Institut für Neurowissenschaften der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth)

Spontane Netzwerkoszillationen in der Großhirnrinde neugeborener Säuger

Jennifer Linn

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth
- 2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Th. R. Tölle
- 3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel, emeritiert,
 - Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 04.10.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.03.2006 angenommen.

1 Inhaltsverzeichnis

1		INHALTSVERZEICHNIS	2
2		VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	5
3		EINLEITUNG	8
3.	1	Die Großhirnrinde	8
	3.1.1	Die Entwicklung der Großhirnrinde	10
	3.1.2	Besonderheiten der Signalübertragung in der unreifen Großhirnrinde	12
3.	2	Die Bedeutung neuronaler Aktivität für die Reifung des zentralen Nervensystems	14
	3.2.3	Spontane Aktivitätsformen im sich entwickelnden Gehirn	19
4		PROBLEMSTELLUNG	22
5		MATERIAL UND METHODEN	24
5.1		Hirnschnitte	24
5.2		Etablierung eines intakten Großhirnpräparates	26
5.3		Lösungen und Pharmaka	30
5.4		Fluoreszenzmessungen	31
5.	5	Elektrophysiologie	35
	5.5.1	Extrazelluäre Feldpotentialmessungen	35
	5.5.2	Patch-clamp-Messungen in perforated-patch Technik	36
6		ERGEBNISSE	38
6.	1	Frühe Netzwerkoszillationen (cENOs) in der Großhirnrinde	38
	6.1.1	Der Großteil der kortikalen Neuronen beteiligt sich an den cENOs	42
	6.1.2	Elektrische Aktivität während der cENOs	44
	6.1.3	Die Ausbreitung der cENOs im Hirnschnittpräparat	46

6.1.4	Die <i>cENOs</i> erfordern Aktionspotentialaktivität und eine funktionsfähige synaptische Übertragung	49
6.1.5	Pharmakologisches Profil der cENOs	51
6.1.6	Entwicklungsprofil der <i>cENOs</i>	53
6.1.7	Die Bedeutung der depolarisierenden GABA-Wirkung für die <i>cENOs</i>	57
6.2	ENOs im Neokortex und im benachbarten Hippocampus	62
6.3	cENOs in Hirnschnittpräparaten neugeborener Mäuse	68
6.4	cENOs im intakten Säugergehirn	72
6.4.1	Pharmakologisches Profil der <i>cENOs</i> im intakten Großhirn	76
6.4.2	2 Kartierung der <i>cENOs</i>	78
7	DISKUSSION	84
7.1	<i>cENOs</i> : Eine globale Netzwerkaktivität in der Großhirnrinde neugeborene Säuger	r 84
7.2	Mechanismen, die den <i>cENOs</i> zugrunde liegen	85
7.2.1	Die <i>cENOs</i> erfordern Aktionspotentialaktivität und die Aktivierung ionotro Glutamatrezeptoren	per 86
7.2.2	2 Die Bedeutung von GABA für die cENOs	88
7.3	Die cENOs im intakten Großhirn	90
7.3.1	Ein intaktes Großhirnpräparat als in vivo-nahes Modell	90
7.3.2	Kartierung der <i>cENOs</i> im intakten Großhirn	91
7.3.2	2 Die cENOs scheinen von mehreren Schrittmacherregionen ausgehen zu können	93
7.3.3	<i>cENOs</i> am lebenden Tier	94
7.4	Die funktionelle Bedeutung der <i>cENOs</i>	96
7.4.1	Evidenzen für die Bedeutung der <i>cENOs</i> bei der Regulierung des Zellwachstums	97
7.4.2	Mögliche Bedeutung der <i>cENOs</i> bei der Konsolidierung synaptischer Verbindungen	98

7.4.3	Mögliche Rolle der <i>cENOs</i> bei der Konsolidierung langer Assoziationsbahnen	99
7.5	Evidenzen für das Auftreten von <i>cENOs</i> bei Frühgeborenen	100
8	ZUSAMMENFASSUNG	102
9	LITERATURVERZEICHNIS	105
10	ANHANG	121
10.1	Publikationsliste	121
10.1.1 Originalarbeiten		121
10.1.	2 Tagungsbeiträge	121
11	DANKVERMERK	122

2 Verzeichnis der Abkürzungen

а	anterior
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AI	agranulär insulär
AM	Acetoxymethylester
AMPA	(alpha)-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolproprionsäure
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺]	intrazelluläre Calciumkonzentration
CaCl ₂	Calciumchlorid
cENOs	cortical Early Network Oscillations/ Frühe kortikale
	Netzwerkoszillationen
CL	Chlorid
[CI ⁻ .],i	intrazelluläre Chloridkonzentration
cm	Zentimeter
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	direct current
D,L-APV	D,L-2-Amino-Phosphono-pentansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	embryonaler Tag/ Gestationstag
EEG	Elektroencephalogramm
ENOs	Early Network Oscillations/ Frühe Netzwerkoszillationen
F	Fluoreszenz
ΔF	Fluoreszenzänderung
Fr	frontal
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
Fura-PE 3 AM	Fura-PE 3 Acetoxymethylester
fs	Femtosekunden
GABA	Gamma Amino Butyric Acid
GDPs	Giant Depolarizing Potentials
h	Stunde(n)

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
Hz	Hertz
K⁺	Kalium
KCC2	Kalium-Chlorid-Cotransporter
KCI	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz
I	Liter
L	links
LGN	Corpus geniculatum laterale
Μ	molar
MΩ	Megaohm
Mg ²⁺	Magnesium
MgATP	Magnesiumadenosintriphosphat
MgCl2	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	millimolar
mosmol	milliosmol
ms	Millisekunden
mV	millivolt
n	Anzahl
NA	numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaGTP	Natrium-Guanosintriphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO4	Natriumdihydrogenphosphat
NBQX	6-Nitro-7-Sulphamoylbenz(f)-Quinoxaline-2,3-Dion
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	mikromolar

μV	Mikrovolt
Oc	occipital
р	posterior
p	<i>p</i> -Wert/ probability
Р	postnataler Tag
Par	parietal
Pir	piriform
PRh	perirhinal
R	rechts
ROI	Region Of Interest
S	Sekunden
Те	temporal
ТТХ	Tetrodotoxin
VGCC	voltage gated calcium channel
%	Prozent

3.1 Die Großhirnrinde

Die Großhirnrinde ist ein äußerst komplexes Netzwerk miteinander kommunizierender Nervenzellen, das zu einzigartigen Leistungen wie Lernen und Gedächtnisbildung befähigt ist. Der Neokortex der erwachsenen Ratte besteht aus ca. 34 Millionen Neuronen, die überwiegend in der zweiten Hälfte der pränatalen Entwicklung entstehen (Rickmann et al., 1977; Raedler et al., 1980). Er ist aus sechs Zellschichten aufgebaut, die sich hinsichtlich ihrer Histologie und dem Muster afferenter und efferenter Verbindungen deutlich unterscheiden. Die Hirnrindenschichten II, III, V und VI bestehen vorwiegend aus erregenden, glutamatergen Neuronen (Parnavelas, 1990), den Pyramidenzellen. Die Axone dieser Neuronen projizieren zu anderen Hirnarealen, einschließlich anderer Regionen Neokortex. Außer den Pyramidenzellen des sind in den Hirnrindenschichten noch viele, hauptsächlich inhibitorische Interneuronen nachweisbar, die γ-Aminobuttersäure (GABA) als Überträgerstoff verwenden (Parnavelas, 1990). Die Afferenzen der verschiedenen Sinnesorgane enden zum überwiegenden Teil in Schicht IV, dem Haupteingang der Großhirnrinde. Sie besteht vor allem aus kleineren Ganglienzellen (Schaltzellen), deren Neuriten sich innerhalb der Rinde verzweigen. Die erste Hirnrindenschicht weist nur eine geringe Zelldichte auf und besteht im Wesentlichen aus den Zellfortsätzen der Pyramidenzellen aus den Schichten II, III und V.

Prinzipiell weist der gesamte Neokortex diese sechsschichtige, horizontale Gliederung auf. Nach Spezialisierung der verschiedenen Regionen der Großhirnrinde kann man jedoch in den funktionell unterschiedlichen Hirnrindenabschnitten auch zytoarchitektonische Unterschiede nachweisen. Während in motorischen Rindenfeldern die Schichten II, IV und VI nur schwach entwickelt sind (agranulärer Rindentyp), sind in den primären sensorischen Rindenbezirken die Körnerzellschichten II und IV besonders kräftig ausgebildet (granulärer Rindentyp). Beim Menschen versteht man unter einer Area Hirnrindenbezirke, die gleichartig aufgebaut sind (Smith, 1907; Campbell, 1905; Brodmann, 1909) oder eine bestimmte Funktion erfüllen (Vogt und Vogt, 1919).

Zusätzlich zu dem sechsschichtigen, horizontalen Aufbau des Neokortex ist die Großhirnrinde auch vertikal gegliedert. Die Dendriten der Pyramidenzellen tiefer Schichten steigen in oberflächlicher gelegene Schichten der Hirnrinde auf und verzweigen sich dort. So entstehen säulenartige Module zusammenarbeitender Zellen, die im physiologischen Reizversuch gleichartig reagieren (Mountcastle, 1957; Goldman und Nauta, 1977, Hubel und Wiesel, 1977). Diese Säulen, die sog. Kolumnen, sind untereinander durch horizontal verlaufende Fasern verbunden (Gilbert, 1985) und stellen mutmaßlich die kleinsten funktionellen Einheiten der Großhirnrinde dar (Bureau et al., 2004).

Die Verbindungen zwischen der Hirnrinde und anderen Teilen des Zentralnervensystems, beispielsweise den Stammganglien oder dem Rückenmark, werden als Projektionsfasern bezeichnet. Die verschiedenen Rindenbezirke einer Großhirnhemisphäre sind untereinander durch die kurzen und langen Assoziationsfasern verbunden. Die Kommisurenfasern dagegen verknüpfen meist identische Bezirke der beiden Großhirnhemisphären miteinander.

3.1.1 Die Entwicklung der Großhirnrinde

Die Ausbildung der sechsschichtigen Großhirnrinde resultiert aus einer komplizierten Sequenz von Ereignissen, wie Neurogenese, neuronaler Migration, Differenzierung und Synapsenentstehung, die sich zum Teil zeitlich überlappen (Sidman und Rakic, 1973; Allendoerfer und Shatz, 1994; Price und Willshaw, 2000, zur Übersicht siehe Sutor, 2002).

Die Nervenzellen der Großhirnrinde der Ratte entwickeln sich zwischen den embryonalen Tagen 12 und 21 (E12 bis E21) bei einer Gestationsdauer von 21 Tagen. Sie entstehen aus dem Neuroepithel der Ventrikelzone, einer Keimschicht an der Wand der Seitenventrikel der Großhirnbläschen. Die postmitotischen Neuronen wandern zur Oberfläche der sich entwickelnden Hirnrinde und bilden dort die sog. preplate (Marin-Padilla, 1971; Rickmann et al., 1977). Vorübergehend bildet sich dann eine zusätzliche Schicht zwischen Ventrikelzone und preplate aus, die Intermediärzone, die hauptsächlich aus tangential verlaufenden Fasern besteht. In der weiteren Entwicklung entsteht innerhalb der preplate die cortical plate (Jacobson, 1991). Die cortical plate, deren Neuronen zwischen E15 und E21 entstehen, teilt die preplate in die oberflächlich gelegene Marginalzone und die subplate. Aus der Marginalzone entsteht die Hirnrindenschicht I, aus der cortical plate die Hirnrindenschichten II bis VI der reifen Hirnrinde. Die cortical plate entwickelt sich von innen nach außen, d.h. die Schichten V und VI bilden sich vor den Schichten II und III. Die letzten Neuronen erreichen die oberflächlichen Schichten der cortical plate zwischen den postnatalen Tagen 3 und 5 (P3 bis P5) (zur Übersicht siehe Sutor, 2002).

Die Entwicklung der Großhirnrinde ist mit der Ausbildung der sechs Hirnrindenschichten nicht abgeschlossen. Damit sie ihre vielfältigen Aufgaben sowohl spezifische Verbindungen erfüllen kann. sind innerhalb einer Hirnrindenregion, als auch zwischen verschiedenen Arealen der Großhirnrinde und zu anderen Teilen des Gehirns notwendig. In den ersten beiden Wochen nach der Geburt vervierfacht sich die Gesamthirnmasse (Uylings et al., 1990) und die Synapsendichte in der Hirnrinde steigt auf das Dreißigfache an (Blue et al., 1983). Schon an P1 können nach Stimulation afferenter Fasern in den Neuronen der Hirnrinde Antworten abgeleitet werden (Armstrong-James und Fox, 1988), d.h. in diesem frühen Entwicklungsstadium existieren bereits funktionelle Synapsen. Die Entwicklung der synaptischen Schaltkreise des Neokortex beginnt also bereits in der Phase der Neurogenese und der Migration der Nervenzellen. Unmittelbar nach der Geburt sind jedoch im Vergleich zum Gehirn des erwachsenen Tieres insbesondere die langen kortikokortikalen Assoziationsfasern und die thalamokortikalen Afferenzen nur spärlich ausgebildet (Bureau et al., 2004; Lopez-Bendito und Molnár, 2003). Die thalamokortikalen Verbindungen etablieren sich in der Ratte hauptsächlich in der ersten postnatalen Woche (zur Übersicht siehe Shatz, 1990; Goodman und Shatz, 1993, Sutor, 2002; Lopez-Bendito und Molnár, 2003).

Die Entstehung und Organisation der komplexen neuronaler Netzwerke erstreckt sich insgesamt über einen längeren Entwicklungszeitraum vor und nach der Geburt und bezieht sowohl aktivitätsabhängige als auch aktivitätsunabhängige Prozesse mit ein (zusammengefasst in Goodman und Shatz, 1993; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Feller et al., 2005).

3.1.2 Besonderheiten der Signalübertragung in der unreifen Großhirnrinde

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem unreifen und dem erwachsenen Gehirn besteht in der Funktion der neuronalen Überträgerstoffe Glutamat und GABA. Beim Erwachsenen stellt Glutamat den wichtigsten erregenden Transmitter im Großhirn dar. Funktionelle glutamaterge AMPA-Rezeptoren sind jedoch erst gegen Ende der ersten postnatalen Woche nachweisbar (Durand et al., 1996, Isaac et al., 1995, Liao et al., 1995). Unmittelbar nach der Geburt tragen die glutamatergen Synapsen im Hippokampus der Ratte fast ausschließlich NMDA-Rezeptoren. Unter Ruhepotentialbedingungen sind diese Rezeptoren durch Magnesiumionen (Mg²⁺) gehemmt, die Synapsen sind also "stumm". Auch die thalamokortikalen Synapsen im somatosensorischen Kortex der Ratte sind zu einem hohen Prozentsatz bis zum 8. Tag nach der Geburt stumm (Isaac et al., 1997; Feldman et al., 1999). Außerdem wurden stumme glutamaterge Synapsen im Tectum des Frosches nachgewiesen (Wu et al., 1996).

Im Gegensatz zu den glutamatergen AMPA-Rezeptoren existieren funktionelle GABA (γ-Aminobuttersäure)-Rezeptoren schon früher. Während GABA im adulten Gehirn der wichtigste hemmende Neurotransmitter ist, stellt sie in der frühen Entwicklung in vielen Hirnregionen den bedeutendsten erregenden Überträgerstoff dar. Eine Verschiebung der GABA-Wirkung von erregend zu hemmend im Laufe der Entwicklung wurde bereits 1978 an Hühnerneuronen in Kultur nachgewiesen (Obata et al., 1978). Ben Ari und Mitarbeiter zeigten an Schnittpräparaten des Hippokampus neugeborener Ratten, dass die Aktivierung GABAerger Synapsen in den ersten beiden postnatalen Wochen zu einer Depolarisation und nicht wie beim erwachsenen Tier zu einer Hyperpolarisation führt

(Ben Ari et al., 1989). Die erregende Wirkung von GABA in der frühen Entwicklung beruht auf einer erhöhten intrazellulären Chloridkonzentration in den jungen Neuronen und einem dadurch ins Positive verschobenen Umkehrpotential für Chloridionen. Die Aktivierung von GABA-Rezeptoren führt in vielen Hirnstrukturen neugeborener Säuger daher zu einer Depolarisation der Zellmembran und über die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zu einer Erhöhuna der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (zusammengefasst in Cherubini et al., 1991 und Ben Ari, 2002). Klare Anhaltspunkte für eine depolarisierende Wirkung GABAs fanden sich in Arbeiten im Hippokampus (Berninger et al., 1995; Leinekugel et al., 1995, 1997 und 1999; Khazipov et al., 1997; Garaschuk et al., 1998; Hollrigel et al., 1998; Ganguly et al., 2001), dem Kortex (Luhmann et al., 1991; Owens et al., 1996; Barker et al., 1998; Garaschuk et al., 2000; Dammerman et al., 2000; Maric et al., 2001), dem Rückenmark (z. B. Serafini et al., 1995), dem Hypothalamus (Chen et al., 1996; Wang et al., 2001; Gao et al., 2001) und dem Riechkolben (Serafini et al., 1995). Die durch GABA-Aktivierung induzierte Depolarisation reicht aus, um die spannungsabhängige Blockierung der NMDA-Kanäle durch Mg²⁺ aufzuheben, d. h. in unreifen Nervenzellen haben GABA und NMDA-Kanäle eine synergistische Wirkung, ähnlich wie AMPA- und NMDA-Rezeptoren im adulten Gehirn.

Die Wirkung von GABA im unreifen Gehirn ist jedoch weitaus komplexer als bisher dargestellt. GABA-induzierte depolarisierende postsynaptische Ströme können nicht nur zu einer Erregung, sondern auch indirekt zu einer Hemmung neuronaler Aktivität führen, indem sie die Wirkung glutamaterger, erregender, postsynaptischer Ströme verringern (Edwards et al., 1990; Staley und Mody, 1992; Zhang und Jackson, 1995; Jackson und Zhang, 1995; Ziskind-Conheim, 1998;

Khalilov et al., 1999). Durch Öffnung von Chloridkanälen wird die Depolarisation, die durch die glutamatergen Ströme verursacht wird, verringert.

GABA hat in der frühen Entwicklung also eine Doppelrolle inne und kann sowohl erregend, als auch hemmend wirken (Sutor, 1994; Wells et al., 2000; Khalilov, 1999; Khazipov, 2004). Im Laufe der ersten zwei Wochen nach der Geburt geht die depolarisierende Wirkung GABAs in eine hyperpolarisierende über, hauptsächlich durch verstärkte Expression des K⁺-Cl⁻-Ko-transporters KCC2 in der Zellmembran, der zu einer Erniedrigung der [Cl⁻]₄ führt (Rivera et al., 1999).

3.2 Die Bedeutung neuronaler Aktivität für die Reifung des zentralen Nervensystems

Die Bedeutung aktivitätsabhängiger gegenüber aktivitätsunabhängiger Mechanismen in der Entwicklung der Großhirnrinde wird seit vielen Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse dieser Studien sind zum Teil sehr widersprüchlich. Es ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wie die genetisch programmierten molekularen Vorgänge mit elektrischer Aktivität interagieren.

Unter dem Begriff "Aktivität" versteht man in diesem Zusammenhang die Freisetzung erregender Neurotransmitter und die dadurch bedingte Aktivierung bestimmter Zellen bzw. das Feuern von Aktionspotentialen. Diese Vorgänge münden in einer Erhöhung der [Ca²⁺]_i. Kalzium (Ca²⁺) und insbesondere periodische Fluktuationen der [Ca²⁺]_i spielen in der Hirnentwicklung eine große Rolle. Sie sind wichtig für Wachstum und Differenzierung in dem sie z. B. Zellproliferation (LoTurco et al., 1995), Genexpression (Ghosh et al., 1995; Gu et al., 1997) und neuronale Migration (Komuro und Rakic, 1996) regulieren. Außerdem beeinflussen sie u. a. die

Motilität axonaler und dendritischer Wachstumskegel (Kater et al., 1988; Nagerl et al., 2004), die Bildung postsynaptischer Rezeptorkanäle (Kirsch et al., 1998) und die aktivitätsabhängige Reifung glutamaterger Synapsen (Durand et al., 1996).

Die verschiedenen Regionen der Großhirnrinde unterscheiden sich in ihrem spezifischen Verbindungsmuster, und diese Unterschiede scheinen wesentlich die Funktionen der Areale zu bedingen (Kolb und Tees, 1990). Damit die Hirnrinde also ihre komplexen Aufgaben ausführen kann, sind äußerst präzise, synaptische Verbindungen zwischen den Nervenzellen notwendig. Man weiß heute, dass die Entstehung dieser synaptischen Schaltkreise in der Großhirnrinde in zwei Hauptphasen abläuft (Sutor, 2002).

Zunächst bildet sich, zeitlich parallel zu der Entstehung der sechs Hirnrindenschichten, ein grobes Grundmuster afferenter und efferenter Verbindungen im Neokortex aus. Diese Vorgänge laufen weitgehend aktivitätsunabhängig ab (Shatz, 1990; Verhage et al., 2000; Demarque et al., 2002). Untersuchungen an *Knock-Out* Mäusen, in denen durch die Ausschaltung des Neuronen-spezifischen synaptischen Proteins Munc18-1 eine Transmitterfreisetzung unmöglich war, zeigten, dass sich das Gehirn dieser Mäuse in frühen embryonalen Stadien morphologisch nahezu normal entwickelte (Verhage et al., 2000; Demarque et al., 2002). In den betroffenen Tieren bildeten sich die verschiedenen Hirnrindenschichten aus, die primären apikalen Dendriten im Hippokampus wuchsen aus und Wachstumskegel und die ersten Synapsen entstanden. Ab dem 15. Gestationstag (E15) setzte jedoch eine ausgeprägte Apoptose der Neuronen ein. Aus diesen Experimenten wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass neuronale Aktivität nicht für die initiale Entwicklung, wohl aber für die Erhaltung der Nervenzellen und die Reifung ihrer Synapsen erforderlich ist.

Die Synapsenreifung findet in der zweiten Phase der frühen Entwicklung statt (Sutor, 2002). Diese Entwicklungsperiode ist durch die Entstehung vieler neuer, jedoch auch durch Elimination alter und Neuverknüpfung vorhandener Synapsen (Shatz, 1990; Katz und Shatz, 1996; Katz und Crowley, 2002) gekennzeichnet. Diese Feinjustierung und Spezifizierung der synaptischen Verbindungen sind auf neuronale Aktivität angewiesen (z.B. Goodmann und Shatz, 1993; Katz und Shatz, 1996; Swindale, 1996; Stryker und Harris, 1986; Sur et al., 1999; Sur und Learney, 2001; Weliky, 2000; Constantine-Paton et al., 1990; Wong, 1993). Wie schon Hebb postulierte (Hebb, 1949), werden "richtige" Synapsen durch die Korrelation prä- und postsynaptischer Aktivitätsmuster gestärkt und bewahrt, während andere Verbindungen eliminiert werden (Katz und Crowley, 2002).

Die Pionierarbeit hinsichtlich der Bedeutung neuronaler Aktivität für die Reifung der Großhirnrinde wurde im visuellen System geleistet. Hubel und Wiesel wiesen 1962 erstmals die funktionelle Organisation der primären Sehrinde in Kolumnen der okulären Dominanz nach. Elektrophysiologische Ableitungen in der primären visuellen Hirnrinde der Katze zeigten, dass die beiden Augen unterschiedliche Neuronen aktivierten, die je nach Augenpräferenz in Säulen gruppiert waren (Hubel und Wiesel; 1962). Nach einäugiger Reizdeprivation junger Katzen sank die Zahl der Neuronen im primären visuellen Kortex, die auf die Stimulierung des betroffenen Auges antworteten. Die Zahl der Nervenzellen, die auf die Reizung des offenen Auges reagierten, stieg dagegen deutlich an (Wiesel und Hubel, 1963 und 1965). Diese Studien lieferten Anhaltspunkte dafür, dass es in der frühen postnatalen Entwicklung eine sog. "kritische Phase" gibt, während der die neuronalen Schaltkreise besonders sensibel für externe Reize sind (Wiesel und Hubel, 1963, 1965; Hubel und Wiesel, 1970). Während dieser "kritischen Phase"

können bereits existierende Verbindungen durch sensorisch-vermittelte Aktivität verändert werden.

Erstaunlicherweise waren die Kolumnen der okulären Dominanz in der visuellen Hirnrinde der Katze jedoch nach beidäugiger Reizdeprivation oder Aufwachsen der Tiere in kompletter Dunkelheit weitgehend regelrecht ausgebildet (Wiesel und Hubel, 1965; Stryker und Harris, 1986). Bei Affen bilden sich die Kolumnen der okulären Dominanz sogar schon vor der Geburt aus, wenn die Augen noch geschlossen sind (Wiesel und Hubel, 1974; Rakic, 1976; Des Rosiers et al., 1978). Horton und Hocking konnten zeigen, dass die Aufteilung der Sehrinde in okuläre Dominanzkolumnen bei neugeborenen Affen anatomisch schon genauso präzise ist wie beim erwachsenen Tier (Horton und Hocking, 1996). Während einerseits also sensorische Erfahrung während einer "kritischen Phase" die funktionelle Architektur der Hirnrinde modifizieren kann, müssen andererseits intrinsische Mechanismen existieren, die die reizunabhängige, initiale Ausbildung dieser funktionellen Gliederung bewirken. Viele Experimente ergaben in den letzten Jahrzehnten Hinweise darauf, dass zusätzlich zu externer, sensorischer Stimulation auch intrinsisch generierte, spontane Aktivitätsformen für die regelrechte Ausbildung der Organisationsstruktur der Hirnrinde erforderlich sind.

Galli und Maffei entdeckten, dass die pränatale Retina spontane Aktivitätsmuster generieren kann, bevor die Photorezeptoren überhaupt ausgebildet sind (Galli und Maffei, 1988; Maffei und Galli-Resta, 1990). Spontane Aktionspotentiale treten in mehreren Zellen synchron auf und breiten sich in Wellenform aus (Feller et al., 1996). Sie werden von einem Netzwerk amakriner Zellen und retinaler Ganglienzellen in komplexen, räumlich-zeitlichen Mustern generiert (Meister et al., 1991; Wong et al., 1993, 1995; Wong und Oakley, 1996;

Maffei und Galli-Resta, 1990; Feller et al., 1997). Für ihre Entstehung und Ausbreitung in der Retina ist eine funktionsfähige, cholinerge, synaptische Übertragung erforderlich. Die Axone der retinalen Ganglienzellen werden im Corpus Geniculatum Laterale (LGN) auf das zweite Neuron der Sehbahn umgeschaltet. Durch die Blockade der spontanen Wellen in der Retina durch Hemmung spannungsaktivierter Natriumkanäle mit Tetrodotoxin (TTX) wird die regelrechte, schichtspezifische Segregation der Axone im LGN verhindert (Sretavan et al., 1988; Shatz und Stryker, 1988; Penn et al., 1998). Beim Frosch wird die Entstehung augenspezifischer Zellstreifen, dem Äquivalent der Dominanzkolumnen bei Säugern, durch Injektion von TTX verhindert bzw. existierende Streifen werden aufgehoben (Reh und Constantine-Paton, 1985). Nach externer Stimulation der mit TTX behandelten Tiere mit synchronen Aktivitätsmustern bildeten sich die Zellstreifen jedoch regelrecht aus (Stryker und Strickland, 1984).

Die spontanen Wellen in der Netzhaut stellen eine Aktivitätsform dar, die in den Retinazellen eines Auges korreliert und unabhängig von der Aktivität im anderen Auge auftritt. Versuche an Nagetieren und Frettchen zeigten, dass durch diese retinalen Wellen thalamische Neuronen aktiviert werden. Sie könnten daher als Signale fungieren, die die Segregation thalamischer Afferenzen in der visuellen Hirnrinde steuern (Mooney et al., 1993, 1996; Weliky und Katz, 1999). Neuere Studien konnten jedoch nachweisen, dass diese Projektion der Axone der Neuronen des LGN in die Schicht 4 der Sehrinde auch nach dem Unterbrechen aller retinalen Eingänge stattfindet (Crowley und Katz, 1999). Diese Experimente weisen darauf hin, dass die spontanen Wellen in der Netzhaut nicht allein für die Aufteilung der thalamischen Afferenzen in der Sehrinde verantwortlich sind. Weliky und Katz fanden in junger Frettchen eine korrelierte spontane Aktivität im sich entwickelnden LGN, die

möglicherweise diesen Prozess steuert (Weliky und Katz, 1999). Sie konnten zeigen, dass beim Fehlen retinaler Eingänge kortiko-thalamische Rückkopplungsmechanismen notwendig sind, um eine synchrone oszillatorische Aktivität im LGN aufrechtzuerhalten.

Der heutige Stand der Forschung spricht dafür, dass der initialen Ausbildung der okulären Dominanzkolumnen und der späteren Plastizität dieser Kolumnen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Sensorisch vermittelte, neuronale Aktivität spielt eine große Rolle in der späteren, plastischen Entwicklungsphase, der "kritischen Periode". Für die Entstehung der Dominanzkolumnen sind dagegen v. a. molekulare Mechanismen und intrinsisch generierte Muster spontaner Aktivität erforderlich (zur Übersicht siehe Crowley und Katz, 2002).

Durch die Erkenntnisse aus diesen Experimenten hat die Untersuchung der Rolle spontaner Aktivität von Neuronen und Netzwerken für die Ausbildung zerebraler Schaltkreise wesentliche Bedeutung erlangt.

3.2.3 Spontane Aktivitätsformen im sich entwickelnden Gehirn

Sich in der Entwicklung befindende Netzwerke zeigen eine Vielfalt spontaner Aktivitätsmuster (z. B. Ben-Ari et al., 1989; Katz und Shatz, 1996; Hanse et al., 1997; Garaschuk et al., 1998; Feller, 1999; Weliky, 2000, 2001; Spitzer 2002; Khazipov et al., 2004).

Beispielsweise wurde im Rückenmark eine Form spontaner Aktivität nachgewiesen, bei der mehrere Zellen gleichzeitig aktiv sind, wobei diese Zellen nicht notwendigerweise nebeneinander liegen (Spitzer et al., 1997; O'Donovan, 1998).

Große, hochgradig synchrone Oszillationen des Membranpotentials treten in den Neuronen des Locus coeruleus neugeborener Ratten auf (Williams und Marshall, 1987). Die Kommunikation zwischen den gleichzeitig aktiven Zellen erfolgt dabei mutmaßlich über Gap-junctions (Travagli et al., 1995).

Im Hippokampus neugeborener Ratten sind *in vitro* und *in vivo* spontane oszillatorische Änderungen der elektrischen Aktivität bekannt, die in der CA3-Region in Form sog. *Giant Depolarizing Potentials (GDPs)* auftreten (Ben-Ari et al., 1989; Khalilov et al., 1997; Leinekugel et al., 1998, 2002). In der CA1-Region sind spontane oszillatorische Änderungen der [Ca²⁺]_i beschrieben, die sog. *Early Network Oscillations (ENOs)* (Garaschuk et al., 1998). Diese treten in nahezu allen Neuronen der CA1-Region synchron auf. Sie erfordern Aktionspotentialaktivität, sind durch den GABA_A- Rezeptorantagonisten Bicucullin komplett blockierbar und werden durch Antagonisten ionotroper Glutamatrezeptoren deutlich reduziert (Garaschuk et al., 1998). Die *ENOs* sind nur während der ersten beiden Wochen nach der Geburt zu beobachten. Simultan zu den *ENOs* können auf Einzelzellebene in den CA1 Pyramidenzellen Aktionspotentialsalven abgeleitet werden (Garaschuk et al., 1998). Ähnliche Aktivitätsmuster konnten auch im Hippokampus neugeborener Hasen (Menendez et al., 1998) und in Primaten (Khazipov et al., 2001) nachgewiesen werden.

Spontane oszillatorische Aktivität in der unreifen Großhirnrinde war bislang nur örtlich begrenzt in Einzelzellen (Luhmann und Prince, 1991; Yuste et al., 1991; Owens et al., 1998; Flint et al., 1999), Zellpaaren (Schwartz et al., 1998) oder kleinen Zellgruppen von 5 bis 50 Nervenzellen (Yuste et al., 1992), beschrieben.

In der embryonalen ventrikulären Zone beispielsweise sind verschiedene Muster spontaner Ca²⁺-Signale in proliferierenden, neuroepithelialen Zellen

beschrieben: isolierte Ca²⁺-Transienten in Einzelzellen, koordinierte Anstiege der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in lokalen Zellclustern und synchrone Ca²⁺-Transienten in mitotischen Zellpaaren (Owens et al., 1998).

In den frühen postnatalen Neuronen des Neokortex treten spontane GABA_Avermittelte depolarisierende Potentiale auf, die mutmaßlich über spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle (VGCC) in den unreifen Nervenzellen der Hirnrinde Ca²⁺-Transienten hervorrufen (Owens et al., 1996; Luhmann und Prince, 1991). Endogenes Glutamat führt in der sich entwickelnden Hirnrinde über metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) zu spontanen Ca²⁺-Oszillationen in einzelnen Zellen, die keine Aktionspotentialaktivität erfordern (Flint et al., 1999).

Die Zellen in der obersten Schicht der Hirnrinde zeigen in den ersten postnatalen Tagen mehrere Sekunden andauernde, spontane Ca²⁺-Anstiege. Diese treten in den Nicht-Cajal-Rezius-Zellen paarweise bzw. simultan in Gruppen von 5 bis 13 nicht benachbarter Zellen auf (Schwartz et al., 1998).

Yuste und Mitarbeiter wiesen in der Hirnrinde neugeborener Ratten sog. "Domänen" gleichzeitig spontan aktiver Zellen nach. Das sind Gruppen von 5 bis 50 benachbarten Nervenzellen, die sich nicht überlappen und koordinierte, spontane Anstiege der [Ca²⁺]_i zeigen (Yuste et al., 1992), die sich in Form einer Ca²⁺-Welle zwischen den Zellen ausbreiten (Kandler und Katz, 1998). Die Aktivität in den unabhängig von Aktionspotentialaktivität auf. Antagonisten Domänen tritt verschiedener Neurotransmitter führen nicht Blockade zu einer dieser Spontanaktivität, d.h. die Erregung breitet sich innerhalb dieser Domänen nicht synaptisch aus. Dagegen gibt es Hinweise darauf, dass die Neuronen innerhalb einer Domäne über Gap-junctions kommunizieren (Yuste et al., 1992, 1995).

4 Problemstellung

Da synchrone Spontanaktivität in der frühen Entwicklung im Neokortex bislang nur in kleinen Zellpopulationen bzw. regional begrenzt nachgewiesen werden konnte, war es bisher völlig unklar, wie sich lange Assoziationsverbindungen zwischen verschiedenen, weit auseinander liegenden Regionen der Großhirnrinde ausbilden können.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, durch die Anwendung der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie, eine neue Form spontaner Netzwerkaktivität in der Großhirnrinde neugeborener Säuger nachzuweisen. Diese sog. kortikalen frühen Netzwerkoszillationen (*cortical Early Network Oscillations, cENOs*) stellten Fluktuationen der [Ca²⁺]_i dar, die über weite Entfernungen entlang des Neokortex hochkorreliert auftraten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften dieser bislang unbekannten Aktivitätsform im Großhirn neugeborener Ratten und Mäuse zu analysieren.

Es wurde untersucht, welcher Anteil der Nervenzellen der Großhirnrinde sich an den *cENOs* beteiligte, welche Muster die *cENOs* in den verschiedenen Hirnarealen zeigten und wie sie sich entlang der Hirnrinde ausbreiteten. Die elektrische Aktivität, die den *cENOs* zugrunde liegt, wurde charakterisiert, die Mechanismen der Entstehung und Ausbreitung der *cENOs* analysiert und ein Entwicklungsprofil dieser neuen Aktivitätsform erstellt.

Im nächsten Schritt wurden die Eigenschaften der neu entdeckten *cENOs* mit den bekannten *ENOs* im Hippokampus (Garaschuk et al., 1998) verglichen.

Problemstellung

Eine weitere wichtige Zielsetzung der Arbeit war der Nachweis und die Kartierung der *cENOs* im intakten Großhirn. Dazu wurde in dieser Arbeit ein neues *in vitro* Ganzhirnpräparat der Maus entwickelt, das es ermöglichte, die spontane Netzwerkaktivität simultan in beiden Großhirnhemisphären zu untersuchen. Außerdem konnten die Muster der *cENOs* in den verschiedenen funktionellen Arealen der Großhirnrinde analysiert und eine Korrelation der Aktivität zwischen diesen Regionen im intakten Gehirn durchgeführt werden.

5 Material und Methoden

Die Versuche wurden an horizontalen Hirnschnitten und an intakten Hirnpräparaten neugeborener Ratten und Mäuse durchgeführt. Die 0 bis 12 Tage alten Wistar Albino Ratten wurden von der Firma Charles-River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die 0 bis 5 Tage alten Balb/c-Mäuse stammten aus der Zucht der Technischen Universität München.

5.1 Hirnschnitte

Experimente an akuten Hirnschnittpräparaten haben in den letzten Jahren viel dazu beigetragen, das Verständnis grundlegender Mechanismen im Gehirn zu erweitern. Schnittpräparate bieten einige prinzipielle Vorteile gegenüber Experimenten am lebenden Tier. Das umgebende Medium kann unter kontrollierten Bedingungen gehalten und verändert werden. Pharmaka können in definierten Konzentrationen einerseits auf das gesamte Präparat, andererseits aber auch gezielt nur auf einzelne Zellen appliziert werden. Im Schnittpräparat sind außerdem die visuelle Identifizierung der untersuchten Zellen und die Untersuchung definierter Hirnrindenschichten möglich.

Zur Herstellung der Hirnschnittpräparate wurde das Versuchstier dekapitiert. Mit einer feinen Schere wurden die Kopfhaut und die dünne Schädeldecke gespalten und entfernt. Das Gehirn der Tiere konnte als Ganzes entnommen und sofort in eine Petrischale überführt werden, die mit eisgekühlter (1 bis 3°C) artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) gefüllt war (Zusammensetzung siehe unten). Die Lösung wurde durch Begasung mit Carbogen (95%O₂, 5%CO₂) mit Sauerstoff

angereichert. Mit einem Skalpell wurden Hirnstamm und Teile des Kleinhirns abgetrennt.

Zur Herstellung von Hirnschnitten wurden die beiden Großhirnhemisphären entlang der Mittellinie getrennt und der kraniale Anteil einer Hemisphäre durch einen Horizontalschnitt entfernt. Auf dieser Schnittfläche wurde das Präparat mit Cyanoacrylatkleber (Uhu, Brühl, Deutschland) auf eine Schneidekammer aufgeklebt. Die Kammer wurde sofort mit eisgekühlter, begaster Ringerlösung aufgefüllt, sodass Hirngewebe vollständig bedeckt Mit einem vibrierenden das war. Gewebeschneidegerät wurden unter Sicht 400 bis 500 µm dicke, transversale Großhirnschnitte hergestellt. Die Aufbewahrung der Hirnschnitte in der Inkubationskammer erfolgte zunächst bei 34°C. Die hohe Temperatur begünstigte ein Absterben der oberflächlich gelegenen Zellen, die durch den Schneidevorgang vorgeschädigt waren. Die darunter liegenden intakten Zellen blieben unversehrt und wurden so für Messungen zugänglich. Nach 30 min wurde die Temperatur auf 25°C gesenkt, um den Stoffwechsel des Gewebes herabzusetzen. Unmittelbar zu Beginn eines Experimentes wurde der Hirnschnitt in eine Messkammer überführt und mit einem u-förmigen Platindraht, über den einige sehr dünne Nylonfäden gespannt waren, am Boden der Messkammer fixiert. Die Qualität der Hirnschnitte wurde vor Versuchsbeginn visuell unter 60facher Vergrößerung überprüft. Die Messkammer wurde während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich mit oxygenierter ACSF perfundiert, um die Sauerstoffversorgung der Präparate während der Experimente zu gewährleisten. Die Versuche an den Hirnschnitten wurden, soweit im Ergebnisteil nicht anders erwähnt, bei 32°C durchgeführt. Dazu war in dem Perfusionssystem zwischen Pumpe und Messkammer ein Heizelement (Eigenbau) zwischengeschaltet, das mit einem Temperaturregler (Eigenbau) verbunden war. Es erwärmte die

Ringerlösung so weit, dass die im Versuchsbad gemessene Temperatur 32°C betrug.

5.2 Etablierung eines intakten Großhirnpräparates

Ein Nachteil der Schnittpräparate besteht darin, dass die Nervenfasern, die nicht in der Schnittebene liegen, unterbrochen sind. Zur Erforschung dreidimensionaler neuronaler Netzwerke sollten die komplexen Schaltkreise der Hirnrinde jedoch weitgehend intakt sein. Diese Untersuchungen müssten daher idealerweise am lebenden Tier durchgeführt werden, um eine Unversehrtheit aller neuronalen Verbindungen zu gewährleisten. Versuche in vivo sind jedoch technisch wesentlich schwieriger durchzuführen als Experimente an isolierten Präparaten. Insbesondere die Untersuchung neugeborener Tiere ist aufgrund der weichen Schädel- und Hirnstrukturen, die die Fixierung der erforderlichen Messgeräte erschweren oder unmöglich machen, eine große Herausforderung an die Technik. Um Störsignale z. B. durch Atmung, Herzschlag und Bewegung gering zu halten, müssen die Tiere in der Regel vor Durchführung der Versuche anästhesiert werden. Eine Vollnarkose an kleinen neugeborenen Säugern wie Ratte oder Maus ist ebenfalls mit technischen Schwierigkeiten verbunden. Darüber hinaus beeinflussen viele Narkotika, z. B. Benzodiazepine, die synaptische Übertragung und verfälschen so die Ergebnisse bei der Untersuchung von Netzwerkaktivitäten oder führen, wie im Fall der cENOs, sogar zu einer Blockade der zu untersuchenden Aktivität (Adelsberger et al., 2005).

Zur detaillierten Untersuchung der Eigenschaften der *cENOs* in der intakten Großhirnrinde wurde daher in dieser Arbeit ein intaktes Hirnpräparat etabliert und auf

Lebensfähigkeit überprüft. Dieses *in vitro* Präparat unterliegt einerseits nicht den Beschränkungen der Schnittpräparate, birgt jedoch andererseits auch nicht die technischen Schwierigkeiten der Experimente am lebenden Tier.

Die Versuche am intakten Hirnpräparat wurden an Mäusen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Großhirnrinde der Maus lediglich ca. 500 µm dick und liegt damit in der Größenordnung der Schnittdicke der Hirnschnittpräparate. Die Sauerstoffversorgung der tiefen Hirnrindenschichten durch Diffusion ist daher einfacher als in der dickeren Hirnrinde einer gleichaltrigen Ratte.

Zur Herstellung des intakten Hirnpräparats wurden die 0 bis 2 Tage alten Balb/c Mäuse (n=42) dekapitiert und die Gehirne schnell als Ganzes entnommen. In einer Petrischale, die mit eisgekühlter (1 bis 3°C), oxygenierter ACSF gefüllt war, wurden Hirnstamm und Teile des Kleinhirns mit einem Skalpell abgetrennt. Die Versuche wurden unmittelbar im Anschluss an die Präparation durchgeführt.

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und eine Beschädigung des Präparates durch die Fixierung während der Experimente zu vermeiden, musste eine neue Messkammer entwickelt werden. In dieser Plexiglaskammer lag das Gehirn auf einem Netz, das von allen Seiten von sauerstoffreicher Ringerlösung umspült wurde. Der Boden der Kammer war mit einer Silikonschicht bedeckt. Die Ganzhirnpräparate wurden auf dem Netz so positioniert, dass das zu untersuchende Kortexareal zugänglich war (Abb.1) und dann mit Minutiennadeln an dem Silikon festgesteckt. Die kleinen Nadeln wurden dabei durch Kleinhirn und Bulbi olfactorii gesteckt, die Großhirnhemisphären blieben unverletzt. Die Messkammer wurde bei Raumtemperatur kontinuierlich mit oxygenierter Ringerlösung perfundiert, wobei die Perfusionsrate 5 ml/min betrug.





Abb. 1: Messkammer für Großhirnpräparate.

Position des Großhirnpräparates in der Messkammer. Das Gewebe wurde von allen Seiten mit Sauerstoff angereicherter Ringerlösung umspült. Im linken Bild sind das zu- bzw. ableitende Schlauchsystem und die Erdungselektrode erkennbar. Der links markierte Bildausschnitt ist rechts vergrößert dargestellt. Kleinhirn und Bulbi olfactorii wurden mit Minutiennadeln fixiert.

Unter den herrschenden Versuchsbedingungen überlebten die Zellen in den Hirnpräparaten für mindestens 4 bis 5 Stunden. Dies wurde mit drei verschiedenen Verfahren überprüft. Zunächst wurde während einer Zeitspanne von bis zu 5 Stunden das Ruhemembranpotential der Neuronen der Hirnrinde zu verschiedenen Zeitpunkten durch *patch-clamp*-Technik in der *whole-cell*-Konfiguration (Neher und Sakmann, 1992; Hille, 1992) bestimmt. Es betrug gleich bleibend -64 bis -67 mV (n=4 Zellen, 150 bis 200 µm tief im Gewebe). Außerdem zeigte sich bei quantitativen Messungen der Ruhe-[Ca²⁺]_i in kortikalen Neuronen kein signifikanter Unterschied zwischen der [Ca²⁺]_i in frisch präparierten Schnitten (31 ± 9 nM; n=134 Zellen) und in Schnitten, die von Ganzhirnpräparaten angefertigt wurden, die zuvor 6 Stunden lang in der Messkammer aufbewahrt wurden (36 ± 3 nM, n=250 Zellen). Zusätzlich wurde ein Färbetest auf Lebensfähigkeit der Zellen durchgeführt (LIVE/DEAD ®Viability/Cytotoxixity Assay Kit, Molecular Probes, Eugene, USA; angewendet wie von Stosiek et al., 2003 beschrieben). Dieser Test bestimmt zwei Parameter der

Intaktheit und Lebensfähigkeit der Zellen: die intrazelluläre Esteraseaktivität und die Integrität der Plasmamembran. Die Färbung der Zellen mit einem Gemisch aus Calcein AM (0,6 mM) und Ethidium Homodimer-1 (0,6 mM) zeigte, dass von 13649 untersuchten Zellen (n=5 Hirne) nach 4 Stunden 87,2 \pm 2 % der Zellen lebendig waren (Abb.2).



Abb. 2: Färbetest auf Lebensfähigkeit der Zellen.

Zwei-Photonen-Fluoreszenzbild eines Präparates, das mit Calcein AM (0,6 mM) und Ethidium Homodimer-1 (0,6 mM) angefärbt war. Diese Substanzen dienten als Indikator der Lebensfähigkeit der Zellen. Die lebenden Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz (Calcein AM), die Kerne der abgestorbenen Zellen stellen sich rot dar (Ethidium Homodimer-1). Die optische Schicht, in der das Fluoreszenzbild aufgenommen wurde, befand sich 150 µm tief im Gewebe.

Das in dieser Arbeit etablierte Großhirnpräparat erlaubte es, die Aktivität kortikaler Neuronen unter Bedingungen zu untersuchen, die Untersuchungen am Gehirn eines lebenden Tieres ähnlich waren.

Die unterschiedlichen Areale der Großhirnrinde wurden anhand ihrer relativen räumlichen Lage innerhalb des Neokortex identifiziert. Zur Zuordnung wurde ein stereotaktischer Atlas des Gehirns einer 5 Tage alten Maus verwendet (Paxinos et al., 1991) und durch proportionale Skalierung an das Gehirn der neugeborenen Mäuse angepasst. Dieses Vorgehen ist auch in Studien an Schnittpräparaten ein gängiges Verfahren (z.B. Calderon et al., 2005). Einschränkend muss dabei berücksichtigt werden, dass im Neokortex neugeborener Säuger die Grenzen zwischen den einzelnen Hirnrindenregionen selbst mikroanatomisch nur sehr viel weniger präzise definiert werden können als im reifen Großhirn.

5.3 Lösungen und Pharmaka

Als extrazelluläre Lösung wurde ACSF mit der folgenden Zusammensetzung (in mM) verwendet: 125 NaCl, 4,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ und 20 Glucose. Die Lösung hatte eine Osmolarität von ca. 310 mosm/l und nach 30-minütiger Begasung mit Carbogen einen pH- Wert von 7,4. Um eine Lösung mit 80 mM K⁺ zu erhalten, wurden in der normalen ACSF 80 mM NaCl durch KCl ersetzt.

Die intrazelluläre Lösung, die für Experimente in *perforated-patch* Technik verwendet wurde, enthielt (in mM) 140 KCI, 10 NaCI, 4 Mg-ATP, 0,4 Na-GTP und 10 HEPES.

CNQX (6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dion, 2 und 10 μM), NBQX (6-Nitro-7-Sulphamoylbenz(f)-Quinoxaline-2,3-Dion, 10 μM), D,L–APV (D,L-2-Amino-Phosphono-pentansäure, 50-100 μM), Bicucullin (2 und 20 μM) und TTX (Tetrodotoxin, 500 nM, Biomol, Plymouth Meeting, USA) wurden verwendet wie im Ergebnisteil beschrieben. Sofern keine andere Bezugsquelle angegeben ist, stammten die Substanzen von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Alle Pharmaka wurden zunächst als Stammlösungen angesetzt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Stammlösungen mit oxigenierter ACSF auf die

gewünschte Endkonzentration verdünnt und dann über die Badlösung auf das gesamte Präparat appliziert. In den Fällen, in denen DMSO (dehydriertes Dimethylsulfoxid) als Lösungsmittel verwendet wurde, überstieg dessen Endkonzentration nie 0,2%.

5.4 Fluoreszenzmessungen

Zur Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration an Hirnschnittpräparaten wurden die Ca²⁺-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, USA) und Fura-PE3 AM (TefLabs, Austin, USA) verwendet. Die AM-Ester dieser Farbstoffe sind aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften zellmembrangängig.

Fura-2 AM wird durch Glykoprotein-Multidrugtransporter in nennenswertem Ausmaß aus der Zelle entfernt. Dies trägt zur Minderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Versuchsdauer bei. Der in dieser Arbeit vorwiegend verwendete Indikator Fura-PE3 AM stellt eine Weiterentwicklung des "klassischen" Fura-2 AM-Farbstoffes dar. Fura-PE3 AM wird nicht von den Multidrugtransportern aus der Zelle transportiert. Bei Verwendung dieses Ca²⁺-Indikators wiesen die gefärbten Zellen deshalb lange eine annähernd gleiche Fluoreszenzintensität auf. Dies ermöglichte die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ über mehrere Stunden. Zu Beginn eines Versuchs wurde der Farbstoff mit ACSF auf eine Endkonzentration von 15 µM verdünnt. Die Hirnschnitte wurden mit der verdünnten Farbstofflösung für 10 min bei 5% CO₂, 37°C und über 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Mit einem Zwei-Photonen Laser-Fluoreszenzmikroskop wurden hochauflösende Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Denk et al., 1990). Als energiereiche

Lichtquelle diente ein *mode-locked* Ti:sapphire Laser (Tsunami, Spectra Physics, Mountain View, USA). Zur Generierung ultrakurzer Laserlichtpulse mit einer Wellenlänge von 790 nm wurde der Ti:sapphire Laser von einem Festkörperlaser (Millenia, Spectra Physics, Mountain View, USA) gepumpt. Die gelieferten Pulse hatten eine Dauer unter 100 fs und wurden mit einer Wiederholungsrate von 80 MHz generiert. Mit einem *laser-scanning*-System (MRC 1024, Bio-Rad, England) wurde der gefärbte Gewebeschnitt mit dem gepulsten Laserstrahl mit einer Frequenz von 1 bis 5 Hz abgetastet. Dazu wurden rechteckige Messregionen (*Regions of interest, ROIs*) eingezeichnet, die je nach Vergrößerung einen einzelnen Zellkörper oder bis zu mehrere tausend Zellen enthielten. Die von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Photonen wurden von einem Photomultiplier (H 1518, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) detektiert und zu Bildern rekonstruiert, die digital gespeichert wurden. (Abb. 3 C-E).

Die Verwendung der Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte es, unter geringer (1,9- bzw. 4facher) Vergrößerung gleichzeitig mehrere tausend Nervenzellen in einer sehr dünnen, optischen Schicht zu untersuchen. Bei höheren Vergrößerungen (bis 120fach) konnten außerdem auch räumlich hoch auflösende Fluoreszenzmessungen durchgeführt und einzelne Nervenzellen und deren Dendriten analysiert werden (Abb.3).



Abb. 3: Zwei-Photonen-Fluoreszenzmessungen an großen Zellpopulationen.

A) Schemazeichnung des Gehirns einer neugeborenen Ratte. Die gestrichelten Linien zeigen die Region, aus der die kortikalen Hirnschnittpräparate stammen. B) Schemazeichnung des Prinzips der Zwei-Photonen-Anregung. Nur in der Fokusebene wird genügend Energie bereitgestellt, um Fluoreszenz zu erzeugen. C) Zwei-Photonen-Fluoreszenzbild eines kortikalen Hirnschnittpräparates einer 2 Tage alten Ratte unter niedriger Vergrößerung (1,9fach). Die dunklen, schräg verlaufenden Linien entsprechen dünnen Nylonfäden, mit denen das Präparat fixiert wurde. Das weiße Rechteck kennzeichnet die Hirnrindenregion, die in D) unter höherer Vergrößerung gemessen wurde. D) Der in C) gekennzeichnete Ausschnitt aus der temporalen Hirnrinde unter 20facher Vergrößerung. Das weiße Kästchen kennzeichnet den in E) vergrößert dargestellten Ausschnitt. E) Unter stärkster Vergrößerung (60fach) sind einzelne Neuronen und ihre apikalen Dendriten gut abgrenzbar. (modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Durch Messungen in einer Fokusebene bis zu 150 µm unter der Schnittoberfläche konnte sichergestellt werden, dass die untersuchten Zellen nur minimal durch den Präparationsvorgang geschädigt waren. Mit relativ geringer Anregungsintensität konnte ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Dies ermöglichte Langzeitmessungen (bis zu acht Stunden) der Fluoreszenzsignale, ohne dass eine signifikante Zellschädigung durch die Anregung oder ein wesentliches Ausbleichen des Farbstoffs auftraten.

Im *line-scan*-Modus konnten zeitlich hochauflösendere Messungen durchgeführt werden. In diesem Messmodus wird als *ROI* eine Linie anstatt eines Rechtecks verwendet. Das Schnittpräparat wird entlang dieser Linie mit einer Aufnahmerate von 160 Hz abgerastert.

Es wurden Wasserimmersionsobjektive (10x, 0,3 NA; 40x, 0,8 NA; 60x, 0,9 NA, Olympus) und trockene Objektive (1,9x, 0,14 NA, Olympus; 5x, 0,24 NA, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) benutzt. Bei Verwendung der Trockenobjektive wurde die Kammer mit einem Deckplättchen (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) bedeckt, um Bildstörungen durch Schwankungen des Flüssigkeitspegels in der Kammer zu verhindern.

Die Auswertung der Bilddaten und der elektrophysiologischen Daten erfolgte mit Hilfe von Softwareroutinen, die in Labview (National Instruments, Austin, USA) und Igor Pro (Wavemetrics, Eugene, USA) erstellt wurden. Das Hintergrundrauschen wurde subtrahiert. Da Fura-2 AM und Fura-PE3 AM bei ansteigender $[Ca^{2+}]_i$ mit einer Abnahme der emittierten Fluoreszenz reagieren, wurden die Fluoreszenzsignale als das negative Verhältnis zwischen der Fluoreszenzänderung (Δ F) und der Ausgangsfluoreszenz vor der Stimulation (F) (- Δ F/F) dargestellt. Um ein Maß für die Stärke der Fluoreszenzänderungen zu erhalten, das sowohl Amplitude

als auch Frequenz mit einbezieht, wurde in einigen Versuchen das Integral von - Δ F/F berechnet.

5.5 Elektrophysiologie

Für elektrophysiologische Messungen wurden Glasmikroelektroden verwendet, die mit einem Elektrodenziehgerät (Narishige, New York, USA) aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) hergestellt wurden. Die Spitze der Mikroelektroden wurde mit RTV16 Silikon (GE Electrics, München, Deutschland) überzogen.

5.5.1 Extrazelluäre Feldpotentialmessungen

Es wurden extrazelluläre Feldpotentialmessungen an den Hirnschnittpräparaten und an den intakten Großhirnpräparaten durchgeführt. Die Ableitelektroden waren mit 3 M NaCl-Lösung als leitender Elektrolytlösung gefüllt und hatten Widerstände zwischen 0,9 und 1,2 M Ω . Mit elektronisch gesteuerten Manipulatoren (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) konnte eine genaue Positionierung der Elektroden im Präparat erfolgen. Die Manipulatoren bewegten die Pipetten entlang dreier Achsen, in x- bzw. y-Richtung sowie entlang einer z-Achse schräg nach unten. Die Steuerungseinheit erlaubte es, die genaue Eindringtiefe der Pipette zu errechnen. Im Ganzhirnpräparat wurden die Pipetten ca. 100 bis 200 μ m tief im Gewebe positioniert. Diese Tiefe entspricht den sich entwickelnden Hirnrindenschichten II und III.

Die Ableitelektroden waren jeweils über einen analogen Vorverstärker (Eigenbau) mit den Manipulatoren verbunden. Die Signale wurden zu Tiefpassfiltern

weitergeleitet, die Signale über 1 kHz wegfilterten. Die Potentialänderungen wurden dann von einem Analog-Digital-Wandler (EPC9, HEKA, Lambrecht, Deutschland) mit 5 kHz digitalisiert. Die digitalen Signale wurden in einen Computer eingespeist und mittels "Pulse"-Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland) registriert und gespeichert. Diese Software steuerte auch den EPC 9.

5.5.2 Patch-clamp-Messungen in perforated-patch Technik

An den Großhirnpräparaten wurden Experimente in der perforated-patch Technik (Horn und Marty, 1988; Kyrozis und Reichling, 1995) durchgeführt. Zur Herstellung eines perforierten patch wird nach Etablierung der cell-attached-Konfiguration der Membranfleck unter der Pipette durch eine porenbildende Substanz. hier Gramicidin D (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), durchlöchert. Durch die Verwendung dieser Chlorid-impermeablen lonophore konnten Messungen in whole-cell Konfiguration durchgeführt werden, ohne die **Bestandteile** des Zytosols auszuwaschen ohne die intrazelluläre und Chloridkonzentration zu verändern (Kyrozis und Reichling, 1995; Rhee et al., 1994).

Um ein unerwünschtes Austreten von Gramicidin während der Annäherung der Pipette an die Zelle zu ermöglichen, wurden die Spitzen der Messelektroden durch 5 bis 7 Sekunden langes Eintauchen in eine Gramicidin-freie Pipettenlösung gefüllt. Danach wurden die Pipetten von hinten mit einer Lösung aufgefüllt, die zusätzlich 25 µg/ml Gramicidin enthielt. Mit dieser Lösung hatten sie einen Widerstand von 6 bis 8 MΩ. Die Elektroden wurden blind ca. 70 bis 200 µm tief in das Hirngewebe eingebracht. Nach dem Etablieren der *cell-attached* Konfiguration konnte die Zunahme der Leitfähigkeit durch die Gramicidinionophoren anhand des seriellen Widerstandes bzw. der Abnahme des Membranwiderstandes ermittelt
werden. Der Serienwiderstand überstieg nie 10 bis 12 MΩ. In der *whole-cell*-Konfiguration wurden mit dem EPC-9 *patch-clamp*-Verstärker (HEKA, Lambrecht, Germany) unter Stromklemme Spannungsänderungen aufgenommen, wie in der Literatur beschrieben (Eilers et al., 1995).

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Frühe Netzwerkoszillationen (*cENOs*) in der Großhirnrinde

Zwei-Photonen-Fluoreszenzmessungen an Hirnschnitten neugeborener Ratten, die mit dem Ca²⁺-Indikatorfarbstoff Fura-PE3 gefärbt waren, zeigten spontane, transiente Erhöhungen der [Ca²⁺]_i. Die Messungen wurden unter niedriger Vergrößerung (1,9- oder 4fach) durchgeführt. So konnten gleichzeitig mehrere tausend Nervenzellen untersucht werden. Die spontanen Ca²⁺-Fluktuationen wiederholten sich regelmäßig und wurden in allen untersuchten Abschnitten der Großhirnrinde beobachtet. Die untersuchten Kortexareale lagen dabei bis zu 8 mm auseinander (Abb. 4). Die spontanen Ereignisse traten meistens in allen Regionen zeitlich hoch korreliert auf. Nur gelegentlich wurden Ereignisse beobachtet, die auf einzelne Regionen beschränkt waren (in Abb. 4 mit einer Raute markiert).

Die unterschiedlichen Kortexareale zeigten dabei verschiedene Aktivitätsmuster (Abb. 5A). Im temporalen Kortex bestanden die Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ meistens aus einem einzelnen Ca^{2+} -Transienten. In den entorhinalen und frontalen Kortexabschnitten dagegen bestand ein Ereignis in der Regel aus mehreren Transienten, wobei die $[Ca^{2+}]_i$ dazwischen nicht den Ruhewert erreichte. Im Folgenden werden die spontanen Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ als Wellen bezeichnet, wobei eine Welle aus einem oder mehreren Ca^{2+} -Transienten bestehen kann.



Abb. 4: Spontane Ca²⁺-Oszillationen treten im gesamten Neokortex neugeborener Ratten auf. A) Schematische Darstellung eines Horizontalschnittes durch das Großhirn einer Ratte. B) Schnittpräparat des Großhirnes einer 2 Tage alten Ratte. Das Präparat entspricht der in A) umrahmten Region. C) Fluoreszenzspuren, die an dem in B) abgebildeten Schnitt gemessen wurden. Sie wurden jeweils in 1x1 mm großen Regionen aufgenommen, die in B) durch Punkte markiert sind. Hier und in allen folgenden Versuchen sind die Fluoreszenzdaten als - Δ F/F dargestellt. Δ F/F bedeutet dabei die Verringerung der Fluoreszenzintensität beim Ansteigen der [Ca²⁺]_i geteilt durch die Intensität unter Ruhebedingungen. Fluoreszenzänderungen, die auf wenige Regionen beschränkt waren, sind in C) mit einer Raute markiert. Auch bei der geringsten Vergrößerung (1,9fach) konnte maximal ein 6 mm langer Ausschnitt des Präparates in einer Messung erfasst werden. Um einen Vergleich der Fluoreszenzänderungen in Regionen, die bis zu 8 mm voneinander entfernt waren, zu ermöglichen, wurde der Versuch in zwei Schritten durchgeführt. Die Spuren a bis d wurden in der ersten, die Spur f in der zweiten Messung aufgenommen. Spur e setzt sich aus beiden zeitlich auseinander liegenden Versuchen zusammen. Die Sternchen markieren die Spuren, die aus der zweiten Messung stammen.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

In bis zu acht Stunden dauernden Langzeitmessungen trat keine signifikante Änderung des beobachteten Aktivitätsmusters auf (Abb. 5B).



Abb. 5: Unterschiedliche Muster der *cENOs* in den verschiedenen Hirnrindengebieten und Langzeitmessungen der *cENOs*.

A) Fluoreszenzspuren, die im entorhinalen Kortex (obere Spur) und im temporalen Kortex (untere Spur) aufgenommen wurden. Die Ziffern links bezeichnen Ca²⁺-Wellen, die rechts jeweils in einer höheren zeitlichen Auflösung dargestellt sind.
 B) Ausschnittsweise Darstellung einer

Fluoreszenzmessung im entorhinalen Kortex einer 1 Tag alten Ratte, die kontinuierlich über sieben Stunden durchgeführt wurde. Der Ausschnitt links wurde während der ersten, der in der Mitte während der dritten und der linke während der siebten Stunde des Experiments aufgenommen. (modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Die Ca²⁺-Wellen wiederholten sich in sehr regelmäßigen Abständen. Abb. 6A zeigt die Zeitabstände zwischen den einzelnen Wellen während einer siebenstündigen kontinuierlichen Messung. Bei 1 bis 2 Tage alten Tieren traten die spontanen Ereignisse alle 1 bis 12 min auf (n=10, Abb. 6B).



Abb. 6: Die *cENOs* traten mit sehr niedriger Frequenz auf.

A) Histogramm, das die Zeitintervalle zwischen zwei aufeinander folgenden Ca²⁺-Wellen (*Interburst*-Intervalle) in min darstellt. 122 Intervalle aus der in Abb. 5B gezeigten Messung wurden ausgewertet.
B) Box-Plot, der die *Interburst*-Intervalle aus 10 Experimenten an 1 oder 2 Tage alten Ratten zusammenfasst. Ausreißer sind durch schwarze Kreise markiert. Die senkrechten Linien zeigen die Werte, die von den Mittelwerten am weitesten entfernt liegen, jedoch noch keine Ausreißer sind. Die Experimente mit den Nummern 4 und 6 entsprechen den in Abb. 4 bzw. 5 und 6A gezeigten Versuchen.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Die getrennte Messung der Aktivität in den verschiedenen Zellschichten des temporalen und perirhinalen Kortex zeigte, dass sich alle Zellschichten der Hirnrinde an dieser Spontanaktivität beteiligten (n=7). Mit diesen Versuchen wurde eine bislang nicht bekannte Form spontaner Netzwerkoszillationen (*cortical Early Network Oscillations, cENOs*) in der Großhirnrinde neugeborener Ratten nachgewiesen. Die *cENOs* traten in allen Regionen des Neokortex auf und wiederholten sich regelmäßig mit niedriger Frequenz.

6.1.1 Der Großteil der kortikalen Neuronen beteiligt sich an den *cENOs*

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welcher Prozentsatz der Neuronen der Großhirnrinde sich an den *cENOs* beteiligt. Dazu wurde die Spontanaktivität in einzelnen Nervenzellkörpern mit der Aktivität in großen Zellpopulationen verglichen.

Fluoreszenzmessungen an einzelnen kortikalen Neuronen und ihren apikalen Dendriten unter höherer Vergrößerung zeigten, dass die spontanen Ca²⁺-Erhöhungen nicht auf die Zellkörper beschränkt waren, sondern auch in den Zellausläufern nachweisbar waren (Abb. 7A,B,D).

Unter 60facher Vergrößerung befanden sich Zellpopulationen von ca. 30 bis 200 Zellen im Gesichtsfeld. Die Spontanaktivität der gesamten erfassten Zellpopulation wurde durch Mittelung der Einzelzellaktivitäten bestimmt (Abb. 7C). Abb. 7 zeigt einen Versuch, der an einer 3 Tage alten Ratte durchgeführt wurde. Hier wurden 38 Einzelzellen analysiert, von denen 32 Zellen (84,2%) *cENOs* zeigten. Die spontanen Ca²⁺-Transienten in den einzelnen Zellen waren in weit überwiegender Zahl synchron zu den in der gemittelten Populationsantwort erkennbaren Ca²⁺-Transienten in einzelnen Zellen kleinere Ca²⁺-Transienten beobachtet werden, die nur in dieser jeweiligen Zelle nachweisbar waren und in der

gemittelten Populationsantwort nicht aufgelöst werden konnten (in Abb. 7D mit einer Raute markiert).

Insgesamt wurden 771 Zellen in 11 Schnitten (Alter P1 bis P3) untersucht. Dabei wurden Zellverbände betrachtet, die zwischen 30 und 200 Neuronen umfassten. Fast 90 Prozent ($87 \pm 3\%$) der untersuchten Nervenzellen beteiligten sich an den *cENOs*. Diese Experimente zeigten, dass es sich bei den *cENOs* um eine neue Form spontaner, kortikaler Netzwerkaktivität handelt, an der nahezu alle Neuronen der Großhirnrinde beteiligt sind.



Abb. 7: Der Großteil der kortikalen Neuronen beteiligt sich an den cENOs.

A) Zwei-Photonen-Fluoreszenzbild des temporalen Kortex einer 3 Tage alten Ratte, unter 10facher Vergrößerung, 60 μm unter der Oberfläche des Hirnschnitts aufgenommen. Das Kästchen markiert den in B) vergrößert dargestellten Ausschnitt. **B)** Hochauflösendes Fluoreszenzbild des in A) markierten Ausschnitts unter 60facher Vergrößerung. Zu erkennen sind einzelne Zellen der sich entwickelnden Hirnrindenschichten II und III und ihre apikalen Dendriten. Das Bild entstand durch x-y Projektion einer Bilderserie, die in optischen Schnitttiefen von 56 bis 64 μm unter der Gewebeoberfläche in 0,5 μm Schritten aufgenommen wurde. Die Ziffern und die farblichen Umrandungen markieren Zellen, deren Ca²⁺-Signale in D) abgebildet sind. **C)** Aktivität der Zellpopulation, erhalten durch Mittelung der Fluoreszenzspuren von 38 Einzelzellen, die in B) zu identifizieren sind. **D)** Fluoreszenzspuren der beiden in B) farblich und durch Ziffern markierten Zellen bzw. ihres Apikaldendriten. Die Ca²⁺-Transienten in diesen individuellen Zellen waren in weit überwiegender Zahl synchron zu den in der Populationsantwort erkennbaren Ca²⁺-Erhöhungen. Ca²⁺-Transienten, die nur in einer Zelle beobachtet werden konnten und daher nicht in der Populationsantwort erkennbar wurden, sind mit einer Raute markiert. (modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

(modifizient flach Garaschuk, O., Linn, J., Lifers, J. & Konfilenti, A. 2000)

6.1.2 Elektrische Aktivität während der cENOs

Um die elektrische Aktivität der Zellen während der *cENOs* zu untersuchen, wurden simultan Fluoreszenzmessungen und extrazelluläre Feldpotentialmessungen am Hirnschnitt durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass jeder einzelne Transient eines Ca²⁺-*Bursts* von einer Feldpotentialänderung begleitet wurde (Abb. 8A). Die elektrischen Ereignisse hatten Amplituden von 51 ± 4 μ V (n=47 Ereignisse, 4 Schnitte).

Um eine Beeinflussung der *cENOs* durch den Färbevorgang oder das Anregungslicht während der Fluoreszenzmessungen auszuschließen, wurden Feldpotentialmessungen an ungefärbten Schnitten durchgeführt. Dabei konnten ebenfalls spontane, wiederholt auftretende Feldpotentialänderungen mit einer mittleren Amplitude von $63 \pm 2 \mu V$ (n=304 Ereignisse, 5 Schnitte) beobachtet werden (Abb.8B). Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der mittleren

Amplitude oder der durchschnittlichen Dauer der elektrischen Ereignisse in gefärbten und ungefärbten Schnitten (Abb. 8C).



Abb. 8: Die spontanen Ca²⁺-Transienten wurden von Feldpotentialänderungen begleitet.

A) Spontanaktivität einer Zellpopulation im temporalen Kortex einer 5 Tage alten Ratte. Simultane Messung der [Ca²⁺]_i (obere Spur) und der Feldpotentialänderungen (untere Spur). Die Pipette war im gleichen Abschnitt des temporalen Kortex positioniert, in dem auch die Fluoreszenzmessung durchgeführt wurde. **B)** Feldpotentialmessungen, die an einem nicht gefärbten Schnittpräparat durchgeführt wurden. Die Ableitelektrode war im temporalen Kortex positioniert. Das Präparat stammte von einer 4 Tage alten Ratte. **C)** Säulendiagramme, die die mittlere Amplitude (links) bzw. die mittlere Dauer (rechts) der *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen zusammenfassen. Dabei sind in jedem Graph die Mittelwerte der Amplituden in den ungefärbten (weiße Balken, n=5 Schnitte,

304 Ereignisse) und den mit Fura-PE3 beladenen Schnitten (graue Balken, n=4 Schnitte, 47 Ereignisse) nebeneinander gestellt.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Diese Experimente zeigten, dass die *cENOs* nicht von der Färbeprozedur oder anderen experimentellen Einflüssen, die durch die Fluoreszenzmessungen entstehen, beeinflusst werden.

6.1.3 Die Ausbreitung der cENOs im Hirnschnittpräparat

Im nächsten Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob sich die *cENOs* entlang der Hirnrinde ausbreiten. Dazu wurden Zwei-Photonen-Messungen im *line-scan*-Modus in höherer zeitlicher Auflösung durchgeführt. Mit diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die *cENOs* nicht synchron im gesamten Kortex auftreten, sondern sich kontinuierlich als Ca²⁺-Welle entlang der Längsachse der Großhirnrinde ausbreiten (Abb. 9A und B). Im abgebildeten Beispielversuch breitete sich diese Welle von posterior nach anterior aus. Die Distanz zwischen der Messregion im posterioren Kortex und der im anterioren betrug hier 4,7 mm.

Line-scan Messungen unter höherer Vergrößerung (40fach, Abb. 10A) ermöglichten die Analyse der Ca²⁺-Wellen auf Einzelzellebene. Jedes Ereignis breitete sich von einer Zelle ausgehend in einer Richtung auf die benachbarte Zelle aus. In dem in Abb. 10A und B gezeigten Beispiel breitete sich die Welle immer vom posterioren Kortex ausgehend nach frontal aus. Abb. 10C zeigt einen weiteren Versuch dieser Reihe, der an einem anderen Schnitt durchgeführt wurde. Hier breiteten sich die Ca²⁺-Wellen in manchen Fällen auch von anterior nach posterior aus.



Abb. 9: Die *cENO*-assoziierten Ca²⁺-Transienten breiten sich wellenförmig entlang der Längsachse des Kortex aus.

A) Oben: Fluoreszenzbild des temporalen Kortex einer 1 Tag alten Ratte. Entlang der gestrichelten Linie wurden *line-scan* Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Unten: *line-scan* Messung entlang der markierten Messlinie während einer spontanen Ca²⁺-Welle. **B)** Normalisierte Fluoreszenzsignale, die in posterioren, mittleren bzw. anterior gelegenen Kortexarealen (im unteren Bild der Abb. 9A mit einem Strich gekennzeichnet) aufgenommen wurden. Der posteriore Kortex wurde als Bezugspunkt genommen. Der Abstand der Messpunkte relativ dazu ist neben den jeweiligen Spuren angegeben. (modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

In Abb. 10D sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst. Im Großteil der Fälle, d.h. in 84 \pm 7% (n=18 Hirnschnitte) breiteten sich die Ca²⁺-Wellen im Hirnschnitt vom posterioren Kortex ausgehend nach anterior aus. In 7 der 18 untersuchten Schnitte wurden Ca²⁺-Wellen beobachtet, deren Ausbreitung von den frontalen Rindenarealen aus nach entorhinal erfolgte (Abb. 10D).

Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit in posterior-anterior Richtung betrug auf Einzelzellebene 2,0 \pm 0.4 mm/s (n=8 Schnitte). In den Versuchen, in denen die Ausbreitung entlang der gesamten Kortexlängsachse untersucht wurde (n=5 Schnitte), war sie mit 2.1 \pm 0.5 mm/s sehr ähnlich. In der umgekehrten Richtung, a-p, breiteten sich die *cENOs* mit 1,6 \pm 0,3 mm/s geringfügig langsamer aus (n=4 Schnitte, Abb. 10E). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (*p* = 0,45, Student's *t*-Test).



Abb. 10: Ausbreitungsrichtung und Ausbreitungsgeschwindigkeit der Ca²⁺-Wellen.

A) Zwei-Photonen-Fluoreszenzbild der sich entwicklenden Hirnrindenschichten II und III der temporalen Hirnrinde eines 3 Tage alten Tieres unter 40facher Vergrößerung. Die optische Schicht liegt 60 μm unter der Oberfläche des Hirnschnitts. Das Bild ist so orientiert, dass sich am linken Bildrand weiter posterior gelegene Kortexbereiche anschließen würden. Entlang der gestrichelten

Linie wurden line-scan Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die auf der Messlinie am weitesten links gelegene Zelle diente als Referenzzelle für die Auswertungen, die in B) und C) graphisch dargestellt sind. B) Die Verzögerung der Ca²⁺-Welle in den einzelnen Zellen, die auf der Messlinie lagen, gegenüber dem Beginn der Ca²⁺-Welle in der Referenzzelle, ist gegen die Entfernung der jeweiligen Zelle von der Referenzzelle aufgetragen. Die Ca²⁺-Welle breitete sich von posterior nach anterior aus. Die durchgezogene Gerade stellt den "linear least-square fit" mit einer Steigung von 1,8 mm/s dar. C) Experiment, das an einem anderen Hirnschnitt durchgeführt wurde. Auswertung und graphische Darstellung wie in B) erläutert. In diesem Versuch breiteten sich die Ca²⁺-Wellen in beide Richtungen aus, von posterior nach anterior (Quadrate) und von anterior nach posterior (Kreise). Die durchgezogene und die gestrichelte Gerade sind die "linear least-square fits" der zugehörigen Datensätze mit Steigungen von 1,7 mm/s bzw. -1,3 mm/s. D) Die Säulendiagramme zeigen die Wahrscheinlichkeit der Ausbreitung der Ca²⁺-Wellen in p-a bzw. a-p- Richtung (n=18 Hirnschnitte). E) Ausbreitungsgeschwindigkeit der Ca²⁺-Wellen. Vergleich der Geschwindigkeit der Ausbreitung von Zelle zu Zelle (kurze Entfernung, n=8) mit der Ausbreitungsgeschwindigkeit zwischen weit auseinanderliegenden Abschnitten der Hirnrinde (große Entfernung, n=5). (modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

6.1.4 Die *cENOs* erfordern Aktionspotentialaktivität und eine funktionsfähige synaptische Übertragung

Nun sollten die Mechanismen, die den *cENOs* zugrunde liegen, näher untersucht werden. Eine Erniedrigung der Umgebungstemperatur durch Herunterkühlen der Badlösung von 32°C auf 20°C führte zu einer Abnahme der Frequenz der *cENOs* auf 78 ± 19% des Kontrollwerts (n=7; *p*=0.22, Students-T-Test; Abb.11A, B). Darüber hinaus verringerte sich die Zahl der Ca²⁺-Transienten pro Welle bei 20°C auf 59 ± 9% des Kontrollwertes bei 32°C (n=7; Abb. 11C).

Um zu klären, ob die cENOs auf Aktionspotentialaktivität angewiesen sind, wurde Tetrodotoxin (TTX; 250 nM oder 500 nM), ein Blocker spannungsaktivierter Natriumkanäle, appliziert. Dieser blockierte die *cENOs* komplett und reversibel (n=7; Abb. 12A). In der nächsten Versuchsreihe wurde ein Gemisch aus den Blockern der GABA_A- und Glutamatrezeptorkanäle appliziert. Das Gemisch enthielt 10 μM CNQX,

50 μM D,L- APV und 20 μM Bicucullin. CNQX und D,L- APV blockieren glutamaterge AMPA (CNQX)- bzw. NMDA- Rezeptoren (D,L- APV). Bicucullin ist ein kompetitiver, spezifischer GABA_A-Rezeptorblocker. Das Gemisch blockierte die *cENOs* komplett und reversibel (n=5; Abb. 12B).





A) *cENOs*, die in der temporalen Hirnrinde einer 2 Tage alten Ratte aufgenommen wurden, unter Kontrollbedingungen (Badtemperatur 32°C; links), während einer Absenkung der Temperatur des Bades auf 20°C (Mitte) und nach Wiedererreichen von 32°C Badtemperatur (rechts). **B)** Relative, zur Frequenz unter Kontrollbedingungen normalisierte Frequenz der *cENOs* während der Änderung der Badtemperatur (n=7). **C)** Relative Anzahl der Ca²⁺-Transienten pro Ca²⁺-Welle während der Änderung der Änderung der Badtemperatur (n=7).

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)



Abb. 12: Die *cENOs* erfordern eine funktionsfähige synaptische Übertragung.

cENOs, die in der temporalen Hirnrinde einer 1 Tag alten Ratte aufgenommen wurden, unter Kontrollbedingungen (links), während Badapplikation von 500 nM TTX (Mitte, oben) bzw. eines Pharmakagemisches (10 μ M CNQX, 50 μ M APV und 20 μ M Bicucullin; Mitte, unten) und nach Auswaschen (rechts).

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Mit diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass zur Generierung und Ausbreitung der *cENOs* Aktionspotentialaktivität und funktionsfähige, chemische Synapsen erforderlich sind.

6.1.5 Pharmakologisches Profil der cENOs

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß Glutamat und GABA an der Entstehung und Ausbreitung der *cENOs* beteiligt sind, wurden die Antagonisten der verschiedenen Rezeptoren im nächsten Schritt einzeln getestet.

Hemmung der glutamatergen AMPA-Rezeptoren mit CNQX (2 μ M; n=6, Abb.13A und 14) oder der NMDA-Rezeptoren mit D,L- APV (50 μ M; n=5; Abb. 14) blockierte die *cENOs* komplett und reversibel.

Der GABA_A- Rezeptor-Antagonist Bicucullin hatte in einer Konzentration von 2 μ M keinen signifikanten Effekt auf die Oszillationen (n=6, Abb. 13B, unten und 14). In einer Konzentration von 20 μ M (n=9) verringerte Bicucullin die Frequenz der *cENOs* in allen getesteten Schnitten. In 5 von 9 untersuchten Präparaten führte der GABA_A -Antagonist zu einer geringfügigen Erhöhung der mittleren Amplitude der Ca²⁺-Transienten (Abb. 13B, oben und 14).



Abb. 13: Wirkung verschiedener Rezeptorantagonisten auf die cENOs.

A) *cENOs*, die in der temporalen Hirnrinde einer 1 Tag alten Ratte aufgenommen wurden, unter Kontrollbedingungen (links), während Badapplikation von 2 μ M CNQX (Mitte) und nach Auswaschen des CNQX (rechts). **B)** *cENOs* unter Kontrollbedingungen (links), während Badapplikation von 20 μ M (Mitte, oben) bzw. 2 μ M Bicucullin (Mitte, unten) und nach Auswaschen des Bicucullins (rechts). Das Präparat stammt von einer 1 Tag alten Ratte. Die Fluoreszenzmessung wurde in der temporalen

Hirnrinde durchgeführt. Die Reduktion der Frequenz der *cENOs* unter 20 µM Bicucullin war ein robustes Phänomen, ein Ansteigen der Amplitude konnte nur in fünf von neun untersuchten Präparaten beobachtet werden.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)



Abb. 14: Pharmakologisches Profil der cENOs

Säulendiagramm, das den Einfluss von CNQX (2 μ M), Bicucullin (20 und 2 μ M) und APV (50 μ M) auf die Frequenz der *cENOs* zusammenfasst. Die Frequenz unter Einwirkung der Pharmaka ist dargestellt in % der Frequenz unter Kontrollbedingungen.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

6.1.6 Entwicklungsprofil der cENOs

An den ersten beiden postnatalen Tagen traten die *cENOs* im gesamten untersuchten Kortex nahezu zeitgleich und mit gleicher Frequenz auf (Abb. 4C). Die Analyse von 347 Ereignissen (11 Schnitte, 8 Versuchstiere) ergab in diesem Entwicklungszeitraum in 92 \pm 3 % ein Auftreten der Ca²⁺-Transienten in allen Rindenarealen. Dabei betrug das durchschnittliche Intervall zwischen zwei *cENOs* in allen untersuchten Kortexregionen ca. 4 min (vgl. auch Abb. 5A und 6B).

Dieses einheitliche Frequenzverhalten änderte sich jedoch in den folgenden Entwicklungstagen. Im der posterioren Rinde blieb die Frequenz bis zum vierten

postnatalen Tag annähernd konstant bei durchschnittlich einem Ereignis alle 4 min. An den postnatalen Tagen 5 und 6 stieg die Frequenz im posterioren, entorhinalen Kortex geringfügig an. In den weiter frontal gelegenen Regionen der Hirnrinde (temporale, perirhinale, insuläre Rinde) dagegen sank die Frequenz kontinuierlich mit fortschreitendem Alter ab. An P4 wurde in diesen Regionen nur noch durchschnittlich eine Ca²⁺-Welle alle 20 bis 50 min gemessen. Diese seltenen Ereignisse traten meistens (74 ± 13%; n=38 Ereignisse, 7 Schnitte) in Korrelation zu den häufigeren Wellen im entorhinalen Kortex auf, während 26% der Ereignisse nur in den frontalen Rindenarealen zu beobachten waren. An P6 konnten während einer Messdauer von 2 bis 3 h nur noch im posterioren Kortex *cENOs* beobachtet werden, nicht dagegen in den frontalen Regionen (n=5). Jenseits P6 konnten in der gesamten Großhirnrinde keine spontanen Ca²⁺-Transienten mehr gemessen werden (n=5; P7). In Abb. 15A ist beispielhaft eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung über zwei Stunden, die am Hirnschnitt eines 3 Tage alten Tieres aufgenommen wurde, dargestellt. Es wurden simultane Messungen im posterioren Kortex (Abb. 15A, obere Spur) und in der anterioren Hirnrinde (Abb. 15A, untere Spur) durchgeführt. In Abb. 15B ist die Veränderung des Zeitintervalls zwischen zwei aufeinander folgenden Ereignissen (Interburst-Intervall) an den postnatalen Tagen 1 bis 7 in Form eines Säulendiagramms zusammengefasst.

Auch die mittlere Amplitude der Ereignisse änderte sich im Verlauf der Entwicklung in den verschiedenen Rindenbereichen unterschiedlich. Im posterioren Kortex ging die zunehmende Frequenz mit einer Abnahme der durchschnittlichen Amplitude einher. In den anterioren Arealen blieb die Amplitude dagegen bei abnehmender Frequenz im Laufe der Entwicklung konstant.





A) Kontinuierliche, simultane Fluoreszenzmessungen über zwei Stunden im posterioren (obere Spur) und im anterioren Kortex (untere Spur). Das Hirnschnittpräparat stammt von einer 3 Tage alten Ratte.
B) Säulendiagramm, das die durchschnittlichen Zeitintervalle zwischen zwei Ereignissen (*Interburst*-Intervalle) im posterioren bzw. im anterioren Kortex an den postnatalen Tagen 1 bis 7 zusammenfasst. Dargestellt ist der Mittelwert der durchschnittlichen *Interburst*-Intervalle aus jeweils 4 bis 12 Experimenten pro Entwicklungstag.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Im posterioren Kortex traten bis zum fünften Tag nach der Geburt überwiegend Ca²⁺-Wellen auf, die aus mehreren Transienten (im Durchschnitt 2,5 \pm 0,3 pro Welle) zusammengesetzt waren. In allen weiter frontal gelegenen Arealen wurden dagegen einzelne oder paarweise auftretende Transienten beobachtet. Selten traten in allen untersuchten Gebieten Ca²⁺-Wellen auf, die aus 4 bis 6 einzelnen Transienten bestanden.

Um ein Maß für die Stärke dieser Netzwerkaktivität zu erhalten, das Frequenz, Amplitude und Anzahl der Transienten pro Ca²⁺-Welle berücksichtigt, wurde, nach Subtraktion der Grundlinie, die Fläche unter den gemessenen Fluoreszenzspuren bestimmt. Die Gesamtaktivität nahm im Laufe der Entwicklung in allen untersuchten Kortexabschnitten ab (Abb. 16).





Säulendiagramm, das die gemittelten Integrale der Fluoreszenzspuren an den postnatalen Tagen 1 bis 7 zusammenfasst. Vor der Bildung des Intergrals wurde die Ruhefluoreszenz subtrahiert. Die gemittelten Integrale an P2 bis P7 sind in % des Mittelwertes an P1, der als Referenzwert galt, dargestellt.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Das Entwicklungsprofil der *cENOs* unterschied sich also in den verschiedenen Hirnrindenarealen bezüglich Frequenz, Amplitude und der Anzahl der Transienten pro Ca²⁺-Welle. Die Stärke der Aktivität nahm jedoch während des untersuchten Zeitraums im gesamten Kortex ab. Jenseits P6 ließen sich in der Hirnrinde keine *cENOs* mehr nachweisen.

6.1.7 Die Bedeutung der depolarisierenden GABA-Wirkung für die *cENOs*

In der zweiten Woche nach der Geburt geht die depolarisierende Wirkung des Transmitters GABA in eine hemmende Wirkung über. Die zeitliche Korrelation zwischen der veränderten Wirkung GABAs und der Abnahme der Stärke der *cENOs* in diesem Entwicklungszeitraum legt nahe, dass zwischen diesen Phänomenen ein kausaler Zusammenhang besteht.

Die lokale Druckapplikation von GABA (100 μ M) bzw. KCI (80 mM) aus dünnen Glaspipetten (6 bis 12 M Ω) auf Neuronen in den sich entwickelnden Hirnrindenschichten 2 und 3 des temporalen Kortex neugeborener Ratten rief Ca²⁺-Transienten in den Zielzellen hervor. Die beiden Glaspipetten wurden so positioniert, dass ihre Öffnungen sich gegenüberlagen und jeweils einen Abstand von ca. 5 μ m von der Zielzelle hatten. Die Druckapplikation erfolgte mit einem Picospritzer II (General Valve, Fairfield, USA) für jeweils 500 ms. Dadurch wurden Ca²⁺-Signale in der Zielzelle und in benachbarten Neuronen in einem Umkreis von ca. 5 μ m um die Pipetten hervorgerufen. Die Amplituden der GABA-vermittelten Ca²⁺-Transienten wurden in Relation gesetzt zu den durch KCI hervorgerufenen Ca²⁺-Erhöhungen, die als Kontrolle dienten (Abb. 17A bis D). Zur Amplitudenanalyse wurden nur die Zielzellen selbst herangezogen. In die Gesamtzahl antwortender Neuronen dagegen

gingen die benachbarten Zellen ebenfalls ein. Die untersuchten Tiere waren 1 bis 12 Tage alt.

Der Prozentsatz der Zellen, die auf GABA mit einer Ca²⁺-Erhöhung reagierten, sank im Laufe der postnatalen Entwicklung deutlich. In den Tagen P1 bis P5/P6 konnten in über 90% aller untersuchten Neuronen GABA evozierte Erhöhungen der [Ca²⁺]_i beobachtet werden. Dieser Zeitraum entspricht dem Entwicklungsstadium, in dem *cENOs* beobachtet werden konnten. An den Tagen P7/P8 fiel der Prozentsatz der antwortenden Zellen auf 41% ab (47 bis 64 Zellen pro Entwicklungstag, Abb. 18A). Ab diesem Entwicklungsstadium konnten keine *cENOs* mehr beobachtet werden (Abb. 16). In den Zellen, die auf GABA mit einem Ca²⁺-Transienten reagierten, nahm die mittlere Amplitude der Antworten im Verlauf der frühen postnatalen Hirnentwicklung nach dem zweiten postnatalen Tag bis zum fünften Tag nach der Geburt kontinuierlich ab. Von P5 bis P12 war keine signifikante Änderung der Amplituden der durch GABA hervorgerufenen Antworten mehr zu beobachten (n=10 bis 15 Zellen pro Entwicklungstag, Abb. 18B).



Abb. 17: GABA- vermittelte Ca²⁺-Transienten in der unreifen Hirnrinde.

A) Links: hoch auflösendes Fluoreszenzbild der Nervenzellen der sich entwicklenden Hirnrindenschichten II und III des temporalen Kortex einer 1 Tag alten Ratte unter 60facher Vergrößerung. Rechts: Der gleiche Bildausschnitt nach Transformation in Schwarz-Weiß-Modus durch Anwendung einer Schwellenfunktion. Auf die hier und in **C** farblich hervorgehobenen Zellen wurde GABA mittels Druck appliziert. Die rot markierten Zellen antworteten auf GABA mit einem Ca²⁺-Transienten. **B)** Ca²⁺-Fluoreszenzspuren, die von den in **A** mit gleichen Ziffern bezeichneten Neuronen aufgenommen wurden. Die Ca²⁺-Transienten wurden durch 500 ms lange Druckapplikation von 80 mM K⁺. (offene Dreiecke) bzw. 100 μM GABA (gefüllte Dreiecke) hervorgerufen. **C) und D)** Experiment, ähnlich dem in **A** und **B** gezeigten, am temporalen Kortex einer 8 Tage alten Ratte. Zellen, die keine Ca²⁺-Antwort auf GABA zeigten (z.B. die Zellen 1 und 2 in **D**), sind blau dargestellt. (modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)



Abb. 18: Änderung des Antwortverhaltens kortikaler Neuronen auf GABA im Laufe der postnatalen Entwicklung.

A) Prozentsatz der Zellen, die GABA-evozierte Ca²⁺-Transienten zeigten, gegen den Tag nach der Geburt aufgetragen. An jedem Entwicklungstag wurden 47 bis 64 Zellen ausgewertet. **B)** Verhältnis der Amplitude der durch GABA hervorgerufenen Ca²⁺-Transienten zu den durch K⁺ hervorgerufenen Ca²⁺-Antworten gegen den Tag nach der Geburt aufgetragen. Analysiert wurden 10 bis 15 Zellen pro Entwicklungstag. In diese Auswertung gingen nur die primären Zielzellen ein (siehe Material und Methoden).

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Bicucullin (10 μ M) rief in Präparaten 7 Tage alter Tiere, die unter Kontrollbedingungen keine *cENOs* zeigten, *cENO*-ähnliche Erhöhungen der [Ca²⁺]_i hervor (n=4; Abb. 19).



Abb. 19: Bicucullin induziert in der späteren Entwicklung *cENO*-ähnliche Ca²⁺-Erhöhungen.

A) Fluoreszenzmessungen in der anterioren Großhirnrinde einer 7 Tage alten Ratte unter Kontrollbedingungen (links), während Badapplikation von 10 μM Bicucullin und nach Auswaschen des Bicucullins (rechts).

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Die Ergebnisse dieser Experimente sprechen dafür, dass die kortikale Netzwerkaktivität ab P7/P8 von der ab diesem Entwicklungszeitpunkt hemmenden Wirkung GABAs unterdrückt wird.

6.2 **ENOs** im Neokortex und im benachbarten Hippocampus

Unter niedriger Vergrößerung (4fach) wurden simultan Zwei-Photonen Fluoreszenzmessungen im entorhinalen Kortex, im perirhinalen Kortex und im Hippocampus durchgeführt. Die *ENOs* konnten in allen drei Hirnregionen beobachtet werden. Die Auswertungen zeigten jedoch, dass sie im Hippocampus bzw. im Kortex mit unterschiedlicher Frequenz auftraten (Abb. 20). Während das Zeitintervall zwischen zwei Ca²⁺-Wellen im Neokortex zwischen 1 und 12 min betrug (n=10), traten die hippokampalen *ENOs* mit einer deutlich höheren Frequenz auf (durchschnittlich 13 Wellen/min, n=22).



Abb. 20: Die *ENOs* im Hippokampus und im Kortex neugeborener Ratten zeigen ein unterschiedliches Oszillationsmuster.

A) Schemazeichnung eines horizontalen Hirnschnitts (oben). Das Rechteck markiert den Ausschnitt, der in der Fotografie (unten) dargestellt ist. Hirnschnittpräparat einer 2 Tage alten Ratte. Die schwarzen Punkte markieren die Positionen der jeweils ca. 1 mm² großen Hirnregionen, an denen Messungen der Fluoreszenzintensität durchgeführt wurden (*Regions of interest, ROIs*). **B)** Ca²⁺-Fluoreszenzmessungen, die an den in A) markierten Hirnregionen durchgeführt wurden.

Korrelationsanalysen zeigten einen hohen Grad an zeitlicher Übereinstimmung zwischen der Aktivität im posterioren und im anterioren Kortex, obwohl diese beiden Regionen ca. 5 mm auseinander lagen. Dagegen war die Spontanaktivität im posterioren Kortex nicht mit den *ENOs* im benachbarten, nur ca. 2 mm entfernten Hippokampus korreliert (Abb. 21).



Abb. 21: Es besteht keine Korrelation zwischen *ENO*s im Hippokampus und im Neokortex neugeborener Ratten.

Korrelationsanalyse der Daten, die in dem in Abb.20 gezeigten Experiment erhoben wurden. Nach Bildung der ersten Ableitung wurden die Daten durch Setzen eines Schwellenwerts in eine binäre Form umgewandelt. Der Schwellenwert betrug ein Vierfaches der Wurzel des Quadrates der mittleren Fluoreszenz unter Ruhebedingungen in den einzelnen *ROIs*. **A)** Ein hohes Maß an Korrelation bestand zwischen den Messungen in der posterioren bzw. anterioren Großhirnrinde, wobei die *ROIs* ca. 5 mm auseinander lagen. **B)** Korrelationsanalyse zwischen den Fluoreszenzspuren, die im Hippokampus bzw. im posterioren Kortex gemessen wurden. Es bestand keine Korrelation, obwohl der Abstand zwischen diesen *ROIs* nur ca. 2 mm betrug.

Durch die gleichzeitige pharmakologische Untersuchung der kortikalen *ENOs* und der *ENOs* im Hippokampus in einem Hirnschnittpräparat konnte ein unterschiedliches pharmakologisches Profil der beiden Netzwerkaktivitäten nachgewiesen werden.

Die *cENOs* wurden schon durch 2 μ M des AMPA-Rezeptorantagonisten CNQX vollständig blockiert. Dagegen hatte er in dieser niedrigen Konzentration keine signifikante Auswirkung auf die *ENOs* im Hippokampus (n=6; Abb. 22A,B). Erst in einer Konzentration von 10 μ M blockierte CNQX die im Hippokampus gemessenen *ENOs*. Die Hemmung der GABA_A-Rezeptoren durch Bicucullin in einer Konzentration von 20 μ M bewirkte eine völlige Blockade der hippokampalen *ENOs*. Im Neokortex führten 20 μ M Bicucullin lediglich zu einer leichten Erniedrigung der Frequenz der *cENOs* und einer geringen Amplitudenerhöhung (Abb. 22C,D). Während Bicucullin schon in einer niedrigen Konzentration von 2 μ M die Frequenz der *ENOs* im Hippokampus um über 80 Prozent erniedrigte, hatte das Pharmakon in dieser Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die *cENOs* (n=5; Abb. 22).

Diese Experimente zeigten deutliche Unterschiede im pharmakologischen Profil der neokortikalen *ENOs* und der *ENOs* im Hippokampus. Beide Formen der Netzwerkaktivität erfordern zwar funktionsfähige AMPA-, NMDA- und GABA_A-Rezeptoren, die einzelnen Überträgerstoffe sind jedoch in unterschiedlichem Ausmaß an der Generierung und Ausbreitung der hippokampalen bzw. der kortikalen *ENOs* beteiligt. Während die Aktivität im Hippokampus kritisch von GABA-vermittelter Erregung abhängt, sind ionotrope Glutamatrezeptoren für die *cENO*s essentiell.



Abb. 22: Die *cENOs* und die *ENOs* im Hippokampus haben ein unterschiedliches pharmakologisches Profil.

A) Horizontales Schnittpräparat einer 1 Tag alten Ratte unter 4facher Vergrößerung. Die gestrichelten Linien umranden die *ROIs*, in denen die in B) dargestellten Fluoreszenzspuren aufgenommen wurden.
B) Fluoreszenzspuren, die simultan im posterioren Kortex (obere Spur) und im Hippokampus (untere Spur) gemessen wurden, unter Kontrollbedingungen (links), unter Badapplikation von 2 μM CNQX (Mitte) und nach Auswaschen des CNQX (rechts). C, D) Vergleichbares Experiment, das den Effekt von 20 μM Bicucullin zeigt.

(modifiziert nach Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. 2000)

Die *ENOs* im Neokortex und im Hippokampus unterschieden sich auch in ihrem Entwicklungsprofil. Während im Hippokampus an P0 keine *ENOs* nachgewiesen werden konnten, traten die *cENOs* in der Großhirnrinde schon wenige Stunden nach der Geburt auf. Die hippokampalen *ENOs* waren dagegen erstmals an

P1 nachweisbar. Sie erreichten an P2 eine maximale Stärke, die im Laufe der ersten zwei postnatalen Wochen kontinuierlich abnahm. Auch am zwölften Entwicklungstag konnten im Hippokampus noch *ENOs* beobachtet werden (Garaschuk et al, 1998), während im Neokortex ab P7 keine *cENOs* mehr auftraten (Abb. 23).

Diese Versuche zeigen, dass sich die Spontanaktivitäten im Hippokampus und in der Großhirnrinde hinsichtlich Frequenz, Pharmakologie und Entwicklungsprofil deutlich unterscheiden. Außerdem ist keine zeitliche Korrelation zwischen den beiden Formen der Netzwerkaktivität nachweisbar. Es handelt sich also hierbei um unterschiedliche Aktivitätsformen, obwohl beide nahezu die gesamte Neuronenpopulation der jeweiligen Region involvieren und von einer funktionsfähigen synaptischen Übertragung abhängig sind.





Säulendiagramme, die die gemittelten Integrale der Fluoreszenzspuren an den postnatalen Tagen 0 bis 13 im Hippokampus (oben) bzw. an den postnatalen Tagen 1 bis 7 in der Großhirnrinde (unten) darstellen. Vor der Bildung des Intergrals wurde die Ruhefluoreszenz subtrahiert. Die gemittelten Integrale an den unterschiedlichen Entwicklungstagen sind in % der Mittelwerte an P2 (Hippokampus) bzw. P1 (Kortex), die als Referenzwerte galten, dargestellt.

6.3 *cENOs* in Hirnschnittpräparaten neugeborener Mäuse

Mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmessungen unter 4facher Vergrößerung konnten auch an Hirnschnitten neugeborener Mäuse (P0 bis P2) spontane Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in der gesamten Hirnrinde (n=14, Abb. 24) nachgewiesen werden. Die *cENOs* traten in der Maus mit einer höheren Frequenz auf (2,7 ± 0,5 Wellen/min) als in einer gleichaltrigen Ratte (eine Ca²⁺-Welle alle 1 bis 12 min).



Abb. 24: cENOs in Hirnrindenschnittpräparaten neugeborener Mäuse.

A) Zwei-Photonen Fluoreszenzbild eines horizontalen Schnittpräparates der Großhirnhemisphäre einer 2 Tage alten Maus. Die gestrichelten Linien und die Kleinbuchstaben markieren die Regionen in denen die in B) gezeigten Fluoreszenzspuren aufgenommen wurden. Der Schnitt wurde mit dünnen Nylonfäden fixiert, die im Bild als schräg verlaufende helle Linien erkennbar sind. **B)** Fluoreszenzsignale, die in den in A) markierten *Regions Of Interest* aufgenommen wurden.

Die chirurgische Trennung des Neokortex von Hippokampus und Thalamus hatte keinen signifikanten Einfluss auf die spontanen Ca²⁺-Wellen. Nach Isolation der Großhirnrinde betrug die mittlere Frequenz der *cENOs* 107,6 \pm 4,6% der Frequenz unter Kontrollbedingungen (n=4). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die cENOs eine intrinsische Form der Spontanaktivität in der Großhirnrinde darstellen.

Simultane Fluoreszenz- und Feldpotentialmessungen im Maushirnschnitt zeigten, dass die Ca²⁺-Transienten von Feldpotentialänderungen begleitet waren (Abb. 25; n=14). Die mittlere Amplitude der elektrischen Ereignisse betrug -34 \pm 20 μ V bei einer durchschnittlichen Dauer von 0.96 \pm 0.39 s.



Ca²⁺-Transienten (untere Spur, 10fache Vergrößerung) und entsprechende extrazelluläre Feldpotentialänderungen (obere Spur), die im temporalen Kortex eines Hirnschnittpräparates aufgenommen wurden. Die extrazelluläre Ableitelektrode befand sich in den sich entwickelnden Hirnrindenschichten II bis III.





A) *cENO*-assoziierte Feldpotentialänderungen, die in einem transversalen Schnittpräparat einer 1 Tag alten Maus aufgenommen wurden. Simultane Messungen im posterioren (obere Spur) und im anterioren (untere Spur) Kortex. Der Abstand zwischen den beiden Ableitelektroden betrug 1,84 mm.
 B) Zusammenfassung der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der *cENOs* von posterioren Abschnitten der Hirnrinde zu anterior gelegenen Rindenanteilen (links) bzw. umgekehrt (rechts; n=14).

Die *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen breiteten sich im Hirnschnitt der Maus mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 8,8 mm/s aus (Abb. 26).

Abb. 27 fasst die pharmakologischen Eigenschaften der *cENOs* in Hirnschnittpräparaten neugeborener Mäuse zusammen. Wie die *cENOs* in der Großhirnrinde der Ratte erforderten die Ca²⁺-Oszillationen in der Maus

Aktionspotentialaktivität und eine funktionsfähige, glutamaterge Übertragung, d.h. sie wurden durch TTX (500 nM) bzw. gleichzeitige Applikation von NBQX (10 μ M) und D,L-APV (100 μ M) vollständig blockiert. Übereinstimmend zu den Versuchen an den Rattenhirnschnitten blieben die *cENOs* unter Blockade der GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin erhalten.

Interessanterweise wurden jedoch zwei deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen bei den Ratten festgestellt. Erstens führten die AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX oder CNQX bei den Mäusen lediglich zu einer ca. 50%igen Reduktion der Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen, während die Aktivität in den Rattenhirnschnitten schon durch CNQX in einer Konzentration von 2 µM komplett blockiert wurde. Zweitens hatte APV einen unerwartet starken Effekt auf die *cENOs* der Maus. Der Antagonist glutamaterger NMDA-Rezeptoren führte zu einer Reduktion der Frequenz um mehr als 80 %. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass bei der neugeborenen Maus, im Gegensatz zur Ratte, hauptsächlich NMDA-Rezeptoren für die Generierung und Ausbreitung der *cENOs* verantwortlich sind.

Diese Experimente zeigten, dass *cENOs* und *cENO*-assoziierte Feldpotentialänderungen auch in der Großhirnrinde neugeborener Mäuse zu beobachten sind. Im Vergleich zu den cENOs der Ratte traten sie mit einer höheren Frequenz auf und breiteten sich im Schnittpräparat schneller aus. Erstaunlicherweise scheint der Spontanaktivität in den verschiedenen Nagetierspezies auch die Aktivierung unterschiedlicher ionotroper, glutamaterger Rezeptoren zugrunde zu liegen.



Abb. 27: Pharmakologisches Profil der *cENOs* in Hirnschnittpräparaten neugeborener Mäuse. Beeinflussung der Frequenz der *cENOs* in Hirnschnittpräparaten neugeborener Mäuse durch NBQX (10μM), APV (50μM), NBQX und APV (10 bzw. 50 μM), Bicucullin (20 μM) und TTX. Die Frequenz unter Einwirkung der Pharmaka ist dargestellt in % der Frequenz unter Kontrollbedingungen.

6.4 *cENOs* im intakten Säugergehirn

Die nächste Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die cENOs auch im intakten Gehirn nachzuweisen und eine räumlich-zeitliche Kartierung der ENOs im unversehrten Neokortex durchzuführen. Dazu wurde ein intaktes Hirnpräparat der neugeborenen Maus etabliert, das einerseits eine Unversehrtheit der neuronalen Netzwerke in der Großhirnrinde gewährleistete, andererseits so einfach zu handhaben war wie ein Schnittpräparat. Dieses Präparat wurde mit verschiedenen Tests validiert Material und Methoden). Unter den herrschenden (vgl. Versuchsbedingungen überlebten die Zellen in dem Präparat für mindestens 4 bis 5 Stunden. Es ermöglichte daher Messungen an der Großhirnrinde in situ unter in vivonahen Bedingungen.

Durch simultane Feldpotentialmessungen in beiden Großhirnhemisphären konnten spontane, regelmäßig wiederkehrende, *cENO*-assoziierte Feldpotentialänderungen im intakten Großhirn der Maus nachgewiesen werden (Abb. 28).


Abb. 28: *cENO*- assoziierte Feldpotentialänderungen im Ganzhirnpräparat der Maus.

A) Schemazeichnung des Ganzhirnpräparats. Zwei extrazelluläre Ableitelektroden wurden jeweils im temporalen Kortex der linken bzw. rechten Großhirnhemisphäre positioniert. Sie markieren die Positionen an denen die Messungen in diesem und in ähnlichen Experimenten dieser Versuchsreihe durchgeführt wurden. B) Versuchsaufbau: Ganzhirnpräparat einer 2 Tage alten Maus, Aufsicht von dorsal. Das Präparat ist mit Hilfe zweier Minutiennadeln an dem mit Silikon beschichteten Boden der Versuchskammer fixiert. Die zwei extrazellulären Ableitelektroden sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Sie befanden sich bei diesem Experiment ca. 110 µm tief im Gewebe. C und D) cENO-assoziierte Feldpotentialänderungen, die in der linken bzw. rechten (**D**) (**C**) Großhirnhemisphäre an den in A) und B) markierten Positionen abgeleitet wurden.

Sie traten in beiden Großhirnhemisphären mit vergleichbarer Amplitude, Dauer und Frequenz auf (Abb. 29 und 30). Korrelationsanalysen zeigten jedoch interessanterweise keine zeitliche Korrelation zwischen den *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen in den beiden Hemisphären (Cross-Korrelogramme, n=8).



Abb. 29: Dauer, Amplitude und Frequenz der cENOs im intakten Großhirn.

A – C) Intervallhistogramme, die die Verteilung der Dauer (**A**) und der Amplitude (**B**) der *cENO*assoziierten Feldpotentialänderungen bzw. des Zeitintervalls zwischen zwei Ereignissen (**C**), die in dem in Abb. 27 ausschnittsweise gezeigten Versuch abgeleitet wurden, zeigen. Die Histogramme links fassen die Ergebnisse der linken Hemisphäre zusammen (n=311 Ereignisse), die Graphen rechts zeigen die Verteilung der in der rechten Hemisphäre gemessenen Daten (n=261 Ereignisse). Der Mittelwert ist jeweils für jede Hemisphäre getrennt angegeben.



Abb. 30: Die cENOs haben in beiden Hemisphären die gleiche Dauer, Amplitude und Frequenz. Boxplots. die die Amplitude (links) und die Dauer (Mitte) der cENO-assoziierten Feldpotentialänderungen bzw. die Zeitintervalle zwischen zwei Ereignissen in der linken bzw rechten Hemisphäre zusammenfassen (n=8 Experimente an intakten Hirnpräparaten). Die roten Linien markieren die Mittelwerte, die auch als Ziffern angegeben sind. Die Rechtecke entsprechen den jeweiligen Interguartilen. Die senkrechten Linien zeigen die Werte, die von den Mittelwerten am weitesten entfernt liegen, jedoch noch keine Ausreißer sind.

Blinde Gramicidin-basierte Messungen in perforated-patch Technik im Stromklemmmodus zeigten, dass während der spontanen extrazellulären Feldpotentialänderungen in den Einzelzellen große, 1,3 bis 4,7 lange S depolarisierende Wellen auftraten (vergleichbar den Giant depolarizing potentials, Ben-Ari et al, 1989). Auf diese Depolarisationen waren 5 bis 12 Aktionspotentiale aufgepfropft (n=5 Zellen, 70-200 µM tief im temporalen Kortex; Abb. 31).



Abb. 31: Einzelzellaktivität während der *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen.

Simultane Gramicidin-basierte Messungen in *perforated-patch* Technik (obere Spur) und extrazelluläre Feldpotentialmessungen (untere Spur), die im temporalen Kortex an Neuronen aus den Hirnrindenschichten 2 bis 3 abgeleitet wurden. Die *perforated-patch* Messungen wurden blind in einer Tiefe von 70 bis 200 µm unter der Kortexoberfläche durchgeführt.

6.4.1 Pharmakologisches Profil der cENOs im intakten Großhirn

Im nächsten Schritt wurden die pharmakologischen Eigenschaften der *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen im intakten Gehirn untersucht, um Rückschlüsse auf die an ihrer Entstehung und Ausbreitung beteiligten Mechanismen ziehen zu können.

TTX (500 nM; n=5) oder die gleichzeitige Applikation der NMDA- bzw. AMPA-Rezeptorantagonisten APV (100µM) bzw. NBQX (10µM) führte zu einer

völligen Blockade der *cENOs*. Die Ausbreitung der *cENOs* im intakten Großhirn erforderte also ebenso wie im Schnittpräparat Aktionspotentialaktivität und eine funktionsfähige glutamaterge synaptische Übertragung.

Die alleinige Blockade der glutamatergen AMPA- Rezeptoren durch CNQX oder NBQX (10 μ M) führte wie in den Schnittpräparaten der Maus lediglich zu einer ca. 50% igen Frequenzminderung der *cENOs* (n=8). Der NMDA-Rezeptorantagonist D,L-APV (100 μ M) dagegen hatte auch im intakten Großhirn eine starke inhibitorische Wirkung auf die *cENOS* und reduzierte deren Frequenz um ca. 80% des Kontrollwertes (n=5).

Analog zu den Versuchen an Hirnschnittpräparaten der Ratte bzw. der Maus konnten nach Blockade der GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin (10 µM) im intakten Großhirn weiterhin *cENOs* nachgewiesen werden. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der pharmakologischen Experimente in Abb. 32 dargestellt.



Abb. 32: Pharmakologisches Profil der cENO-assoziierten Feldpotentialänderungen.

Die Säulen zeigen die Frequenz der cENOs während der Pharmakaapplikation, normalisiert zu der entsprechenden Frequenz unter Kontrollbedingungen. Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX (10 μ M) und der NMDA-Rezeptorblocker D,L-APV (100 μ M) bewirkten eine Reduktion der Frequenz auf 54% (n=8) bzw. 13% (n=5). Die gleichzeitige Applikation von NBQX und APV (n=5) bzw. des Blockers spannungsabhängiger Na+-Kanäle, Tetrodotoxin (500 nM, n=5), führte zu einer völligen Blockade der cENOs.

Diese Experimente bestätigen die Ergebnisse der pharmakologischen Experimente an den Hirnschnittpräparaten der Maus. Während bei der Ratte hauptsächlich die AMPA-Rezeptoren für die Entstehung und Ausbreitung der *cENOs* verantwortlich sind, ist die spontane Netzwerkaktivität in der Großhirnrinde der neugeborenen Maus v. a. auf funktionsfähige NMDA-Rezeptoren angewiesen. Die Tatsache, dass die Pharmaka im intakten Hirnpräparat in den gleichen Konzentrationen wirksam waren wie im Schnittpräparat, zeigt, dass das Hirngewebe neugeborener Mäuse kaum eine Diffusionsbarriere darstellt.

6.4.2 Kartierung der cENOs

Das Ziel der nächsten Versuchsreihe war es, das Vorkommen der cENOs in den verschiedenen Regionen der Großhirnrinde zu untersuchen. Im temporalen Kortex konnten in jedem Experiment große *cENO*-assoziierte Feldpotentiale gemessen werden. In dieser Region wurde daher eine "Referenzelektrode" positioniert, in der während der gesamten Versuchsdauer zuverlässig cENOs abgeleitet werden konnten. Die Frequenz der *cENOs* in der Referenzelektrode blieb über die gesamte Messdauer (bis zu 4 Stunden) konstant, was für die Stabilität der experimentellen Bedingungen im Ganzhirnpräparat spricht (Abb. 33).



Abb. 33: Die *cENOs* sind ein sehr stabiles Phänomen.

Durchschnittliche Zeitintervalle zwischen dem Auftreten zweier *cENO*-assozierter Feldpotentiale im intakten Großhirnpräparat während der ersten Stunde eines Experiments (weiße Säulen) bzw. während der vierten Stunde eines kontinuierlichen Experiments (graue Säulen). Vier Experimente sind dargestellt. Nach vier Stunden war keine signifikante Änderung des Zeitintervalls zwischen zwei Ereignissen nachweisbar.

Mit einer zweiten Ableitpipette, der sog. Testelektrode, wurden die übrigen Rindenareale systematisch getestet. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 34A schematisch dargestellt. Abb. 34B zeigt einen Ausschnitt der Messung an den beiden in Abb. 34A eingezeichneten Ableitpositionen. Die Testelektrode befindet sich hier beispielsweise im parietalen Kortex.

Auf diese Weise wurden der occipitale, der parietale, der piriforme und der frontale Kortex sowie die Inselregion untersucht (n=15 Hirne, 89 Ableitpositionen). Die einzelnen Kortexareale sind in Abb. 34D farblich kodiert dargestellt.



Abb. 34: Kartierung der cENOs.

A) Schemazeichnung des Versuchsaufbaus. Die Referenzelektrode wurde im mittleren, posterioren Anteil der Hirnrinde positioniert. In diesem Areal konnten in jedem Experiment große *ENO*-assoziierte Feldpotentialänderungen gemessen werden. Während eines Versuchs blieb die Position dieser Referenzelektrode unverändert. Gleichzeitig wurden mit einer zweiten Testelektrode nacheinander verschiedene Regionen der Großhirnrinde untersucht. B) *cENO*-assoziierte Feldpotentialänderungen, die mit der Referenz- bzw. der Testelektrode an den in A) markierten Positionen abgeleitet wurden. C) Zusammenfassung der Daten aus 15 untersuchten Hirnen. Die Ergebnisse wurden auf die Fotografie eines präparierten Gehirns einer 2 Tage alten Maus projiziert. Jeder Punkt markiert eine Position der Testpipette. Die roten Punkte zeigen die Positionen, an denen mit der Testelektrode *cENO*-assoziierte Feldpotentialänderungen gemessen werden konnten. Die schwarzen Punkte hingegen markieren die Areale, an denen keine *cENO*s nachgewiesen wurden. D) Der gleiche Datensatz wie in C) wurde auf eine topographische Karte der Großhirnhemisphäre projiziert (Sagittalansicht). Die unterschiedlichen Hirnrindenregionen sind farbkodiert dargestellt (**Fr** frontal, **Par** parietal, **Te** temporal, **Oc** occipital, **PRh** perirhinal, **Pir** piriform, **Al** agranulär insulär).





Säulendiagramme, die den Prozentsatz der Positionen der Testelektrode zeigen, an denen in den unter-schiedlichen Hirnrindenregionen *cENOs* abgeleitet werden konnten (**A**) bzw. die mittlere Amplitude der *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen in den verschiedenen Regionen der Hirnrinde (**B**) zusammenfassen. In die Auswertung der Amplituden sind nur die Messungen eingegangen, in denen *cENOs* gefunden wurden.

In allen untersuchten Kortexabschnitten, außer im frontalen Kortex, konnten *cENO*-assoziierte Feldpotentiale abgeleitet werden (Abb. 35). Während jedoch in den temporalen bzw. perirhinalen Hirnrindenarealen, die als Kontrolle dienten, die Erfolgsrate 100% betrug, traten die *cENOs* in den anderen Kortexbereichen mit geringerer Wahrscheinlichkeit (Abb. 35A) und Amplitude (Abb. 35B) auf. Die mittlere

Amplitude der Feldpotentiale sank von 38 - 45 μ V in der perirhinalen, occipitalen bzw. temporalen Hirnrinde auf 21 μ V im parietalen Kortex.

Während die cENO-assoziierten Feldpotentialänderungen in den beiden Großhirnhemisphären zeitlich unabhängig voneinander auftraten (s. o.), waren sie in den verschiedenen Hirnregionen einer Hemisphäre immer hoch korreliert, selbst wenn die beiden Ableitelektroden mehrere mm voneinander entfernt waren. Um die Ausbreitung der *cENOs* in der intakten Großhirnhemisphäre zu charakterisieren, wurden zwei Ableitelektroden 1 bis 2,5 mm voneinander entfernt, entlang einer horizontalen Achse, in der Hirnrinde platziert. Die cENOs breiteten sich in 11 von 14 untersuchten Hirnen entlang dieser Achse mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit in beide Richtungen aus. Ca. 45% der Ereignisse breiteten sich in posterioranterior Richtung, ca. 55% in anterior-posterior Richtung aus. In zwei Präparaten breiteten sich alle *cENOs* vom posterioren Kortex nach anterior aus. In einem Gehirn fand die Ausbreitung in allen Fällen in die Gegenrichtung (anterior-posterior) statt. Die Latenz zwischen den *cENOs* im intakten Großhirn korrelierte jedoch nicht wie im Hirnschnitt mit dem Abstand zwischen den beiden Ableitelektroden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Ausbreitung der *cENOs* im intakten Gehirn wesentlich komplexer ist als im Schnittpräparat. Sie legen nahe, dass im unversehrten Großhirn verschiedene Hirnregionen potentiell als Schrittmacher der *cENOs* fungieren können.

Durch die Etablierung eines intakten Hirnpräparates gelang es erstmals eine dreidimensionale Kartierung *cENO*-assoziierter Feldpotentiale in der intakten Großhirnrinde neugeborener Mäuse zu erstellen. Diese Experimente ermöglichten eine Analyse der komplexen räumlichen und zeitlichen Muster dieser Spontanaktivität, die ergab, dass sich die *cENO*-assoziierten Feldpotentiale innerhalb

einer Hemisphäre über mehrere Millimeter ausbreiteten und zeitlich hoch korreliert auftraten. Zwischen den spontanen Feldpotentialänderungen in den beiden Großhirnhemisphären dagegen bestand keine Korrelation. Die *cENO*-assoziierten Feldpotentiale waren besonders stark in den posterioren Regionen der Großhirnrinde, also in den primären sensorischen Rindenarealen und in den Assoziationsregionen ausgeprägt. Im frontalen, überwiegend motorischen Kortex hingegen waren sie nicht nachweisbar.

7 Diskussion

Diese Arbeit beschreibt eine neuartige Form spontaner Netzwerkaktivität in der Großhirnrinde neugeborener Säugetiere, *"cortical Early Network Oscillations"* (*cENOs*). Die *cENOs* stellen spontane, sich wiederholende Fluktuationen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration dar, die durch folgende charakteristische Eigenschaften gekennzeichnet sind:

1. Sie beziehen das gesamte neuronale Netzwerk der Großhirnrinde mit ein.

2. Sie treten mit einer sehr niedrigen Wiederholungsfrequenz auf.

3. Sie breiten sich über mehrere Hirnrindenareale hinweg aus.

4. Sie zeigen ein charakteristisches Entwicklungsprofil und sind nur bis zum Ende der ersten Woche nach der Geburt nachweisbar.

5. Im intakten Gehirn sind die *cENOs* besonders stark in allen sensorischen Hirnrindenregionen nachweisbar, während sie in den frontalen, überwiegend motorischen Rindenarealen nicht beobachtet wurden.

7.1 *cENOs*: Eine globale Netzwerkaktivität in der Großhirnrinde neugeborener Säuger

Wie in den Ergebnissen dargestellt, existiert zusätzlich zu den bislang bekannten, lokal begrenzten Formen korrelierter Spontanaktivität (Schwartz et al., 1998; Owens et al., 1998; Yuste et al., 1992, 1995) in der unreifen Großhirnrinde eine spontane Aktivitätsform, an der sich nahezu die gesamte Neuronenpopulation beteiligt. Diese *cENOs* breiteten sich wellenförmig durch mehrere Hirnregionen aus und rekrutierten im Hirnschnittpräparat an jedem Ort bis zu 90% aller Nervenzellen

des Neokortex. Die *cENOs* stellten damit die stärkste Form der Aktivität im sich entwickelnden Netzwerk der Großhirnrinde dar. In einer Entwicklungsperiode, in der die sensorischen Systeme und die funktionellen Verbindungen zwischen den verschiedenen Regionen der Hirnrinde nur schwach ausgebildet sind (Juraska und Fifkova, 1979; Blue und Parnavelas, 1983; Dalva und Katz, 1994; Katz und Shatz, 1996) war das ein überraschender Befund.

Kürzlich wurden in der Großhirnrinde von Mäuseembryonen am Entwicklungstag E16 spontane synchrone Ca²⁺-Transienten nachgewiesen (Corlew et al, 2004), die mit den *cENOs* in der Hirnrinde der Maus hinsichtlich Frequenz und Dauer weitgehend übereinstimmen und daher mutmaßlich das gleiche Phänomen repräsentieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die *cENOs* die erste Aktivitätsform darstellen, die in postmitotischen Neuronen der Hirnrinde auftritt. Vor der Geburt war die Aktivität zwischen den Zellen allerdings weniger stark synchronisiert, als zum Zeitpunkt der Geburt (Corlew et al., 2004). Die Arbeitsgruppe folgerte daraus, dass die spontane Aktivität möglicherweise in einigen Zellen auftritt, bevor die Mechanismen heranreifen, die sie synchronisieren (Corlew et al., 2004).

7.2 Mechanismen, die den *cENOs* zugrunde liegen

Die *cENOs* stellen spontane Fluktuationen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration dar. Dabei geben mehrere Studien Hinweise darauf, dass diese spontanen Ca²⁺-Transienten hauptsächlich über Aktionspotential-vermittelten Ca²⁺-Einstrom durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle zustande kommen (Garaschuk et al., 1998; Corlew et al., 2004). Ihnen scheint also ein anderer Mechanismus

zugrunde zu liegen, als den Ca²⁺-Erhöhungen in den neuronalen Domänen, die durch Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern verursacht werden (Yuste et al., 1992; Kandler und Katz, 1998).

7.2.1 Die *cENOs* erfordern Aktionspotentialaktivität und die Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Entstehung der *cENOs* in der neokortikalen Hirnrinde Aktionspotentialaktivität und funktionsfähige, glutamaterge Transmission erfordert. Diese Eigenschaft unterscheidet die *cENOs* von der Spontanaktivität in den neuronalen Domänen, die unter Blockade der Aktionspotentialaktivität durch TTX persistiert (Yuste et al., 1992, 1995) und sich mutmaßlich über Gap junctions ausbreitet.

Unklar ist, welche Rolle Gap junctions bei der Ausbreitung der *cENOs* spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Gap junction Blocker Octanol und Heptanol ebenso wie TTX zu einer Blockade der synchronen Ca²⁺-Transienten in der Hirnrinde der Maus führen (Corlew et al., 2004). Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung der Gap junctions an der Ausbreitung der *cENOs* in der Hirnrinde nahe. Möglicherweise ist eine Kommunikation zwischen den Hirnrindenneuronen oder zwischen einer Subpopulation von Schrittmacherzellen über Gap junctions für die synchrone Aktivität erforderlich (Corlew et al., 2004). Es muss jedoch beachtet werden, dass die bisher bekannten Gap junction Blocker nicht sehr spezifisch sind. Beispielsweise bewirkt Octanol in Hirnrindenschnitten der Ratte auch eine Hemmung der TTX-sensitiven Natriumkanäle (Garaschuk et al., nicht publizierte Daten). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Octanol-Effekt durch eine

Blockade dieser Natriumkanäle zustande kommt. Um eine mögliche Rolle der Gap junctions bei der Ausbreitung der *cENOs* zu evaluieren, sind daher weiterführende Experimente mit einem spezifischen Gap junction Blocker erforderlich.

Die *cENOs* hängen kritisch von funktionsfähiger, synaptischer Übertragung über ionotrope Glutamatrezeptoren ab. In der Ratte waren sie schon am ersten postnatalen Tag äußerst empfindlich gegenüber einer niedrigen Konzentration von CNQX (2 µM), die lediglich zu einer partiellen Blockade der AMPA-Rezeptoren führt (Blake et al., 1989). Dies steht im Gegensatz zu der Pharmakologie der ENOs im Hippocampus (diese Arbeit; Garaschuk et al., 1998). Die essentielle Rolle der AMPA-Rezeptoren für die *cENOs* in der Ratte war ein unerwarteter Befund, da in der frühen postnatalen Entwicklung im Hippocampus und im Neokortex die NMDA-Rezeptoren gegenüber den AMPA-Rezeptoren dominieren (Agmon und O'Dowd, 1992; Durand et al., 1996; Isaac et al., 1997; Rumpel et al., 1998; Petralia et al., 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass während der gleichen Entwicklungsstufe Synapsen mit funktionsfähigen AMPA-Rezeptoren im sich entwickelnden Neokortex der Ratte eine wesentlich stärkere Bedeutung haben als im Hippokampus. Diese neuen Erkenntnisse legen nahe, dass die Reifung der erregenden, glutamatergen, synaptischen Übertragung in der neokortikalen Hirnrinde der Ratte im Vergleich zum Hippokampus früher erfolgt.

Bemerkenswerterweise existierten deutliche Unterschiede zwischen den *cENOs* in der Ratte und denen in der Maus hinsichtlich des pharmakologischen Profils. In der Großhirnrinde der Maus spielten NMDA-Rezeptoren die Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung der *cENOs*. Die *cENOs* in Ratten und Mäusen werden demnach jeweils von unterschiedlichen Subtypen ionotroper Glutamatrezeptoren vermittelt (diese Arbeit; Adelsberger et al., 2005).

In weiterführenden Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnte ausgeschlossen werden, dass Gliazellen bzw. eine Transmitterfreisetzung aus Gliazellen (Araque et al., 2000) bei der Entstehung und Ausbreitung der cENOs eine relevante Rolle spielen (Adelsberger et al., 2005).

7.2.2 Die Bedeutung von GABA für die cENOs

Die *cENOs* persistierten nach Blockade der GABA_A-Rezeptoren durch Bicucullin. In Anbetracht der Rolle von GABA als wichtigstem depolarisierendem Transmitter in der unreifen Hirnrinde (Ben Ari et al., 1989; Owens et al., 1996; Yuste et al., 1991) und der essentiellen Bedeutung der GABA_A-Rezeptoren für die hippokampalen *ENOs* bzw. die *GDPs* (Ben Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998; diese Arbeit) war dies ein überraschender Befund. Das Ergebnis passt allerdings zu Beobachtungen an Kulturen neokortikaler Neuronen, die ebenfalls spontane synchrone Ca²⁺-Transienten zeigen (Voigt et al., 2001). Während die Spontanaktivität in frischen Kulturen durch Blockade der GABA_A-Rezeptoren gehemmt wurde, bewirkte Bicucullin an 3 bis 4 Tage alten Kulturen lediglich noch eine Reduktion der Frequenz der spontanen Ca²⁺-Transienten (Voigt et al., 2001). Da die Neuronen nach einer Woche Kultivierungszeit ungefähr das Reifestadium erreichen, das die Zellen in der intakten Hirnrinde zum Zeitpunkt der Geburt haben (Voigt et al., 2001), stimmen diese Beobachtungen gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

Der Übergang der depolarisierenden Wirkung GABAs in eine Hyperpolarisation korrelierte interessanterweise mit dem entwicklungsbedingten Ausbleiben der cENOs gegen Ende der ersten Woche nach der Geburt.

Es häufen sich Hinweise darauf, dass GABA in der frühen postnatalen Entwicklung des Neokortex und auch des Hippokampus eine komplexere Bedeutung hat, als lange Zeit angenommen. Obwohl GABA nachgewiesenermaßen in beiden Hirnarealen in dieser Entwicklungsperiode eine depolarisierende Wirkung hat, scheint es dennoch nicht rein als erregender Transmitter zu fungieren, sondern auch inhibitorische Wirkung zu haben. Nach Blockade GABAerger synaptischer Übertragung wurde im Neokortex (Wells et al., 2000) und im Hippokampus (Khalilov et al., 1999; Wells et al., 2000) neugeborener Mäuse und Ratten eine paroxysmale, elektrische Aktivität beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass GABA in der neonatalen Hirnrinde zumindest teilweise eine ähnliche inhibitorische Aufgabe wie im reifen Gehirn erfüllt und dazu dient, epileptiforme Entladungen zu vermeiden. der Befund, dass die cENOs jenseits P7, einem Dazu passt zu Entwicklungszeitpunkt an dem unter Kontrollbedingungen keine cENOs mehr beobachtet wurden, durch Blockade der GABA-Rezeptoren sogar evoziert werden konnten. Mit zunehmender Konsolidierung der synaptischen Verbindungen erhält GABA zunehmend rein inhibitorische Wirkung, gleichzeitig erlischt die spontane Netzwerkaktivität (diese Arbeit; Wong et al., 1995; Isaac et al., 1997; Garaschuk et al., 1998). Durch diese Veränderungen scheint das sich entwickelnde Gehirn von einem unreifen System in den funktionellen Status überzugehen, der für die adäguate Erfüllung seiner komplexen Funktionen erforderlich ist.

7.3 Die cENOs im intakten Großhirn

7.3.1 Ein intaktes Großhirnpräparat als *in vivo*-nahes Modell

Die geringe Größe neugeborener Säuger, ihre fragile Homöostase und das Fehlen geeigneter Anästhesieverfahren erschwert *in vivo* Experimente an Neugeborenen. Daher wurden in den letzten Jahrzehnten v. a. auf dem Feld der Entwicklungsneurobiologie eine Reihe intakter, nicht-kortikaler Hirnpräparate entwickelt (Otsuka und Konishi, 1974; Bourque und Renaud, 1984; Fulton und Walton, 1986; O'Donovan, 1989; Gu und Spitzer, 1995; Cazalets et al., 1996; Jacquin et al., 1996 und Mooney et al., 1996). Ben Ari und Mitarbeiter isolierten beispielsweise den intakten septohippocampalen Komplex (Khalilov et al., 1997) und untersuchten daran die Rolle der *GDPs* in der Synchronisierung neuronaler Aktivität im limbischen System (Leinekugel et al., 1998).

Einige Studien wurden an einem *in vitro* Präparat des intakten Neokortex durchgeführt. In diesem Präparat blieb durch Ausschälen der Großhirnrinde die dreidimensionale Struktur des Kortex erhalten, die Assoziationsfasern zwischen den Hirnrindenneuronen und alle Afferenzen von und Efferenzen zu anderen Hirnarealen waren jedoch durchtrennt (Kilb und Luhmann, 2003).

Von Llinas und Mitarbeitern wurde ein Verfahren beschrieben, das die *in vitro* Untersuchung eines perfundierten Ganzhirnpräparates des erwachsenen Meerschweinchens ermöglicht. Damit konnten erstmals Experimente an der Großhirnrinde des intakten Gehirns von Säugern durchgeführt werden (DeCurtis et al., 1991; Mühlethaler et al., 1993; Pare und Llinas, 1995). Bei kleinen Tieren (Mäusen oder neugeborenen Ratten) kann dieses Präparationsverfahren jedoch

nicht angewendet werden, da die Gefäßstrukturen hier sehr klein sind und deshalb eine künstliche arterielle Perfusion über die Aa. vertebralis nicht möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein intaktes Großhirnpräparat der Maus als neues Versuchsmodell etabliert. Im untersuchten Entwicklungszeitraum blieben die Zellen in dem Präparat für viele Stunden lebensfähig. Diese Tatsache erlaubte die Untersuchung der Eigenschaften zusammenhängender Hirnrindenregionen und intakter kortikaler Netzwerke.

Im Gegensatz zu dem Hirnpräparat des erwachsenen Meerschweinchens (DeCurtis et al., 1991; Mühlethaler et al., 1993; Pare und Llinas, 1995) war das hier vorgestellte Großhirnpräparat der neugeborenen Maus leicht herzustellen und zu handhaben. Um die Zellen vital zu erhalten war keine arterielle Perfusion erforderlich. Dieses Präparat bot viele Vorteile eines Schnittpräparates, indem es die einfache Anwendung elektrophysiologischer, pharmakologischer und bildgebender (Stosiek et al., 2003) Techniken erlaubte. Gleichzeitig lieferte es aber auch die Möglichkeit, das intakte kortikale Netzwerk und die unversehrten tieferen Schaltkreise in ihrer Gesamtheit zu untersuchen.

7.3.2 Kartierung der *cENOs* im intakten Großhirn

Das in dieser Arbeit etablierte intakte Großhirnpräparat ermöglichte die Registrierung der frühen elektrischen Netzwerkaktivität im Großhirn neugeborener Mäuse. Die Frequenz, die kinetischen und die pharmakologischen Eigenschaften der beobachteten elektrischen Spontanaktivität im intakten Gehirn stimmten mit den *cENO*-assoziierten Feldpotentialänderungen in den Kortexschnitten überein. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich um dasselbe Phänomen handelt. Das

intakte Großhirnpräparat erlaubte im Gegensatz zu den Hirnschnitten die Untersuchung der *cENO*-assoziierten Feldpotentiale in den unterschiedlichen Regionen des Endhirns und simultan in beiden intakten, verbundenen Großhirnhemisphären.

Im intakten Ganzhirnpräparat waren die *cENOs* besonders zuverlässig in den sensorischen Hirnrindenarealen, einschließlich des visuellen, des auditorischen und des somatosensorischen Kortex, nachzuweisen. Hier zeigten sie auch die größten Amplituden.

Die primären sensorischen Hirnrindenareale zeichnen sich durch eine spezifische, funktionelle Gliederung aus. Die primäre Hörrinde beispielsweise ist tonotop aufgebaut, in der primären somatosensorischen Rinde existieren die sog. *barrels* (z. B. Killackey und Leshin, 1975; White und DeAmicis, 1977) und im visuellen Kortex die Kolumnen der okulären Dominanz (z.B. Hubel und Wiesel, 1962; Crowley und Katz, 2002). Die Entstehung dieser funktionellen Einheiten beginnt sehr früh in der Entwicklung, teilweise sind sie schon vor dem Auftreten sensorischevozierter Aktivität nachweisbar (z. B. Crowley und Katz, 2000; Katz und Crowley, 2002; Feller und Scanziani, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in neugeborenenen Säugern, zusätzlich zu der Spontanaktivität in der Retina, eine intrinsische Form der Spontanaktivität im visuellen Kortex in Form der *cENOs* exisitiert. Die Zuverlässigkeit mit der die *cENOs* im intakten visuellen Kortex nachgewiesen werden konnten, steht dabei in bemerkenswertem Gegensatz zu den Schwierigkeiten, die bei den Versuchen, diese Aktivität in Hirnschnittpräparaten des visuellen Kortex nachzuweisen, auftraten (Linn et al., nicht publizierte Daten).

Während lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass die Entwicklung der Kolumnen der okulären Dominanz im visuellen Kortex wesentlich von den spontanen retinalen Ca²⁺-Wellen (Galli und Maffei, 1988; Maffei und Galli-Resta, 1990; Meister et al., 1991; Wong et al., 1993, 1995) gesteuert wird, weiß man heute, dass die funktionelle Gliederung der Sehrinde auch nach Durchtrennung der retinalen Eingänge stattfindet (Crowley und Katz, 1999, 2002). Vielmehr existieren jetzt Hinweise darauf, dass endogen generierte Formen kortikaler Spontanaktivität, die den *cENOs* ähneln (Chiu und Weliky, 2001, 2004), wahrscheinlich im Zusammenspiel mit den Retinawellen, zur Reifung des visuellen Kortex vor dem Öffnen der Augen beitragen (Crowley und Katz, 2002).

Unklar ist bislang, warum die *cENOs* im intakten Großhirnpräparat im frontalen, überwiegend motorischen Kortex nicht nachgewiesen werden können. Dazu passt jedoch die Tatsache, dass bei neugeborenen Mäusen keine *cENO*-assoziierten, konvulsiven Bewegungen beobachtet werden. Möglicherweise treten die *cENOs* in den frontalen Abschnitten der Hirnrinde zu einem früheren Entwicklungsstadium auf und in diesen Kortexregionen vollzieht sich, ähnlich wie im Rückenmark, ein beschleunigter Reifungsprozess.

7.3.2 Die *cENOs* scheinen von mehreren Schrittmacherregionen ausgehen zu können

In den meisten Experimenten am kortikalen Hirnschnitt schien der entorhinale Kortex die Schrittmacherregion der *cENOs* zu sein. In manchen Fällen wurde jedoch auch beobachtet, dass die *cENOs* von den anterioren Hirnrindenregionen ausgingen. Diese Ergebnisse ließen bereits vermuten, dass mehr

als eine Hirnrindenregion als potentieller Schrittmacher für die *cENOs* fungieren kann.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen an den Schnittpräparaten wurde im intakten Großhirnpräparat keine Hirnregion identifiziert, die als hauptsächlicher Schrittmacher für die *cENOs* fungiert. Das weist darauf hin, dass die spontanen Ca²⁺-Wellen im intakten Gehirn, ähnlich den Befunden in der Retina (Wong et al., 1995), von verschiedenen Zellen ausgehen können. In der intakten septohippokampalen Region wurde dagegen eindeutig die Septalregion als Schrittmacher für die Spontanaktivität im Hippokampus identifiziert (Leinekugel et al., 1998). Allerdings können auch im Hippokampus beim Wegfall des primären Schrittmachers andere Anteile der Hippokampusformation diese Aufgabe übernehmen (Leinekugel et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *cENOs* und die *ENOs* im Hippocampus, obwohl sie in den benachbarten Hirnregionen im gleichen Entwicklungsstadium auftreten, untereinander nicht korreliert sind. Eine Beteiligung des Hippokampus an der Steuerung der Aktivität im Neokortex konnte damit ausgeschlossen werden. Die *cENOs* werden also von einem anderen Schrittmacher generiert als die *ENOs* im Hippocampus.

7.3.3 cENOs am lebenden Tier

Das Auftreten *cENO*-assoziierter Feldpotentiale am intakten Hirnpräparat unter *in vivo*-nahen Bedingungen wurde in dieser Arbeit belegt. Kürzlich gelang es Konnerth und Mitarbeitern erstmals, *cENO*-ähnliche Ca²⁺-Wellen in nicht anästhesierten, neugeborenen Mäusen nachzuweisen (Adelsberger et al., 2005). Es

wurde dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den *in vivo* und den *in vitro* gemessenen Ca²⁺-Wellen hinsichtlich ihrer Zeitkonstanten oder ihrer Wiederholungsfrequenz gefunden (Adelsberger et al., 2005). Die Ca²⁺-Wellen traten im lebenden Tier interessanterweise hauptsächlich während schlafähnlicher Ruhezustände auf (Adelsberger et al., 2005).

Damit unterscheiden sich die *cENOs* von den *GDPs* im Hippocampus (Leinekugel et al., 2002) und den von Buzsáki und Mitarbeitern beobachteten sog. *spindle bursts* in der primären somatosensorischen Rinde wacher neugeborener Ratten (Khazipov et al., 2004). Diese Aktivitätsformen traten im Gegensatz zu den cENOs meist in Phasen auf, in denen die Tiere aktiv waren (Khazipov et al., 2004; Karlsson und Blumberg, 2003).

Die *spindle bursts* stellen hauptsächlich sensorische Rückkopplungsignale der vom Rückenmark generierten Muskelzuckungen dar (Khazipov et al., 2004). Die *cENOs* dagegen waren unabhängig von sensorischen Eingängen und auch nach Durchtrennung der thalamo-kortikalen Bahnen in *in vitro* Präparaten nachweisbar (Adelsberger et al., 2005). Bei den *cENOs* handelt es sich demnach mutmaßlich um eine intrinsische Form spontaner Netzwerkaktivität, die von den Zellen der Großhirnrinde selbst generiert wird. Beim Fehlen der peripheren Eingänge durch Verletzung des Rückenmarks traten die *spindle bursts* mit niedrigerer Frequenz auch spontan auf (Khazipov et al., 2004). Möglicherweise handelt es sich bei diesen niedrig frequenten, spontanen Ereignissen, die unabhängig von sensorischen Afferenzen auftraten, um *cENO*-assoziierte elektrische Aktivität.

Bei adulten Tieren und auch beim erwachsenen Menschen können während bestimmter Schlafformen (Steriade et al., 2003; Vanhatalo et al., 2002) langsame kortikale Wellen einer Frequenz von 0,3 bis 1 Hz abgeleitet werden. Man geht davon

aus, dass diese schlafassoziierte, langsame, wellenförmige Aktivität der neuronalen Plastizität und der Konsolidierung von Gedächtnisleistungen, die im wachen Stadium aquiriert wurden, zugrunde liegt (Steriade et al., 1993; Vanhatalo et al., 2002). Neugeborene Mäuse (Daszuta et al., 1985) und Ratten (Gramsbergen, 1970; Jouvet-Mounier, 1970) verbringen 60 bis 80% ihres Lebens in dem schlafähnlichen Ruhezustand, in dem die *cENO*-ähnlichen Ca²⁺-Wellen *in vivo* beobachtet wurden (Adelsberger et al., 2005). Adelsberger et al. zogen aus ihren Ergebnissen daher den Schluss, dass die *cENO*-assoziierten Ca²⁺-Wellen dazu beitragen könnten, die Ca²⁺abhängige Reifung der Neuronen in der Hirnrinde zu steuern (Adelsberger et al., 2005).

7.4 Die funktionelle Bedeutung der *cENOs*

Die *cENOs* treten im unreifen Gehirn während einer Entwicklungsperiode auf, die durch ein bedeutendes Wachstum von Dendriten und Axonen und eine ausgeprägte Synaptogenese gekennzeichet ist (Uylings et al., 1990; Katz und Shatz, 1996). Dabei spielen insbesondere oszillatorische Veränderungen des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels eine große Rolle (Katz und Shatz, 1996; Spitzer et al., 2004), beispielsweise bei der Regulation von Genexpression (Buonanno und Fields, 1999), Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen (Spitzer et al., 2004), Aussprossen von Nervenzellfortsätzen (Spitzer et al., 2004) und Synapsenbildung (Katz und Shatz, 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass in der Großhirnrinde neugeborener Säuger die *cENOs* die wichtigste und verbreitetste Form spontaner Ca²⁺-Wellen in der frühen postnatalen Entwicklung darstellen. Sie scheinen daher besonders geeignet,

die fundamentalen Prozesse, die in dieser Reifungsphase des Gehirns stattfinden, zu regulieren.

7.4.1 Evidenzen für die Bedeutung der *cENOs* bei der Regulierung des Zellwachstums

Schon lange wird vermutet, dass neuronale Aktivität in der frühen postnatalen Entwicklung einen wichtigen Faktor bei der Kontrolle des Wachstums der Nervenzellen darstellt (zur Übersicht siehe Cline, 2001).

Im Rückenmark z. B. wird die Migrationgeschwindigkeit der Wachstumskegel durch die Frequenz spontan auftretender Ca²⁺-Oszillationen kontrolliert. Spitzer und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Wachstumskegel, die hoch frequente Ca²⁺-Transienten erfuhren (10 bis 12 pro h), langsam wanderten oder sich sogar retrahierten. Dagegen migrierten die Wachstumskegel, die niedrig frequente (0 bis 0,4 pro h) Ca²⁺-Oszillationen erfahren, schnell (Gomez et al., 1999).

Ben Ari und Mitarbeitern gelang der Nachweis, dass eine Blockade der *ENOs* im Hippokampus *in vivo* durch TTX zu einer Hemmung der Aussprossung der basalen Dendriten führt (Groc et al., 2002). Nach Blockade der Spontanaktivität betrug die Gesamtlänge des basalen Dendritenbaums der betroffenen CA1 Pyramidenzellen lediglich ein Drittel der Länge, verglichen mit Zellen, die sich unter Kontrollbedingungen entwickelten. Dabei war die Länge der einzelnen Dendriten allerdings unverändert, während die Anzahl der Dendriten verringert war. Die Wachstumshemmung betraf nur die basalen Dendriten, während der Apikaldendrit, die Axone und der Zellkörper ein normales Wachstum unter Blockade der *ENOs* zeigten (Groc et al., 2002). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass *in vivo* die

ENOs im Hippokampus die Verzweigung der Dendriten fördern und so für ein regelrechtes Wachstum der Nervenzellen mitverantwortlich sind. Hinweise darauf, dass neuronale Aktivität *in vivo* die Aufzweigung der Zellausläufer reguliert, wurden außerdem beispielsweise auch in Tektumneuronen des Xenopus gefunden (Li et al., 2002).

7.4.2 Mögliche Bedeutung der *cENOs* bei der Konsolidierung synaptischer Verbindungen

Spontane Aktivitätsmuster könnten die Entstehung und Konsolidierung synaptischer Verbindungen regulieren (Katz und Shatz, 1996; Mc Cormick et al., 1999; Ben-Ari, 2001). Bei Hirnrindenzellen in Kultur z. B. führt eine Hemmung der Spontanaktivität durch TTX zu einer verringerten Zahl postsynaptischer GABA-Rezeptoren (Kilman et al., 2002).

Eine Blockade der spontanen *Giant Depolarizing Potentials* (*GDPs*) in den CA3 Neuronen des Hippocampus hemmt die Ausbildung funktionsfähiger, GABAerger Synapsen (Colin le Brun et al., 2004). Außerdem regulieren die *GDPs* auch die Zahl der glutamatergen Synapsen im Hippocampus der Ratte (Lauri et al., 2003). Interessanterweise konnten Lauri et al. hierbei zeigen, dass eine Inkubation mit TTX zu einer Erhöhung der Dichte der erregenden Synapsen in der CA3-Region führte (Lauri et al., 2003).

Seit Hebb postulierte, dass *"coincidence detection"*, d.h. die übereinstimmende Aktivierung prä- und postsynaptischer Endigungen, eine essentielle Rolle für die Stärkung synaptischer Verbindungen spielt (Hebb, 1949), wurde diese Theorie in vielen Studien untermauert (z. B. Bi und Poo, 2001; Feldman, 2000; Pouille et al., 2001). Im Hippokampus konnte nachgewiesen werden, dass die *GDPs*

als Koinzidenzdetektoren fungieren können und so die Effizienz der sich entwickelnden Synapsen erhöhen (Kasyanov et al., 2004). Die *GDPs* trugen dazu bei, "stumme" Synapsen zu aktiven Synapsen umzuformen und Verbindungen mit einer geringen Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung zu stärken (Kasyanov et al., 2004).

7.4.3 Mögliche Rolle der *cENOs* bei der Konsolidierung langer Assoziationsbahnen

Die spontane Aktivität in der sich entwickelnden Großhirnrinde ist weitaus komplexer als bislang angenommen. Die bekannten, räumlich eher begrenzten Oszillationsformen (Yuste et al., 1992; Schwartz et al., 1998), an denen sich nur wenige Zellen beteiligen, wirken zusammen mit den in dieser Arbeit beschriebenen "large-scale" *cENOs*, an denen sich das gesamte neuronale Netzwerk der Großhirnrinde beteiligt.

Obwohl alle Arten synchroner Aktivität durch die Verstärkung von Verbindungen zwischen gleichzeitig aktiven Nervenzellen mutmaßlich dazu beitragen, neuronale Netzwerke auszubilden (Katz und Shatz, 1996), unterscheiden sie sich wahrscheinlich in ihren einzelnen Aufgabengebieten. Aufgrund der radiären Organisation und der klaren Grenzen der lokalen neuronalen Domänen, ist es wahrscheinlich, dass die korrelierte Spontanaktivität innerhalb dieser Domänen dafür verantwortlich ist, die säulenartige Organisation der Hirnrinde zu fördern (Yuste et al., 1992).

Die *Spindle Bursts* scheinen für die somatotope Anordnung der thalamokortikalen Afferenzen in der somatosensorischen Rinde verantwortlich zu sein (Khazipov et al., 2004).

Die *cENOs* dagegen sind besonders geeignet, die Etablierung und Festigung weit reichender neuronaler Verbindungen zu fördern, wie sie beispielsweise im visuellen Kortex schon zum Zeitpunkt des Augenöffnens nachweisbar sind (Galuske und Singer, 1996). Während der frühen postnatalen Entwicklung könnten die intrinsisch generierten *cENOs* durch die Miteinbeziehung nahezu der gesamten Neuronenpopulation der Hirnrinde für die kohärente Entwicklung anfänglich nur schwach miteinander verbundener Hirnrindenregionen verantwortlich sein.

Zusammenfassend ergeben sich aus den existierenden Studien Hinweise auf mögliche Funktionen der *cENOs*. Es sind jedoch vielfältige, weiterführende Untersuchungen notwendig, um die genaue Rolle der *cENOs* bei Wachstum, Synaptogenese und Transmitterentstehung in der frühen Entwicklung der Großhirnrinde zu bestimmen.

7.5 Evidenzen für das Auftreten von *cENOs* bei Frühgeborenen

Die oszillatorische elektrische Hirnaktivität des Menschen wird in den letzten Jahrzehnten mittels EEG hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung und ihrer klinischen Korrelate sehr detailliert untersucht. Die Forschung konzentriert sich dabei in der Regel auf das mit konventionellen EEG-Ableitungen erfassbare Frequenzspektrum zwischen 0,5 und mehreren hundert Hz, da in den konventionellen EEG-Ableitungen aufgrund einer High-pass Filterung langsamere Frequenzmuster weggefiltert werden (Niedermeyer und Lopes da Silva, 1999). Insbesondere das unreife Gehirn ist jedoch durch eine Fülle langsamer elektrischer Aktivitätsmuster gekennzeichnet, die im Laufe der Entwicklung nach und nach durch

hoch frequentere Aktivitätsmuster ersetzt wird (Scher, 1998; Watanabe et al., 1999; Lamblin et al., 1999; Niedermeyer, 1999). Kaila und Mitarbeitern gelang es kürzlich mittels *direct current* (DC) EEG an frühgeborenen Babys eine bislang unbekannte Form negativer, großamplitudiger, niedrig frequenter Hirnwellen nachzuweisen, die hinsichtlich Frequenz und Dauer sehr an die *cENOs* erinnert (Vanhatalo et al., 2002). Bemerkenswerterweise war diese Aktivität hauptsächllich über den temporoparietalen und den occipitalen Ableitungen, nicht jedoch über den frontalen Ableitungen ausgeprägt (Vanhatalo et al., 2002), was sehr genau mit der in dieser Arbeit vorgestellten Kartierung der *cENOs* im intakten Gehirn der Maus übereinstimmt. Diese Aktivität trat nur in einem begrenzten Stadium der perinatalen Entwicklung auf, zu einem Zeitpunkt in dem zumindest in Nagetieren GABA depolarisierende Wirkung hat. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es auch in der perinatalen Entwicklung des Menschen eine Phase gibt, in der eine den *cENOs*ähnliche Form der Spontanaktivität dominiert.

Zusammenfassung

8 Zusammenfassung

Die ersten Tage nach der Geburt eines Nagetiers sind gekennzeichnet durch ein enormes Wachstum des Gehirns und die Reifung der Synapsen in der Großhirnrinde. Die Mechanismen, die diesen wichtigen Vorgängen zu Grunde liegen, sind im Detail noch weitgehend unklar, es scheinen jedoch sowohl aktivitätsabhängige als auch aktivitätsunabhängige Prozesse involviert zu sein. Die aktivitätsabhängigen Prozesse werden in dieser Entwicklungsphase v. a. durch verschiedene Formen spontaner Aktivität gesteuert, die zu Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration führen.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang mit der Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie erstmals der Nachweis einer neuartigen Form spontaner Netzwerkaktivität in der Großhirnrinde neugeborener Säuger, den sog. *cortical Early Network Oscillations* (*cENOs*). Die *cENOs* haben folgende charakteristische Eigenschaften:

1. Sie stellen spontane, niedrig frequente Fluktuationen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration dar, die von Feldpotentialänderungen begleitet werden.

2. Nahezu 90% aller neokortikaler Neuronen beteiligen sich an den *cENOs*. Während die bislang bekannten Formen spontaner Aktivität in der unreifen Großhirnrinde nur lokal begrenzt auftreten, breiten sich die *cENOs* über anatomische Grenzen unterschiedlicher Hirnregionen hinweg entlang der Längsachse des Neokortex aus.

3. Im Gegensatz zu den bekannten Ca²⁺-Oszillationen in den neuronalen Domänen, erfordern die *cENOs* Aktionspotentialaktivität und eine funktionsfähige synaptische Übertragung. Während die Spontanaktivität in der Ratte durch Blockade

Zusammenfassung

der glutamatergen AMPA-Rezeptoren vollständig blockiert wird, sind die *cENOs* der Maus auf funktionelle NMDA-Rezeptoren angewiesen.

4. Die spontanen Ca²⁺-Wellen zeigen regionenspezifische Muster und ein charakteristisches Entwicklungsprofil, das sich in den anterioren und posterioren Hirnrindenabschnitten unterscheidet.

5. Das Verschwinden der cENOs in der gesamten Großhirnrinde am Ende der ersten postnatalen Woche korreliert zeitlich mit dem Übergang der depolarisierenden Wirkung GABAs in eine hyperpolarisierende.

6. Der Vergleich der *cENOs* mit den *ENOs* im benachbarten Hippokampus (Garaschuk et al., 1998) ergab, dass diese beiden Formen der Spontanaktivität nicht zeitlich korreliert sind und sich auch hinsichtlich ihrer Pharmakologie und ihres Entwicklungsprofils unterscheiden. Während im Hippokampus die GABA-vermittelte Depolarisation notwendige Voraussetzung für das Entstehen der *cENOs* ist, werden die Ca²⁺-Wellen im Neokortex über Glutamatrezeptoren vermittelt.

7. Durch die Etablierung eines intakten Großhirnpräparats konnten die *cENOs* auch unter *in vivo*-nahen Bedingungen im unversehrten Großhirn neugeborener Mäuse nachgewiesen und charakterisiert werden. Dieses Versuchsmodell ermöglichte erstmals eine Kartierung der *cENOs* im intakten Gehirn, die zeigte, dass sie in allen sensorischen Hirnrindengebieten vorkommen und in beiden Großhirnhemisphären unabhängig voneinander auftreten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in der Großhirnrinde schon zum Zeitpunkt der Geburt spontane, neuronale Netzwerkaktivität auftritt, die zwischen weit entfernten Hirnrindenregionen korreliert ist. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass diese globale Aktivitätsform dazu geeignet ist, die Entwicklung und Reifung der

präzisen Schaltkreise des Neokortex, insbesondere der langen Assoziationsbahnen, zu fördern und zu koordinieren.

9 Literaturverzeichnis

- Adelsberger, H., Garaschuk, O. & Konnerth, A. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci.* 8 (2005) 988-990.
- Agmon, A. & O'Dowd, D. K. NMDA receptor-mediated currents are prominent in the thalamocortical synapse response before maturation of inhibition. J Neurophysiol. 68 (1992) 345-349.
- Allendoerfer, K. L. & Shatz, C. J. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Ann Rev Neurosci.* **17** (1994) 185-218.
- Araque, A., Li, N., Doyle, R. T. & Haydon, P. G. Snare protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci.* **20** (2000) 666-673.
- Armstrong-James, M. & Fox, K. The physiology of developing cortical neurons. In: "Cerebral cortex", Vol. 7, Development and maturation of cerebral cortex, Peters A. & Jones E. G. (Eds), Plenum Press, New York, 1988, 237-272.
- Barker, J. L., Behar, T., Li, Y. X., Liu, Q. Y., Ma, W., Maric, D., Maric, I., Schaffner,
 A. E., Serafini, R., Smith, S. V., Somogyi, R., Vautrin, J. Y., Wen, X. L. &
 Xian, H. GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol.* 5 (1998) 305-322.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J. L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol.* **416** (1989) 303-325.
- **Ben-Ari, Y.** Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* **24** (2001) 353-360.
- **Ben-Ari, Y.** Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* **3** (2002) 728-739.
- Berninger, B., Marty, S., Zafra,F., Da Penha Berzaghi, M., Thoenen, H. & Lindholm, D. GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. Development. 121 (1995) 2327-2335.
- Bi, G. & Poo, M. Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. Ann Rev Neurosci. 24 (2001) 139-166.

- Blake, J. F., Yates, R. G., Brown, M. W. & Collingridge, G. L. 6-Cyano-7nitroquinoxaline-2,3-dione as an excitatory amino acid antagonist in area CA1 of rat hippocampus. *Br J Pharmacol.* **97** (1989) 71-76.
- Blue, M. E. & Parnavelas, J. G. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J Neurocytol.* **12** (1983) 697-712.
- **Bourque, C.W. & Renaud, L.P.** Activity patterns and osmosensitivity of rat supraoptic neurones in perfused hypothalamic explants. *J Physiol.* **349** (1984) 631-642.
- **Brodmann, K.** "Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaus" J. A Barth, Leipzig, 1909.
- Bureau, I., Shepherd, G. M. G. & Svoboda, K. Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex. *Neuron*. **42** (2004) 789-801.
- Buonanno, A. & Fields, R. D. Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr Opin Neurobiol.* 9 (1999) 110-120.
- Calderon, D. P., Leverkova, N. & Peinado, A. Gq/11-induced and spontaneous waves of coordinated network activation in developing frontal cortex. J Neurosci. 25 (2005) 1737-1749.
- **Campbell, A. W.** "Histological studies on the localisation of cerebral function" University Press, Cambridge, 1905.
- Cazalets, J.R., Borde, M. & Clarac, F. The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurones in the newborn rat. *J Neurosci*. **16** (1996) 298-306.
- Chen, G., Trombley, P. O. & Van den Pol, A. N. Exitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurons. *J Physiol*. **494** (1996) 451-464.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., & Ben-Ari, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* **14** (1991) 515-519.
- Chiu, C. & Weliky, M. Spontaneous activity in the developing ferret visual cortex in vivo. *J Neurosci.* **21** (2001) 8906-8914.
- Chiu, C. & Weliky, M. Relationship of correlated spontaneous activity to functional ocular dominance columns in the developing visual cortex. *Neuron.* **35** (2002) 1123-1134.
- Chiu, C. & Weliky, M. Multi-electrode recording from the developing visual pathway of awake behaving ferrets. *J Neurosci Methods*. **136** (2004) 55-61.

- Cline, H. T. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. **11** (2001) 118-126.
- Colin le Brun, I., Ferrand, N., Caillard, O., Tosetti, P., Ben-Ari, Y. & Gaiarsa, J. L. Spontaneous synaptic activity is required for the formation of functional GABAergic synapses in the developing rat hippocampus. *J Physiol.* **559** (2004) 129-139.
- Constatine-Paton, M., Cline, H. T. & Debski, E. Patterned activity, synaptic convergence and the NMDA-receptor in developing visual pathways. *Ann Rev Neurosci.* **13** (1990) 129-154.
- Constantine-Paton, M. & Cline, H. T. LTP and activity-dependent synaptogenesis: the more alike they are, the more different they become. *Curr Opin Neurobiol.* 8 (1998) 139-148.
- Corlew, R., Bosma, M. M. & Moody, W. J. Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J Physiol*. **560** (2004) 377-390.
- Crowley, J. C. & Katz, L. C. Development of ocular dominance columns in the absence of retinal input. *Nat Neurosci.* **2** (1999) 1125-1130.
- Crowley, J. C. & Katz, L. C. Early development of ocular dominance columns. *Science.* **290** (2000) 1321-1324.
- Crowley, J. C. & Katz, L. C. Ocular dominance development revisited. *Curr Opin Neurobiol.* **12** (2002) 104-109.
- Dalva, M. B. & Katz, L. C. Rearrangements of synaptic connections in visual cortex revealed by laser photostimulation. *Science*. **265** (1994) 255-258.
- Dammerman, R. S., Flint, A. C., Noctor, S. & Kriegstein, A. R. An exitatory GABAergic plexus in developing neocortical layer 1. *J Neurophysiol.* 84 (2000) 428-434.
- **Daszuta, A. & Gambarelli, F.** Early postnatal development of EEG and sleep-waking cycle in two inbred mouse strains. *Brain Res.* **354** (1985) 39-47.
- **De Curtis, M., Pare, D. & Llinas, R. R.** The electrophysiology of the olfactoryhippocampal circuit in the isolated and perfused adult mammalian brain in vitro. *Hippocampus.* **1** (1991) 341-354.
- Demarque, M., Represa, A., Becq, H., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Aniksztejn, L. Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron.* 36 (2002) 1051-1061.

Literaturverzeichnis

- Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science. 248 (1990) 73-76.
- Des Rosiers, M. H., Sakurada, O., Jehle, J., Shinohara, M., Kenneds, C. & Sokoloff, L. Functional plasticity in the immature striate cortex of the monkey shown by the [¹⁴C]desoxyglucose method. *Science*. **200** (1978) 447-449.
- **Durand, G. M., Kovalchuk, Y. & Konnerth, A.** Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature*. **381** (1996) 71-75.
- Edwards, D. H. Mechanisms of depolarizing inhibition at the crayfish giant motor synapse. I. Electrophysiology. *J Neurophysiol.* **64** (1990) 532-540.
- Eilers, J., Callewaert, G., Armstrong, C. & Konnerth, A. Calcium signaling in a narrow somatic submembrane shell during synaptic activity in cerebellar Purkinje neurons. *PNAS*. **92** (1995) 10272-10276.
- Feldman, D. E., Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Synaptic plasticity at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex: LTP, LTD and silent synapses. *J Neurobiol.* 41 (1999) 92-101.
- **Feldman, D. E.** Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron*. **27**. (2000) 45-56.
- 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.
- Feller, M. B., Butts, D. A., Aaron, H. L., Rokhsar, D. S. & Shatz, C. J. Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves. *Neuron*. 19 (1997) 293-306.
- Feller, M. B. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron*.22 (1999) 653-656.
- Feller, M. B. & Scanziani, M. A precritical period for plasticity in visual cortex. *Curr Opin Neurobiol.* **15** (2005) 94-100.
- Flint, A. C., Dammerman, R. S. & Kriegstein, A. R. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors in neocortical development causes neuronal calcium oscillations. *PNAS*. **96** (1999) 12144-12149.
- Fulton, B. P. & Walton, K. Electrophysiological properties of neonatal rat motoneurones studied in vitro. J Physiol. 370 (1986) 651-678.
- Galli, L. & Maffei, L. Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science*. 242 (1988) 90-91.
- Galuske, R. A. & Singer, W. The origin and topography of long-range intrinsic projections in cat visual cortex: a developmental study. *Cereb Cortex*. 6 (1996) 417-430.
- Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T. & Poo, M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell.* **105** (2001) 521-532.
- Gao, X. B. & Van den Pol, A. N. GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol.* 85 (2001) 425-434.
- 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., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci.* **3** (2000) 452-459.
- Ghosh, A. & Greenberg, M. E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. **268** (1995) 239-247.
- Gilbert, C. D. Horizontal integration in the neocortex. *Trends Neurosci.* 8 (1985) 160-165.
- Goldman, P. S. & Nauta, W. J. H. Columnar distribution of cortico-cortical fibers in the frontal association, limbic, and motor cortex of the developing rhesus monkey. *Brain Res.* **122** (1977) 393-413.
- Gomez, T. M. & Spitzer, N. C. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature*. **397** (1999) 350-355.
- Goodman, C. S. & Shatz, C. J. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* **72**/*Neuron.* **10** [Suppl] (1993) 77-98.
- Gramsbergen, A., Schwartze, P. & Prechtl, H. F. The postnatal development of behavioral states in the rat. *Dev Psychobiol*. **3** (1970) 267-280.
- Groc, L., Petanjek, Z., Gustafsson, B., Ben-Ari, Y., Hanse, E. & Khazipov, R. In vivo blockade of neuronal activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci.* **16** (2002) 1931-1938.
- **Gu, X. & Spitzer, N. C.** Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature*. **375** (1995) 784-787.
- **Gu, X. & Spitzer, N. C.** Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev Neurosci.* **19** (1997) 33-41.

- Hanse, E., Durand, G. M., Garaschuk, O. & Konnerth, A. Activity-dependent wiring of the developing hippocampal neuronal circuit. Sem Cell Dev Biol. 8 (1997) 35-42.
- **Hille, B.** "Ionic channels of excitable membranes" Sinauer Verlag, Sunderland, MA, 1992.
- Hebb, D. O. "The organization of Behaviour" Wiley, New York, 1949.
- Hollrigel, G. S., Ross, S. T. & Sltesz, I. Temporal patterns of depolarizing actions of spontaneous GABA_A receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus. *J Neurophysiol.* 80 (1998) 2340-2351.
- Horn, R. & Marty, A. Activation of ioinic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*. **92** (1988) 145-159.
- Horton, J. C. & Hocking, D. R. An adult-like pattern of ocular dominance columns in striate cortex of newborn monkeys prior to visual experience. *J Neurosci.* 16 (1996) 1791-1807.
- Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol*. **160** (1962) 106-154.
- Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. *J Physiol.* **165** (1963) 559-568.
- Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. *J Neurophysiol.* 26 (1963) 994-1002.
- Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol.* **28** (1965) 1041-1059.
- Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol.* **206** (1970) 419-436.
- Hubel, D. H. & Wiesel, T. N. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B.* **198** (1977) 1-59.
- Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron*. **15** (1995) 427-434.
- Isaac, J. T. R., Crair, M. C., Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron*. **18** (1997) 269-280.
- Jacobson, M. "Developmental neurobiology" Plenum Press, New York, 1991.
- Jackson, M. B & Zhang, S. J. Action potential propagation and propagation block by GABA in rat posterior pituitary nerve terminals. *J Physiol*. **483** (1995) 597-611.

 Jacquin, T.D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato,
 F., Charnay, P. & Champagnat, J. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron*. 17 (1996) 747-758.

- Jouvet-Mounier, D., Astic, L. & Lacote, D. Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat and guinea pig during the first postnatal month. *Dev Psychobiol*. **2** (1970) 216-239.
- Juraska, J. M. & Fifkova, E. An electron microscope study of the early postnatal development of the visual cortex of the hooded rat. *J Comp Neurol.* **183** (1979) 257-267.
- Kandler, K. & Katz, L. C. Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci.* 18 (1998) 1419-1427.
- Karlsson, K. A. & Blumberg, M. S. Hippocampal theta in the newborn rat is reveales under conditiond that promote REM sleep. J Neurosci. 23 (2003) 1114-1118.
- Kasyanov, A. M., Safiulina, V. F., Voronin, L. L. & Cherubini, E. GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *PNAS*. **101** (2004) 3967-3972.
- Kater, S. B., Mattson, M. P., Cohan, C. & Connor, J. Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci.* **11** (1988) 315-321.
- Katz, L. C. & Shatz, C. J. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*. 274 (1996) 1133-1138.
- Katz, L. C. & Crowley, J.C. Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Neurosci Rev.* 3 (2002) 34-42.
- Khalilov, I., Esclapez, M., Medina, I., Aggoun, D., Lamsa, K., Leinekugel, X.,
 Khazipov, R. & Ben-Ari, Y. A novel in vitro preparation: the intact hippocampal formation. *Neuron*. **19** (1997) 743-749.
- Khalilov, I., Dzhala, V., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Dual role of GABA in the neonatal rat hippocampus. *Dev Neurosci.* **21** (1999) 310-319.
- Khazipov, R., Leinekugel, X., Khalilov, I., Gaiarsa, J. L & Ben Ari, Y. Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *J Physiol.* **498** (1997) 763-772.
- Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhala, V., Berger, B. & Ben-Ari, Y. Early development of

neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci.* **21** (2001) 9770-9781.

- Khazipov, R., Khalilov, I., Tyzio, R., Morozova, E., Ben-Ari, Y. & Holmes, G.L. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* **19** (2004) 590-600.
- Khazipov, R., Sirota, A. Leinekugel, X., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y. & Buszaki, G. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*. **432** (2004) 758-761.
- **Kilb, W. & Luhmann, H.J.** Carbachol-induced network oscillations in the intact cerebral cortex of the newborn rat. *Cerebral Cortex*. **13** (2003) 409-421.
- Kilman, V., Van Rossum, M. C. W. & Turrigiano G. G. Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABAa receptors clustered at neocortical synapses. *J Neurosci.* 22 (2002) 1328-1337.
- Killackey, H. P. & Leshin, S. The organization of specific thalamocortical projections to the posteromedial barrel subfield of the rat somatic sensory cortex. *Brain Res.* 86 (1975) 469-472.
- **Kirsch, J. & Betz, H.** Glycine receptor activation is required for receptor clusterimg in spinal neurons. *Nature*. **392** (1998) 717-720.
- Kolb, B & Tees, R. C. (Hrsg.) "The cerebral cortex of the rat" MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1990.
- **Komuro, H. & Rakic, P.** Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron.* **17** (1996) 275-285.
- Kyrozis, A. & Reichling, D. B. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J Neurosci Meth.* 57 (1995) 27-35.
- Lamblin, M. D., Andre, M., Challamel, M. J., Curzi-Dascalova, L., D'Allest, A. M., De Giovanni, E., Moussalli-Salefranque, F., Navelet, Y., Plouin, P., Radvanyi-Bouvet, M. F., Samson-Dollfus, D. & Vecchierini-Blineau, M. F.
 Electroencephalography of the premature and term newborn. Maturational aspects and glossary. *Neurophysiol Clin.* 29 (1999) 123-219.
- Lauri, S. E., Lamsa, K., Pavlov, I., Riekki, R., Johnson, B. E., Molnar, E., Rauvala, H. & Taira, T. Activity blockade increases the number of functional synapses in the hippocampus of newborn rats. *Mol Cell Neurosci.* 22 (2003) 107-117.

- Leinekugel, X., Tseeb, V., Ben Ari, Y. & Bregestovski, P. Synaptic GABA_A. activation induces Ca²⁺ rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampus slices, *J Physiol.* **478** (1995) 319-329.
- **Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R.** Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory action of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron*. **18** (1997) 243-255.
- Leinekugel, X., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex in vitro. *J Neurosci.* **18** (1998) 6349-6357.
- Leinekugel, X., Khalilov, I., McLean, H., Caillard, O., Gaiarsa, J. L., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol.* **79** (1999) 189-201.
- Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y. & Buzsáki, G. Correlated Bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science*. **296** (2002) 2049-2052.
- Li, Z., Aizenman, C. D. & Cline, H. T. Regulation of Rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron.* **33** (2002) 741-750.
- Liao, D., Hessler, N. A. & Malinow, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*. 375 (1995) 400-404.
- López-Bendito, G. & Molnár, Z. Thalamocortical development: How are we going to get there? *Nat Neurosc Rev.* **4** (2003) 276-289.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B. & Kriegstein, A. R. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*. **15** (1995) 1287-1298.
- Luhmann, H. J. & Prince, D. A. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol.* 65 (1991) 247-263.
- Luhmann, H.J, Dzhala, V.I. & Ben-Ari, Y. Generation and propagation of 4-APinduced epilepiform activity in neonatal intact limbic structures in vitro. *Eur J Neurosci.* 12 (2000) 2757-2768.
- Maffei, L. & Galli-Resta, L. Correlation in the discharges of neighboring rat retinal ganglion cells during prenatal life. *PNAS*. 87 (1990) 2861-2864.

- Maric, D., Liu, Q. Y., Maric, I., Chaudry, S., Chang, Y. H., Smith, S. V., Sieghart,
 W., Fritschy, J. M. & Barker, J. L. GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates outgrowth via GABA_A-autoreceptor/Cl⁻-channels. *J Neurosci.* 21 (2001) 2343-2360.
- Marin-Padilla, M. Early prenatal onogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (Felis domestica). A golgi study.I. The primordial neocortical organisation. *Z Anat Entwicklungsgesch.* **134** (1971) 117-145.
- McCormick, D. A. Spontaneous activity. Signal or noise? *Science*. **285** (1999) 541-543.
- Meister, M., Wong, R.O., Baylor, D.A. & Shatz, C.J. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science*. **252** (1991) 939-943.
- Menendez de la Prida, L., Bolea, S. & Sanchez-Andres, J. V. Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus. *Eur J Neurosci.* **10** (1998) 899-906.
- Mooney, R., Madison, D. V. & Shatz, C. J. Enhancement of transmission at the developing retinogeniculate synapse. *Neuron*. **10** (1993) 815-825.
- Mooney, R., Penn, A.A., Gallego, R. & Shatz, C.J. Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. *Neuron*. **17** (1996) 863-874.
- **Mountcastle,V. B.** Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol.* **20** (1957) 408-434.
- Miller, A. J. & Fry, G. Postnatal development of presynaptic terminals in the gigantocellular tegmental field (FTG) of the rat. *Brain Res.* **188** (1980) 301-317.
- Muhlethaler, M., De Curtis, M., Walton, K. & Llinas, R. The isolated and perfused brain of the guinea-pig in vitro. *Eur J Neurosci.* **5** (1993) 915-926.
- Nagerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. & Bonhoeffer, T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. 44 (2004) 759-767.
- Neher, E. & Sakmann, B. The patch clamp technique. Sci Am. 266 (1992) 44-51.
- Niedermeyer, E. Maturation of the EEG development of waking and sleep patterns. In: "Electroencephalography: basic principles, clinical applications and related fields", Niedermeyer, E. & Lopes da Silva, F. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, 1999, 4th ed., 15-27.

- **Niedermeyer, E. & Lopes da Silva, F.** (Eds.), "Electroencephalography: basic principles, clinical applications and related fields", Williams and Wilkins, Baltimore, 1999, 4th ed.
- **Obata, K., Oide, M. & Tanaka, H.** Exitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Res.* **144** (1978) 179-184.
- O'Donovan, M.J. Motor activity in the isolated spinal cord of the chick embryo: synaptic drive and firing patterns of single motoneurones. *J Neurosci.* **8** (1989) 2530-2543.
- O'Donovan, M.J. Mechanisms of spontaneous activity in developing spinal networks. Review. *J Neurobiol*. **18** (1998) 131-145.
- Otsuka, M. & Konishi, S. Electrophysiology of mammalian spinal cord in vitro. *Nature*. **252** (1974) 733-734.
- Owens, D. F., Boyce, L. H., Davis, M. B. & Kriegstein, A. R. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci.* **16**, (1996) 6414-6423.
- Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. Patterns of intracellular calcium fluctuations in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci.* 18 (1998) 5374-5388.
- Pare, D. & Llinas, R. Intracellular study of direct entorhinal inputs to field CA1 in the isolated guinea pig brain in vitro. *Hippocampus.* 5 (1995) 115-119.
- Parnavelas, J. G. Neurotransmitters in the cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 85 (1990) 13-29.
- Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. "The mouse brain in stereotaxic coordinates" Academic Press, 1991.
- Penn, A. A., Riquelme, P. A., Feller, M. B. & Shatz, C. J. Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science*. 279 (1998) 2108-2112.
- Petralia, R.S., Esteban, J. A., Wang, Y. X., Partridge, J. G., Zhao, H. M., Wenthold, R. J. & Malinow, R. Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci.* 2 (1999) 31-36.

- Pouille, F. & Scanziani, M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*. 293 (2001) 1159-1163.
- **Raki**_ς, **P.** Prenatal genesis of connections subserving ocular dominance in the rhesus monkey. *Nature*. **261** (1976) 467-471.
- Raedler, E., Raedler, A. & Feldhaus, S. Dynamic aspects of neocortical histogenesis in the rat. *Anat Embryol (Berl)*. **158** (1980) 253-269.
- Reh, T. A. & Constatine-Paton, M. Eye-specific segregation requires neural activity in three-eyed Rana pipens. *J Neurosci.* **5** (1985) 1132-1143.
- Reiter, H. O., Waitzman, D. M. & Stryker, M.P. Cortical activity blockade prevents ocular dominance plasticity in the kitten visual cortex. *Exp Brain Res.* 65 (1986) 182-188.
- Rhee, J. S., Ebihara, S. & Akaike, N. Gramicidin perforated patch-clamp technique reveals glycine-gated outward chloride current in dissociated nucleus solitarrii neurons of the rat. *J Neurophysiol.* **72** (1996) 1103-1108.
- Rickmann, M., Chronwall, B. M. & Wolff, J. R. On the development of nonpyramidal neurons and axons outside the cortical plate. The early marginal zone as a pallial anlage. *Anat Embrol (Berl)*. **151** (1977) 285-307.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. & Kaila, K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*. **397** (1999) 251-255.
- Rumpel, S., Hatt, H. & Gottmann, K. Silent synapses in the developing rat visual cortex; evidence for postsynaptic expression of synaptic plasticity. *J Neurosci.* 18 (1998) 8863-8874.
- Scher, M.S. Unterstanding sleep ontogeny to assess brain functions in neonates and infantes. *J Child Neurol.* **13** (1998) 467-474.
- Schwartz, T. H., Rabinowitz, D., Unni, V., Kumar, V.S., Smetters, D.K., Tsiola, A.
 & Yuste, R. Network of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron*. 20 (1998) 541-552.
- Shatz C. J. & Stryker, M. P. Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. *Science*. 242 (1988) 87-89.
- Shatz, C. J. Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron*. **5** (1990) 745-756.

- Serafini, R., Valeyev, A. Y., Barker, J. L. & Poulter, M. O. Depolarizing GABAactivated CE-channels in the embryonic rat spinal cord and olfactory bulb cells. *J Physiol.* **488** (1995) 371-386.
- Sidman, R. L. & Rakic, P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 62 (1973) 1-35.
- Smith, G. E. A new topographical survey of the human cerebral cortex being an account of the districution of the anatomically distinct cortical areas and their relationship to the cerebral sulci. J Anat (Lond). 41 (1907) 237-254.
- **Spitzer, N. C.** Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurons: signaling systems for differentiation. *Trends Neurosci.* **17** (1994) 115-118.
- Spitzer, N. C. & Gu, X. Purposeful patterns of spontaneous calcium transients in embryonic spinal neurons. Semin Cell Dev Biol. 8 (1997) 13-19.
- Spitzer, N. C., Lautermilch, N. J., Smith, R. D. & Gomez, T. M. Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *BioEssays*. 22 (2000) 811-817.
- **Spitzer, N. C.** Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients. *J Physiol (Paris)*. **96** (2002) 73-80.
- Spitzer, N. C. Coincidence detection enhances appropriate wiring of the nervous system. *PNAS*. **101** (2004) 5311-5312.
- Spitzer, N. C., Root, C. M. & Borodinsky, L.N. Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice. *Trends in Neurosci.* 27 (2004) 415-421.
- Sretavan, D. W., Shatz, C. J. & Stryker, M. P. Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. *Nature*. **336** (1988) 468-471.
- Staley, K. J. & Mody, I. Shunting of exitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABA_A receptor-mediated postsynaptic conductance. J Neurophysiol. 68 (1992) 197-212.
- Steriade, M., McCormick, D. A. & Sejnowinski, T. J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. **262** (1993) 679-685.
- Steriade, M. & Timofeev, I. Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron*. **37** (2003) 563-576.
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K. & Konnerth, A. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *PNAS*. **100** (2003) 7319-7324.

- Stryker, M. P. & Strickland, S. L. Physiological segregation of ocular dominance columns depend on the pattern of afferent electrical activity. *Ophthalmol Vis Sci (Suppl)*. 25 (1984) 278.
- Stryker, M. P. & Harris, W. A. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J Neurosci.* 6 (1986) 2117-2133.
- Sur, M., Angelucci, A. & Sharma, J. Rewiring cortex: The Role of patterned activity in development and plasticity of neocortical circuits. *J Neurobiol.* 41 (1999) 33-43.
- Sur, M. & Leamey, C. A. Development and plasticity of cortical areas and networks. *Nat Rev Neurosci.* 2 (2001) 251-262.
- Sutor, B., Hablitz, J. J., Rucker, F. & ten Bruggencate, G. Spread of epileptiform activity in the immature rat neocortex studied with voltage-sensitive dyes and laser scanning microscopy. *J Neurophysiol*. **72** (1994) 1756-1768.
- Sutor, B. Gap junctions and their implications for neurogenesis and maturation of synaptic circuitry in the developing neocortex. In: "Results and Problems in cell Differentiation, Vol. 39: Cortical development", Hoffmann, C.F. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2002, 53-73.
- Swindale, N. V. Visual cortex: looking into a Klein bottle. Curr Biol. 6 (1996) 776-779.
- Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C. S. The molecular biology of axon guidance. *Science*. **274** (1996) 1123-1133.
- Travagli, R. A., Dunwiddie, T. V. & Williams, J. T. Opioid inhibition in locus coeruleus. *J Neurophys.* **74** (1995) 518-528.
- Uylings, H.B.M., Van Eden, C.G., Parnavelas, J.G. & Kalsbeek, A. The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. In "The cerebral cortex of the rat", Kolb, B. & Tees, R.C. (Eds.), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1990, 36-76.
- Vanhatalo, S., Tallgren, P., Andersson, S., Sainio, K., Voipio, J. & Kaila, K. DC-EEG discloses prominent very slow activity pattern during sleep in preterm infants. *Clin Neurophysiol.* **113** (2002) 1822-1825.
- Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., Van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J. & Sudhof, T. C. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*. 287 (2000) 864-869.

- Vogt, C. & Vogt, O. Allgemeine Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J Psychol Neurol* (*Lpz*) 25 (1919) 279-462.
- Voigt, T., Opitz, T. & de Lima, A. D. Synchronous oscillatory activity in immature cortical network is driven by GABAergic preplate neurons. *J Neurosci.* 21 (2001) 8895-8905.
- Wang, Y. F., Gao, X. B. & Van den Pol, A. N. Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *J Neurophysiol.* **86** (2001) 1252-1265.
- Watanabe, K., Hayakawa, F. & Okumura, A. Neonatal EEG: a powerful tool in the assessment of brain damage in preterm infants. *Brain Dev.* **21** (1999) 361-372.
- Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C. & Kriegstein, A.R. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron.* 43. (2004) 647-661.
- Weliky, M. & Katz, L.C. Correlational structure of spontaneous neuronal activity in the developing lateral geniculate nucleus in vivo. *Science*. **285** (1999) 599-604.
- Weliky, M. Correlated neuronal activity and visual cortical development. *Neuron*. **27** (2000) 427-430.
- Wells, J. E., Porter J. T. & Agmon, A. GABAergic inhibition suppresses paroxysmal network activity in the neonatal rodent hippocampus and neocortex. J Neurosci. 20 (2000) 8822-8830.
- White, E. L. & DeAmicis, R. A. Afferent and efferent projections of the region in mouse SmL cortex which contains the posteromedial barrel subfield. *J Comp Neurol.* 175 (1977) 455-482.
- Wiesel, T.N. & Hubel, D. H. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol.* 28 (1965) 1029-1040.
- Wiesel, T.N. & Hubel, D. H. Ordered arrangement of orientation columns in monkey lacking visual experience. *J Comp Neurol.* **158** (1974) 307-318.
- Williams, J. T. & Marshall, K. C. Membrane properties and adrenergic responses in locus coeruleus neurons of young rats. *J Neurosci.* 7 (1987) 3687-3694.
- Wong, R. O. The role of spatio-temporal firing patterns in neuronal develop-ment of sensory systems. *Curr Opin Neurobiol.* 4 (1993) 595-601.

- Wong, R. O., Meister, M. & Shatz, C. J. Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron*. **5** (1993) 923-938.
- Wong, R. O., Chernjavsky, A., Smith, S. J. & Shatz, C. J. Early functional neural networks in the developing retina. *Nature*. **374** (1995) 716-718.
- Wong, R. O. & Oakley, D.M. Changing patterns of spontaneous busting activity of on and off retinal ganglion cells during development. *Neuron*. **16** (1996) 1087-1095.
- Wong, R. O. Patterns of correlated spontaneous bursting activity in the developing mammalian retina. Sem Cell Dev Biol. 8. (1997) 5-12.
- Wu, G. M., Malinow, R. & Cline, H. T. Maturation of a central glutamatergic synapse. Science. 274 (1996) 972-976.
- **Yuste, R. & Katz, L. C.** Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*. **6** (1991) 333-44.
- Yuste, R., Peinado, A. & Katz, L. C. Neuronal domains in developing neocortex. *Science*. **257** (1992) 665-669.
- Yuste, R., Nelson, D. A., Rubin, W. W. & Katz, L. C. Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron*. 14 (1995) 7-17.
- Zhang, S. J. & Jackson, M. B. GABA_A receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. *J Physiol.* 483 (1995) 583-595.
- **Ziskind-Conheim, L.** Physiological functions of GABA-induce depolarisations in the developing rat spinal cord. *Perspect Dev Neurobiol.* **5** (1998) 279-287.

10 Anhang

10.1 Publikationsliste

- 10.1.1 Originalarbeiten
- Garaschuk, O., Linn J., Eilers J. & Konnerth A. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci.* **3** (2000) 452- 459.
- Schankin, C. J., Birnbaum, T., Linn, J., Brüning, R., Kretschmar, H.A., Straube, A. & Krebs, B. A fetal encephalitis. *Lancet.* **365** (2005) 358.

10.1.2 Tagungsbeiträge

- Linn, J., Garaschuk, O. & Konnerth, A. Evidence for functional metabotropic glutamate receptors in the immature hippocampus. *Eur J Physiol.* **437** (1999) 122.
- Linn, J., Garaschuk, O., Stosiek, C. & Konnerth, A. Early network oscillations in the intact mouse brain *"in vitro*". *Eur J Physiol* **441** (2001) 135.
- Linn, J., Garaschuk, O. & Konnerth, A. Early network oscillations in an intact mouse brain preparation. *Göttingen Neurobiology Report.* **28** (2001) 622.
- Linn, J., Wiesmann, M., Fesl, G., Herms, J. & Brückmann, H. Subarachnoidale und subpiale Blutablagerungen als differentialdiagnostisches Kriterium bei der Zerebralen Amyloidangiopathie (CAA). *Klin Neuroradiol.* **15** (2005) 213.
- Linn, J., Ertl-Wagner, B., Seelos, K., Brückmann, H. & Brüning, R. Wertigkeit der Multi-slice CT-Angiographie (MSCTA) bei der Diagnose der Sinusvenenthrombose. Ergebnisse einer Pilotstudie. *Klin Neuroradiol.* 15 (2005) 214.
- Garaschuk, O., Linn, J. & Konnerth, A. Distinct types of early network oscillations in neighbouring regions of immature cortex and hippocampus. *Eur J Physiol.* 439 (2000) 413.
- Garaschuk, O., Stosiek, C., Linn J. & Konnerth, A. *cENO*-associated calcium waves in the intact mouse brain *"in vitro"*. *Eur J Physiol.* **443** (2002) 324.

Dankvermerk

11 Dankvermerk

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Arthur Konnerth durchgeführt. Ihm danke ich vor allem für die intensive Betreuung auf inhaltlicher und methodischer Ebene, aber auch für eine Reihe von Diskussionen, die mich den kritischen Umgang mit wissenschaftlichen Ergebnissen gelehrt haben.

Mein allerherzlichster Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Olga Garaschuk, die mich sowohl bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente als auch bei der Niederschrift dieser Dissertation mit großem Engagement unterstützt hat.

Darüberhinaus möchte ich mich außerdem bei allen anderen, v. a. auch den technischen Mitarbeiter des Instituts bedanken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen der Graduiertenkollegs 377 ("Zelluläre Regulation und Wachstum") und 333 ("Biologie menschlicher Erkrankungen") gefördert. Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung und insbesondere für die Ermöglichung des intensiven Erfahrungsaustauschs und der interdisziplinären Weiterbildung, die im Rahmen dieser fachübergreifenden Programme erfolgten.

Abschließend möchte ich mich noch herzlich bei meinen Eltern und meinem Freund Hendrik Strebel für ihre Unterstützung, ihre aufmunternden Worte und ihre große Geduld bedanken.

122