese umgebende Neuropil durch das Glutamat aktiviert. In diesem Beispiel-Experiment wurde die Aktivität in fünf weiteren Fokusebenen (Abstand variierte in Abhängigkeit von der Zelldichte zwischen 10 und 40 μm) aufgenommen und insgesamt so 90 durch Glutamat aktivierbare Nervenzellen identifiziert. Im nächsten Schritt wurde dann die Glasfaser auf die kortikale Oberfläche über der gefärbten Hirnregion aufgesetzt. Da der horizontale Durchmesser der durch das Glutamat abgedeckten Region kleiner als der Durchmesser der Glasfaser war, konnte davon ausgegangen werden, dass mit der Glasfaser tatsächlich das Fluoreszenzsignal von allen aktivierten Zellen aufgefangen wurde. In Abbildung 29C sind drei konsekutive Glutamat-induzierte Netzwerk-Kalzium-Transienten gezeigt, die also auf die Aktivierung von 90 Nervenzellen und dem sie umgebenden Neuropil zurückzuführen sind. Die Zusammenfassung von sechs derartigen Experimenten zeigt schließlich eine lineare Abhängigkeit der Amplitude der Netzwerk-Kalzium-Transienten von der Anzahl der aktiven Zellen (Abb. 29D). Darüber hinaus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die gleichzeitige Aktivität, hier pharmakologisch durch das Glutamat ausgelöst, von mindestens 20 Zellen notwendig und ausreichend ist, um Netzwerk-Kalzium-Transienten zu erzeugen, welche in Amplitude und Struktur vergleichbar mit den unter physiologischen Bedingungen beobachtbaren Netzwerk-Kalzium-Transienten sind.

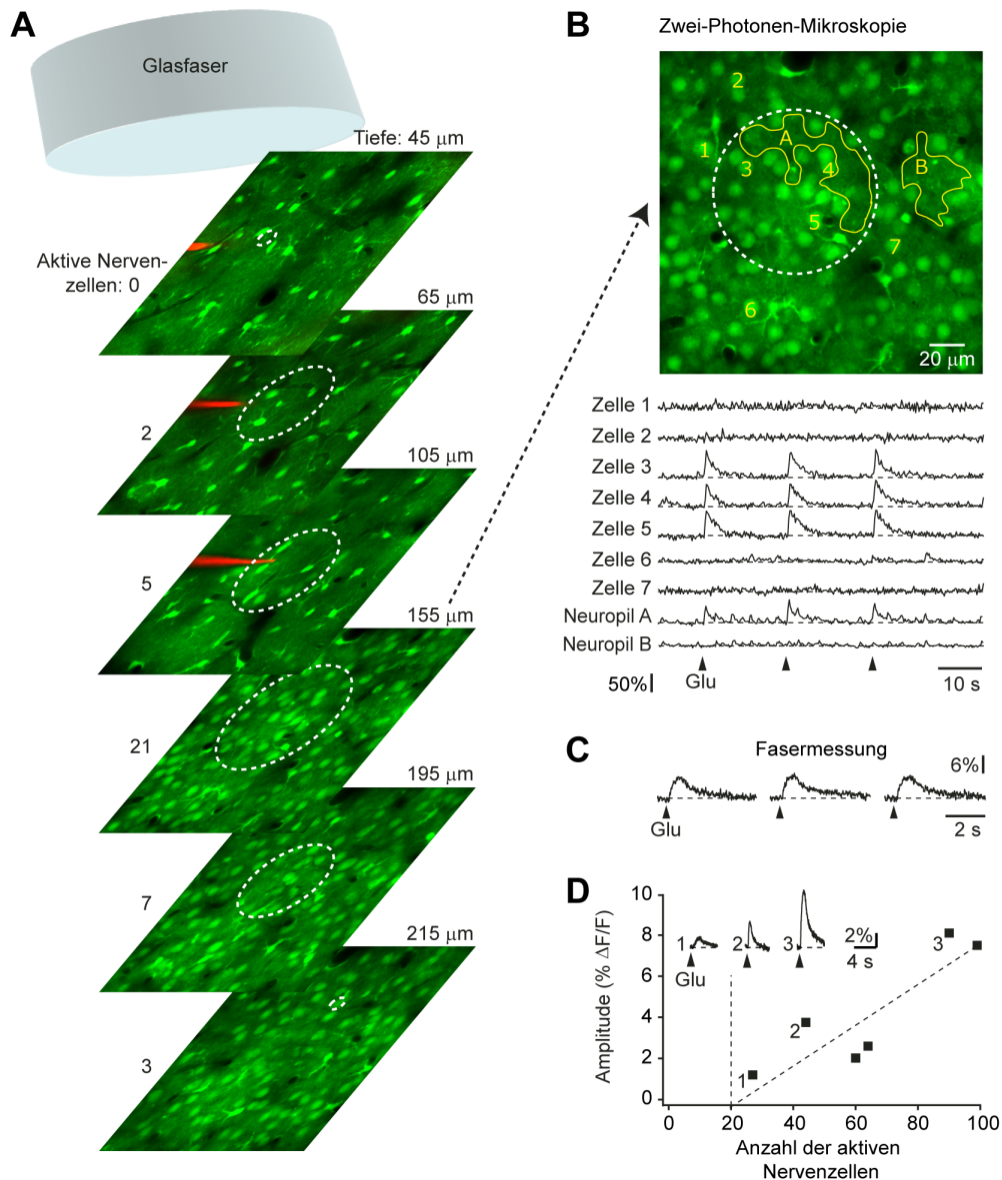


Abb. 29: Abschätzung der Detektionsschwelle der mikroendoskopischen Kalzium-Messungen.

(A) Experimenteller Aufbau. Fokusebenen, aufgenommen mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop in unterschiedlichen Kortex-Tiefen (rechts) und nach Anfärbung mit dem Kalzium-Indikator Oregon Green BAPTA-1 AM. Die weiße gestrichelte Linie umgibt den Bereich, in dem die Nervenzellen durch die Glutamat-Applikation mittels einer Glaspipette (rot, gefüllt mit Alexa 594) aktiviert wurden. Die Anzahl der aktiven Zellen pro Ebene sind auf der linken Seite aufgeführt. Glasfaser (oben), auf die kortikale Oberfläche über der gefärbten Hirnregion aufgesetzt. **(B)** Oben: Fokusebene, aufgenommen mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop in einer Tiefe von 155 μm . Unten: Glutamat-induzierte Kalzium-Transienten, gezeigt für 7 Nervenzellen (Zelle 1-7) und zwei Neuropil-Regionen (Neuropil A und B). Bitte beachten Sie, dass nur Zellen und die Neuropil-Region Kalzium-Transienten aufweisen, welche sich innerhalb der gestrichelten Linie befinden. **(C)** Glutamat-induzierte Netzwerk-Kalzium-Transienten, aufgenommen mit dem Lichtleiter-basierten System. **(D)** Abhängigkeit der Amplitude der Netzwerk-Kalzium-Transienten von der Anzahl der aktiven Nervenzellen ($n=6$ Tiere). (Experimente durchgeführt von Prof. Helmuth Adelsberger, Prof. Olga Garaschuk und Dr. Ruxandra-Iulia Milos).

4.3.5 Verhältnis zwischen spontanen und Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten

Zahlreiche elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass sich Spontan- und sensorisch-evozierte Aktivität im auditorischen Kortex und anderen kortikalen Arealen gegenseitig beeinflussen (Castro-Alamancos, 2004; Curto et al., 2009; Edeline, 2003; Kisley und Gerstein, 1999; Marguet und Harris, 2011; Petersen et al., 2003b; Sachdev et al., 2004; Worgotter et al., 1998). Deswegen wurde als nächster Schritt die Beziehung zwischen spontaner und sensorisch-evozierter Netzwerkaktivität analysiert. Zu diesem Zweck wurden Ton-evozierte Transienten untersucht, welche während spontaner Transienten auftraten. Abbildung 30 zeigt drei unterschiedliche in einem Tier aufgenommene Beispiel-Transienten, bei denen die Tonstimulation (weißes Rauschen von 100 ms Dauer) an der Spitze bzw. zu Beginn der Abfallsphase (links), in etwa der Mitte der Abfallsphase (Mitte) oder am Ende der Abfallsphase (rechts) des spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten erfolgte. Es zeigte sich, dass die frühe Komponente (schwarz) gar nicht oder nur schwach vom Fluoreszenzlevel bei Stimulationsbeginn abhing. Die späte, langsam-ansteigende Komponente (rot) wies hingegen eine deutliche Abhängigkeit von diesem Fluoreszenzlevel auf. So war der Stimulus-evozierte langsame Transient klein, wenn die Stimulation an der Spitze des vorhergehenden spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten erfolgte (Abb.30, links), war in ihrer typischen Größe vorhanden, wenn die Stimulation am Ende des spontanen Transienten erfolgte (Abb. 30, rechts) und hatte eine mittlere Amplitude, wenn die Stimulation in etwa der Mitte der Abfallsphase durchgeführt wurde (Abb. 30, Mitte). Die Amplitude der Ton-evozierten langsamen Komponente ist also eine stark abfallende Funktion des Fluoreszenzlevels zu Beginn des Stimulus, was als Marker für die spontane Nervenzell-Aktivität bei Stimulusbeginn angesehen werden kann. Es hatte sogar den Anschein, als ob der evozierte Transient stets zu dem gleichen typischen Fluoreszenzlevel ansteigen würde, nicht aber darüber hinaus.

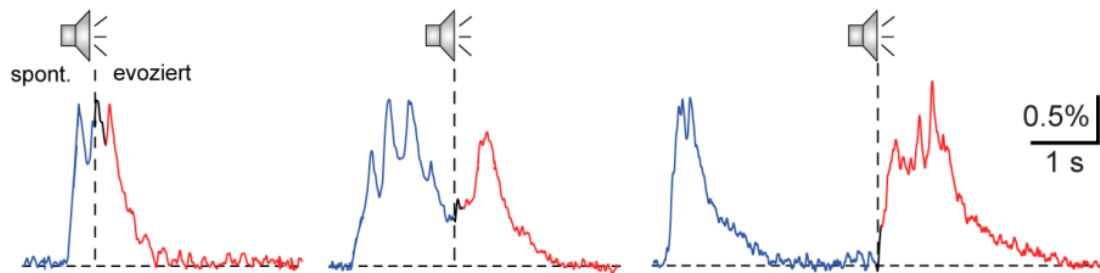


Abb. 30: Beziehung zwischen spontanen und sensorisch-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten.

Netzwerk-Kalzium-Transienten, welche in unterschiedlichen Phasen des vorhergehenden spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten durch weißes Rauschen von 100 ms Dauer evoziert wurden.

Diese Beobachtungen konnten durch eine weitere Quantifizierung bestätigt werden. Für jeden Stimulus wurde die Amplitude der frühen, schnell-ansteigenden Antwort, definiert als der größte Anstieg an Fluoreszenz während der ersten 100 Millisekunden nach Stimulusbeginn, und die Amplitude der späten, langsam-ansteigenden Komponente, definiert als der größte Anstieg an Fluoreszenz nach den ersten 100 Millisekunden nach Stimulusbeginn, bestimmt. Diese Werte (schnelle Komponente: schwarze Kreise; langsame Komponente: rote Quadrate) sind für vier unterschiedliche Experimente als Funktion der durchschnittlichen Fluoreszenzwerte in einem Zeitraum von 100 ms vor Stimulusbeginn dargestellt (Abb. 31). Es zeigt sich deutlich, dass, während der schnelle Kalzium-Anstieg kaum oder nicht vom Aktivitätslevel bei Stimulusbeginn abhängig ist, die langsame Komponente eine deutliche Abhängigkeit zeigt. Interessanterweise weisen die Regressionslinien durch die maximale Amplitude der späten Komponente (rote Linien in Abb. 31A-D) eine Steigung von beinahe -1 auf. Dies bestätigt den Eindruck, dass der maximale Fluoreszenzanstieg stets einen charakteristischen Maximalwert erreichte, diesen aber typischerweise nicht überschritt.

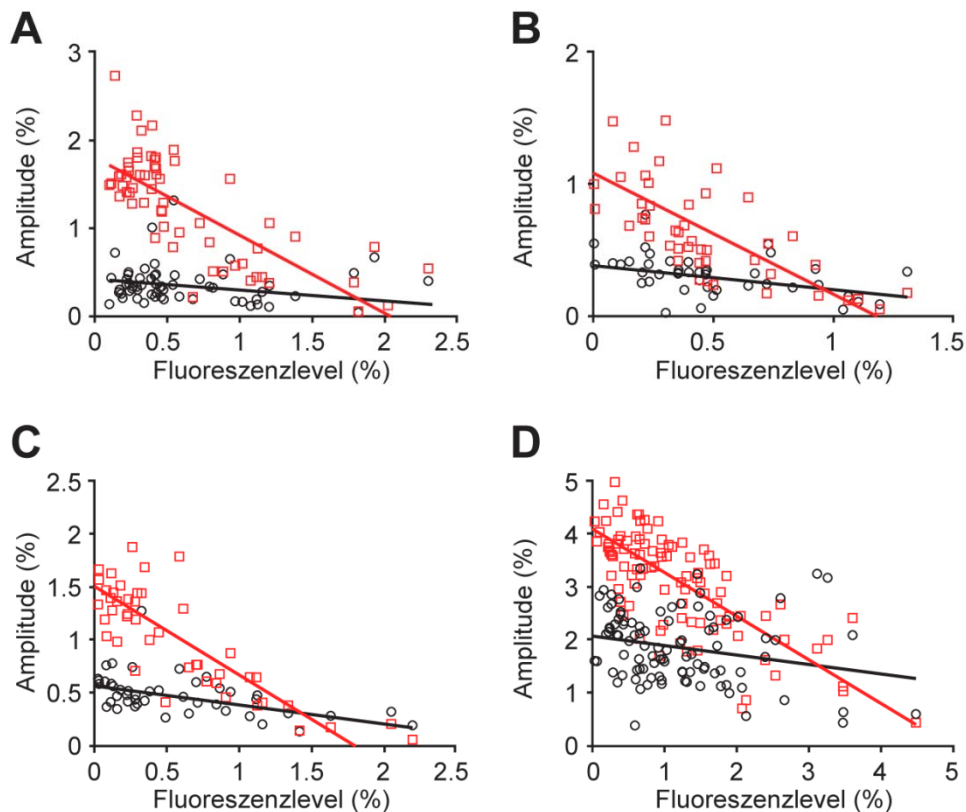


Abb. 31: Abhängigkeit der langsamen Komponente der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten von der Spontanaktivität zu Stimulusbeginn.

(A) Darstellung der maximalen Amplitude der schnellen (schwarze Kreise) und der langsamen (rote Quadrate) Komponente der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten als Funktion des Fluoreszenzlevels bei Stimulusbeginn. Die Regressionslinien sind in den jeweiligen Farben dargestellt. Beide Werte wurden als relative Fluoreszenz $\Delta F/F$ gemessen. Es sind Datenpunkte aus einem Versuchstier gezeigt. (B-D) Darstellung wie in A für drei weitere Versuchstiere.

Die Verallgemeinerbarkeit dieser Beobachtungen aus 4 Einzelexperimenten wurde durch die Analyse von insgesamt 63 Aufnahme-Perioden in 17 Tieren bestimmt. In allen Tieren konnte in mindestens einer Aufnahmeperiode signifikante Antworten auf weißes Rauschen nachgewiesen werden. Signifikante Antworten wurden stets als signifikanter Unterschied der durchschnittlichen Fluoreszenzwerte 500 ms vor und nach dem Tonstimulus definiert (t-Test mit dem Kriterium $p < 0.05$). Für alle Bedingungen, in denen signifikante Antworten gefunden werden konnten (58 von 63, 92%), wurde die Abhängigkeit der Amplituden der frühen und der späten Komponente vom Fluoreszenzlevel zu Stimulusbeginn bestimmt. Beide

Komponenten nahmen als Funktion des Fluoreszenzlevels zu Stimulusbeginn ab. Die Abhängigkeit der schnellen Komponente war sehr gering. Der durchschnittliche Abfall der frühen Komponente betrug -0.09 ± 0.13 %/% (Mittelwert \pm Standardabweichung, als Einheit %/% ist die prozentuale Änderung der Amplitude pro 1% Anstieg in Fluoreszenz zu Stimulusbeginn angegeben). Der Abfall war negativ in 41 von 58 (71%) Aufnahmeperioden und signifikant kleiner als 0 in 18 von 58 (31%) Aufnahmeperioden. Im Vergleich dazu war die Abhängigkeit der späten Komponente bedeutend größer. Der durchschnittliche Abfall dieser späten Komponente betrug nämlich -0.77 ± 0.16 %/% (Mittelwert \pm Standardabweichung, als Einheit %/% ist die prozentuale Änderung der Amplitude pro 1% Anstieg in Fluoreszenz zu Stimulusbeginn angegeben). Der Abfall war negativ in allen 58 Aufnahmeperioden (100%) und signifikant kleiner als 0 in 55 von 58 (95%) Aufnahmeperioden. Zusätzlich war der Abfall der Regressionslinie der langsamen Komponente signifikant größer als der der schnellen Komponente ($p < 0.001$). Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die schnelle Komponente eine schwache (allerdings auf Populationsebene signifikante) und die langsame Komponente eine starke Abhängigkeit vom Fluoreszenzlevel bei Stimulusbeginn, welcher als Ausdruck der spontanen Hirnaktivität bei Stimulusbeginn zu sehen ist, zeigte.

Der Ton-evozierte langsame Netzwerk-Kalzium-Transient war also besonders klein, wenn er direkt an der Spitze eines spontanen Transienten ausgelöst wurde. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass in diesem Fall das Detektionssystem saturiert, d.h. am oberen Detektionslimit, war und deswegen die vollständige Amplitude der langsamen Komponente nicht erfasst werden konnte, wurde in vier Experimenten Bicucullin, ein Antagonist der hemmenden GABA-Typ A-Rezeptoren, mittels Badapplikation auf die Oberfläche des Gehirns aufgebracht. Diese Substanz verursacht eine der Epilepsie ähnliche abnorme Aktivierung von Nervenzellen und führt zu einem erheblich verstärkten Feuern von Aktionspotentialen (siehe z.B. Badea et al., 2001; Ben-Ari et al., 1981; Chervin et al., 1988). Das Ziel dieser Substanzanwendung war es, Netzwerk-Kalzium-Transienten zu erzeugen, deren Amplituden weit größer waren als die der unter physiologischen Bedingungen beobachteten Transienten. Tatsächlich konnten während topischer Anwendung von Bicucullin Netzwerk-Kalzium-Transienten beobachtet werden, deren durchschnittliche Amplituden um das 4.7-fache größer waren als die der unter Kontrollbedingungen

beobachteten spontan-auftretenden Transienten (Abb. 32, $3 \pm 0.05\% \Delta F/F$ bzw. $12.4 \pm 2.6\% \Delta F/F$; $n=4$ Tiere; 50 Transienten pro Bedingung wurden ausgewertet, Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p<0.05$). Somit kann ausgeschlossen werden, dass sich das Detektionssystem an seinem Detektionslimit befand.

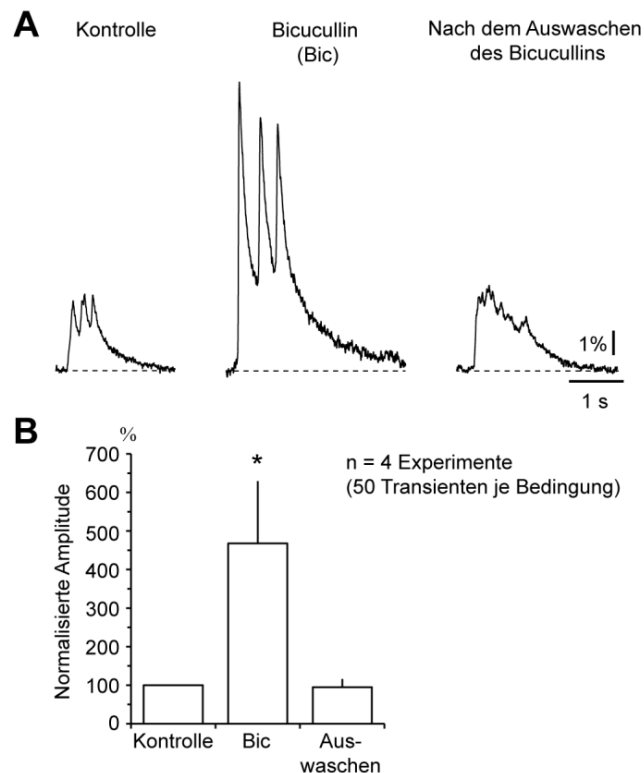


Abb. 32: Keine Saturation des Detektionssystems durch Bicucullin-induzierte Netzwerk-Kalzium-Transienten.

(A) Spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten vor, während und nach Badapplikation von Bicucullin 100 μM . **(B)** Diagramm zur Darstellung der Bicucullin-Wirkung. Gezeigt ist die normalisierte durchschnittliche Amplitude der Netzwerk-Kalzium-Transienten unter den drei Bedingungen ($n=4$ Tiere; 50 Transienten je Bedingung, Kolmogorov-Smirnov-Test, $*p<0.05$).

4.3.6 Netzwerk-Kalzium-Transienten nach reiner Ton-Stimulation

Bisher wurde nur diejenige Netzwerkaktivität analysiert, welche durch weißes Rauschen als Tonstimulus ausgelöst wurden. Da die primären Felder des auditorischen Kortex der Maus bei Betrachtung von Bereichen mit einem Durchmesser $> 250 \mu\text{m}$ eine tonotope Gliederung aufweisen, war zu untersuchen, ob Netzwerk-Kalzium-Transienten durch eine Spezifität für bestimmte Tonfrequenzen gekennzeichnet waren. Verwendet wurden für diese Experimente reine Töne als Stimulus. Dies sind Töne, welche nur aus einer einzigen Frequenz bestehen.

In der Tat konnte so festgestellt werden, dass Netzwerk-Kalzium-Transienten frequenzspezifisches Antwortverhalten aufweisen. So sind in den oberen Bereichen der Abbildungen 33A-C 10 Einzeltransienten (schwarz) und deren Mittelwert (rot), aufgenommen in drei unterschiedlichen Mäusen (Experiment 1-3), gezeigt. Stimuliert wurde mit reinen Tönen, deren Frequenz optimal geeignet war. Diese optimalen Frequenzen waren von Tier zu Tier (getestet in $n=11$ Tieren) verschieden. Die Abbildungen 33A-C zeigen dann in der Mitte Antworten, ebenfalls 10 Einzeltransienten (schwarz) und deren Mittelwert (blau), die nach Stimulation mit reinen Tönen einer Frequenz, die sich von der optimalen Frequenz unterschied, beobachtet werden konnten. Schließlich sind die beiden Mittelwerte direkt verglichen und zur besseren Illustration nur die ersten 500 Millisekunden nach Stimulusbeginn dargestellt (Abb. 33A-C, unten). Dadurch ist zu erkennen, dass die schnelle Komponente nur nach Tonstimulation mit der optimalen Frequenz vorhanden war. Bei Stimulation mit reinen Tönen einer anderen Frequenz fehlte sie hingegen und nur der Ton-evozierte langsame Netzwerk-Kalzium-Transient war nachweisbar. Die mittlere Antwort auf die Gesamtheit aller in den drei Mäusen getesteten reinen Töne sind als Antwortfelder (Fernald und Gerstein, 1972) dargestellt (Abb. 33 D-F). Diese Form der Darstellung beinhaltet die Antwortgröße (dargestellt als Farbe) in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf (x-Achse) und der verwendeten Tonfrequenz (y-Achse).

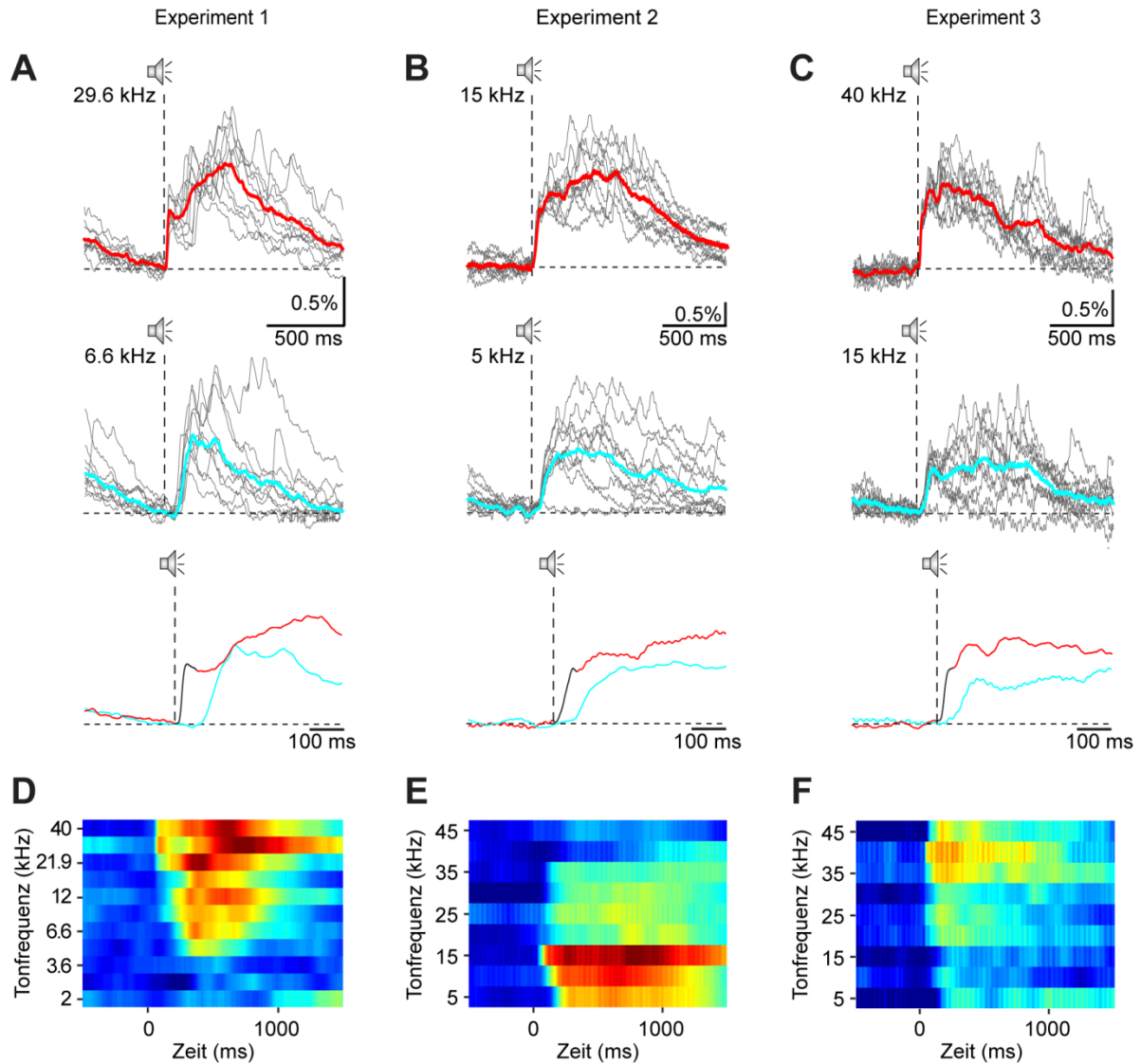


Abb. 33: Netzwerk-Kalzium-Transienten nach Stimulation mit reinen Tönen.

(A-C) Netzwerk-Kalzium-Transienten, aufgenommen in drei verschiedenen Tieren (Experiment 1 – 3), nach Stimulation mit reinen Tönen. Oben: 10 Einzeltransienten (schwarz) und deren Mittelwert (rot) nach Stimulation mit der optimalen Frequenz: (A) 29.6 kHz, (B) 15 kHz, (C) 40 kHz. Mitte: 10 Einzeltransienten (schwarz) und deren Mittelwert (blau) nach Stimulation mit einer nicht-optimalen Frequenz: (A) 6.6 kHz, (B) 5 kHz, (C) 15 kHz. Unten: Vergleich der Mittelwerte. Die schnelle Komponente ist in schwarzer Farbe dargestellt. Deutlich sind die Unterschiede in der Latenz, der Anstiegszeit und der Struktur zwischen den Antworten auf die optimale und nicht-optimale Tonfrequenz-Stimulation. (D-F) „Antwortfelder“ für Experiment 1-3. Gezeigt ist die Antwortgröße (dargestellt als Farbe) in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf (x-Achse) und der verwendeten Tonfrequenz (y-Achse). Die Farbskala korrespondiert mit relativen Fluoreszenzänderungen zwischen - 0.1% (blau) und 1.1% $\Delta F/F$ (rot).

Um diese Beobachtung genauer zu quantifizieren, wurde in 11 Tieren der Frequenzbereich, der entweder die schnelle oder langsame Komponente, als auch derjenige Frequenzbereich, der nur die schnelle Komponente hervorrufen konnte, bestimmt. Da in den Experimenten stets die Lautstärke sowie das Intervall der reinen Töne variiert wurde, konnten in 11 Tieren 42 Bedingungen unterschieden und somit 42 „Antwortfelder“ gebildet werden. In der Mehrheit (36 von 42, 86%) war mindestens eine Frequenz geeignet, schnelle Antworten zu evozieren. Der Bereich, der eine schnelle Antwort erzeugen konnte, war im Median 0.67 Oktaven groß, und in 27 von 36 Fällen war der Frequenzbereich kleiner als 1 Oktave. Der Frequenzbereich, der einen langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten evozieren konnte, war vergleichbar oder größer als der Bereich, der eine schnelle Antwort erzeugte. In der Mehrheit der Fälle (30 von 42, 71%) war dieser Bereich aber kleiner als der insgesamt getestete Frequenzbereich. Dies bedeutet, dass auch die langsame Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten durch einen bestimmten Antwortbereich gekennzeichnet war (durchschnittliche Größe: 2.3 Oktaven). Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die schnelle Komponente durch einen relativ engen Frequenzbereich auslösbar war, während die langsame Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten durch einen vergleichsweise größeren Bereich von Frequenzen ausgelöst werden konnte. Besonders die schnelle Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten zeigte also eine Spezifität für Stimulation mit bestimmten Frequenzen.

4.3.7 Verhältnis zwischen Netzwerk-Kalzium-Transienten und Elektrokortikogramm

Während die frühe, schnell-ansteigende Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten höchstwahrscheinlich mit der frühen Aktionspotential-Antwort, die in zahlreichen elektrophysiologischen Studien beschrieben ist (Hromadka et al., 2008; Linden et al., 2003), korrespondiert, ist das elektrische Korrelat des evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten unbekannt. Eine mögliche Hypothese ist, dass es sich bei dem elektrischen Korrelat um einen Zustand der Gesamtaktivierung des Gehirns handelt, der sich über ausgedehnte Hirnregionen ausbreitet. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine Lichtleiter-basierte Messung lokal im

auditorischen Kortex mit der Messung eines Elektrokortikogramms, welches Hirnaktivität über den größten Teil der ipsilateralen Hirnhemisphäre widerspiegelt, kombiniert (Abb. 34).

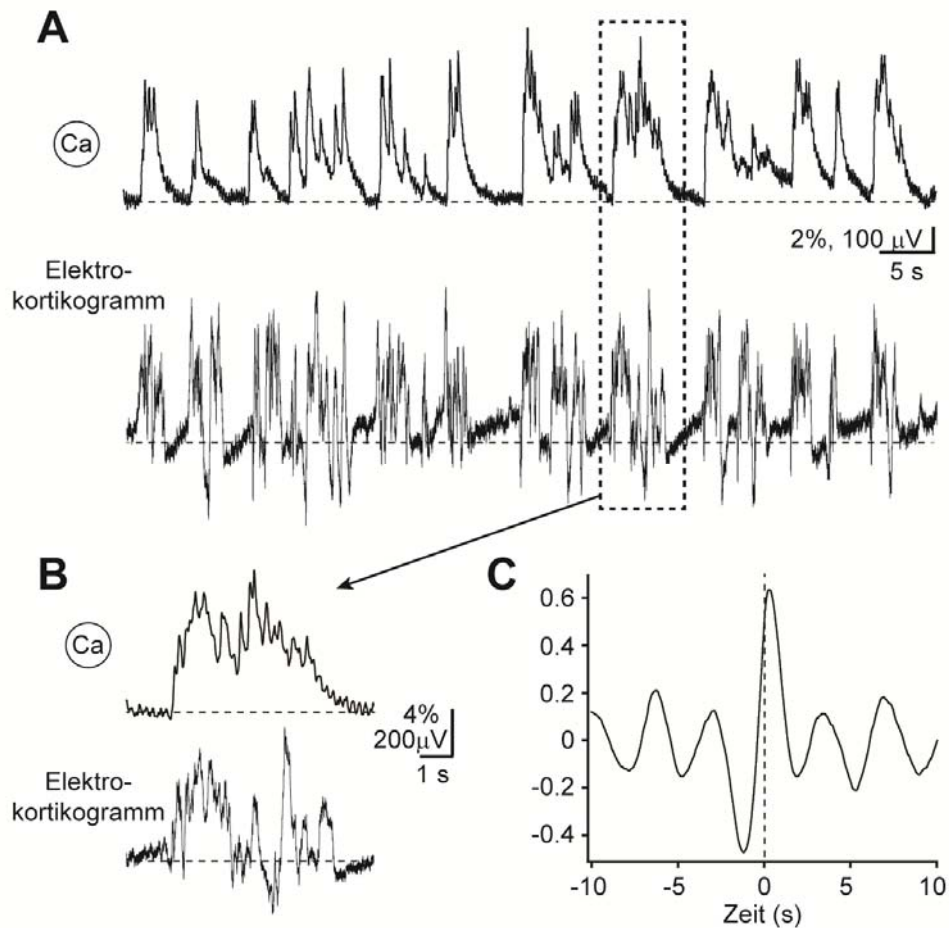


Abb. 34: Elektrisches Korrelat der spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten.

(A) Gleichzeitige Messung des Lichtleiter-basierten Kalzium-Signals (oben) und des Elektrokortikogramms (unten) in Abwesenheit einer Ton-Stimulation. (B) Vergrößerte Darstellung des Zeitabschnittes, der in (A) durch die Box (gestrichelte Linie) markiert ist. (C) Korrelationsanalyse zwischen dem spontanen Faser-Kalzium-Signal und dem Elektrokortikogramm. Die Daten sind dem gleichen Experiment, welches in (A) gezeigt ist, entnommen. Die Korrelationskurve hat ein Maximum mit einer positiven Verzögerung gegenüber dem Zeitpunkt $t = 0$ s, was bedeutet, dass das Kalzium-Signal dem elektrischen Signal nachfolgt.

Die Abbildung 34A zeigt ein typisches Beispiel einer solchen gleichzeitigen Messung des Lichtleiter-basierten Kalzium-Signals (oben) und des Elektrokortikogramms (unten) in Abwesenheit einer Ton-Stimulation. Das Elektrokortikogramm zeigt Übergänge zwischen Perioden der Netzwerkaktivität und Netzwerkinaktivität, die sog. „langsamen Wellen“. Diese treten mit einer Häufigkeit von <1 Hz auf (Crunelli und Hughes, 2010) und sind mit gleichzeitigen Membranpotential-Übergängen von Nervenzellen zwischen dem Ruhemembranpotential und depolarisierten Werten assoziiert (Doi et al., 2007; Steriade et al., 1993b). In den Messungen korrelierten die mit elektrophysiologischen Methoden aufgenommenen langsamen Wellen stark mit den Netzwerk-Kalzium-Transienten. In Abbildung 34B ist ein solches Paar aus spontanem Netzwerk-Kalzium-Transient (oben) und elektrischer langsamer Welle (unten) gezeigt. Während sich die Dauer dieser beiden Signale kaum unterscheidet, ist der Kalzium-Transient gegenüber der langsamen Welle leicht verzögert. Dies zeigt sich besonders deutlich in der Korrelationsanalyse für das Beispiel, welches in A gezeigt ist (Abb. 34C). Die Korrelation besitzt eine Maximum mit einer positiven Verzögerung gegenüber dem Zeitpunkt $t = 0$ s, d.h. das Kalzium-Signal folgt dem elektrischen Signal. Dies war ein typischer Befund in der Analyse der Spontanaktivität: 81% (60/74) der spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten fanden während einer Periode der Netzwerkaktivität statt, d.h. dass spontane Netzwerk-Kalzium-Transienten folgten tatsächlich konsistent den langsamen Wellen.

Interessanterweise veränderte sich dieses zeitliche Verhältnis zwischen Kalzium-Transienten und elektrischem Signal nach Tonstimulation. In diesem Fall war nämlich nun das elektrische Signal gegenüber dem Kalzium-Signal verzögert (Abb. 35A-C). Bei genauerer Betrachtung ließ sich feststellen, dass vor allem die frühe Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten der langsamen Welle voranging. Die langsame Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten hingegen trat gleichzeitig mit der langsamen Welle auf. Um dies genauer beschreiben zu können, wurden 991 Stimuli identifiziert, die (1) nicht während spontanen Netzwerk-Kalzium-Transienten auftraten, (2) nicht während einer langsamen Welle auftraten und (3) einen Netzwerk-Kalzium-Transienten mit einer Latenz von weniger als 50 ms evozierten. In 925 von diesen 991 Stimulationsfällen (93%) wurde eine langsame Welle nach Beginn des Netzwerk-Kalzium-Transienten evoziert (wie in den Beispielen in Abb. 35A-C gezeigt). Die durchschnittliche Latenz dieser langsamen

Welle gegenüber dem Tonstimulus war 325 ± 300 ms (Mittelwert \pm Standardabweichung). Dieser Wert war signifikant kleiner als die typische Zeitspanne zwischen zwei spontan-auftretenden langsamen Wellen (> 1 Sekunde). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten, und hier besonders deren schnelle Komponente, langsame Wellen, welche global in großen Teilen der gleichen Hirnhälfte nachweisbar waren, auslösen konnte.

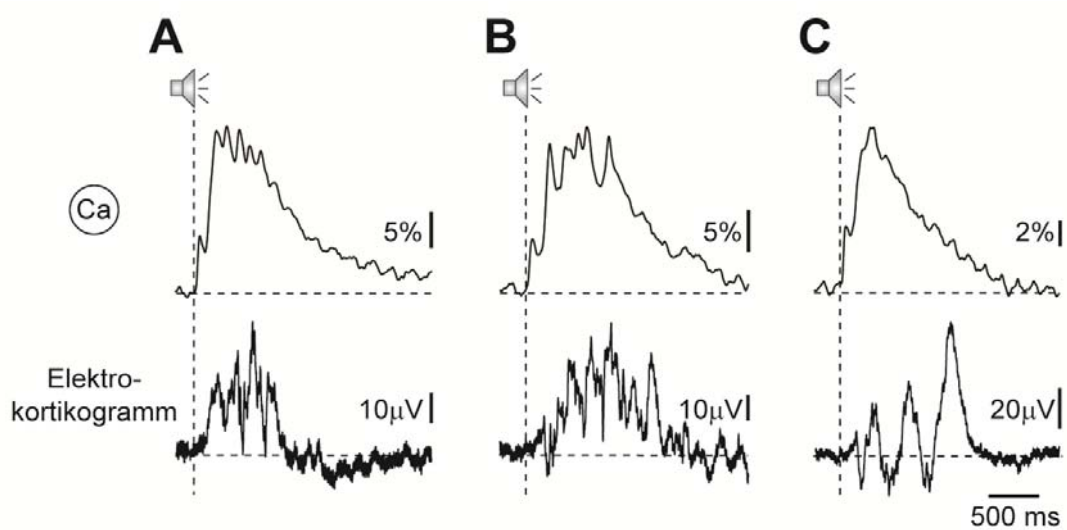


Abb. 35: Elektrisches Korrelat der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten.

(A-C) Drei Beispiele von Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten und dem gleichzeitig elektrisch-aufgenommenen langsamen Wellen. Nach Tonstimulation folgt das Elektrokortikogramm-Signal oftmals dem Kalzium-Signal nach.

4.3.8 Optogenetische Auslösung der langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten

Um den Mechanismus, der den langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten (spontan oder Ton-evoziert) zugrunde liegt, aufzuklären, wurde ein optogenetischer Ansatz verwendet. So ist bekannt, dass die mit den elektrischen langsamen Wellen assoziierten Übergänge des Nervenzell-Membranpotentials vom hyperpolarisierten „Down-state“ zum depolarisierten „Up-state“ in der kortikalen Schicht 5 ausgelöst werden (Sanchez-Vives und McCormick, 2000). Somit war diese Schicht auch ein mögliches Kandidatenareal für die Auslösung der langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten. Deswegen wurden für diese Experimente eine transgene Mauslinie verwendet (Arenkiel et al., 2007), die den lichtabhängigen Ionenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) unter dem thy1-Promotor im eben dieser kortikalen Schicht 5 exprimiert (Abb. 36A). ChR2 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, welcher sich durch Anwendung von Licht der Wellenlänge 488 nm öffnet und dadurch eine Depolarisation von Nervenzellen bedingt (Yizhar et al., 2011a). Zur ChR2-Aktivierung wurden Lichtpulse von 10 ms Dauer mittels derselben Faser, welche auch die Kalzium-abhängige Fluoreszenz sammelte, appliziert und damit also gezielt Schicht 5 Pyramidenzellen depolarisiert (Adelsberger et al., 2011). Diese Methode erzeugte dann auch tatsächlich verlässlich mit dem Lichtleiter detektierbare Kalzium-Transienten (Abb. 36B-C, rechts). Diesen Transienten fehlte die schnelle Komponente, wie sie bei Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten, die an derselben Färbestelle aufgenommen worden waren, beobachtet werden konnte (Abb. 36B-C, links). Die Struktur der ChR2-evozierten Kalzium-Transienten ähnelte also derjenigen der spontanen bzw. der langsamen Komponente der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten (Abb. 36D; n=253 Ton-evozierte, 213 spontane und 159 optogenetisch-evozierte Kalzium-Transienten; Mann-Whitney-Test, Ton-ChR2: Anstiegszeit $p=0.11$, Halbwertsbreite $p=0.11$, Abfallszeitkonstante $p=0.32$, Spontan-ChR2: Anstiegszeit $p=0.62$, Halbwertsbreite $p=0.18$, Abfallszeitkonstante $p=0.81$).

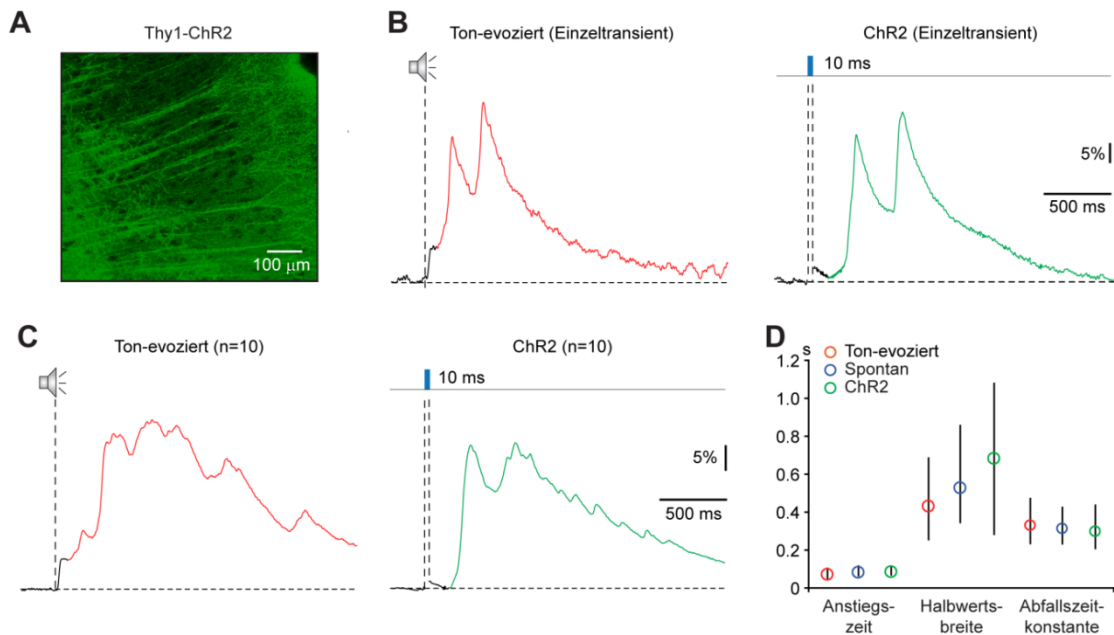


Abb. 36: Optogenetische Auslösung der langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten durch Aktivierung von kortikalen Schicht 5 Pyramidenzellen.

(A) Expression des Channelrhodopsin-2 (ChR2) in Schicht 5 Pyramidenzellen in der ChR2-Thy1 transgenen Mauslinie. (B-C) Einzeltransienten (B) und Mittelwert aus 10 Einzeltransienten (C) nach Ton- (links) und ChR2-Lichtstimulation (rechts). (D) Anstiegszeiten, Halbwertsbreiten und Abfallszeitkonstanten der langsamen Komponente der Ton-evozierten (rot, n=253 Transienten in 10 Tieren), spontanen (blau, n=213 Transienten in 10 Tieren) und optogenetisch-ausgelösten (grün, n=159 Transienten in 5 Tieren) Netzwerk-Kalzium-Transienten. Alle Verteilungen sind als Median (Kreis) und Interquartilsabstand (Linie) dargestellt. (Mann-Whitney-Test, Evoziert-ChR2: Anstiegszeit $p=0.11$, Halbwertsbreite $p=0.11$, Abfallszeitkonstante $p=0.32$, Spontan-ChR2: Anstiegszeit $p=0.62$, Halbwertsbreite $p=0.18$, Abfallszeitkonstante $p=0.81$).

Aus diesen Experimenten lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Aktivität von Pyramidenzellen, welche in der Schicht 5 gelegen sind, eine zentrale Rolle in der Auslösung der hier beschriebenen langsamen Netzwerkaktivität spielt. Dies steht nach bisherigen Erkenntnissen im Gegensatz zu dem Ursprung der schnellen Komponente, welche wahrscheinlich durch Eingänge aus dem Thalamus in der kortikalen Schicht 4 ausgelöst wird. Darüber hinaus zeigt dies, dass die langsame Komponente der Netzwerk-Kalzium-Transienten durch Ereignisse, die auf die Großhirnrinde beschränkt sind, auslösbar ist. Dennoch kann auch jetzt ein Beitrag von subkortikalen Hirnregionen, wie z.B. des Thalamus, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5 Diskussion

Die Lichtleiter-basierte Fluoreszenz-Mikroendoskopie ist eine Technik zur Analyse überschwelliger Populationsaktivität auf der Ebene lokaler Netzwerke im Gehirn von Mäusen. Bis jetzt war diese Technik nur für Kalzium-Messungen im parietalen Kortex neugeborener, 3-4 Tage alter, Mäuse verwendet worden (Adelsberger et al., 2005). Wie in dieser Doktorarbeit nun dargestellt, ist diese Technik auch dazu geeignet, Netzwerkaktivität in älteren, 1-2 Monate-alten, anästhesierten oder wachen Mäusen zu untersuchen. Netzwerkaktivität kann mit diesem Ansatz gleichzeitig in mehreren Hirnregionen sowie in kaum zugänglichen tieferen Hirnregionen aufgenommen werden.

So konnten nun zum ersten Mal spontane und sensorisch-evozierte Populations-Kalzium-Signale in den Kernfeldern des auditorischen Kortex der Maus charakterisiert werden (Grienberger et al., 2012a). Während Ton-evozierte Kalzium-Signale auf Einzelzellebene (Bandyopadhyay et al., 2010; Rothschild et al., 2010) oder auf Ebene von Dendriten im auditorischen Kortex (Chen et al., 2011) beschrieben sind, war die Kalzium-Signalgebung auf Ebene größerer Nervenzellpopulationen bisher vollkommen unbekannt.

In dieser Arbeit wurden die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten beschrieben, die (1) sich ihrer zeitlichen Struktur nicht von den spontan-beobachtbaren Kalzium-Transienten unterschieden, (2) mit einer Verzögerung auftraten, die beträchtlich länger war, als diejenige, welche bisher für sensorische Antworten im primären auditorischen Kortex beschrieben war, (3) tendenziell eine größere Amplitude besaßen als die schnelle Antwortkomponente, (4) nach Stimulation mit reinen Tönen im Vergleich zur schnellen Antwortkomponente ein unspezifisches Antwortverhalten besaßen, (5) mit elektrischen langsamen Wellen assoziiert waren und (6) durch optogenetische Stimulation von Pyramidenzellen in der kortikalen Schicht 5 ausgelöst werden konnten.

Durch diese Ergebnisse wird die Wechselwirkung zwischen kortikaler spontaner und sensorisch-evozierter Netzwerkaktivität deutlich und ein Beitrag zu einem verbesserten Verständnis dieser Form von Hirnaktivität geleistet.

5.1 Neuronale Aktivität als Grundlage der Netzwerk-Kalzium-Transienten

Netzwerk-Kalzium-Transienten sind ein Summen-Signal, welches auf Kalzium-Signalen in den Zellkörpern der Neuronen und im diese umgebenden Neuropil beruht. Durch Kombination von Zwei-Photonen-basierten Kalzium-Messungen und anschließenden Lichtleiter-Messungen konnte festgestellt werden, dass Nervenzellen und Neuropil zu gleichen Teilen zu dem mit der Glasfaser aufgenommenen Kalzium-Signal beitragen (Abb. 27). Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass die gleichzeitige Aktivität von mindestens 20 Neuronen zusammen mit dem sie umgebenden Neuropil notwendig ist, um einen Netzwerk-Kalzium-Transienten zu erzeugen (Abb. 29). Astrozytäre Kalzium-Signale unterscheiden sich dramatisch in Auftrittshäufigkeit und Zeitverlauf von den Netzwerk-Kalzium-Transienten und tragen nicht zu diesem Signal bei (Abb. 28).

Die Kalzium-Signale in Nervenzellkörpern spiegeln die Aktionspotential-Aktivität dieser Nervenzellen wieder, wohingegen die Kalzium-Signale im Neuropil, d.h. in den die Zellen umgebenden Zellfortsätzen, ganz besonders die Aktionspotential-Aktivität in präsynaptischen axonalen Fortsätzen abbilden (Berger et al., 2007; Kerr et al., 2005; Rochefort et al., 2009). Postsynaptische Kalzium-Signale, wie sie in den Nervenzell-Dendriten vorkommen, tragen hingegen kaum oder nicht zum Neuropil-Signal bei (Kerr et al., 2005). Dies steht im starken Kontrast zu anderen Methoden, welche, im Gegensatz zu der hier verwendeten AM-Beladungstechnik, zur Anfärbung einzelner Nervenzellen genutzt werden können. Dies sind Patch-Clamp-Messungen, bei denen über eine Glas-Pipette durch ein Loch in der Zellmembran Farbstoff in die Zelle gelangt („whole-cell configuration“), (Eilers und Konnerth, 2009) oder die Einzelzell-Elektroporation (Judkewitz et al., 2009). Die Einzelzell-Anfärbung erlaubt es dann, genau diese postsynaptische Kalzium-Signale in einzelnen Dendriten oder sogar dendritischen Dornfortsätzen aufzulösen (Chen et al., 2011; Jia et al., 2010; Kitamura und Häusser, 2011; Takahashi et al., 2012; Varga et al., 2011).

Zusammenfassend bilden die Netzwerk-Kalzium-Transienten also die Aktionspotentialaktivität eines lokalen Netzwerkes von Nervenzellen ab und repräsentieren damit die Ausgänge dieses Nervenzell-Ensembles.

5.2 Eigenschaften der Fluoreszenz-Mikroendoskopie *in vivo*

Netzwerk-Kalzium-Transienten, wie sie mit dem Lichtleiter-basierten Mikroendoskopie-Verfahren aufgenommen werden können, spiegeln also die Aktivierung eines lokalen Nervenzell-Netzwerkes wieder. Dafür wird die Faser, vergleichbar einer Elektrode in elektrischen Messungen, als ein „Pixel“ wahrgenommen. Dieses System erzeugt kein Bild und bietet keine zelluläre Auflösung. Studien struktureller Vorgänge sind mit dieser Technik somit nicht möglich. Aufgenommen wird ein Summen-Kalzium-Signal, was die integrierte gleichzeitige Aktionspotential-Aktivität der lokalen Nervenzellpopulation, welche sich in dem mit der Glasfaser ausgeleuchteten Bereich befindet, widerspiegelt (Abb. 9 und 26). Die Grundfläche dieses kegelförmigen Volumens hat bei Verwendung eines 200 μm -Durchmesser Lichtleiters einen Durchmesser von 200-400 μm , während seine Tiefe 400-600 μm beträgt. Dieses Volumen entspricht beispielsweise etwa 20% der Fläche der primären Felder des auditorischen Kortex und deckt somit also nur einen Teil des tonotop organisierten Areals ab (z.B. Stiebler et al., 1997). Bestätigt wird dies auch durch die funktionellen Messungen, in denen Tonfrequenz-spezifische Antworten nachgewiesen werden konnten (Abb. 33). Diese Methode besitzt also ausreichend Spezifität, um funktionell-unterschiedliche Hirnareale nachzuweisen.

Netzwerkaktivität, erzeugt in Ensembles von gleichzeitig aktiven Nervenzellen, ist essentiell für verschiedenste Vorgänge in unserem Gehirn, wie z.B. sensorische Verarbeitung, Lernprozesse, Gedächtnisbildung und sogar Bewusstseinsbildung (Engel et al., 2001; Gray et al., 1989). Derartige Prozesse werden oft von Gruppen von Nervenzellen ausgeführt, welche sich über verschiedene Bereiche des Gehirns verteilen und über flexible Verbindungen kommunizieren (Buzsaki und Draguhn, 2004; Harris et al., 2003; Varela et al., 2001). Ein einfaches Beispiel dafür ist die Angstkonditionierung, ein Lernparadigma, was eine Vielzahl von Nervenzell-Ensembles in unterschiedlichen Hirnregionen einbezieht. Das sind neben der Amygdala (Johansen et al., 2011; Sotres-Bayon und Quirk, 2010) verschiedene Regionen der Großhirnrinde, darunter die primären sensorischen Areale, z.B. der primäre auditorische Kortex, sowie assoziative Areale, wie der präfrontale und der perirhinale Kortex (Kholodar-Smith et al., 2008; Leon et al., 2008; Nieuwenhuis und Takashima, 2011). Außerdem ist auch noch der Hippokampus beteiligt (Bangasser et

al., 2006). Der genaue Mechanismus, wie diese Nervenzell-Gruppen miteinander in Kontakt treten, ist nicht bekannt. Deswegen ist es besonders interessant, gleichzeitig Aktivität in verschiedenen Hirnarealen beobachten zu können, wie es mit der Lichtleiter-basierten Fluoreszenz-Mikroendoskopie möglich ist (Abb. 16). Damit können zu gleicher Zeit Aktivierungsmuster in verschiedenen Hirnarealen beobachtet und dann mittels optogenetischer Ansätze sogar beeinflusst werden. Die Lichtleiter-Methode erlaubt außerdem den Zugang zu tieferen Hirnregionen. In dieser Arbeit ist dies anhand des Hippokampus gezeigt (Abb. 15 und 16). Natürlich sind auch Messungen in anderen Hirnarealen vorstellbar, z.B. dem Thalamus, der Amygdala oder dem Hirnstamm. Allerdings müssten für derartige Messungen sowohl die Glaspipette zur Anfärbung mit dem chemischen Kalzium-Indikator als auch die Glasfaser durch das Hirngewebe bewegt werden. Dies würde zwangsläufig zu einer Schädigung des Hirngewebes führen. Diese Problematik sollte bei der experimentellen Planung beachtet werden. Mögliche Ansätze zur Minimierung des Gewebeschadens sind die Verwendung von transgenen Mauslinien, die genetisch-kodierte Kalzium-Indikatoren exprimieren (Looger und Griesbeck, 2012), oder die Verwendung von Lichtleitern mit geringerem Durchmesser (Abb. 21 und 22). Die Lichtleiter-Technik erlaubt außerdem die Analyse von Netzwerkaktivität in wachen und sich bewegenden Tieren (Abb. 17). Damit wird ein möglicher Einfluss des Anästhetikums auf die gemessene Hirnaktivität vermieden (Collins et al., 2007; Movshon et al., 2003; Niell und Stryker, 2010). Außerdem wird eine Kombination mit Verhaltensbeobachtung möglich und die Tiere können ihr gesamtes Repertoire an Bewegungen und Handlungsweisen ausschöpfen.

5.3 Vergleich mit anderen Methoden zur Netzwerkanalyse *in vivo*

Lichtleiter-basierte Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse von neuronaler Netzwerkaktivität verwendet und also solche sollen sie im Folgenden mit anderen ausgewählten Methoden zur Untersuchung von Populationsaktivität verglichen werden.

5.3.1 Intrinsisch optische Signale

Die intrinsisch optischen Signale beruhen auf einer Änderung der optischen Eigenschaften des Hirngewebes in Folge erhöhter Hirnaktivität (Grinvald et al., 1988). Der Ursprung dieser Signale ist vielfältig und beinhaltet beispielsweise eine Änderung des Blutsauerstoffgehalts, welche sowohl durch eine Erhöhung des Sauerstoffbedarfs der aktiven Nervenzellen als auch durch eine aktivitätsabhängige Blutfluss-Änderung verursacht wird. Außerdem kommt es zu Änderungen im kortikalen Blutvolumen, was zusätzlich die Lichtabsorptions- und Lichtstreuungseigenschaften des Hirngewebes beeinflusst (Grinvald et al., 2005b). Die Hauptkomponente der intrinsisch optischen Signale ist aber der initiale Abfall des Blutsauerstoffgehaltes, da deren Messung sich vor allem die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin zunutze macht (Zepeda et al., 2004). Im Gegensatz zu Kalzium-Signalen sind die intrinsisch optischen Signale also nur sehr indirekt und nicht linear mit neuronaler Aktivität assoziiert. Sie sind damit auch zwangsläufig ungeeignet, unterschwellige und überschwellige neuronale Aktivität zu unterscheiden. Intrinsisch optische Signale haben außerdem, im Vergleich zu den Kalzium-Signalen, einen langsameren zeitlichen Verlauf. So war in einem Experiment im Riechkolben der Maus das Maximum der Duftstoff-evozierten intrinsischen Signale erst 5 Sekunden nach dem Maximum der Kalzium-Signale erreicht (Wachowiak und Cohen, 2003). Außerdem haben sie in der Regel eine kleine Amplitude (Mrsic-Flogel et al., 2003). Dies macht Aufnahmen über längere Zeit (im Bereich von Minuten bis Stunden) und anschließende Mittelwertbildung nötig. Der wichtige Vorteil dieser Methode ist jedoch deren geringe Invasivität, da keinerlei exogene Farbstoffzufuhr notwendig ist. So wird

diese Methode vor allem dazu verwendet, einmalig oder auch wiederholt über einen längeren Zeitraum statische funktionelle Einheiten, z.B. Orientierungssäulen im visuellen Kortex von Katzen (Grinvald et al., 1986; Sengpiel et al., 1999), zu identifizieren. Intrinsisch optische Signale können auch in nicht-anästhesierten, fixierten Tieren, z.B. in Affen, detektiert werden (Grinvald et al., 1991). Dynamische Änderungen der Hirnaktivität im Millisekunden- oder Sekundenbereich, wie mittels der Kalzium-Signale, können mit dieser Technik jedoch sicherlich nicht untersucht werden.

5.3.2 Verwendung von spannungsabhängigen Farbstoffen

Fluoreszierende spannungsabhängige Farbstoffe erlauben, wenn in der Zellmembran lokalisiert, eine direkte Messung elektrischer Aktivität (Homma et al., 2009). Die Amplitude dieser Signale ist dabei sowohl vom Membranpotential als auch der angefärbten Zellmembranfläche abhängig. Sie ermöglichen so in den Nervenzellen den Nachweis von Depolarisation und Hyperpolarisation sowie von Aktionspotentialen (Peterka et al., 2011). Da dendritische Membranen im Vergleich zu den Membranen der Zellkörper eine weit größere Oberfläche besitzen, ist das aufgenommene Signal jedoch von den unterschwelligen postsynaptischen Potentialen dominiert (Grinvald und Hildesheim, 2004). *In vivo* kann mit diesen Farbstoffen eine räumliche Auflösung von 50-100 μm erreicht werden (Grinvald et al., 2005a). Dabei ist nicht die Detektortechnologie der limitierende Faktor, vielmehr sind dafür das eher unvorteilhafte Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Phototoxizität als Gründe zu nennen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden spannungsabhängige Farbstoffe *in vivo* in Maus oder Ratte mit der Detektion durch Faserbündel (Ferezou et al., 2006), GRIN-Linsen (Fisher et al., 2004) oder Weitfeld-Mikroskopie (Mohajerani et al., 2010; Orbach et al., 1985; Song et al., 2006; Tsodyks et al., 1999; Xu et al., 2007) kombiniert. Die Anfärbung für diese Anwendungen erfolgte stets durch topische Applikation auf die kortikale Oberfläche. Die Eindringtiefe bei der Weitfeldmikroskopie konnte mittels kombinierter elektrophysiologischer und Weitfeld-Fluoreszenzmessung im Maus-Barrel-Kortex ermittelt werden (Petersen et al., 2003a). Dabei zeigte sich, dass das spannungsabhängige Fluoreszenz-Signal vor allem ein Summensignal aus den dendritischen postsynaptischen Potentialen der

oberflächlichen kortikalen Schichten (bis zu Schicht 2/3) darstellt. Messungen in wachen Tieren sind möglich (Petersen, 2009). In Affen ermöglichte die Entwicklung einer artifiziellen Dura mater wiederholte Messungen über einen Zeitraum von mehr als 1 Jahr hinweg (Arieli et al., 2002; Slovin et al., 2002). In Mäusen oder Ratten sind chronische Messungen bis jetzt nicht durchgeführt worden, möglicherweise aufgrund der Schwierigkeit der mehrmaligen Anfärbung mit den synthetischen Spannungs-Indikatoren.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass spannungsabhängige und Kalzium-abhängige Farbstoffe zur Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen geeignet sind. Während Kalzium-Signale die überschwellige Aktionspotential-Aktivität von Nervenzellen widerspiegeln, sind die mit dem Spannungs-Indikator gemessenen Signale von der postsynaptischen unterschwelligen Aktivität dominiert. Die Kalzium-Signale decken somit die Ausgangsseite von Nervenzellen ab, während spannungsabhängige Farbstoffe eher dazu geeignet sind, die Eingangsseite von Nervenzellen zu untersuchen. Genau diese Tatsache wurde von Berger und Kollegen (2007) ausgenutzt, um im Barrel-Kortex von Mäusen die Dynamiken von unter- und überschwelliger Aktivität kontrastieren zu können.

5.3.3 Elektrische extrazelluläre Messungen

Transmembrane Ionenströme als Teil von aktiven zellulären Vorgängen an Dendriten, Zellkörpern, Axonen oder an präsynaptischen Endigungen überlagern sich zu jeder Zeit an jedem beliebigen Ort und erzeugen so ein Potential (Buzsaki et al., 2012). Der Unterschied im Potential zwischen zwei Orten erzeugt ein elektrisches Feld, welches mittels einer extrazellulär positionierten Elektrode aus Glas (gefüllt mit einer leitenden Lösung), Metall oder Silikon gemessen werden kann. Prinzipiell können alle Zelltypen zum elektrischen Feld beitragen, ihr relativer Anteil hängt allerdings von ihrem anatomischen Aufbau ab. So steuern Pyramidenzellen mit ihrer relativ starken räumlichen Trennung von Dendritenbaum und Zellkörper mehr zum elektrischen Feld als Zelltypen mit einem eher symmetrischen Zellaufbau bei. Das elektrische Signal im Extrazellulärraum kann dann anhand des Frequenzspektrums aufgeteilt werden. Die eher niederfrequenten Anteile (z.B. < 100 Hz) bilden das lokale Feldpotential, die hochfrequenten Anteile (z.B. > 300 Hz) reflektieren die

summierte Aktionspotential-Aktivität aller Nervenzellen, die sich im Messgebiet der Elektrode befinden, die sog. Multiunit-Aktivität (MUA). Wie die Lichtleiter-basierte Mikroendoskopie erlauben Extrazellulärmessungen Aufnahmen an mehreren Orten gleichzeitig, ermöglichen Zugang zu tiefen Hirnstrukturen und haben eine hohe zeitliche Auflösung im Submillisekundenbereich. Die besondere Stärke der extrazellulären Messungen ist, dass sie routinemäßig mit Verhaltensstudien in wachen, sich frei bewegenden Tieren kombiniert werden (siehe z.B. Ainsworth und O'Keefe, 1977; Anstrom und Woodward, 2005; Chrobak und Buzsaki, 1996; Hafting et al., 2005; Sakata und Brainard, 2008; Simons et al., 1992; Steinschneider et al., 1995). Auch wiederholte Messungen sind aufgrund von etablierten chronischen Präparationen möglich (Kipke et al., 2008).

Die Abgrenzung zur Lichtleiter-basierten Methode liegt in der Herkunft des aufgenommenen Signals begründet. Im Gegensatz zur Kalzium-Messung spiegelt das lokale Feldpotential hauptsächlich die Gesamtheit der unterschwellig synaptischen Potentiale wieder (Elul, 1971). Dabei spielt die zeitliche Koordination, d.h. das Ausmaß der Synchronisierung, der Signalquellen eine entscheidende Rolle. Deren jeweiliger Beitrag nimmt zusätzlich mit zunehmender Entfernung von der Elektrode ab. Bezüglich der Größe des tatsächlichen Aufnahmegebietes einer Feldpotential-Elektrode gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben, die einen Bereich von 200 μm bis zu mehreren Millimetern abdecken (Destexhe et al., 1999; Katzner et al., 2009; Kreiman et al., 2006; Nauhaus et al., 2009; Nelken und Ulanovsky, 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie, durchgeführt im auditorischen Kortex von Makaken, bestätigte, dass das lokale Feldpotential in der Tat einen Mix aus lokalen Potentialen und Potentialen aus einer Entfernung im Millimeter- oder sogar Zentimeterbereich darstellt (Kajikawa und Schroeder, 2011). Diese Werte entsprechen in etwa oder überschreiten sogar die Größe des gesamten auditorischen Kortex der Maus. Die Lichtleiter-basierte Mikroendoskopie kann hingegen Kalzium-Signale in umrissenen Unterbereichen der primären Felder des auditorischen Kortex der Maus detektieren. Somit ist sie im Vergleich zum lokalen Feldpotential spezifischer in Bezug auf den Aufnahmebereich.

Zusätzlich zur Messung des lokalen Feldpotentials können extrazelluläre Metallelektroden auch dazu verwendet werden, Aktionspotential-Aktivität von mehreren Nervenzellen gleichzeitig aufzunehmen (Multiunit-Aktivität, MUA) (Buzsaki, 2004). Soll nach dem Experiment anhand Form und Amplitude des elektrischen

Signals Aktionspotentiale einer einzigen mutmaßlichen Nervenzelle zugewiesen werden, ist allerdings die Positionierung von mehr als einer Messelektrode im Extrazellulärraum erforderlich (Hill et al., 2011). Das kann z.B. in Form von Multi-Elektroden-Arrays, Stereotroden, Tetroden oder vertikalen Silikon-Elektroden geschehen (Churchland et al., 2007; Gray et al., 1995; McNaughton et al., 1983; Sakata und Harris, 2009). Eine korrekte Aktionspotential-Zuweisung ist dennoch schwierig oder sogar unmöglich, falls benachbarte Nervenzellen synchron Aktionspotentiale feuern. In diesem Fall ist es erforderlich, ausschließlich von einer einzigen Nervenzelle aufzunehmen („Single unit“-Aktivität). Der Einzugsbereich einer Elektrode für die MUA-Messung beträgt typischerweise 100-200 μm (Abeles, 1982; Henze et al., 2000). Dies ist mit dem Bereich vergleichbar, der zu den Netzwerk-Kalzium-Transienten beiträgt. Somit ist die Multiunit-Aktivität dem Fluoreszenz-Mikroendoskopie-Verfahren bzgl. des Messgebietes und des Entstehungsmechanismus am ähnlichsten.

	Haupt-Entstehungsmechanismus	Räumliche Auflösung	Nachweis von Einzelzellaktivität	Zeitliche Auflösung im Subsekunden-Bereich
Lichtleiter-basierte Mikroendoskopie	Aktionspotentiale	50 - 600 μm (Glasfaser-abhängig)	-	+
Intrinsisch optische Signale	Änderung im Blutsauerstoffgehalt und im Blutvolumen	~ 20 μm	-	-
Spannungs-abhängige Farbstoffe	Postsynaptische Potentiale	50 - 100 μm	-	+
Lokales Feldpotential	Postsynaptische Potentiale	~ 1 mm	-	+
Multiunit-Aktivität	Aktionspotentiale	100 - 200 μm	+	+

Tabelle 1: Vergleich der Methoden zur Netzwerkanalyse *in vivo*.

Diese Angaben beziehen sich spezifisch auf die *in vivo*-Anwendung dieser Techniken (siehe Text).

5.4 Charakterisierung der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten

5.4.1 Zellulärer Ursprung der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten

Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten, nachgewiesen in den Kernfeldern des auditorischen Kortex der Maus als Ausdruck dortiger Netzwerkaktivierung, bestehen aus zwei eindeutig unterscheidbaren Komponenten: aus einem frühen, schnell-ansteigenden Transienten und diesem nachfolgend aus einem späten, langsam-ansteigenden Kalzium-Transienten. Die frühe Komponente fehlt in spontanen und optogenetisch-erzeugten Kalzium-Signalen (Abb. 24 und 36) und ist höchstwahrscheinlich Ausdruck von Signaleingängen aus dem auditorischen Thalamus, welche in der unteren Schicht 3, Schicht 4 und der Grenze zwischen Schicht 5 und 6 der Großhirnrinde ankommen (Kimura et al., 2003; Romanski und LeDoux, 1993; Winer und Lee, 2007).

Aber was ist nun der Ursprung des langsamen Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten? Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, dass beide Komponenten der Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten in unterschiedlicher Weise vom Ausmaß der Spontanaktivität bei Stimulusbeginn abhängig waren (Abb. 30 und 31). Der frühe Transient zeigte, wenn überhaupt, eine geringe Abhängigkeit vom Aktivitätslevel zu Stimulusbeginn, während die langsame Komponente sehr stark von diesem Aktivitätslevel abhängig war. Spontaner und Ton-evozierter langsamer Netzwerk-Kalzium-Transient schlossen sich also effektiv gegenseitig aus. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass spontane und Ton-evozierte langsame Netzwerk-Kalzium-Transienten auf die Aktivität der gleichen oder zumindest überlappenden Nervenzellpopulationen zurückgehen. Aufgrund der durchgeführten Zwei-Photonen-Experimente kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die spontanen und Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten auf jeweils kleine Anstiege in der Aktionspotential-Aktivität einer sehr großen Population von Nervenzellen zurückzuführen sind, die verstreut in der gesamten kortikalen Säule (einschließlich Schicht 2/3) zu finden ist. Ein Aktivitätsanstieg um wenige Aktionspotentiale, welcher in vielen Nervenzellen zu finden ist, würde nämlich

einen großen Fluoreszenzanstieg, wie im Falle der evozierten langsamen Transienten vorliegend, erklären. Weiterhin ist festzustellen, dass die optogenetische Aktivierung von Schicht 5 Pyramidenzellen Kalzium-Signale erzeugte, welche den Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten sehr ähnlich waren (Abb. 36). Dies legt also als Entstehungsmechanismus der Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten folgendes nahe: nach Tonstimulation führen die Eingänge aus dem Thalamus zu einer schnellen und synchronisierten Aktivität in der Schicht 4 des Kortex. Diese Aktivität wandert von dort in die tieferen Schichten, wo in Schicht 5 ein langsamer Netzwerk-Kalzium-Transient ausgelöst wird. Dieser ist Ausdruck der Aktivierung eines Nervenzell-Netzwerkes, welches über die verschiedenen Schichten des auditorischen Kortex verteilt zu finden ist.

5.4.2 Bedeutung der Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten

Die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten stellen im Vergleich zu der gut-bekannteren schnellen Aktionspotentialantwort, welche nach der Tonstimulation mit einer Verzögerung von ungefähr 20 ms auftritt (Hromadka et al., 2008; Sakata und Harris, 2009), eine verzögerte Form der evozierten Nervenzell-Aktivität dar. Auch in elektrophysiologischen Studien, die *in vitro* und *in vivo* durchgeführt wurden, sind derartige langsame Antworten beschrieben (Campbell et al., 2010; Metherate und Cruikshank, 1999; Moshitch et al., 2006; Sally und Kelly, 1988; Wang et al., 2005).

Metherate und Cruikshank (1999) zeigten zum Beispiel *in vitro* in der kortikalen Schicht 4 die Existenz eines Potentials mit kurzer Latenz, welches durch elektrische Thalamus-Stimulation erzeugt werden konnte. Diesem nachfolgend fanden die Autoren ein langsames Potential, welches auf polysynaptischer Aktivierung beruht und sich intrakortikal ausbreitet. Moshitch und Kollegen (2006) fanden bei Messungen in Halothan-anästhesierten Katzen späte Aktionspotentialantworten, die für hunderte von Millisekunden nach Stimulusbeginn anhielten und mittels reiner Töne evoziert werden konnten. Harris und Kollegen schließlich demonstrierten in mehreren Artikeln mittels Analyse der Multiunit-Aktivität

die Existenz einer Ton-evozierten Aktivität, welche bedeutend länger als der Tonstimulus selbst war (Bartho et al., 2009; Curto et al., 2009; Sakata und Harris, 2009). Diese Aktivität könnte sehr wohl das elektrische Korrelat der späten langsamen Ton-evozierten Netzwerk-Kalzium-Transienten darstellen. Denn die in diesen Studien gefundene Tonstimulus-abhängige Anzahl der Aktionspotentiale in jeder Nervenzelle war relativ gering, die Summe aller Tonstimulus-abhängigen Aktionspotentiale hingegen war beträchtlich.

5.4.3 Ton-evozierte Netzwerk-Kalzium-Transienten und elektrische langsame Wellen

Die spontanen sowie die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten korrelierten stark mit den im Elektrokortikogramm (ECoG) gefundenen langsamen Wellen (Abb. 34 und 35). Jedoch ist hervorzuheben, dass diese, im Gegensatz zu den lokalen Kalzium-Signalen, global in der Großhirnrinde nachweisbar waren.

Die langsamen Wellen, welche im ECoG oder in Messungen des lokalen Feldpotentials nachgewiesen werden können, stellen Fluktuationen zwischen Perioden der Netzwerkaktivierung und der Netzwerk-Inaktivität dar (Steriade et al., 1993c). Die Frequenz dieser Wellen ist stark vom Bewusstseins- und Verhaltensstatus des Versuchstieres abhängig (Steriade et al., 1993a). So kann die Dauer der Perioden der Netzwerkinaktivität einige Sekunden (in tiefer Anästhesie) bis zu einigen Millisekunden (in wachen Tieren) betragen (Poulet und Petersen, 2008; Steriade et al., 1993c). Die langsamen Wellen sind eng mit Übergängen des Nervenzell-Membranpotentials vom hyperpolarisierten „Down-state“ zum depolarisierten „Up-state“ assoziiert (Steriade et al., 1993b, c). Dies führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Aktionspotentialen. Nervenzellen zeigen also, korreliert mit diesen langsamen Wellen, Anstieg bzw. Abfall in der Aktionspotentialfrequenz (Luczak et al., 2009).

So sind diese langsamen Wellen höchstwahrscheinlich das globale elektrische Gegenstück der lokal nachweisbaren langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten und umgekehrt die Netzwerk-Kalzium-Transienten das lokale Gegenstück der global-

nachweisbaren langsamen Wellen. Diese Hypothese wird durch den experimentellen Befund gestützt, dass optogenetische Stimulation von Schicht 5 Pyramidenzellen, von denen unter *In vitro*-Bedingungen die Up-Down-State-Übergänge ausgehen (Sanchez-Vives und McCormick, 2000), ebenfalls langsame Kalzium-Transienten erzeugte, welche von den spontanen bzw. den Ton evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten nicht unterscheidbar waren.

5.4.4 Netzwerk-Kalzium-Transienten als sich ausbreitende Wellen

Studien, welche im visuellen und Barrel-Kortex der Maus sowie auch im Menschen durchgeführt wurden, zeigen, dass die elektrischen langsamen Wellen nicht gleichzeitig über der gesamten Großhirnrinde nachweisbar sind. Stattdessen treten sie als Wellen auf, welche von einem Punkt ausgehen und zunehmend mehr kortikale Regionen betreffen (Ferezou et al., 2007; Massimini et al., 2004; Xu et al., 2007).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich bei den Lichtleiter-basierten Kalzium-Messungen in den primären Feldern des auditorischen Kortex, dass die dort aufgenommenen spontanen Kalzium-Signale gegenüber den global-auftretenden elektrischen langsamen Wellen verzögert erschienen (Abb. 34C). Somit ist wohl der Ausgangspunkt dieser spontan-auftretenden elektrischen langsamen Wellen nicht (oder zumindest nicht ausschließlich) im auditorischen Kortex zu suchen. Es ist eher wahrscheinlich, dass diese durch Aktivität in einem anderen Teil des Gehirns ausgelöst werden, welche dann in den auditorischen Kortex „wandert“ und dort als spontaner Netzwerk-Kalzium-Transient nachweisbar ist. Ein Tonstimulus, welcher einen Kalzium-Transienten im auditorischen Kortex zur Folge hat, könnte also möglicherweise ebenfalls eine langsame Welle initiieren, welche dann ihrerseits in andere Teile der Großhirnrinde wandert.

In diesem Sinne können die Resultate im Rahmen der Stimulation mit reinen Tönen interpretiert werden (Abb. 33). Dabei fanden sich nach Stimulation mit einer nicht-optimalen Frequenz Netzwerk-Kalzium-Transienten ohne frühe Komponente. Diese könnten Ausdruck sich ausbreitender elektrischer langsamer Wellen sein, welche an einer Stelle in den primären Feldern des auditorischen Kortex ausgelöst

wurden, für die die Stimulus-Frequenz optimal war. Unter dieser Annahme kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit dieser Welle abgeschätzt werden. Sie breitet sich im Durchschnitt über einen Bereich von 1 mm (Hälfte der primären Felder des auditorischen Kortex) in ungefähr 100 ms (Verzögerung zwischen Antwort nach optimaler und nicht-optimaler Frequenz, abgelesen aus Abb. 33) aus. Dies lässt auf eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von ca. 0.01 m/s schließen. Dieses Ergebnis entspricht in etwa den Messungen von Metherate und Cruikshank (1999), welche in einer Hirnschnittpräparation eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von 0.02 m/s für ein durch elektrische Thalamus-Stimulation erzeugtes kortikales Potential bestimmten. Diese Beziehung zwischen langsamen Wellen und Netzwerk-Kalzium-Transienten zeigt, dass die Lichtleiter-basierte Detektionsmethode die Möglichkeit bietet, lokal auftretende Netzwerkaktivitäten zu identifizieren und in Beziehung zu globaler Netzwerkaktivierung zu stellen.

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Netzwerkaktivität in den Kernfeldern des auditorischen Kortex analysiert und so zum ersten Mal die Ton-evozierten langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten beschrieben. Als Entstehungsmechanismus lag diesen Transienten die Aktivierung von Schicht 5 Pyramidenzellen zugrunde. Folgerichtig ist nun die Frage zu stellen, ob weitere Faktoren die Entstehung der langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten beeinflussen. Äußerst interessant wäre beispielsweise die Untersuchung des Einflusses der lokalen Inhibition auf diese Form der Populationsaktivität. Neokortikale Interneurone, welche für die lokale Hemmung in der Großhirnrinde verantwortlich sind, bilden etwa 10-20% der kortikalen Nervenzellen (Markram et al., 2004). Sie sind sehr divers in ihrer Struktur und ihrer Funktion, so dass ihre Klassifikation bis heute nicht eindeutig ist. Einer von vielen Klassifikationsansätzen besteht in ihrer Einteilung mittels molekularer Marker, z.B. Parvalbumin oder Somatostatin (Monyer und Markram, 2004). Interneurone haben entscheidende Bedeutung für sämtliche Informationsverarbeitungsprozesse in unserem Gehirn (Moore et al., 2010). So

zeigte sich, dass die spezifische Aktivierung der Parvalbumin-positiven Interneurone zu einer Verstärkung der Gamma-Oszillationen im Gehirn führt und somit die Weitergabe von sensorischer Information im somatosensorischen Kortex verstärkt (Cardin et al., 2009). Möglicherweise haben diese Interneurone also auch eine Rolle in der Entstehung der hier untersuchten Populations-Kalzium-Signale im auditorischen Kortex. Um dieser Fragestellung nachzugehen, könnte z.B. Channelrhodopsin-2 selektiv in Interneuronen im auditorischen Kortex exprimiert werden. So könnte man direkt die Interneuron-Aktivität beeinflussen und dann die Auswirkung auf die Netzwerk-Kalzium-Transienten analysieren. Ein weiteres interessantes Experiment wäre die Expression eines genetisch-kodierten Kalzium-Indikators, z.B. GCaMP3, in den unterschiedlichen Interneuron-Klassen (Looger und Griesbeck, 2012). So könnte ausschließlich interneuronale Netzwerkaktivität untersucht werden und dann in einem nächsten Schritt z.B. die Wechselwirkung zwischen dieser Form der Populationsaktivität und den elektrischen langsamen Wellen, dem globalen Korrelat der langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten, bestimmt werden.

Neben der Beeinflussung durch andere Zelltypen könnten die langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten auch durch andere Hirnareale in ihrer Entstehung beeinflusst wurden. Ein wichtiges Kandidatenareal dafür ist der Thalamus. So ist bekannt, dass im auditorischen System, wie auch im visuellen oder somatosensorischen System, neben den thalamokortikalen Verbindungen auch funktionell wichtige Verbindungen von Schicht 5 oder 6 der Großhirnrinde in den Thalamus bestehen (Winer, 2006). Diese Verbindungen enden entweder direkt an den Schalt-Neuronen des Corpus geniculatum mediale oder an Interneuronen im retikulären Teil des Thalamus. Durch diese Verbindungsformen bestehen bedeutende Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Hirnregionen. Ob solche Interaktionen auch eine Rolle für die hier untersuchte Netzwerkaktivität im auditorischen Kortex spielen, ist bisher unbekannt. Um dies näher zu beleuchten, könnte erneut ein optogenetischer Ansatz unter Verwendung von Channelrhodopsin-2 gewählt und damit die Auswirkung einer Aktivierung des Corpus geniculatum mediale bzw. des retikulären Teil des Thalamus auf die langsamen Netzwerk-Kalzium-Transienten untersucht werden.

Methodisch wäre es interessant, longitudinale Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchführen zu können. Dazu wäre, neben der Expression von

genetisch-kodierten Kalzium-Indikatoren in verschiedenen Zellpopulationen, die Entwicklung eines zweiteiligen Lichtleiter-Systems vonnöten. Davon wäre ein Anteil chronisch auf dem Schädelknochen des Versuchstieres fixiert und der andere Teil, der die Verbindung zum eigentlichen Detektor- und Aufnahmesystem herstellt, reversibel mit dem implantierten Anteil der Glasfaser verbunden. Solche Verbindungstechniken sind verfügbar, haben aber den Nachteil, dass es bei suboptimaler Verknüpfung zu Lichtverlust kommen kann (Yizhar et al., 2011b). Diese technische Weiterentwicklung würde es möglich machen, Aktivitätsänderungen, z.B. aufgrund von Plastizitätsprozessen, über einen längeren Zeitraum hinweg sichtbar zu machen. So könnte eine mögliche Fragestellung sein, ob sich Netzwerkaktivität durch langfristige Exposition mit einem Ton einer bestimmten Frequenz für Tage oder sogar Wochen verändern lässt oder ob verhaltensrelevante Geräusche, wie z.B. die Rufe der Mutter an ihre Jungtiere, besonders effektive Reize für Plastizitätsprozesse im auditorischen Kortex darstellen. Dies würde es auch ermöglichen, die Bedeutung von Netzwerkaktivität für die neuronale Verarbeitung im Kontext von bestimmten Verhaltensweisen herauszustellen.

6 Literaturverzeichnis

Abeles, M. "Local cortical circuits : an electrophysiological study", Springer-Verlag, Berlin und New York, 1982.

Adelsberger, H., Garaschuk, O., Konnerth, A. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci.* 8 (2005), 988-990.

Adelsberger, H., Grienberger, C., Stroh, A., Konnerth, A. In Vivo Calcium Recordings and Channelrhodopsin-2 Activation through an Optical Fiber. In "Imaging in neuroscience : a laboratory manual", F. Helmchen, A. Konnerth, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2011, third edition, 889-895.

Ainsworth, A., O'Keefe, J. A lightweight microdrive for the simultaneous recording of several units in the awake, freely moving rat. *J Physiol.* 269 (1977), 8P-10P.

Anstrom, K.K., Woodward, D.J. Restraint increases dopaminergic burst firing in awake rats. *Neuropsychopharmacology.* 30 (2005), 1832-1840.

Aravanis, A.M., Wang, L.P., Zhang, F., Meltzer, L.A., Mogri, M.Z., Schneider, M.B., Deisseroth, K. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng.* 4 (2007), S143-156.

Arenkiel, B.R., Peca, J., Davison, I.G., Feliciano, C., Deisseroth, K., Augustine, G.J., Ehlers, M.D., Feng, G. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 54 (2007), 205-218.

Arieli, A., Grinvald, A., Slovin, H. Dural substitute for long-term imaging of cortical activity in behaving monkeys and its clinical implications. *J Neurosci Methods.* 114 (2002), 119-133.

Ashley, C.C., Ridgway, E.B. Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibers. *Nature.* 219 (1968), 1168-1169.

Averbeck, B.B., Latham, P.E., Pouget, A. Neural correlations, population coding and computation. *Nat Rev Neurosci.* 7 (2006), 358-366.

Badea, T., Goldberg, J., Mao, B., Yuste, R. Calcium imaging of epileptiform events with single-cell resolution. *J Neurobiol.* 48 (2001), 215-227.

Bandyopadhyay, S., Shamma, S.A., Kanold, P.O. Dichotomy of functional organization in the mouse auditory cortex. *Nat Neurosci.* 13 (2010), 361-368.

Bangasser, D.A., Waxler, D.E., Santollo, J., Shors, T.J. Trace conditioning and the hippocampus: the importance of contiguity. *J Neurosci.* 26 (2006), 8702-8706.

Barretto, R.P., Ko, T.H., Jung, J.C., Wang, T.J., Capps, G., Waters, A.C., Ziv, Y., Attardo, A., Recht, L., Schnitzer, M.J. Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy. *Nat Med.* 17 (2011), 223-228.

- Barretto, R.P., Messerschmidt, B., Schnitzer, M.J. In vivo fluorescence imaging with high-resolution microlenses. *Nat Methods*. 6 (2009), 511-512.
- Bartho, P., Curto, C., Luczak, A., Marguet, S.L., Harris, K.D. Population coding of tone stimuli in auditory cortex: dynamic rate vector analysis. *Eur J Neurosci*. 30 (2009), 1767-1778.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., Naquet, R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*. 6 (1981), 1361-1391.
- Ben Achour, S., Pascual, O. Astrocyte-Neuron Communication: Functional Consequences. *Neurochem Res*. (2012), epub Jun 6.
- Berger, T., Borgdorff, A., Crochet, S., Neubauer, F.B., Lefort, S., Fauvet, B., Ferezou, I., Carleton, A., Luscher, H.R., Petersen, C.C. Combined voltage and calcium epifluorescence imaging in vitro and in vivo reveals subthreshold and suprathreshold dynamics of mouse barrel cortex. *J Neurophysiol*. 97 (2007), 3751-3762.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4 (2003), 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1 (2000), 11-21.
- Bezprozvanny, I., Hayden, M.R. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 322 (2004), 1310-1317.
- Bird, D., Gu, M. Compact two-photon fluorescence microscope based on a single-mode fiber coupler. *Opt Lett*. 27 (2002a), 1031-1033.
- Bird, D., Gu, M. Fibre-optic two-photon scanning fluorescence microscopy. *J Microsc*. 208 (2002b), 35-48.
- Bizley, J.K., Nodal, F.R., Nelken, I., King, A.J. Functional organization of ferret auditory cortex. *Cereb Cortex*. 15 (2005), 1637-1653.
- Bloodgood, B.L., Sabatini, B.L. Ca^{2+} signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*. 17 (2007), 345-351.
- Bonhoeffer, T., Grinvald, A. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature*. 353 (1991), 429-431.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 8 (2005), 1263-1268.
- Brown, J.E., Cohen, L.B., De Weer, P., Pinto, L.H., Ross, W.N., Salzberg, B.M. Rapid changes in intracellular free calcium concentration. Detection by metallochromic indicator dyes in squid giant axon. *Biophys J*. 15 (1975), 1155-1160.

- Busche, M.A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K.H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., Garaschuk, O. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science*. 321 (2008), 1686-1689.
- Buzsaki, G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci*. 7 (2004), 446-451.
- Buzsaki, G., Anastassiou, C.A., Koch, C. The origin of extracellular fields and currents - EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci*. 13 (2012), 407-420.
- Buzsaki, G., Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*. 304 (2004), 1926-1929.
- Campbell, R.A., Schulz, A.L., King, A.J., Schnupp, J.W. Brief sounds evoke prolonged responses in anesthetized ferret auditory cortex. *J Neurophysiol*. 103 (2010), 2783-2793.
- Cardin, J.A., Carlen, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H., Moore, C.I. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*. 459 (2009), 663-667.
- Castro-Alamancos, M.A. Dynamics of sensory thalamocortical synaptic networks during information processing states. *Prog Neurobiol*. 74 (2004), 213-247.
- Catterall, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16 (2000), 521-555.
- Chen, X., Leischner, U., Rochefort, N.L., Nelken, I., Konnerth, A. Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature*. 475 (2011), 501-505.
- Chervin, R.D., Pierce, P.A., Connors, B.W. Periodicity and directionality in the propagation of epileptiform discharges across neocortex. *J Neurophysiol*. 60 (1988), 1695-1713.
- Chrobak, J.J., Buzsaki, G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J Neurosci*. 16 (1996), 3056-3066.
- Churchland, M.M., Yu, B.M., Sahani, M., Shenoy, K.V. Techniques for extracting single-trial activity patterns from large-scale neural recordings. *Curr Opin Neurobiol*. 17 (2007), 609-618.
- Cohen, L.B., Salzberg, B.M., Grinvald, A. Optical methods for monitoring neuron activity. *Annu Rev Neurosci*. 1 (1978), 171-182.
- Collins, T.F., Mann, E.O., Hill, M.R., Dommett, E.J., Greenfield, S.A. Dynamics of neuronal assemblies are modulated by anaesthetics but not analgesics. *Eur J Anaesthesiol*. 24 (2007), 609-614.
- Conchello, J.A., Lichtman, J.W. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*. 2 (2005), 920-931.

- Crunelli, V., Hughes, S.W. The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci.* 13 (2010), 9-17.
- Curto, C., Sakata, S., Marguet, S., Itskov, V., Harris, K.D. A simple model of cortical dynamics explains variability and state dependence of sensory responses in urethane-anesthetized auditory cortex. *J Neurosci.* 29 (2009), 10600-10612.
- Davidson, B.L., Breakefield, X.O. Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 4 (2003), 353-364.
- De Vry, J., Martinez-Martinez, P., Losen, M., Temel, Y., Steckler, T., Steinbusch, H.W., De Baets, M.H., Prickaerts, J. In vivo electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery. *Prog Neurobiol.* 92 (2010), 227-244.
- Delaney, P.M., Harris, M.R., King, R.G. Novel microscopy using fibre optic confocal imaging and its suitability for subsurface blood vessel imaging in vivo. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 20 (1993), 197-198.
- Denk, W. Principles of Multiphoton-excitation Fluorescence Microscopy. In "Imaging in neuroscience and development : a laboratory manual", R. Yuste, A. Konnerth, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2005, second edition, 53-58.
- Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* 248 (1990), 73-76.
- Denk, W., Svoboda, K. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron.* 18 (1997), 351-357.
- Destexhe, A., Contreras, D., Steriade, M. Spatiotemporal analysis of local field potentials and unit discharges in cat cerebral cortex during natural wake and sleep states. *J Neurosci.* 19 (1999), 4595-4608.
- Doi, A., Mizuno, M., Katafuchi, T., Furue, H., Koga, K., Yoshimura, M. Slow oscillation of membrane currents mediated by glutamatergic inputs of rat somatosensory cortical neurons: in vivo patch-clamp analysis. *Eur J Neurosci.* 26 (2007), 2565-2575.
- Dombeck, D.A., Graziano, M.S., Tank, D.W. Functional clustering of neurons in motor cortex determined by cellular resolution imaging in awake behaving mice. *J Neurosci.* 29 (2009), 13751-13760.
- Dombeck, D.A., Harvey, C.D., Tian, L., Looger, L.L., Tank, D.W. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat Neurosci.* 13 (2010), 1433-1440.
- Drzezga, A., Becker, J.A., Van Dijk, K.R., Sreenivasan, A., Talukdar, T., Sullivan, C., Schultz, A.P., Sepulcre, J., Putcha, D., Greve, D., Johnson, K.A., Sperling, R.A. Neuronal dysfunction and disconnection of cortical hubs in non-demented subjects with elevated amyloid burden. *Brain.* 134 (2011), 1635-1646.

- Duff Davis, M., Schmidt, J.J. In vivo spectrometric calcium flux recordings of intrinsic Caudate-Putamen cells and transplanted IMR-32 neuroblastoma cells using miniature fiber optodes in anesthetized and awake rats and monkeys. *J Neurosci Methods*. 99 (2000), 9-23.
- Dulhunty, A.F. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33 (2006), 763-772.
- Edeline, J.M. The thalamo-cortical auditory receptive fields: regulation by the states of vigilance, learning and the neuromodulatory systems. *Exp Brain Res*. 153 (2003), 554-572.
- Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., Takahashi, T. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch*. 414 (1989), 600-612.
- Ehret, G. The auditory cortex. *J Comp Physiol A*. 181 (1997), 547-557.
- Ehret, G. Infant rodent ultrasounds -- a gate to the understanding of sound communication. *Behav Genet*. 35 (2005), 19-29.
- Eilers, J., Konnerth, A. Dye loading with patch pipettes. *Cold Spring Harb Protoc*. (2009), pdb prot5201.
- Elul, R. The genesis of the EEG. *Int Rev Neurobiol*. 15 (1971), 227-272.
- Engel, A.K., Fries, P., Singer, W. Dynamic predictions: Oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat Rev Neurosci*. 2 (2001), 704-716.
- Engel, A.K., Singer, W. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. *Trends Cogn Sci*. 5 (2001), 16-25.
- English, D.F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsaki, G., Deisseroth, K., Tepper, J.M., Koos, T. GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat Neurosci*. 15 (2012), 123-130.
- Fan, G.Y., Fujisaki, H., Miyawaki, A., Tsay, R.K., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H. Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons. *Biophys J*. 76 (1999), 2412-2420.
- Feller, M.B., Wellis, D.P., Stellwagen, D., Werblin, F.S., Shatz, C.J. Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science*. 272 (1996), 1182-1187.
- Ferezou, I., Bolea, S., Petersen, C.C. Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. *Neuron*. 50 (2006), 617-629.
- Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L.J., Aronoff, R., Weber, B., Petersen, C.C. Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron*. 56 (2007), 907-923.

- Fernald, R.D., Gerstein, G.L. Response of cat cochlear nucleus neurons to frequency and amplitude modulated tones. *Brain Res.* 45 (1972), 417-435.
- Fine, A. Confocal Microscopy: Principles and Practice. In "Imaging in neuroscience and development : a laboratory manual", R. Yuste, A. Konnerth, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2005, second edition, 43-51.
- Fischer, R.S., Wu, Y., Kanchanawong, P., Shroff, H., Waterman, C.M. Microscopy in 3D: a biologist's toolbox. *Trends Cell Biol.* 21 (2011), 682-691.
- Fisher, J.A., Civillico, E.F., Contreras, D., Yodh, A.G. In vivo fluorescence microscopy of neuronal activity in three dimensions by use of voltage-sensitive dyes. *Opt Lett.* 29 (2004), 71-73.
- Flecknell, P.A. "Laboratory Animal anaesthesia ", Academic Press, London 2000.
- Flusberg, B.A., Cocker, E.D., Piyawattanametha, W., Jung, J.C., Cheung, E.L., Schnitzer, M.J. Fiber-optic fluorescence imaging. *Nat Methods.* 2 (2005), 941-950.
- Garaschuk, O., Hanse, E., Konnerth, A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol.* 507 (1998), 219-236.
- Garaschuk, O., Milos, R.I., Grienberger, C., Marandi, N., Adelsberger, H., Konnerth, A. Optical monitoring of brain function in vivo: from neurons to networks. *Pflugers Arch.* 453 (2006a), 385-396.
- Garaschuk, O., Milos, R.I., Konnerth, A. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat Protoc.* 1 (2006b), 380-386.
- Gmitro, A.F., Aziz, D. Confocal microscopy through a fiber-optic imaging bundle. *Opt Lett.* 18 (1993), 565.
- Göbel, W., Nimmerjahn, A., Helmchen, F. Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber. *Opt Lett.* 29 (2004), 1285-1287.
- Gonzalez-Lima, F., Cada, A. Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: a qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience.* 63 (1994), 559-578.
- Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell.* 147 (2011), 678-689.
- Gray, C.M., Konig, P., Engel, A.K., Singer, W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature.* 338 (1989), 334-337.
- Gray, C.M., Maldonado, P.E., Wilson, M., McNaughton, B. Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *J Neurosci Methods.* 63 (1995), 43-54.

Green, K.N., LaFerla, F.M. Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron*. 59 (2008), 190-194.

Greenberg, D.S., Houweling, A.R., Kerr, J.N. Population imaging of ongoing neuronal activity in the visual cortex of awake rats. *Nat Neurosci*. 11 (2008), 749-751.

Grienberger, C., Adelsberger, H., Stroh, A., Milos, R.I., Garaschuk, O., Schierloh, A., Nelken, I., Konnerth, A. Sound-evoked network calcium transients in mouse auditory cortex in vivo. *J Physiol*. 590 (2012a), 899-918.

Grienberger, C., Konnerth, A. Imaging calcium in neurons. *Neuron*. 73 (2012), 862-885.

Grienberger, C., Rochefort, N.L., Adelsberger, H., Henning, H.A., Hill, D.N., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Konnerth, A. Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 3 (2012b), 774.

Grinvald, A., Frostig, R.D., Lieke, E., Hildesheim, R. Optical imaging of neuronal activity. *Physiol Rev*. 68 (1988), 1285-1366.

Grinvald, A., Frostig, R.D., Siegel, R.M., Bartfeld, E. High-resolution optical imaging of functional brain architecture in the awake monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88 (1991), 11559-11563.

Grinvald, A., Hildesheim, R. VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. *Nat Rev Neurosci*. 5 (2004), 874-885.

Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., Wiesel, T.N. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature*. 324 (1986), 361-364.

Grinvald, A., Sharon, D., Slovlin, H., Vanzetta, I. Voltage-sensitive Dye Imaging of Neocortical Activity. In "Imaging in neuroscience and development : a laboratory manual", R. Yuste, A. Konnerth, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2005a, second edition, 673-688.

Grinvald, A., Sharon, D., Sterkin, A., Slovlin, H., Hildesheim, R. Intrinsic Signal Imaging in the Neocortex: Implications for Hemodynamic-based Functional Imaging. In "Imaging in neuroscience and development : a laboratory manual", R. Yuste, A. Konnerth, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2005b, second edition, 655-671.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 260 (1985), 3440-3450.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.B., Moser, E.I. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 436 (2005), 801-806.

Hahn, T.T., Sakmann, B., Mehta, M.R. Differential responses of hippocampal subfields to cortical up-down states. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (2007), 5169-5174.

- Hallett, M., Carbone, E. Studies of calcium influx into squid giant axons with aequorin. *J Cell Physiol.* 80 (1972), 219-226.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391 (1981), 85-100.
- Harris, K.D., Bartho, P., Chadderton, P., Curto, C., de la Rocha, J., Hollender, L., Itskov, V., Luczak, A., Marguet, S.L., Renart, A., Sakata, S. How do neurons work together? Lessons from auditory cortex. *Hear Res.* 271 (2011), 37-53.
- Harris, K.D., Csicsvari, J., Hirase, H., Dragoi, G., Buzsaki, G. Organization of cell assemblies in the hippocampus. *Nature.* 424 (2003), 552-556.
- Helmchen, F., Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods.* 2 (2005), 932-940.
- Helmchen, F., Fee, M.S., Tank, D.W., Denk, W. A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in freely moving animals. *Neuron.* 31 (2001), 903-912.
- Helmchen, F., Svoboda, K., Denk, W., Tank, D.W. In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci.* 2 (1999), 989-996.
- Henze, D.A., Borhegyi, Z., Csicsvari, J., Mamiya, A., Harris, K.D., Buzsaki, G. Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo. *J Neurophysiol.* 84 (2000), 390-400.
- Hill, D.N., Mehta, S.B., Kleinfeld, D. Quality metrics to accompany spike sorting of extracellular signals. *J Neurosci.* 31 (2011), 8699-8705.
- Hirano, M., Yamashita, Y., Miyakawa, A. In vivo visualization of hippocampal cells and dynamics of Ca²⁺ concentration during anoxia: feasibility of a fiber-optic plate microscope system for in vivo experiments. *Brain Res.* 732 (1996), 61-68.
- Hirase, H., Qian, L., Bartho, P., Buzsaki, G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol.* 2 (2004), E96.
- Holy, T.E., Guo, Z. Ultrasonic songs of male mice. *PLoS Biol.* 3 (2005), e386.
- Homma, R., Baker, B.J., Jin, L., Garaschuk, O., Konnerth, A., Cohen, L.B., Zecevic, D. Wide-field and two-photon imaging of brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364 (2009), 2453-2467.
- Hromadka, T., Deweese, M.R., Zador, A.M. Sparse representation of sounds in the unanesthetized auditory cortex. *PLoS Biol.* 6 (2008), e16.
- Hudspeth, A.J. How hearing happens. *Neuron.* 19 (1997), 947-950.
- Hudspeth, A.J., Logothetis, N.K. Sensory systems. *Curr Opin Neurobiol.* 10 (2000), 631-641.

- Jaffe, D.B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J.E., Miyakawa, H., Ross, W.N. The spread of Na⁺ spikes determines the pattern of dendritic Ca²⁺ entry into hippocampal neurons. *Nature*. 357 (1992), 244-246.
- Jares-Erijman, E.A., Jovin, T.M. FRET imaging. *Nat Biotechnol*. 21 (2003), 1387-1395.
- Jia, H., Rochefort, N.L., Chen, X., Konnerth, A. Dendritic organization of sensory input to cortical neurons in vivo. *Nature*. 464 (2010), 1307-1312.
- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., LeDoux, J.E. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*. 147 (2011), 509-524.
- Johnson, I.D., Spence, M.T.Z. "Molecular Probes Handbook, A guide to fluorescent probes and labeling technologies", Molecular Probes, Eugene, OR, USA, 2010.
- Judkewitz, B., Rizzi, M., Kitamura, K., Häusser, M. Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo. *Nat Protoc*. 4 (2009), 862-869.
- Jung, J.C., Mehta, A.D., Aksay, E., Stepnoski, R., Schnitzer, M.J. In vivo mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *J Neurophysiol*. 92 (2004), 3121-3133.
- Jung, J.C., Schnitzer, M.J. Multiphoton endoscopy. *Opt Lett*. 28 (2003), 902-904.
- Kajikawa, Y., Schroeder, C.E. How local is the local field potential? *Neuron*. 72 (2011), 847-858.
- Katzner, S., Nauhaus, I., Benucci, A., Bonin, V., Ringach, D.L., Carandini, M. Local origin of field potentials in visual cortex. *Neuron*. 61 (2009), 35-41.
- Kerr, J.N., de Kock, C.P., Greenberg, D.S., Bruno, R.M., Sakmann, B., Helmchen, F. Spatial organization of neuronal population responses in layer 2/3 of rat barrel cortex. *J Neurosci*. 27 (2007), 13316-13328.
- Kerr, J.N., Greenberg, D., Helmchen, F. Imaging input and output of neocortical networks in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (2005), 14063-14068.
- Kholodar-Smith, D.B., Boguszewski, P., Brown, T.H. Auditory trace fear conditioning requires perirhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem*. 90 (2008), 537-543.
- Kiesslich, R., Burg, J., Vieth, M., Gnaendiger, J., Enders, M., Delaney, P., Polglase, A., McLaren, W., Janell, D., Thomas, S., Nafe, B., Galle, P.R., Neurath, M.F. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 127 (2004), 706-713.
- Kilgard, M.P., Merzenich, M.M. Distributed representation of spectral and temporal information in rat primary auditory cortex. *Hear Res*. 134 (1999), 16-28.
- Kimura, A., Donishi, T., Sakoda, T., Hazama, M., Tamai, Y. Auditory thalamic nuclei projections to the temporal cortex in the rat. *Neuroscience*. 117 (2003), 1003-1016.

- Kipke, D.R., Shain, W., Buzsaki, G., Fetz, E., Henderson, J.M., Hetke, J.F., Schalk, G. Advanced neurotechnologies for chronic neural interfaces: new horizons and clinical opportunities. *J Neurosci.* 28 (2008), 11830-11838.
- Kisley, M.A., Gerstein, G.L. Trial-to-trial variability and state-dependent modulation of auditory-evoked responses in cortex. *J Neurosci.* 19 (1999), 10451-10460.
- Kitamura, K., Häusser, M. Dendritic calcium signaling triggered by spontaneous and sensory-evoked climbing fiber input to cerebellar Purkinje cells in vivo. *J Neurosci.* 31 (2011), 10847-10858.
- Kitamura, K., Judkewitz, B., Kano, M., Denk, W., Häusser, M. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat Methods.* 5 (2008), 61-67.
- Knight, J.C. Photonic crystal fibres. *Nature.* 424 (2003), 847-851.
- Komiyama, T., Sato, T.R., O'Connor, D.H., Zhang, Y.X., Huber, D., Hooks, B.M., Gabitto, M., Svoboda, K. Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature.* 464 (2010), 1182-1186.
- Kreiman, G., Hung, C.P., Kraskov, A., Quiroga, R.Q., Poggio, T., DiCarlo, J.J. Object selectivity of local field potentials and spikes in the macaque inferior temporal cortex. *Neuron.* 49 (2006), 433-445.
- Krey, J.F., Dolmetsch, R.E. Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca²⁺ signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 17 (2007), 112-119.
- Kuchibhotla, K.V., Goldman, S.T., Lattarulo, C.R., Wu, H.Y., Hyman, B.T., Bacskai, B.J. Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron.* 59 (2008), 214-225.
- Kudo, Y., Akita, K., Nakamura, T., Ogura, A., Makino, T., Tamagawa, A., Ozaki, K., Miyakawa, A. A single optical fiber fluorometric device for measurement of intracellular Ca²⁺ concentration: its application to hippocampal neurons in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 50 (1992), 619-625.
- Kwan, A.C. What can population calcium imaging tell us about neural circuits? *J Neurophysiol.* 100 (2008), 2977-2980.
- LeChasseur, Y., Dufour, S., Lavertu, G., Bories, C., Deschenes, M., Vallee, R., De Koninck, Y. A microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons in vivo. *Nat Methods.* 8 (2011), 319-325.
- Lechleiter, J.D., Lin, D.T., Sieneart, I. Multi-photon laser scanning microscopy using an acoustic optical deflector. *Biophys J.* 83 (2002), 2292-2299.
- Leon, M.I., Poytress, B.S., Weinberger, N.M. Avoidance learning facilitates temporal processing in the primary auditory cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 90 (2008), 347-357.
- Levene, M.J., Dombeck, D.A., Kasischke, K.A., Molloy, R.P., Webb, W.W. In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *J Neurophysiol.* 91 (2004), 1908-1912.

- Li, Y., Fitzpatrick, D., White, L.E. The development of direction selectivity in ferret visual cortex requires early visual experience. *Nat Neurosci.* 9 (2006), 676-681.
- Li, Y., Lu, H., Cheng, P.L., Ge, S., Xu, H., Shi, S.H., Dan, Y. Clonally related visual cortical neurons show similar stimulus feature selectivity. *Nature.* 486 (2012), 118-121.
- Lichtman, J.W., Conchello, J.A. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* 2 (2005), 910-919.
- Lima, S.Q., Miesenböck, G. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell.* 121 (2005), 141-152.
- Linden, J.F., Liu, R.C., Sahani, M., Schreiner, C.E., Merzenich, M.M. Spectrotemporal structure of receptive fields in areas AI and AAF of mouse auditory cortex. *J Neurophysiol.* 90 (2003), 2660-2675.
- Liu, S.J., Zukin, R.S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30 (2007), 126-134.
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., Tonegawa, S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature.* 484 (2012), 381-385.
- Llewellyn, M.E., Barretto, R.P., Delp, S.L., Schnitzer, M.J. Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans. *Nature.* 454 (2008), 784-788.
- Llinas, R., Nicholson, C. Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72 (1975), 187-190.
- Llinas, R.R. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science.* 242 (1988), 1654-1664.
- Logothetis, N.K. What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature.* 453 (2008), 869-878.
- Lohmann, C., Finski, A., Bonhoeffer, T. Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. *Nat Neurosci.* 8 (2005), 305-312.
- Looger, L.L., Griesbeck, O. Genetically encoded neural activity indicators. *Curr Opin Neurobiol.* 22 (2012), 18-23.
- Luczak, A., Bartho, P., Harris, K.D. Spontaneous events outline the realm of possible sensory responses in neocortical populations. *Neuron.* 62 (2009), 413-425.
- Luo, L., Callaway, E.M., Svoboda, K. Genetic dissection of neural circuits. *Neuron.* 57 (2008), 634-660.
- Lyons, M.R., West, A.E. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog Neurobiol.* 94 (2011), 259-295.

- Mank, M., Reiff, D.F., Heim, N., Friedrich, M.W., Borst, A., Griesbeck, O. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J.* 90 (2006), 1790-1796.
- Mank, M., Santos, A.F., Drenth, S., Mrcic-Flogel, T.D., Hofer, S.B., Stein, V., Hendel, T., Reiff, D.F., Levelt, C., Borst, A., Bonhoeffer, T., Hübener, M., Griesbeck, O. A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods.* 5 (2008), 805-811.
- Margrie, T.W., Brecht, M., Sakmann, B. In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Arch.* 444 (2002), 491-498.
- Marguet, S.L., Harris, K.D. State-dependent representation of amplitude-modulated noise stimuli in rat auditory cortex. *J Neurosci.* 31 (2011), 6414-6420.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 5 (2004), 793-807.
- Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S., Tononi, G. The sleep slow oscillation as a traveling wave. *J Neurosci.* 24 (2004), 6862-6870.
- McNaughton, B.L., O'Keefe, J., Barnes, C.A. The stereotrode: a new technique for simultaneous isolation of several single units in the central nervous system from multiple unit records. *J Neurosci Methods.* 8 (1983), 391-397.
- Mehta, A.D., Jung, J.C., Flusberg, B.A., Schnitzer, M.J. Fiber optic in vivo imaging in the mammalian nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 14 (2004), 617-628.
- Metherate, R., Cruikshank, S.J. Thalamocortical inputs trigger a propagating envelope of gamma-band activity in auditory cortex in vitro. *Exp Brain Res.* 126 (1999), 160-174.
- Mittmann, W., Wallace, D.J., Czubayko, U., Herb, J.T., Schaefer, A.T., Looger, L.L., Denk, W., Kerr, J.N. Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo. *Nat Neurosci.* 14 (2011), 1089-1093.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., Tsien, R.Y. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 388 (1997), 882-887.
- Miyoshi, G., Fishell, G. Directing neuron-specific transgene expression in the mouse CNS. *Curr Opin Neurobiol.* 16 (2006), 577-584.
- Mizrahi, A., Crowley, J.C., Shtoyerman, E., Katz, L.C. High-resolution in vivo imaging of hippocampal dendrites and spines. *J Neurosci.* 24 (2004), 3147-3151.
- Mohajerani, M.H., McVea, D.A., Fingas, M., Murphy, T.H. Mirrored bilateral slow-wave cortical activity within local circuits revealed by fast bihemispheric voltage-sensitive dye imaging in anesthetized and awake mice. *J Neurosci.* 30 (2010), 3745-3751.

- Monfared, A., Blevins, N.H., Cheung, E.L., Jung, J.C., Popelka, G., Schnitzer, M.J. In vivo imaging of mammalian cochlear blood flow using fluorescence microendoscopy. *Otol Neurotol.* 27 (2006), 144-152.
- Monyer, H., Markram, H. Interneuron Diversity series: Molecular and genetic tools to study GABAergic interneuron diversity and function. *Trends Neurosci.* 27 (2004), 90-97.
- Moore, C.I., Carlen, M., Knoblich, U., Cardin, J.A. Neocortical interneurons: from diversity, strength. *Cell.* 142 (2010), 189-193.
- Moshitch, D., Las, L., Ulanovsky, N., Bar-Yosef, O., Nelken, I. Responses of neurons in primary auditory cortex (A1) to pure tones in the halothane-anesthetized cat. *J Neurophysiol.* 95 (2006), 3756-3769.
- Movshon, J.A., Albright, T.D., Stoner, G.R., Majaj, N.J., Smith, M.A. Cortical responses to visual motion in alert and anesthetized monkeys. *Nat Neurosci.* 6 (2003), 3; author reply 3-4.
- Mrsic-Flogel, T., Hübener, M., Bonhoeffer, T. Brain mapping: new wave optical imaging. *Curr Biol.* 13 (2003), R778-780.
- Mrsic-Flogel, T.D., Hofer, S.B., Ohki, K., Reid, R.C., Bonhoeffer, T., Hübener, M. Homeostatic regulation of eye-specific responses in visual cortex during ocular dominance plasticity. *Neuron.* 54 (2007), 961-972.
- Mrsic-Flogel, T.D., Versnel, H., King, A.J. Development of contralateral and ipsilateral frequency representations in ferret primary auditory cortex. *Eur J Neurosci.* 23 (2006), 780-792.
- Murayama, M., Perez-Garci, E., Luscher, H.R., Larkum, M.E. Fiberoptic system for recording dendritic calcium signals in layer 5 neocortical pyramidal cells in freely moving rats. *J Neurophysiol.* 98 (2007), 1791-1805.
- Murayama, M., Perez-Garci, E., Nevian, T., Bock, T., Senn, W., Larkum, M.E. Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature.* 457 (2009), 1137-1141.
- Nagayama, S., Zeng, S., Xiong, W., Fletcher, M.L., Masurkar, A.V., Davis, D.J., Pieribone, V.A., Chen, W.R. In vivo simultaneous tracing and Ca²⁺ imaging of local neuronal circuits. *Neuron.* 53 (2007), 789-803.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., Bamberg, E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003), 13940-13945.
- Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 19 (2001), 137-141.
- Nauhaus, I., Busse, L., Carandini, M., Ringach, D.L. Stimulus contrast modulates functional connectivity in visual cortex. *Nat Neurosci.* 12 (2009), 70-76.

- Neher, E., Sakaba, T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*. 59 (2008), 861-872.
- Nelken, I., Bizley, J.K., Nodal, F.R., Ahmed, B., Schnupp, J.W., King, A.J. Large-scale organization of ferret auditory cortex revealed using continuous acquisition of intrinsic optical signals. *J Neurophysiol*. 92 (2004), 2574-2588.
- Nelken, I., Ulanovsky, N. Mismatch Negativity and Stimulus-Specific Adaptation in Animal Models. *Journal of Psychophysiology*. 21 (2007), 214-223.
- Nguyen, Q.T., Callamaras, N., Hsieh, C., Parker, I. Construction of a two-photon microscope for video-rate Ca(2+) imaging. *Cell Calcium*. 30 (2001), 383-393.
- Niell, C.M., Stryker, M.P. Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *J Neurosci*. 28 (2008), 7520-7536.
- Niell, C.M., Stryker, M.P. Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron*. 65 (2010), 472-479.
- Nieuwenhuis, I.L., Takashima, A. The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. *Behav Brain Res*. 218 (2011), 325-334.
- Nimmerjahn, A. Astrocytes going live: advances and challenges. *J Physiol*. 587 (2009), 1639-1647.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N., Helmchen, F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods*. 1 (2004), 31-37.
- Oertel, D. Encoding of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Neuron*. 19 (1997), 959-962.
- Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., Reid, R.C. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature*. 433 (2005), 597-603.
- Ohki, K., Chung, S., Kara, P., Hübener, M., Bonhoeffer, T., Reid, R.C. Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels. *Nature*. 442 (2006), 925-928.
- Ohl, F.W., Scheich, H. Learning-induced plasticity in animal and human auditory cortex. *Curr Opin Neurobiol*. 15 (2005), 470-477.
- Orbach, H.S., Cohen, L.B., Grinvald, A. Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J Neurosci*. 5 (1985), 1886-1895.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4 (2003), 552-565.
- Otsu, Y., Bormuth, V., Wong, J., Mathieu, B., Dugue, G.P., Feltz, A., Dieudonne, S. Optical monitoring of neuronal activity at high frame rate with a digital random-access multiphoton (RAMP) microscope. *J Neurosci Methods*. 173 (2008), 259-270.
- Palmer, L., Murayama, M., Larkum, M. Inhibitory Regulation of Dendritic Activity in vivo. *Front Neural Circuits*. 6 (2012), 26.

- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., Lechleiter, J.D. Chemical calcium indicators. *Methods*. 46 (2008), 143-151.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J. "The mouse brain in stereotaxic coordinates", Academic Press, San Diego, 2001.
- Pesaran, B., Pezaris, J.S., Sahani, M., Mitra, P.P., Andersen, R.A. Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat Neurosci*. 5 (2002), 805-811.
- Peterka, D.S., Takahashi, H., Yuste, R. Imaging voltage in neurons. *Neuron*. 69 (2011), 9-21.
- Petersen, C.C. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*. 56 (2007), 339-355.
- Petersen, C.C. Genetic manipulation, whole-cell recordings and functional imaging of the sensorimotor cortex of behaving mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 195 (2009), 91-99.
- Petersen, C.C., Grinvald, A., Sakmann, B. Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J Neurosci*. 23 (2003a), 1298-1309.
- Petersen, C.C., Hahn, T.T., Mehta, M., Grinvald, A., Sakmann, B. Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (2003b), 13638-13643.
- Petreaanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., Svoboda, K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci*. 10 (2007), 663-668.
- Poe, G.R., Kristensen, M.P., Rector, D.M., Harper, R.M. Hippocampal activity during transient respiratory events in the freely behaving cat. *Neuroscience*. 72 (1996), 39-48.
- Polley, D.B., Read, H.L., Storace, D.A., Merzenich, M.M. Multiparametric auditory receptive field organization across five cortical fields in the albino rat. *J Neurophysiol*. 97 (2007), 3621-3638.
- Poulet, J.F., Petersen, C.C. Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice. *Nature*. 454 (2008), 881-885.
- Purves, D., Williams, S.M. Intracellular Signal Transduction. In "Neuroscience", D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, L.C. Katz, A.-S. LaMantia, J.O. McNamara, S.M. Williams, (Eds.), Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2001, second edition, 165-188.
- Rector, D., Harper, R. Imaging of hippocampal neural activity in freely behaving animals. *Behav Brain Res*. 42 (1991), 143-149.
- Rector, D.M., Poe, G.R., Harper, R.M. Imaging of hippocampal and neocortical neural activity following intravenous cocaine administration in freely behaving cats. *Neuroscience*. 54 (1993), 633-641.

- Rehberg, M., Lepier, A., Solchenberger, B., Osten, P., Blum, R. A new non-disruptive strategy to target calcium indicator dyes to the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 44 (2008), 386-399.
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*. 5 (2008), 763-775.
- Reynolds, R.P., Kinard, W.L., Degraff, J.J., Leverage, N., Norton, J.N. Noise in a laboratory animal facility from the human and mouse perspectives. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 49 (2010), 592-597.
- Rochefort, N.L., Garaschuk, O., Milos, R.I., Narushima, M., Marandi, N., Pichler, B., Kovalchuk, Y., Konnerth, A. Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (2009), 15049-15054.
- Rochefort, N.L., Grienberger, C., Konnerth, A. In Vivo Two-Photon Calcium Imaging Using Multicell Bolus Loading of Fluorescent Indicators. In "Imaging in neuroscience : a laboratory manual", F. Helmchen, A. Konnerth, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2011a, third edition, 491-500.
- Rochefort, N.L., Narushima, M., Grienberger, C., Marandi, N., Hill, D.N., Konnerth, A. Development of direction selectivity in mouse cortical neurons. *Neuron*. 71 (2011b), 425-432.
- Romanski, L.M., LeDoux, J.E. Organization of rodent auditory cortex: anterograde transport of PHA-L from MGv to temporal neocortex. *Cereb Cortex*. 3 (1993), 499-514.
- Rothschild, G., Nelken, I., Mizrahi, A. Functional organization and population dynamics in the mouse primary auditory cortex. *Nat Neurosci*. 13 (2010), 353-360.
- Sachdev, R.N., Ebner, F.F., Wilson, C.J. Effect of subthreshold up and down states on the whisker-evoked response in somatosensory cortex. *J Neurophysiol*. 92 (2004), 3511-3521.
- Sakata, J.T., Brainard, M.S. Online contributions of auditory feedback to neural activity in avian song control circuitry. *J Neurosci*. 28 (2008), 11378-11390.
- Sakata, S., Harris, K.D. Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron*. 64 (2009), 404-418.
- Saleh, B.E.A., Teich, M.C. Optical Fiber Communications. In "Fundamentals of photonics", Wiley Interscience, Hoboken, N.J., 2007a, second edition, 1072-1121.
- Saleh, B.E.A., Teich, M.C. Ray optics. In "Fundamentals of photonics", Wiley Interscience, Hoboken, N.J., 2007b, second edition, 1-37.
- Sally, S.L., Kelly, J.B. Organization of auditory cortex in the albino rat: sound frequency. *J Neurophysiol*. 59 (1988), 1627-1638.
- Sanchez-Vives, M.V., McCormick, D.A. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci*. 3 (2000), 1027-1034.

- Sanderson, M.J., Parker, I. Video-rate confocal microscopy. *Methods Enzymol.* 360 (2003), 447-481.
- Sawinski, J., Wallace, D.J., Greenberg, D.S., Grossmann, S., Denk, W., Kerr, J.N. Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (2009), 19557-19562.
- Scanziani, M., Häusser, M. Electrophysiology in the age of light. *Nature.* 461 (2009), 930-939.
- Schneggenburger, R., Forsythe, I.D. The calyx of Held. *Cell Tissue Res.* 326 (2006), 311-337.
- Schulz, K., Sydekum, E., Krueppel, R., Engelbrecht, C.J., Schlegel, F., Schroter, A., Rudin, M., Helmchen, F. Simultaneous BOLD fMRI and fiber-optic calcium recording in rat neocortex. *Nat Methods.* (2012).
- Sengpiel, F., Stawinski, P., Bonhoeffer, T. Influence of experience on orientation maps in cat visual cortex. *Nat Neurosci.* 2 (1999), 727-732.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2 (2005), 905-909.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 59 (1962), 223-239.
- Simons, D.J., Carvell, G.E., Hershey, A.E., Bryant, D.P. Responses of barrel cortex neurons in awake rats and effects of urethane anesthesia. *Exp Brain Res.* 91 (1992), 259-272.
- Slovin, H., Arieli, A., Hildesheim, R., Grinvald, A. Long-term voltage-sensitive dye imaging reveals cortical dynamics in behaving monkeys. *J Neurophysiol.* 88 (2002), 3421-3438.
- Smetters, D., Majewska, A., Yuste, R. Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods.* 18 (1999), 215-221.
- Song, W.J., Kawaguchi, H., Totoki, S., Inoue, Y., Katura, T., Maeda, S., Inagaki, S., Shirasawa, H., Nishimura, M. Cortical intrinsic circuits can support activity propagation through an isofrequency strip of the guinea pig primary auditory cortex. *Cereb Cortex.* 16 (2006), 718-729.
- Sotres-Bayon, F., Quirk, G.J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol.* 20 (2010), 231-235.
- Steinschneider, M., Reser, D., Schroeder, C.E., Arezzo, J.C. Tonotopic organization of responses reflecting stop consonant place of articulation in primary auditory cortex (A1) of the monkey. *Brain Res.* 674 (1995), 147-152.
- Stephens, D.J., Allan, V.J. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science.* 300 (2003), 82-86.

Steriade, M. Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience*. 101 (2000), 243-276.

Steriade, M., McCormick, D.A., Sejnowski, T.J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. 262 (1993a), 679-685.

Steriade, M., Nunez, A., Amzica, F. Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *J Neurosci*. 13 (1993b), 3266-3283.

Steriade, M., Nunez, A., Amzica, F. A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci*. 13 (1993c), 3252-3265.

Stiebler, I., Neulist, R., Fichtel, I., Ehret, G. The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *J Comp Physiol A*. 181 (1997), 559-571.

Stinnakre, J., Tauc, L. Calcium influx in active *Aplysia* neurones detected by injected aequorin. *Nat New Biol*. 242 (1973), 113-115.

Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., Konnerth, A. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (2003), 7319-7324.

Sullivan, M.R., Nimmerjahn, A., Sarkisov, D.V., Helmchen, F., Wang, S.S. In vivo calcium imaging of circuit activity in cerebellar cortex. *J Neurophysiol*. 94 (2005), 1636-1644.

Sumbre, G., Muto, A., Baier, H., Poo, M.M. Entrained rhythmic activities of neuronal ensembles as perceptual memory of time interval. *Nature*. 456 (2008), 102-106.

Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., Tank, D.W. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*. 385 (1997), 161-165.

Svoboda, K., Helmchen, F., Denk, W., Tank, D.W. Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo. *Nat Neurosci*. 2 (1999), 65-73.

Svoboda, K., Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron*. 50 (2006), 823-839.

Szobota, S., Gorostiza, P., Del Bene, F., Wyart, C., Fortin, D.L., Kolstad, K.D., Tulyathan, O., Volgraf, M., Numano, R., Aaron, H.L., Scott, E.K., Kramer, R.H., Flannery, J., Baier, H., Trauner, D., Isacoff, E.Y. Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron*. 54 (2007), 535-545.

Tai, S.P., Chan, M.C., Tsai, T.H., Guol, S.H., Chen, L.J., Sun, C.K. Two-photon fluorescence microscope with a hollow-core photonic crystal fiber. *Opt Express*. 12 (2004), 6122-6128.

Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Locally synchronized synaptic inputs. *Science*. 335 (2012), 353-356.

- Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., Nedergaard, M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* 9 (2006), 260-267.
- Tan, K.R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J.J., Doehner, J., Labouebe, G., Deisseroth, K., Tye, K.M., Luscher, C. GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron.* 73 (2012), 1173-1183.
- Theer, P., Hasan, M.T., Denk, W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett.* 28 (2003), 1022-1024.
- Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S.A., Schreier, E.R., Bargmann, C.I., Jayaraman, V., Svoboda, K., Looger, L.L. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods.* 6 (2009), 875-881.
- Tsien, R.W., Tsien, R.Y. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol.* 6 (1990), 715-760.
- Tsien, R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* 19 (1980), 2396-2404.
- Tsien, R.Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature.* 290 (1981), 527-528.
- Tsien, R.Y. Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci.* 12 (1989), 227-253.
- Tsodyks, M., Kenet, T., Grinvald, A., Arieli, A. Linking spontaneous activity of single cortical neurons and the underlying functional architecture. *Science.* 286 (1999), 1943-1946.
- Tsytsarev, V., Fukuyama, H., Pope, D., Pumbo, E., Kimura, M. Optical imaging of interaural time difference representation in rat auditory cortex. *Front Neuroeng.* 2 (2009), 2.
- Varela, F., Lachaux, J.P., Rodriguez, E., Martinerie, J. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat Rev Neurosci.* 2 (2001), 229-239.
- Varga, Z., Jia, H., Sakmann, B., Konnerth, A. Dendritic coding of multiple sensory inputs in single cortical neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (2011), 15420-15425.
- Verkhatsky, A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev.* 85 (2005), 201-279.
- Vincent, P., Maskos, U., Charvet, I., Bourgeais, L., Stoppini, L., Leresche, N., Changeux, J.P., Lambert, R., Meda, P., Paupardin-Tritsch, D. Live imaging of neural structure and function by fibred fluorescence microscopy. *EMBO Rep.* 7 (2006), 1154-1161.

- Wachowiak, M., Cohen, L.B. Correspondence between odorant-evoked patterns of receptor neuron input and intrinsic optical signals in the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 89 (2003), 1623-1639.
- Wachowiak, M., Denk, W., Friedrich, R.W. Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004), 9097-9102.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., Nedergaard, M. Astrocytic Ca(2+) signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci.* 9 (2006), 816-823.
- Wang, X., Lu, T., Snider, R.K., Liang, L. Sustained firing in auditory cortex evoked by preferred stimuli. *Nature.* 435 (2005), 341-346.
- Wessels, J.T., Busse, A.C., Mahrt, J., Dullin, C., Grabbe, E., Mueller, G.A. In vivo imaging in experimental preclinical tumor research--a review. *Cytometry A.* 71 (2007), 542-549.
- Wilt, B.A., Burns, L.D., Wei Ho, E.T., Ghosh, K.K., Mukamel, E.A., Schnitzer, M.J. Advances in light microscopy for neuroscience. *Annu Rev Neurosci.* 32 (2009), 435-506.
- Winer, J.A. Decoding the auditory corticofugal systems. *Hear Res.* 212 (2006), 1-8.
- Winer, J.A., Lee, C.C. The distributed auditory cortex. *Hear Res.* 229 (2007), 3-13.
- Winship, I.R., Plaa, N., Murphy, T.H. Rapid astrocyte calcium signals correlate with neuronal activity and onset of the hemodynamic response in vivo. *J Neurosci.* 27 (2007), 6268-6272.
- Worgotter, F., Suder, K., Zhao, Y., Kerscher, N., Eysel, U.T., Funke, K. State-dependent receptive-field restructuring in the visual cortex. *Nature.* 396 (1998), 165-168.
- Xu, W., Huang, X., Takagaki, K., Wu, J.Y. Compression and reflection of visually evoked cortical waves. *Neuron.* 55 (2007), 119-129.
- Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Mitsui, S., Ishida, Y., van der Horst, G.T., Suzuki, M., Shibata, S., Okamura, H. View of a mouse clock gene ticking. *Nature.* 409 (2001), 684.
- Yaroslavsky, A.N., Schulze, P.C., Yaroslavsky, I.V., Schober, R., Ulrich, F., Schwarzmaier, H.J. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Phys Med Biol.* 47 (2002), 2059-2073.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Davidson, T.J., Mogri, M., Deisseroth, K. Optogenetics in neural systems. *Neuron.* 71 (2011a), 9-34.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., Stehfest, K., Fudim, R., Ramakrishnan, C., Huguenard, J.R., Hegemann, P., Deisseroth, K. Neocortical

excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*. 477 (2011b), 171-178.

Yuste, R. Fluorescence microscopy today. *Nat Methods*. 2 (2005), 902-904.

Yuste, R., Katz, L.C. Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*. 6 (1991), 333-344.

Yuste, R., Peinado, A., Katz, L.C. Neuronal domains in developing neocortex. *Science*. 257 (1992), 665-669.

Zepeda, A., Arias, C., Sengpiel, F. Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Methods*. 136 (2004), 1-21.

Zhang, F., Wang, L.P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., Deisseroth, K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*. 446 (2007), 633-639.

Zheng, J.Q., Poo, M.M. Calcium signaling in neuronal motility. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23 (2007), 375-404.

Zipfel, W.R., Williams, R.M., Webb, W.W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*. 21 (2003), 1369-1377.

Zucker, R.S. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 9 (1999), 305-313.

7 Eigene Publikationen

7.1 Publikationen, die Teile dieser Dissertation enthalten

Garaschuk O., Milos R.I., **Grienberger C.**, Marandi N., Adelsberger H., Konnerth A. (2006) Optical monitoring of brain function *in vivo*: from neurons to networks. *Pflugers Arch* 453:385-396

Adelsberger H., **Grienberger C.**, Stroh A., Konnerth A. *In Vivo* Calcium Recordings and Channelrhodopsin-2 Activation through an Optical Fiber, *Imaging in Neuroscience: A Laboratory Manual*, F. Helmchen and A. Konnerth, editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2011.

Grienberger C.*, Adelsberger H.*, Stroh A., Milos R.I., Garaschuk O., Schierloh A., Nelken I., Konnerth A. (2012) Sound-evoked network calcium transients in mouse auditory cortex *in vivo*. *J Physiol* 590(Pt 4):899-918

* Gleicher Beitrag

7.2 Weitere Publikationen

Rocheffort N.L., **Grienberger C.**, Konnerth A., *In vivo* two-photon calcium imaging using multicell bolus loading of fluorescent indicators, *Imaging in Neuroscience: A Laboratory Manual*, F. Helmchen and A. Konnerth, editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2011.

Rocheffort N.L.*, Narushima M.*, **Grienberger C.**, Marandi N., Hill D.N. and Konnerth A. (2011) Development of direction-selectivity in mouse cortical neurons, *Neuron* 71(3):425-432

Grienberger C., Konnerth A. (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73(5):862-885.

Grienberger C.*, Rochefort N.L.*, Adelsberger H., Henning H.A., Hill D.N., Reichwald J., Staufenbiel M. and Konnerth A. (2012) Staged decline of neuronal function *in vivo* in an animal model of Alzheimer's Disease. *Nature Communications* 3: 774.

* Gleicher Beitrag

7.3 Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen

Gemeinsame Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft und der Europäischen Physiologischen Gesellschaften, 26. – 28. März 2006, München, Deutschland. Optic fiber based detection of calcium signals in the auditory cortex of mice *in vivo*. **Grienberger C.**, Adelsberger H., Konnerth A. Oral presentation (OT10-55).

31. *Tagung der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, 28. März – 1. April 2007, Göttingen, Deutschland. Long-range calcium waves in the brain of adult mice. Adelsberger H., Schierloh A., **Grienberger C.**, Milos R-I., Garaschuk O., Konnerth A. Poster presentation (T30-2C).

91. *Deutsche Physiologentagung*, 22. – 25. März 2012, Dresden, Deutschland. Optic fiber-based detection of sound-evoked network calcium transients in the mouse auditory cortex *in vivo*. Adelsberger H., **Grienberger C.**, Stroh A., Milos R-I., Garaschuk O., Schierloh A., Konnerth A. Oral presentation (041).

8 Danke

Ich danke Herrn Prof. Dr. Arthur Konnerth und Herrn apl. Prof. Dr. Helmuth Adelsberger für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung in die Methoden, die inspirierenden wissenschaftlichen Diskussionen und die hervorragende Betreuung der Arbeit. Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Albrecht Stroh für das kritische Lesen dieser Dissertationsarbeit.

Ich danke allen ehemaligen und jetzigen Kollegen am Lehrstuhl für zelluläre Physiologie und am Institut für Neurowissenschaften für die Unterstützung sowie für die großartige Arbeitsatmosphäre.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Familie, meinen Geschwistern Regine, Simon und Maria und ganz besonders meinen Eltern, für ihren bedingungslosen Beistand und ihre Zuneigung.

9 Eidesstattliche Erklärung

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

Neuronale Netzwerkanalyse mittels Fluoreszenz-Mikroendoskopie *in vivo*

im Institut für Neurowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch

Prof. Dr. Arthur Konnerth und apl. Prof. Dr. Helmuth Adelsberger

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser ohne 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 :.....

.....

Christine Grienberger

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christine Maria Grienberger
Geboren am	25. November 1982 in Eichstätt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsweg

09/1988 – 07/1992	Grundschule St. Walburg, Eichstätt
09/1992 – 11/1997	Gabrieli – Gymnasium Eichstätt
12/1997 – 07/2001	Willibald – Gymnasium Eichstätt
10/2001 – 09/2003	Studium der Humanmedizin (Vorklinischer Abschnitt) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2003 – 11/2008	Studium der Humanmedizin (Klinischer Abschnitt) an der Technischen Universität München
11. Dezember 2008	Approbation als Ärztin
Seit 01/2009	Studentin im PhD-Studiengang „Medical Life Science and Technology“ der Technischen Universität München

Berufliche Tätigkeit

10/2004 – 09/2005	Unterbrechung des Medizinstudiums und Doktorandin am Lehrstuhl für zelluläre Physiologie des Physiologischen Instituts der LMU (Direktor: Prof. Konnerth)
Seit 01/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neurowissenschaften der TU München (Direktor: Prof. Konnerth)