



Etablierung eines dreistufigen Messkonzepts zur elektrophysiologischen Analyse akuter Hirnschnitte

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Constantin Klisch

aus Frankfurt am Main

2017

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.10.2012-31.12.2016 unter der Leitung von
Prof. Dr. rer. nat. Jörg Geiger am Institut für Neurophysiologie an der Charité Berlin erstellt

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg R. P. Geiger

2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist

Disputation am 17.05.2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet. Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich wurde nicht beantragt.

Constantin Klisch

Dank gilt den vielen Unterstützern

meinen Betreuern Jörg Geiger und Stephan Sigrist, die diese Arbeit erst ermöglicht haben

den finanziellen Unterstützern diese Arbeit: Jörg Geiger, Christine Winter und dem GRK1123

Benjamin Marquez-Klaka, Nikolaus Maier, Peter Bäuerle und Stefanie Schinkel für ausgiebige fachliche Gespräche, Diskussionen und Anregungen

Christoph Kulisch, Yangfan Peng, Julia Neugebauer, Stéphanie Braud und Luisa Hasam-Henderson, meinen wissenschaftlichen Mitstreitern, die mit mir zusammen an den Aufbauten und Messungen gearbeitet haben

Sonja Frosinski, Katrin Schulze und Kerstin Rückwardt für ihre Unterstützung und Beratung in allen formalen und bürokratischen belangen

den Mitarbeitern des Instituts für Neurophysiologie, die mit ihrer Präsenz den Alltag und Stress erst erträglich machten

Euch allen meinen herzlichsten Dank

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	9
EINLEITUNG	11
<i>In vivo</i> Verfahren in der Neurophysiologie	11
<i>In vitro</i> Verfahren in der Neurophysiologie	12
Akute Hirnschnitte	12
Elektrophysiologische Verfahren, die im Hirnschnitt angewandt werden können	13
Extrazelluläre Ableitung und Feldpotentiale	13
Intrazelluläre Ableitung und Patch-Clamp	14
Elektrophysiologische Aufbauten	14
Interface-Kammer-Aufbau.....	14
γ -Oszillationen.....	15
Multielektrodenarray	15
Patch-Clamp-Aufbau.....	16
Welche Hirnregionen eignen sich besonders für Untersuchungen in akuten Hirnschnitten von transgenen und pharmakologischen Tiermodellen?	17
Der präfrontale Cortex und warum wir ihn als Modell nutzen.....	17
Der Hippocampus und warum wir ihn als Modell nutzen	18
Analyse transgener Tiermodelle neuropsychiatrischer Erkrankungen	19
Beispiel: Neuregulin 3 und ErbB4	20
Analyse modulatorischer Systeme in Hirnschnitten	21
Nikotinische Acetylcholinrezeptoren.....	21
Lokalisation von nAChRs und neuronale Verschaltung im PFC.....	22
Zielsetzung	24
MATERIAL & METHODEN	25
Chemikalienliste	25
Lösungen	26
Präparier- und Lagerungslösungen.....	26
Ratten- und Maus-ACSF für Oszillationsmessungen am Interface-Aufbau	27
Maus-ACSF für MEA-Messungen	28
Ratten-ACSF für Patch-Clamp-Messungen	28
Ratten-Intrazellulärlösung für Patch-Clamp-Messungen	29
Maus-Intrazellulärlösung für Patch-Clamp-Messungen	29
Maus-Intrapipettenlösung für zellangeheftete Patch-Clamp-Messungen	29
Geräte und Aufbauten	30
Feldpotential- und Oszillations-Aufbau	30
MEA-Aufbau.....	31
Patch-Clamp-Aufbau.....	32

Allgemeine Geräte	34
Gehirnschnittpräparation	35
Tierschutz.....	35
Verwendete Tiere	35
Organentnahme.....	35
Hippocampale Schnitte.....	35
Prälimbischer Cortex-Schnitte	36
Messung am Interface-Aufbau.....	36
NRG3 delNEO KO-Mäuse	36
Auswertung und Statistik	37
Oszillationen am Interface-Aufbau	37
MEA	39
ERGEBNISSE.....	41
Aufbauten	41
Hexadeca-Oszillations-Aufbau	41
MEA-Aufbau.....	43
Octa-Patch-Clamp-Aufbau	44
Fazit	47
Messungen.....	48
Etablierung eines Oszillationsprotokolls für den PrL in Ratten und Mäusen in Feldpotentialmessungen	48
Induzierung von γ -Oszillationen mit Kainsäure und Carbamylcholin in männlichen und weiblichen Ratten	49
Induzierung von Oszillationen mit Kainsäure und Carbamoylcholin in Mäusen	51
Fazit	52
Einfluss von cholinergen Agonisten und nikotinischen Antagonisten auf Oszillationen im prälimbischen Cortex von <i>Rattus norvegicus wistar</i>	53
Erhöhung der Oszillationsfrequenz und Power mit ACH und PHYS	53
Einfluss von nikotinischen Antagonisten auf mit CCH, KA, ACH und PHYS generierte Oszillationen	56
Fazit	59
Oszillationen in NRG3-Knock-Out-Mäusen.....	59
Prelimbischer Cortex	59
Hippocampus CA3	62
Fazit	65
Messungen am MEA in coronalen PrL-Schnitten von NRG3-Knock-Out-Mäusen	65
Fazit	66
Patch-Clamp-Experimente an NRG3-KO-Mäusen.....	66
Patch-Clamp im PrL von NRG3-KO-Mäusen (vorläufige Ergebnisse)	67
Patch-Clamp in der CA1-Region des Hippocampus von NRG3-KO-Mäusen.....	68
Fazit	69
Ableitungen am Octa-Patch-Clamp-Aufbau (exemplarisch).....	70
DISKUSSION	73
Oszillationen am Hexadeca-Interface-Aufbau	73
Oszillationen im prälimbischen Cortex von <i>Rattus norvegicus wistar</i>	74

Oszillationen im prälimbischen Cortex von NRG3-Knock-Out-Mäusen.....	78
Oszillationen im Hippocampus von NRG3-Knock-Out-Mäusen.....	79
MEA.....	80
Dopamin induzierte Muster im PrL von NRG3-KO-Mäusen	81
Patch-Clamp Messungen	81
Messungen am Octa-Patch-Clamp-Aufbau.....	81
Patch-Clamp-Analyse in NRG3-KO-Mäusen.....	82
Fazit	83
Statistik, Auswertung und anfallende Datenmengen.....	83
Tierverbrauch.....	84
Ausblick	85
ZUSAMMENFASSUNG	86
SUMMARY	87
LITERATUR	88

Abkürzungen

ACH	Acetylcholin
ACSF	künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (<i>Artificial cerebrospinal fluid</i>)
CCH	Carbamoylcholinchlorid
CCK	Cholecystokinin
Ci	Korrelations-Index
DH β E	Dihydro- β -Erythroidinhydrobromid
EEG	Elektroenzephalogramm
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
EPSC	exzitatorische postsynaptische Ströme
FFT	schnelle Fourier-Transformation
GABA	γ -Aminobuttersäure
ING	Interneuron-Netzwerk Gamma
KA	Kainsäure
KO	Knock-out Mutante
LFP	lokales Feldpotential
MEA	Multielektrodenarray
mEPSC	miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NGFZ	neurogliaforme Zellen
NRG3	Neuregulin 3
PFC	präfrontaler Cortex
PG	persistentes Gamma
PING	Pyramiden-Interneuron-Netzwerk Gamma
PHYS	Physostigminhemisulfat
PPR	paarige Puls Ratio
PrL	prälimbischer Cortex
PV	Parvalbumin
SOM	Somatostatin
TMPH	Tetramethylpiperidinheptanoate-Hydrochlorid

VE voll entsalzt
VIP vasoaktives intestinales Polypeptid
vgl. vergleiche
WT Wildtyp

Einleitung

Die elektrischen Eigenschaften neuronalen Gewebes stehen seit den historischen Experimenten eines Galvani im ausgehenden 18. Jahrhundert im Zentrum des Interesses und der experimentellen Forschung zur Funktion neuronaler Schaltkreise. Fortschritte wurden dabei wesentlich auch durch die ständige Entwicklung neuer elektrophysiologischer Messmethoden erreicht, die sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf Systemebene neue Analysemöglichkeiten zur Verfügung stellten. So ist es heute möglich, elektrische Prozesse in subzellulären Kompartimenten von Nervenzellen zu untersuchen und andererseits in der Systemphysiologie die Aktivität tausender Neurone aufzulösen. Eine gute Beschreibung neuronaler Prozesse bedarf des Einsatzes vielfältiger Analysemethoden auf verschiedenen Systemebenen. Dabei unterscheidet man grundsätzlich Verfahren, die *in vivo* und *ex vivo* angewandt werden.

In vivo Verfahren in der Neurophysiologie

Das bekannteste *in vivo* Verfahren ist das Enzephalogramm (EEG), das 1924 erstmals am Menschen von Hans Berger eingesetzt wurde und seitdem ein wichtiges nicht invasives Werkzeug in der Neuropsychiatrie, der Epilepsiediagnose (Trimble, 2016) und in wissenschaftliche Experimente an meist größeren Versuchstieren wie z.B. Primaten ist.

Magnetoenzephalographie, das eine bessere durchdringungstiefe als das klassische EEG bietet, ist auch eine Möglichkeit Aktivität im Gehirn aufzunehmen, findet aber, auf Grund des hohen Heliumverbrauchs und des großen technischen Aufwands, meist nur bei Menschen eine Anwendung.

Für Aufnahmen von tieferen Hirnregionen kann man Feldelektroden implantieren und die Ableitung oder die Stimulation der Region mit dem Verhalten korrelieren, wie z.B. für die Untersuchung von Orts- und Gitterzellen (O'Keefe and Dostrovsky, 1971; Brun et al., 2002).

In leicht zugänglichen Regionen des Neocortexes kann man auch Einzelzellen mittels Patch-Clamp untersuchen. Dabei kann man entweder ohne optische Hilfsmittel vorgehen (Margrie et al., 2002) oder mit Unterstützung eines 2-Photonen-Mikroskops arbeiten (Jouhanneau et al., 2015).

Transkraniale Magnetstimulation erlaubt einem die nicht invasive Stimulation, was z.B. genutzt wird, um die Auswirkung von Aktivierung verschiedener Areale bei unterschiedlichen psychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depressionen (Sachdev et al., 2002) oder konditionierter Angst (Guhn et al., 2014) zu testen.

Abseits der Elektrophysiologie finden auch bildgebende Verfahren Anwendung wie zum Beispiel Computertomographie, zur Darstellung von Geweben innerhalb des Tieres oder funktionelle Magnetresonanztomographie, mit der sich Durchblutungsänderungen im Gehirn zeigen lassen.

In vitro Verfahren in der Neurophysiologie

In vitro stehen einem mehrere artifizielle Systeme zur Verfügung. Einerseits kann man akute Gewebeproben oder Schnitte vermessen, andererseits kann man sich unterschiedlicher Kultursysteme bedienen. Schnittkulturen (Kapoor et al., 1988) bieten einem die systemische Möglichkeit circadiane, entwicklungsabhängige oder pharmakologisch induzierte Veränderungen innerhalb einer spezifischen Struktur zu beobachten, während verschiedene Formen dissoziierter Zellkulturen einem Erlauben die Interaktion, Entwicklung, circadianes Verhalten und Veränderungen zwischen einem oder mehreren Zelltypen, Synapsen oder Autapsen mechanistisch zu verfolgen und zu modulieren (Bekkers and Stevens, 1991;Tominaga et al., 1994;Segal et al., 2003).

In vitro Messungen lassen prinzipiell auch alle *in vivo* verwendeten Verfahren zu. Der technische Aufwand, auf Grund kleinerer und isolierterer biologische Systeme, ist allerdings deutlich geringer und weniger störanfällig.

Akute Hirnschnitte

In vitro Experimente können, im Gegensatz zu *in vivo* durchgeführte Studien, nie die Gänze eines Systems repräsentieren. Dennoch bieten reduktionistische und artifizielle Systeme, wie Gehirnschnitte, Möglichkeiten, die *in vivo* schwer zu erhalten sind. Während man aus einem Gehirn viele Präparate machen kann, ist die Anzahl von Elektroden, die man in einem lebenden Tier im Gehirn platzieren kann schon allein durch die Größe des Kopfes und der Elektrodenhalter viel beschränkter. Die Untersuchung verhaltensunabhängiger mechanistischer Grundlagen und Phänomene sowie die Interpretation der Daten gestaltet sich *in vitro* durch die strukturelle Eingrenzung wesentlich einfacher, da das untersuchte System manipulierbarer und weitgehend isoliert von Einflüssen anderer Hirnstrukturen ist. Die *in vivo* gemessene Konnektivität im Neocortex (Jouhanneau et al., 2015) von 6,7% zeigt, dass die Situation *in vitro* diese Ergebnisse regionsabhängig mit 5-15% Konnektivität (Bannister, 2005;Morishima et al., 2011;Jiang et al., 2015), trotz abgeschnittener Axone, gut widerspiegelt.

In vitro Experimente erlauben es einem die Versuchszahl bei geringerem Arbeits- und Zeitaufwand in die Höhe zu treiben, bei gleichzeitig geringerem monetärem und bürokratischem Aufwand im Verhältnis zu Tierversuchverfahren. Dadurch kann man Parameter erforschen, für deren

Beschreibung eine hohe Versuchsanzahl notwendig ist, wie zum Beispiel geschlechtsspezifische Unterschiede oder Ansprechraten für durch Stimulation induzierte Phänomene.

Auch wenn Experimente im Gehirnschnitt *in vivo* Untersuchungen nicht ersetzen können, sind Schnittpräparate ein ideales und kostengünstiges Modell für pharmakologische, gewebetypische und mechanistische Untersuchungen.

Elektrophysiologische Verfahren, die im Hirnschnitt angewandt werden können

Extrazelluläre Ableitung und Feldpotentiale

Die einfachste Methode elektrische Aktivität in Geweben zu messen besteht daraus eine Elektrode in oder am zu untersuchende Gewebe zu platzieren. Dabei werden je nach Elektrodenbeschaffenheit größere Areale des Gewebes und deren Feldpotentiale vermessen. Eine klassische humane, nicht invasive Anwendung wäre zum Beispiel das Elektroenzephalogramm (EEG), das einem Einblick in Schicht I des Neocortex gewährt. Um tiefere Hirnschichten und-regionen *in vivo* zu betrachten müssen die Elektroden implantiert werden. *In vitro* Experimente von Geweben oder Zellkulturen geben einem eine chirurgisch weniger aufwendige und tierschutzrechtlich mit geringeren Auflagen versehene Möglichkeit zur Untersuchung tieferer Hirnregionen mittels derselben Methodik.

Zur Untersuchung kleinerer Felder mit mehreren Elektroden werden sogenannte Multi-Elektroden-Arrays (MEA) genutzt. Diese erlauben einem meist zwischen 32 - 256 Ableitung in einem Gewebeschnitt oder Zellkultur. Dadurch lässt sich die räumlich Auflösung der Messung erhöhen und Signalantworten kleinerer Gebiete untereinander korrelieren.

Oszillationen von Neuronenverbänden lassen sich extrazellulär besonders einfach untersuchen. Oszillationen sind deswegen interessant, weil unterschiedliche Oszillationsfrequenzen verschiedenen Aufgaben zugeordnet werden können, wie zum Beispiel Schlaf oder Konzentration (siehe auch γ -Oszillationen auf Seite 15).

Extrazelluläre Untersuchungen lassen sich sowohl in einer Interface-Kammer, als auch in einer Bad-Kammer vornehmen. Die Bad-Kammer erlaubt einem gleichzeitige Patch-Clamp-Anwendungen. Auch Drogenapplikation scheint seine Wirkung schneller als in der Interface-Kammer zu entfalten. Allerdings braucht man bei Oszillationsmessungen fünfmal höhere Perfusionsraten als in der Interface-Kammer zum Erreichen ähnlicher Ergebnisse (Lu et al., 2012). Außerdem hat die Sauerstoffversorgung des Schnittes Einfluss auf die Qualität der Messung (Carlin and Brownstone, 2006; Huchzermeyer et al., 2008; Hajos et al., 2009; Huchzermeyer et al., 2013) und ist in der Interface-Kammer leichter zu beeinflussen.

Bei extrazelluläre Bad-Ableitungen ist außerdem zu beachten, dass durch den Nebenschlusswiderstand des Bades die Amplitude von Populationsantworten geringer ausfallen kann (Aitken et al., 1995; Lipton et al., 1995).

Intrazelluläre Ableitung und Patch-Clamp

Um einzelne Zellen zu vermessen kann man entweder mit scharfen Mikroelektroden die Zelle penetrieren oder mittels Patch-Clamp ein Kontinuum zwischen dem Cytosol und dem Inneren einer Pipette mit Elektrode herstellen. Patch-Clamp-Messungen bieten auf Grund des großen Zugangs zur Zelle den Vorteil geringerer Widerstände, allerdings verdünnt die Flüssigkeit in der Pipette mit der Zeit das Cytosol. Auch lassen sich hochauflösend aktive wie passive Eigenschaften des Neurons, wie Zell-, Kanal- und Membraneigenschaften, Widerstände, Kapazitäten und Aktionspotentiale mittels Patch-Clamp bestimmen.

Benutzt man mehr als einen Mikromanipulator mit zugehöriger Elektrode, lassen sich auch Konnektivitäten zwischen verschiedenen Zellen testen. Dies sind gewebeabhängig sehr zeitintensive Experimente. Manche Hirnregionen zeigen eine Konnektivität zwischen Zellen in naher Umgebung von unter 5%. Dementsprechend müssen hunderte Verbindungen gemessen werden, um eine statistische relevante Aussage treffen zu können.

Wenn man nicht blind oder *in vivo* ableiten möchte, müssen intrazelluläre Messungen in einer Bad-Kammer ausgeführt werden.

Elektrophysiologische Aufbauten

Alle Aufbauten sind darauf ausgelegt möglichst flexibel genutzt werden zu können. Dies beinhaltet die Nutzungsmöglichkeit von akuten Schnitten, Schnittkulturen und Zellkulturen. Auf technischer Seite versuchen wir weitest gehend offene Systeme zu nutzen, die schnell anderwärtig genutzt, ausgetauscht, auf- oder umgerüstet werden können.

Interface-Kammer-Aufbau

Messungen von Feldpotentialen in Interface-Kammern sind seit Jahrzehnten ein etablierter Bestandteil elektrophysiologischer Untersuchungen. Stärken der Interface-Kammer liegen vor allem in Oszillations-, Langzeitpotenzierungs- und –depressionsmessungen und der Untersuchung von so genannten „*sharp-wave ripples*“. Dabei werden Hirnschnitte in einer beheizbaren und Carbogen angereicherten Kammer mit künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) umspült und die Potentialänderungen großer Areale mit einer extrazellulären Elektrode vermessen.

Auch wenn es kommerziell erhältliche Interface-Kammern gibt, haben wir uns für eine selbstgebaute Lösung entschieden, da diese wesentlich günstiger sind und bessere Möglichkeiten zur Anpassung an neue Anforderungen bieten, gerade im Hinblick auf die Maximierung der experimentellen Datenausbeute und Verwendung möglichst aller Gehirnschnitte oder mehrerer unterschiedlicher Präparate aus einem Tier.

γ -Oszillationen

γ -Oszillationen beschreiben oszillatorische Aktivitäten von neuronalen Netzwerken von 30 Hz bis 100 Hz. γ -Oszillationen lassen sich in vielen Hirnregionen nachweisen, wie zum Beispiel im Hippocampus (Buzsaki et al., 1983), enthorinalen Cortex (Chrobak and Buzsaki, 1998), visuellen Cortex (Gray et al., 1989) oder sensomotorischen Cortex (Murthy and Fetz, 1992). γ -Aktivität wird unter anderem in Verbindung mit assoziativem Lernen, erhöhter Erregtheit und fokussierter Aufmerksamkeit gebracht (Bouyer et al., 1981; Steriade et al., 1996; Miltner et al., 1999; Steinmetz et al., 2000). Im Neocortex werden γ -Oszillationen vor allem in der Schicht II/III generiert (Roopun et al., 2006).

Es gibt drei Modelle zur kortikalen γ -Rhythmusgenerierung: Interneuron-Netzwerk Gamma (ING), Pyramiden-Interneuron-Netzwerk Gamma (PING) und persistentes Gamma (PG) (Whittington et al., 2011). ING-Modelle sind simple, auf Interneuronennetzwerke aufgebaute Modelle, deren lokale γ -Oszillation charakterisiert ist durch eine Folge von inhibitorischen postsynaptischen Ereignissen in inaktiv erscheinenden Prinzipalneuronen und schnell feuernenden Interneuronen (Whittington et al., 1995; Traub et al., 1996). PING-Modelle beruhen auf der reziproken Verschaltung von Inter- und Prinzipalneuronen zur γ -Oszillationsgenerierung (Traub et al., 1997). Hier ist der vorherrschende Mechanismus phasische Exzitation der Interneurone, nach orthodromer Aktionspotentialgenerierung in Prinzipalneuronen (Whittington et al., 2000). Im PING-Modell wird der γ -Rhythmus wahrscheinlich durch parvalbumin-positive Korbzellen synchronisiert (Whittington et al., 2000; Whittington et al., 2011). ING- und PING-basierende Oszillationen scheinen in kortikalen Netzwerken allerdings nur transient, während oder kurz nach Perioden hoher Aktivität von Prinzipalneuronen. PG-Modelle involvieren tonische Aktivierung von Kainat-Rezeptoren, muscarinergen Rezeptoren und metabotropen Glutamat-Rezeptoren und Oszillationen können stundenlang anhalten. Dabei scheinen Frequenzunterschiede der Oszillation nur geringen Einfluss auf die Power zu haben (Whittington et al., 2011).

Multielektrodenarray

Multielektrodenarrays (MEA) geben einem die Möglichkeit zur Beobachtung von Feldpotentialen im Präparat mit einer genaueren räumlichen Auflösung als in die Interfacekammer. Dies erlaubt einem

nicht nur Potentialänderungen zu messen, sondern auch nach Mustern in der zeitlichen Aktivierung der verschiedenen Ableitorte zu suchen und das Verhalten kleinerer Zellverbände oder kortikaler Kolumnen zu analysieren. Die bessere räumliche Auflösung erlaubt einem nicht nur die Untersuchung induzierter Aktivität, wie bei der Interface-Kammer, sondern auch spontaner Ereignisse, die in der Interface-Kammer aufgrund des großen Feldes und der damit verbundenen niedrigen Auflösung uninteressant sind.

Die Auswertung der MEA-Daten gestaltet sich durch die hohe Anzahl von Elektroden technisch schwieriger und komplexer als in Einzelelektrodenmessungen, bietet einem aber durch die hohe räumliche Auflösung mehr mögliche zu untersuchende Parameter als die Interface-Kammer. Auch Einzelereignisse und Spannungsspitzen kleiner Zellpopulationen lassen sich mit dieser Technik analysieren. Allerdings sind die Untersuchungsmethoden im Verhältnis zur Interface-Kammer oder Patch-Clamp bisher weniger ausgiebig beschrieben und es mangelt an kommerzieller Software zur Analyse.

Patch-Clamp-Aufbau

Die Patch-Clamp-Technik erlaubt es dem Experimentator die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner Zellen, deren Verbindungen untereinander und Ionenkanäle zu vermessen (Neher et al., 1978; Sakmann and Neher, 1984). Meist wird mit einem – zur Vermessung passiver und aktiver Eigenschaften einzelner Zellen oder Synapsen - oder zwei Mikromanipulatoren gearbeitet, falls auch noch Interesse an Zell-Zell-Kommunikation oder Konnektivität besteht. Ableitungen mit mehreren Elektroden sind schwieriger, da sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Verbindung zur einer der zu messenden Zellen abreißt, sei es durch Verfahrensfehler des Experimentators oder präparatinhärente Probleme. Trotz steigender Schwierigkeit nimmt die Ausbeute gemessener Verbindung mit mehr Mikromanipulatoren zu. Die Anzahl der möglichen Zellverbindungen **N** bei Mikromanipulatoranzahl **n** errechnet sich aus **N = n * (n - 1)**. Zum Beispiel kann man mit acht Mikromanipulatoren bis zu 56 Zellverbindungen auf einmal zu testen.

Auch beim Patch-Clamp ist es häufig der Fall, dass ein einzelner Experimentator an einem Messtag nie alle gewonnenen Hirnschnitte vermessen kann. Aufgrund des Aufbaus und der anspruchsvollen Technik, lässt sich dieses Problem nur lösen, indem man mehr Setups und Experimentatoren zur Hilfe nimmt. Dies ist durch die damit anfallenden Kosten unrealistisch. Es ist sinnvoller, die Präparatausnutzung zu optimieren. Hierfür wird ein Patch-Clamp-Aufbau mit mehreren Mikromanipulatoren ausgestattet. Damit kann man nicht nur mehrere Zellen gleichzeitig vermessen und so die Erfolgsrate innerhalb eines Präparats erhöhen, sondern auch die synaptischen

Verbindungen der Zellen testen. Multi-Elektroden-Patch-Clamp-Aufbauten mit bis zu zwölf Mikromanipulatoren werden schon angewandt (Perin and Markram, 2013), allerdings sind diese Anwendung noch sehr komplex, schwer handhabbar und bedürfen lange Trainingszeiten des Experimentators.

Welche Hirnregionen eignen sich besonders für Untersuchungen in akuten Hirnschnitten von transgenen und pharmakologischen Tiermodellen?

Natürlich besteht bei der Antwort auf diese Frage eine gewisse Abhängigkeit von dem verwendeten Modell und wieviel Vorwissen zu der zu untersuchenden Thematik existiert. Nichts desto trotz haben viele psychiatrische Erkrankungen und Dysfunktionen des Gehirns einen Effekt auf mehrere Hirnregionen. Dementsprechend gibt es Hirnregionen, die in verschiedensten Erkrankungen eine hervorgehobene Rolle spielen. Wir haben unseren Fokus daher auf zwei Regionen gelegt, die sich unserer Ansicht nach auch bei vielen unbekanntem Parametern besonders gut dazu eignen pharmakologischen Einfluss und genetische Veränderungen im Gehirn zu analysieren.

Der präfrontale Cortex und warum wir ihn als Modell nutzen

Der präfrontale Cortex (PFC) ist in eine Vielzahl höherer kognitiver Funktionen involviert, wie zum Beispiel Planung komplexen Verhaltens, Aufmerksamkeit, Entscheidungsfindung, Persönlichkeit, Arbeitsgedächtnis und sozialem Verhalten (Damasio et al., 1994; Arnsten and Li, 2005; Coutlee and Huettel, 2012; dos Santos Coura and Granon, 2012; Euston et al., 2012; Rossi et al., 2012; Funahashi, 2013; Jin and Maren, 2015). Es ist daher nicht verwunderlich, dass der PFC mit vielen neurologischen Krankheitsbildern assoziiert ist, wie zum Beispiel Schizophrenie (Sigurdsson and Duvarci, 2015), Depression (Swaab et al., 2000), Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom, Hyperaktivität, Angststörungen (Sonuga-Barke et al., 2015) oder späten Phasen von Parkinson (Poletti and Bonuccelli, 2012). Genau so wenig überraschend ist die Konnektion des PFCs mit zahlreichen Hirnregionen, unter anderem Verbindungen zu sensorischen Arealen, Striatum, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, motorischen und limbischen Arealen (Ongur and Price, 2000; Gabbott et al., 2005; Li et al., 2015).

Der dorsolaterale PFC der Primaten entspricht in der Ratte dem medialen PFC (mPFC) in seinen Funktionen (Uylings et al., 2003). Dem mPFC werden der prälimbische Cortex (PrL), der infralimbische Cortex und mediopräzentrale Cortexareale zugerechnet (Krettek and Price, 1977; Ray and Price, 1992). In der Ratte ist der mPFC agranulär und besitzt keine Schicht IV (Van Eden and Uylings, 1985).

In Primaten gibt es Hinweise, dass der präfrontale Cortex in Kolumnen organisiert ist (Mountcastle, 1997; Hirata and Sawaguchi, 2008).

Trotz der vielen Implikationen des PFCs in Krankheiten, Bewusstsein und Verhalten ist diese Hirnstruktur elektrophysiologisch betrachtet bisher nicht hinlänglich erforscht und seine Organisation und Zell-Zell-Verschaltung weitgehend unbekannt. Daher ist es nicht nur von Priorität seine Architektur zu beschreiben und verstehen, sondern auch Tiermodelle zu entwickeln, die es einem Erlauben pharmakologische Auswirkungen, auch auf kognitive Funktionen, zu Testen. Daher ist eins der Ziele dieser Arbeit ein γ -Oszillationsmodell zu entwickeln, das weiter von der Grenze zu schnellen β -Oszillationen entfernt ist, um höhere kognitive Funktionen zu repräsentieren.

Der Hippocampus und warum wir ihn als Modell nutzen

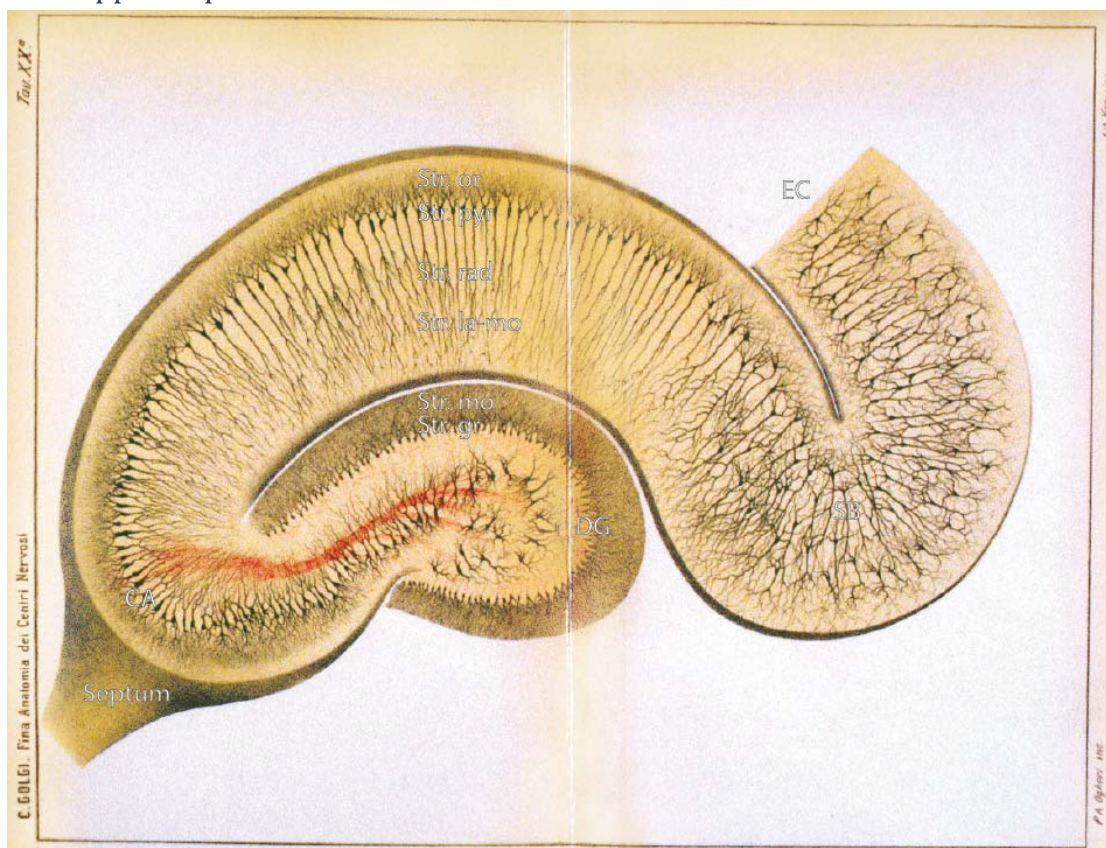


Abbildung 1 Darstellung des Hippocampus einer neu geborenen Katze verändert nach Golgi (Golgi et al., 2001): **CA** Cornu Ammonis **DG** Gyrus dentatus **EC** entorhinaler Cortex **SB** Subiculum **Str. or** Stratum oriens **Str. pyr** Stratum pyramidale **Str. rad** Stratum radiatum **Str. la-mo** Stratum lacunosum-moleculare **Str. mo** Stratum moleculare **Str. gr** Stratum granulosum

Der Hippocampus ist in der Elektrophysiologie ein häufig genutztes Modellsystem. Diese Substruktur des Temporallappens setzt sich aus dem *Gyrus dentatus*, *Cornu Ammonis* und dem *Subiculum* zusammen (Squire et al., 2004). Seine dreischichtige Zytoarchitektur unterscheidet sich von dem sechsschichtigen Aufbau des Iso- oder Neocortex und wird als Allocortex oder, wenn man sein phylogenetisches Alter betonen möchte, Archicortex bezeichnet. *Stratum oriens* beinhaltet

vorwiegend die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen, *Stratum pyramidale* die Somata und *Stratum radiatum* basale Dendriten und Axone (Spruston, 2008;Bartsch and Wulff, 2015).

Der *Gyrus dentatus* erhält seine Eingänge vor allem aus dem enthorinalen Cortex, aber auch aus dem Prä- und Parasubiculum und projiziert in die CA3-Unterregion der *Cornu Ammonis*, welche wiederum Verbindungen zu CA2 und CA1 aufweist (Witter et al., 2000;Witter and Moser, 2006;Witter et al., 2014). Von CA1 führen Projektionen zum Subiculum (Witter et al., 2014). Vom Hippocampus gehen auch direkte Verbindungen zum PFC und mehrere indirekt, unter anderem über das Subiculum und den enthorinalen Cortex. Die Aktivität beider Hirnregionen scheinen sich soweit zu beeinflussen und modulieren, dass vorgeschlagen wird, sie als Teil eines interagierenden Netzwerks, notwendig für gedächtnisabhängiges Verhalten, zu betrachten (Shin and Jadhav, 2016).

Der Hippocampus spielt, wie man unter anderem aus Läsionsstudien weiß, eine tragende Rolle für das Langzeitgedächtnis (Squire, 2004;Squire et al., 2007). Außerdem ist der Hippocampus im Zusammenspiel mit dem enthorinalen Cortex an räumlicher Orientierung beteiligt (O'Keefe and Dostrovsky, 1971;Witter and Moser, 2006;Witter et al., 2014).

In Krankheiten, wie zum Beispiel Alzheimer, Epilepsie, Parkinson, Schizophrenie und Multipler Sklerose kommt es zu Beeinträchtigungen des Hippocampus und seiner Funktion (Calabresi et al., 2013;Bartsch and Wulff, 2015;Hollands et al., 2016;Seinfeld et al., 2016).

Eine Publikationsdatenbanksuche mit den Stichworten Hippocampus und Elektrophysiologie ergibt mehr als 5000 Ergebnisse, was verdeutlicht, dass der Hippocampus für *in vivo*, *in vitro*, Patch-Clamp, LFP-Messungen und Lernmechanismen wie Langzeitpotenzierung und -depression über mehrere Spezies wie Ratte, Maus und Affe ein etabliertes und gut untersuchtes Modell ist. Seine Architektur, Zelltypen und Mechanismen sind weitestgehend gut beschrieben und bekannt. Dies, seine Involvierung in unterschiedliche Krankheiten und die Verbindungen zum PFC, machen den Hippocampus interessant für verschiedene elektrophysiologische Untersuchungen und als Vergleich zwischen Wildtyp und genmanipulierten Organismen

Analyse transgener Tiermodelle neuropsychiatrischer Erkrankungen

Transgene neuropsychiatrische Modelle werden zuerst in Verhaltensversuchen evaluiert, um Anhaltspunkte für mögliche Veränderungen im Gehirn zu erhalten. Mit den gewonnen Hinweisen werden hinterher histologische Untersuchungen der in nähere Auswahl gerückten Hirnregionen vorgenommen. Die daraus erlangten Erkenntnisse werden dann versucht mit elektrophysiologischen Daten zu untermauern.

Wir entschlossen uns das etablierte Konglomerat unserer elektrophysiologischen Messaufbauten an einer Neuregulin-3-Knock-Out-Maus zu testen, da für diese Tiere bereits verhaltensexperimentelle (Loos et al., 2014;Loos et al., 2016) und histologische Daten (noch nicht veröffentlicht) vorliegen.

Beispiel: Neuregulin 3 und ErbB4

Neureguline (NRG) sind Proteine für Zell-Zell-Kommunikation. Sie sind Liganden für Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie. NRG 1-3 werden unter anderem im Gehirn von Säugern exprimiert. Von NRG1 ist bekannt, dass es eine zentrale Rolle für die Gehirnentwicklung und Funktion einnimmt, z.B. bei der Proliferation von Schwanzzellen oder bei der Migration von kortikalen Interneuronen (Falls, 2003;Flames et al., 2004).

Die Funktion von NRG3 ist nicht endgültig geklärt. Allerdings weiß man, dass NRG3 ein Ligand für die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB4 ist (Zhang et al., 1997). Blockade des NRG3/ErbB4-Signalweges scheint Angstzustände bei Nikotinentzug in Mäusen zu unterdrücken (Turner et al., 2014). Im mPFC der Maus konnte gezeigt werden, dass NRG3 die Impulskontrolle beeinflusst. NRG3-Null- Mäuse scheinen keine veränderte Impulsivität zu haben, allerdings sind sie wesentlich aktiver als ihre Wildtypverwandten (Loos et al., 2014). Eine Überexpression von NRG3 lässt Mäuse in Verhaltenstest impulsiver handeln. NRG3 und Polymorphismen dieses Proteins werden daher in Verbindung mit Sucht, Angststörungen, Schizophrenie, Alzheimer, bipolarer Störung und Aufmerksamkeitsstörungen gebracht (Meier et al., 2013;Loos et al., 2014;Paterson and Law, 2014;Wang et al., 2014;Zeledon et al., 2015;Hayes et al., 2016;Loos et al., 2016). Außerdem wird NRG3 im Gegensatz zu anderen Neuregulinen nur im zentralen Nervensystem exprimiert (Zhang et al., 1997;Longart et al., 2004).

Glutamat-Decarboxylase67 ist in allen ErbB4-positiven Neuron vorhanden, womit alle ErbB4-positiven Neurone Interneurone sind; allerdings exprimiert nicht jedes Interneuron ErbB4. Im Cortex und Hippocampus findet die Expression von ErbB4 vor allem in PV- und SOM-positiven Zellen statt (Yau et al., 2003;Vullhorst et al., 2009;Fazzari et al., 2010;Neddens and Buonanno, 2010;Neddens et al., 2011;Bean et al., 2014). Im somatosensorischen Cortex sind ErbB4-Interneurone besonders in Schicht II/III gefolgt von Schicht I anzutreffen (Bean et al., 2014). Im PFC von Mäusen wird über ErbB4-Aktivierung mittels NRG1 die Synchronizität der KA induzierten γ -Oszillation erhöht (Hou et al., 2014). ErbB4-deletionsmutante Mäuse scheinen kein Defizit in GABAerger Synapsenentwicklung im PFC zu haben, allerdings ist die Pyramidenzellaktivität erhöht (Yang et al., 2013).

ErbB4 wird im Hippocampus der Maus in PV-positiven Interneuronen, aber nicht in Pyramidenzellen exprimiert (Vullhorst et al., 2009) und ErbB4-Aktivierung erhöht die GABAerge Transmission im Hippocampus (Chen et al., 2010). Im Ammons Horn, einer Substruktur des Hippocampus, findet man ErbB4-positiv Interneurone vor allem im *stratum pyramidale* (Bean et al., 2014).

Analyse modulatorischer Systeme in Hirnschnitten

Neuronale Aktivität, vor allem ausgelöst durch unseren wichtigsten Neurotransmitter Glutamat, kann durch viele andere Transmittersysteme moduliert werden. Diese modulatorischen Systeme zeichnen sich durch Transmitter aus, die von einer kleineren Gruppe Neurone ausgeschüttet werden und über die Cerebrospinalflüssigkeit die Aktivität in größeren Arealen beeinflussen. Bekannte Modulatoren sind z.B. Serotonin, Dopamin, Noradrenalin oder Acetylcholin. Modulatoren wie Serotonin wirken über metabotrope Rezeptoren und haben dadurch eine längerfristige Auswirkung auf die Aktivität der Neurone. Acetylcholin kann sowohl metabotrop über muscarinerge Rezeptoren, wie ionotrop über nikotinische Rezeptoren Einfluss nehmen. Für uns ist das cholinerge System, vor allem durch seine Rolle in γ -Oszillationen und die Expression von muscarinergen Rezeptoren im Neocortex und Hippocampus, von Interesse.

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR) ist ein pentamerer, ionotroper Kanal und gehört zur Cystein-Schleifen-Superfamilie, wie GABA_A- oder 5-HT₃-Rezeptoren (Changeux, 2012). Es sind 12 neuronale Untereinheiten für nAChRs beschrieben – $\alpha 2$ - $\alpha 10$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ (Gotti and Clementi, 2004). Dies erlaubt für eine hohe Anzahl verschiedenster Rezeptorkompositionen (Gotti et al., 2006). Sie können sowohl als Homo-, wie Heteropentamere vorkommen. Im zerebralen Cortex konnten bisher die Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ nachgewiesen werden. Die Heteromere im Neocortex bestehen aus mindestens zwei $\alpha 4$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten, wobei die fünfte Untereinheit $\alpha 4$, $\alpha 5$ oder $\beta 2$ sein kann (Albuquerque et al., 2009). In Mensch, Maus und rekombinant in *Xenopus*-Oozyten wurde auch eine $\alpha 7\beta 2$ -Variation nachgewiesen (Liu et al., 2009; Moretti et al., 2014). Homomere bilden im Neocortex nur die $\alpha 7$ -Untereinheit einen funktionalen Rezeptor. Alle nAChRs sind permeabel für Natrium, Kalium und Calcium, wobei der $\alpha 7$ -Rezeptor eine besonders hohe Permeabilität für Calcium aufweist (Fucile, 2004). Über den Calciumeinstrom durch nAChRs und den mit ihnen assoziierten spannungsabhängigen Calciumkanälen kann die Exozytose, Plastizität und Apoptose / Entwicklung beeinflusst werden (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004).

Im Hippocampus können außerdem noch $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs nachgewiesen werden (Lomazzo et al., 2010; dos Santos Coura and Granon, 2012).

Homomere $\alpha 7$ -Rezeptoren besitzen fünf ACh-Bindungsstellen, geformt zwischen jeder Untereinheit. Heteromere Rezeptoren, haben nur zwei ACh-Bindungsstellen, die nur zwischen α - und β -Untereinheiten gebildet werden können, wobei $\alpha 5$ und $\beta 3$ keine Bindungsstellen haben, sondern nur modulierende Eigenschaften besitzen (Gotti et al., 2006).

Lokalisation von nAChRs und neuronale Verschaltung im PFC

AChRs können in allen Schichten des Isocortexes gefunden werden (Schröder et al., 1989; Happe et al., 1994). $\alpha 7$ -Untereinheiten können auf glutamatergen Synapsen, sowie dem Soma nachgewiesen werden und vom PFC präparierte Synaptosome können mit $\alpha 7$ - und $\beta 2$ -Agonisten zur Aspartat-ausschüttung angeregt werden (Dickinson et al., 2008). In Korbzellen und Chandellierzellen im Neocortex konnten bisher keine $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren nachgewiesen werden (dos Santos Coura and Granon, 2012). Im Motorcortex der Ratte gezeigt werden, dass regulär und Irregulär feuernde Interneurone, die beide positiv für Cholecystokinin (CCK) und vasoaktive intestinale Polypeptide (VIP) sein können (Markram et al., 2004), nikotinische $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren exprimieren (Porter et al., 1999).

Ein Großteil der Schicht I Interneurone exprimieren funktionelle postsynaptische nAChRs und inhibieren Schicht II/III Interneurone. $\alpha 4$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ mRNA lässt sich in unterschiedlichen Interneuronen nachweisen (Christophe et al., 2002). Neurogliaforme Interneurone (NGFZ) exprimieren nAChRs, entgegen vorheriger gegenteiliger Darstellung (dos Santos Coura and Granon, 2012), allerdings wird der kurzzeitige aktivierende Effekt von muscarinergen M1-Rezeptoren, die einen langen inhibitorischen Effekt auf die Zelle ausüben, meistens überdeckt (Brombas et al., 2014). Schicht I NGFZ des Neocortex vermitteln über extrasynaptische GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren eine Inhibition der Schicht II/III Pyramidenzellen, durch GABA-Ausschüttung in den Extrazellulärraum (Olah et al., 2009; Wozny and Williams, 2011). Klassisch akkommodierende Zellen projizieren auf Schicht II/III Pyramidenzellen und schnell feuernde Interneurone (Wozny and Williams, 2011) – zu den auch die Korbzellen gehören - und können auch VIP-positiv sein (Markram et al., 2004). Im mPFC der Maus konnte gezeigt werden, dass Layer I Interneurone, die positiv für VIP sind, vor allem somatostatin-positive (SOM) und parvalbumin-positive (PV) Interneurone und vereinzelt auch Pyramidenzellen inhibiert (Pi et al., 2013). Die Aktivierung von VIP-positiven Interneuronen führt somit über die Inhibition von SOM/PV-Interneuron zur Disinhibition des Netzwerkes (Jackson et al., 2016).

Exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) von Schicht II/III Pyramidenzellen des PFC lassen sich mit nikotinischen Agonisten modulieren; wahrscheinlich findet diese Modulation präsynaptisch an den Dendriten statt (Vidal and Changeux, 1993). Neuere Experimente in der Maus widersprechen dieser Darstellung (Poorthuis et al., 2013). In der Maus konnte gezeigt werden, dass eine Minderheit der Schicht II/III Pyramidenzellen und die Meisten schnellfeuernden Interneurone $\alpha 7$ -Rezeptoren haben, aber generell keine $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren (Poorthuis et al., 2013). Des Weiteren besitzen nicht-schnellfeuernde SOM-Interneurone $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren (Poorthuis et al., 2013).

Schicht V Pyramidenzellen und schnellfeuernde Interneurone des PFC der Maus können funktionale $\alpha 7$ -nAChRs exprimieren (Poorthuis et al., 2013), was im gegensätzlich zu Couey *et alii* Experimenten steht (Couey et al., 2007). Thalamokortikale Verbindungen, die in der Ratte und Maus auf

Pyramidenzellen der Schicht V und teilweise auch höhere Schichten projizieren, lassen sich nikotinisch modulieren (Gil et al., 1997;Gioanni et al., 1999;Lambe et al., 2003).

Schicht VI Pyramidenzellen des Neocortex lassen sich cholinerg stimulieren und modulieren und spielen eine wichtige Rolle in cortico-corticoaler und cortico-thalamischer Signalverarbeitung. Es ist eine der wenigen Hirnregionen in der sich $\alpha 5$ -Untereinheiten nachweisen lassen (Wada et al., 1990;Proulx et al., 2014). Des Weiteren exprimieren Schicht VI Pyramidenzellen des PFC $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptoren (Poorthuis et al., 2013), wobei es entwicklungsabhängige Unterschiede der Stimulierbarkeit zwischen Männchen und Weibchen gibt (Alves et al., 2010).

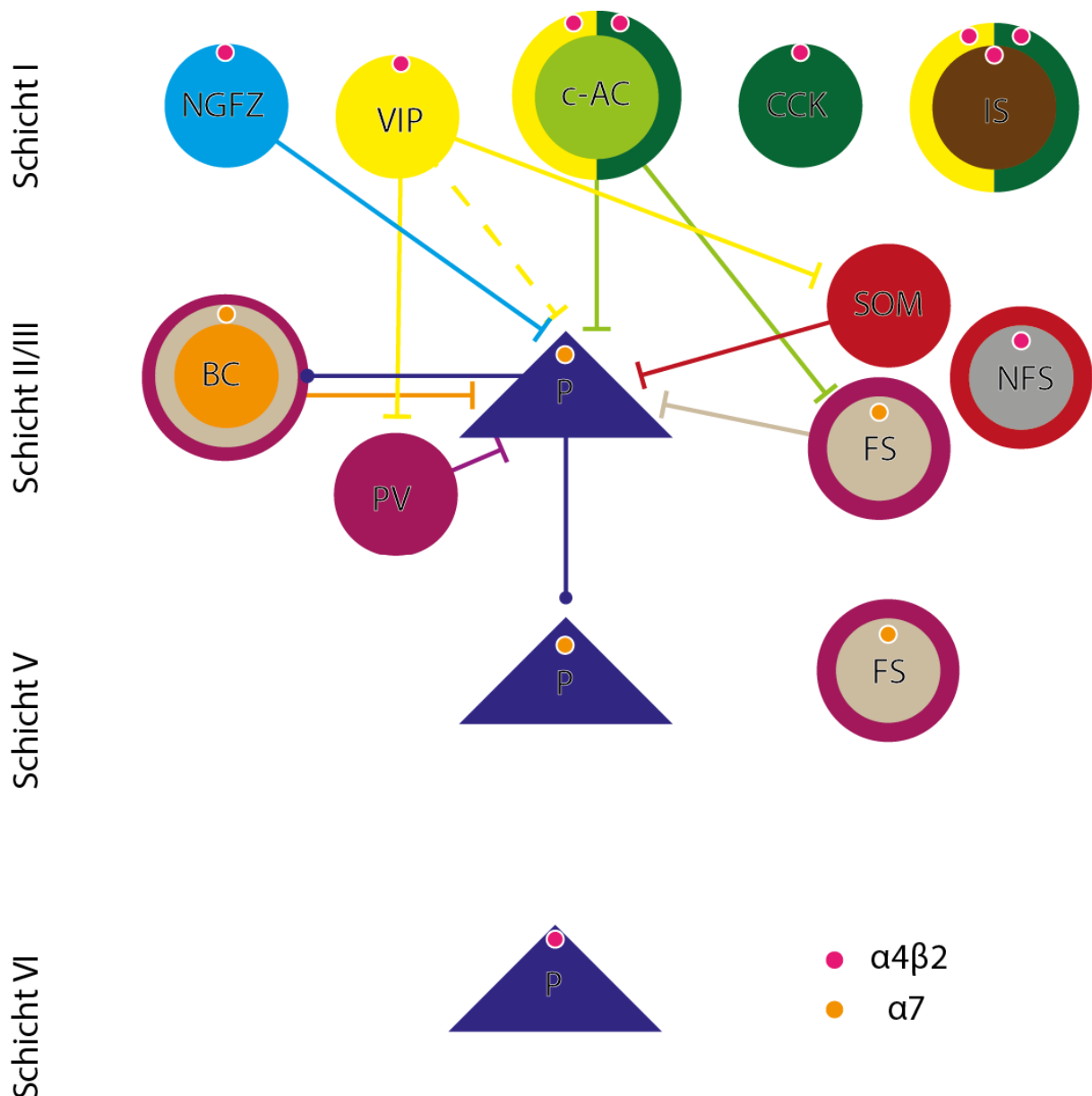


Abbildung 2 Darstellung der Verteilung von nAChRs und Zellkonnektivität, wie sie in der Literatur dargestellt wird. Leider beziehen sich verschiedene Veröffentlichungen in unterschiedlicher Weise auf morphologische, histologische und elektrophysiologische Zelleigenschaften. Zelltypen, die sich durch mehrere dieser Eigenschaften auszeichnen, sind mehrfarbig markiert. Es wird in dieser Darstellung kein Wert auf synaptische Stärke oder Lokalisation der Synapse gelegt.

*Ein Review, dass viele der multiplen Aspekte und Marker für interneuron darstellt ist Markram 2004. Für eine vereinfachte Darstellung siehe Abbildung 31 **NGFZ** neurogliaforme Zelle **VIP** vasointestinales Peptid positives Interneuron **c-AC** klassische akkomodierende Zelle **CCK** Cholecystokinine positive Zelle **IS** irreguläre feuernde Zelle **BC** Korbzelle **P** Pyramidenzelle **SOM** Somatostatin positive Zelle **PV** Parvalbumin positive Zelle **FS** schnell feuerndes Interneuron **NFS** nicht schnellfeuerndes Interneuron*

Zielsetzung

Untersuchungen von Mutanten und gentechnisch manipulierten Organismen sind langwierig, vor allem durch den Mangel an Vorwissen, zu welchen Veränderungen die Mutation, Insertion oder Deletion im Organismus führt.

Um die elektrophysiologische Beschreibung für veränderte Organismen oder unbeschriebene Hirnareale zu beschleunigen, ist es von Nutzen, nicht nur ein Konglomerat von Unterschiedlichen Messaufbauten und Methoden zur Verfügung zu haben, sondern diese auf hohen Datendurchsatz und maximale Nutzung des unter Umständen beschränkten Ausgangsmaterials zu optimieren, sowie die Experimentanzahl ohne zusätzlichen Versuchstierverbrauch hochzutreiben, um die statistische Aussagekraft zu verbessern.

Bei den Messaufbauten handelt es sich um Methoden für Messungen von Feldpotentialen in Interfacekammern, Multielektrodenarrays (MEA), um das Verhalten der Zellen in größeren Verbänden zu evaluieren und Patch-Clamp zur Analyse von einzelnen Neuronen sowie ihrer Konnektivität.

Der Plan dieser Arbeit ist es drei elektrophysiologische Messaufbauten für diesen Zweck einzurichten, zu verfeinern und an einem genetisch veränderten Versuchstier die Sinnhaftigkeit dieses Procederes zu verdeutlichen.

Material & Methoden

Chemikalienliste

Substanz	Summenformel	Lieferant
Acetylcholinchlorid	$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3\text{Cl}^-$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Biocytin	$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	AAT Bioquest (Sunnyvale, CA, USA)
Calciumchloriddihydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Calciumchloridlösung 1M	CaCl_2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Carbamoylcholinchlorid	$\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Cl})(\text{CH}_3)_3$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Carbogen	5% CO_2 95% O_2	Linde (München, GER)
D-Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
D-Glucosemonohydrat	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Dihydro- β -Erythroidinhydrobromid	$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_3 \cdot \text{HBr}$	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Dopaminhydrochlorid	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
EGTA	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
HEPES	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hexamethoniumbromid	$\text{C}_{12}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{N}_2$	Abcam plc. (Cambridge, UK)
Isofluran	$\text{C}_3\text{H}_2\text{ClF}_5\text{O}$	Abbvie (North Chicago, IL, USA)
Kainsäure	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$	Abcam plc. (Cambridge, UK)
Kalilauge (1N)	KOH	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Kaliumgluconat	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{KO}_7$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
L-Ascorbinsäure	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Magnesiumchloridlösung 1m	MgCl_2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Magnesiumsulfathydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Methyllycaconitincitrat	$\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{10} \cdot \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Abcam plc. (Cambridge, UK)
N-Methyl-D-Aspartat	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Na_2 -Adenosintriphosphat	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Na_2 -Guanosintrophosphat	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3 \cdot x\text{Na}^+ y\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Na_2 -Phosphokreatin	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5\text{PNa}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Natriumhydrogenkarbonat	NaHCO_3	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natronlauge (1N)	NaOH	Merck KGaA (Darmstadt, GER)

Oxybutyninhydrochlorid	$C_{22}H_{31}NO_3 \cdot HCl$	Abcam plc. (Cambridge, UK)
Physostigminhemisulfat	$C_{15}H_{21}N_3O_2 \cdot 0.5H_2SO_4$	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tetramethylpiperidinheptanoate-Hydrochlorid	$C_{16}H_{31}NO_2 \cdot HCl$	Tocris Bioscience (Bristol, UK)

Lösungen

Präparier- und Lagerungslösungen

Lösungen werden spätestens alle zwei Wochen frisch angesetzt. $CaCl_2$ und $MgCl_2$ werden in Form 1M-Lösungen (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) verwendet. Fertige Lösungen werden auf Osmolarität geprüft und bei Abweichung größer als 6 mOsmol verworfen.

Sucroselösung (Ratte) [330 mOsmol]

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	80
$NaHCO_3$	25
NaH_2PO_4	1,25
KCl	2,5
Glucose	25
Sucrose	85
$CaCl_2$	0,5
$MgCl_2$	3

Sucroselösung (Maus) [310 mOsmol]

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	87
$NaHCO_3$	25
NaH_2PO_4	1,25
KCl	2,5
Glucose	10
Sucrose	75
$CaCl_2$	0,5
$MgCl_2$	3

Ratten- und Maus-ACSF für Oszillationsmessungen am Interface-Aufbau

Stammlösungen wurden spätestens alle zwei Wochen frisch angesetzt. Zur Verwendung im Versuch werden zu acht Teilen entionisierten Wassers jeweils ein Teil beider Stammlösungen gegeben. Gebrauchsfertige Lösungen weisen 300 mOsmol auf und werden bei Abweichung größer als 6 mOsmol verworfen.

ACSF Stammlösung I Cortex 10x

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	1250
D-Glucose	100
NaH ₂ PO ₄	12,5
MgSO ₄	10
CaCl ₂	12
KCl	45

ACSF Stammlösung II Cortex 10x

Substanz	Konz. [mM]
NaHCO ₃	250

ACSF Stammlösung I Hippocampus 10x

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	1290
D-Glucose	100
NaH ₂ PO ₄	12,5
MgSO ₄	18
CaCl ₂	16
KCl	30

ACSF Stammlösung II Hippocampus 10x

Substanz	Konz. [mM]
NaHCO ₃	210

Maus-ACSF für MEA-Messungen

Lösungen werden spätestens alle zwei Wochen frisch angesetzt. CaCl_2 und MgCl_2 werden in Form 1M-Stocklösungen (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) verwendet. Die gebrauchsfertige Lösung weist 300 mOsmol auf und wird bei Abweichung größer als 6 mOsmol verworfen.

Maus-ACSF

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	125
NaHCO_3	25
NaH_2PO_4	1,25
KCl	2,5
Glucose	10
CaCl_2	2
MgCl_2	1

Maus-ACSF hoch Kalium

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	125
NaHCO_3	25
NaH_2PO_4	1,25
KCl	4
Glucose	10
CaCl_2	2
MgCl_2	1

Ratten-ACSF für Patch-Clamp-Messungen

Lösungen werden spätestens alle zwei Wochen frisch angesetzt. CaCl_2 und MgCl_2 werden in Form 1M-Stocklösungen (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) verwendet. Gebrauchsfertige Lösung weist 320 mOsmol auf und wird bei Abweichung größer als 6 mOsmol verworfen.

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	125
NaHCO_3	25
NaH_2PO_4	1,25
KCl	2,5
Glucose	25
CaCl_2	2
MgCl_2	1

Ratten-Intrazellulärlösung für Patch-Clamp-Messungen

MgCl₂ wird in Form 1M-Stocklösungen (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) verwendet. Gebrauchsfertige Lösung weist 290-300 mOsmol auf. pH wird mit KOH auf 7,2 eingestellt. Biocytin ist optional für morphologische Analysen.

Substanz	Konz. [mM]
Kaliumgluconat	130
KCl	6
MgCl ₂	2
EGTA	0,2
Na ₂ -Phosphokreatin	5
Na ₂ ATP	2
Na ₂ GTP	0,5
HEPES	10
Biocytin	0,1%

Maus-Intrazellulärlösung für Patch-Clamp-Messungen

MgCl₂ wird in Form 1M-Stocklösungen (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) verwendet. Gebrauchsfertige Lösung weist 270-280 mOsmol auf. pH wird mit KOH auf 7,2 eingestellt.

Substanz	Konz. [mM]
Kaliumgluconat	135
KCl	20
MgCl ₂	2
EGTA	0,2
Na ₂ -Phosphokreatin	5
Na ₂ ATP	2
Na ₂ GTP	0,5
HEPES	10

Maus-Intrapipettenlösung für zellengeheftete Patch-Clamp-Messungen

MgCl₂ wird in Form 1M-Stocklösungen (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) verwendet. Gebrauchsfertige Lösung weist 270-280 mOsmol auf. pH wird mit NaOH auf 7,3 eingestellt.

Substanz	Konz. [mM]
NaCl	141
KCl	2,5
NaH ₂ PO ₄	1,25
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1

Geräte und Aufbauten

Feldpotential- und Oszillations-Aufbau

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Schwebekörper-Durchflussmesser	Purgemaster A6141	ABB (Zürich, CHE)
AD/DA-Wandler	1401 Micro 3	CED (Cambridge, GB)
AD/DA-Wandlererweiterung	ADC 12	CED (Cambridge, GB)
Pumpe (4 Kanäle, peristaltisch)	Minipulse 3	Gilson (Middleton, WI, USA)
Mikromanipulator	MM33	Märzhäuser (Wetzlar, GER)
Schwingungsgedämpfter Tisch (passiv)	BT-1620	Newport (Irvine, CA, USA)
Verstärker (Master)	EXB-EXT-02B	NPI Electronic (Tamm, GER)
Verstärker (Slave)	EXB-EXT-02BS	NPI Electronic (Tamm, GER)
Vorverstärker	EXB-HS	NPI Electronic (Tamm, GER)
Elektrodenwiderstandstester	EXB-REL-08B	NPI Electronic (Tamm, GER)
Elektrodenhalter	EXB-EH	NPI Electronic (Tamm, GER)
Beleuchtung	EasyLED RL	Schott (Mainz, GER)
Stereomikroskop	Stemi 2000	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Okular	PL 10x/23 Br. foc.	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Stativ/Armverlängerung	Traverse U 35/320 mm (D)	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Stativ/Federarm	Stativ U mit Federgelenkarm	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Interface-Kammer	Haas-Typus	Eigenbau

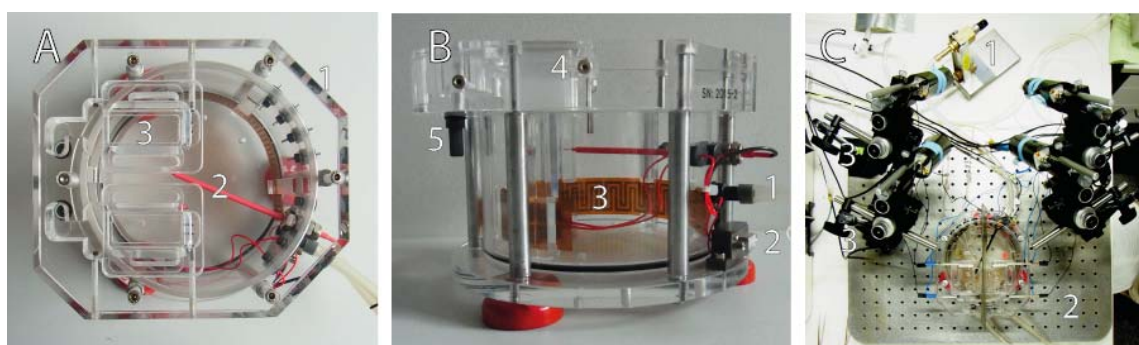


Abbildung 3 Ansichten der Interface-Kammer **A** von oben: 1. Schlauchanschlüsse des Zuflusses der ACSF und zur Lagerungskammer (3) 2. Temperaturmessfühler 3. Lagerungskammer **B** Seitenansicht der Interface-Kammer: 1. Anschluss der Carbogenzuleitung 2. Anschluss der Temperaturkontrolle 3. Heizfolie 4. Erdungsanschluss 5. ACSF-Abfluss **C** Anordnung auf einem schwingungsgedämpften Tisch: 1. Purgemaster A6141 2. BT-1620 3. MM33

Die Interfacekammer des Haas-Typus (Haas et al., 1979) ist in der Elektrophysiologie für die Messung von Feldpotentialen seit Jahrzehnten etabliert und weit verbreitet. Wir entschieden uns ein

selbstgebautes Model (siehe Abbildung 3) zu nutzen, da es sich für zukünftige anders ausgelegte Experiment leicht und schnell modifizieren lässt. Falls man z.B. die Lagerungskammer umgestalten möchte (siehe Abbildung 3A 3) muss man lediglich einen neuen Deckel für die Interface-Kammer fräsen.

Ziel ist es aus den hier aufgelisteten Bestandteilen einen flexiblen Messplatz für Feldpotentialmessungen zu errichten, der es einem erlaubt möglichst viel Hirnschnitte gleichzeitig zu vermessen und dabei von nur einem wissenschaftlichem Mitarbeiter bedient werden muss.

MEA-Aufbau

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Schwingungsgedämpfter Tisch (aktiv)	Halcionics_i4	Accurion (Göttingen, GER)
Pumpe (2 Kanäle, peristaltisch)	Minipulse 3	Gilson (Middleton, WI, USA)
C-Mount	LM-Scope C-Mount	Micro-Tech-Lab (Graz, AUT)
Kameraadapter	LM-Scope TUST30C	Micro-Tech-Lab (Graz, AUT)
Multielektroden Array	USB-MEA32-STIM4	Multi Channel Systems (Reutlingen, GER)
pMEA32S12 Layout 4		Multi Channel Systems (Reutlingen, GER)
Temperaturkontrolle	TC02	Multi Channel Systems (Reutlingen, GER)
Vakuumpumpe	CVP	Multi Channel Systems (Reutlingen, GER)
Beleuchtung	EasyLED Backlights	Schott (Mainz, GER)
Analoge Digitalkamera	Alpha 37	Sony (Minato, JPN)
Stereomikroskop	Stemi 2000C	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Okular	PL 10x/23 Br. foc.	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)
Stativ/Federarm	Stativ U mit Federgelenkarm	Carl Zeiss (Oberkochen, GER)

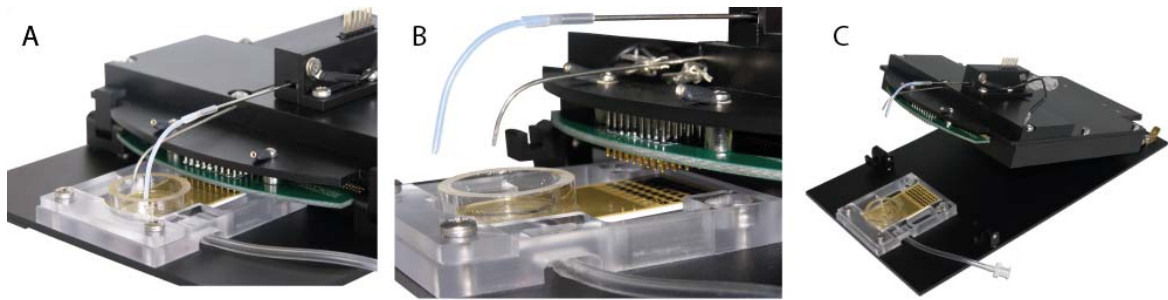


Abbildung 4 USB-MEA32-STIM4 **A** Frontalansicht **B** Seitenansicht **C** Komplettansicht mit geöffnetem Deckel. Bilder mit freundlicher Genehmigung von Multi Channel Systems

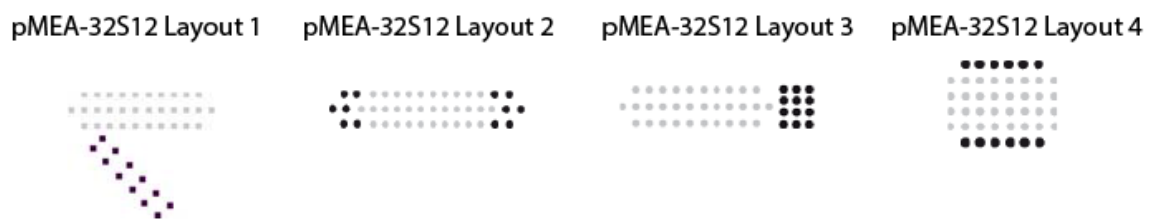


Abbildung 5 Abbildung der verschiedenen kommerziellen MEA-Layouts für das USB-MEA32-STIM4-System von Multi Channel Systems. Grau dargestellt sind die 32 Ableitelektroden, schwarz die 12 Stimulationselektroden

Ziel ist es ein MEA-System zu etablieren, um Feldpotentialdynamiken innerhalb eines Schnittes zu analysieren.

Patch-Clamp-Aufbau

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Pumpe (2 Kanäle, peristaltisch)	Minipulse 3	Gilson (Middleton, WI, USA)
Manometer	MP 105 & MP 115	Kimo Instruments (Montpon-Ménésterol, FRA)
Verstärker	Multiclamp 700B	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
A/D-Wandler	DigiData 1550	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
Temperaturkontrolle	TC02	Multi Channel Systems (Reutlingen, GER)
Mikroinjektionssystem	Picospritzer III	Parker Hannifin (Hollis, NH, USA)
Kamera	XM10	Olympus (Shinjuku, JPN)

Kameraadapter (C-Mount)	U-CAMD3	Olympus (Shinjuku, JPN)
Fototubus (C-Mount)	U-TV1X-2	Olympus (Shinjuku, JPN)
Analyser Durchlicht 900nm	WI-ANIR	Olympus (Shinjuku, JPN)
Objektiv 40x	LUMPlanFLN 40	Olympus (Shinjuku, JPN)
Objektiv 5x	MPlan N 5	Olympus (Shinjuku, JPN)
Fluoreszenzfilterwürfel	WIB	Olympus (Shinjuku, JPN)
8 Positionen Universalkondensator	U-UCD8	Olympus (Shinjuku, JPN)
viertel Welle Schattierungsfilter	WI-TP137	Olympus (Shinjuku, JPN)
Differentialinterferenzkontrast	DIC40	Olympus (Shinjuku, JPN)
Differentialinterferenzkontrast	DIC60	Olympus (Shinjuku, JPN)
Differentialinterferenzkontrastprisma	WI-DICT2	Olympus (Shinjuku, JPN)
Trinocolartubus für Infrarot	U-TR30IR	Olympus (Shinjuku, JPN)
Lambda-1/4-plättchen	WI-TP137	Olympus (Shinjuku, JPN)
Polarisationsfilter	32POIR	Olympus (Shinjuku, JPN)
Micromanipulator	PatchStar	Scientifica (Uckfield, GB)
Mikroskop (aufrecht)	SliceScope	Scientifica (Uckfield, GB)
XY-Tisch	Universal Motorized Stage (UMS)	Scientifica (Uckfield, GB)
Schwingungsgedämpfter Tisch (aktiv)	TS-140	Table Stable (Mettmenstetten, CHR)
LED-Lichtquelle (Infrarot)	M780L2-C1	ThorLabs (Newton, NJ, USA)
LED-Lichtquelle (Blau)	M490L2	ThorLabs (Newton, NJ, USA)

Ziel ist es ein Multi-Patch-Clamp-Aufbau zu erstellen, der einem eine gute Balance zwischen höher Ergebnisausbeute und Bedienbarkeit für einen einzelnen Experimentator bietet.

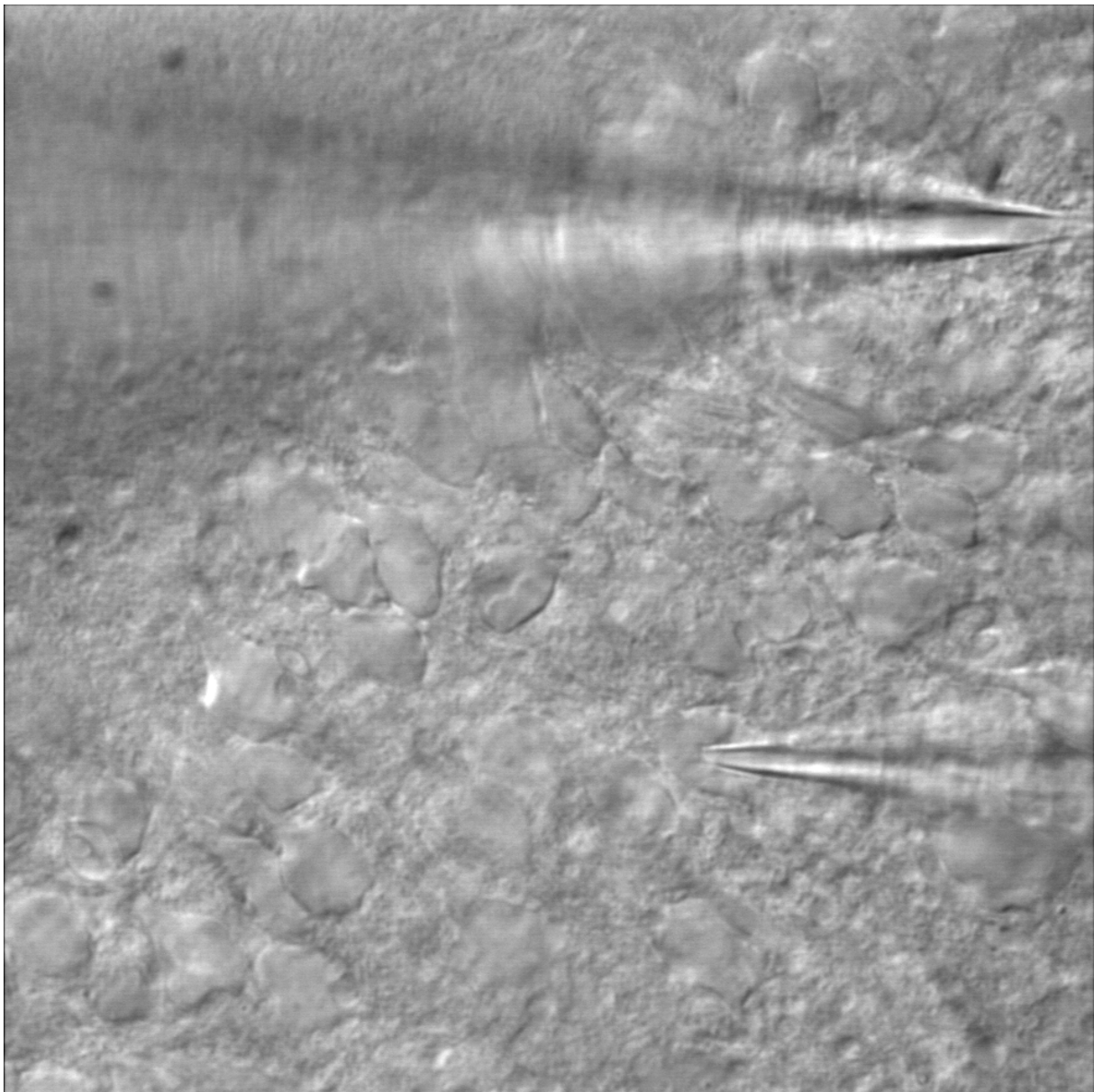


Abbildung 6 Beispielhafte Darstellung der Patch-Clamp-Technik mit zwei Pipetten. Bei der unteren Pipette ist der Kontakt zur Zelle deutlich zu erkennen.

Allgemeine Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Guillotine	-	Bachofer (Reutlingen, GER)
Vibratom	D.S.K. Microslicer DTK-1000	Dosaka (Kyoto, JPN)
Vibratom	VT-1200	Leica (Wetzlar, GER)
Reinstwasseranlage	Milli-Q Synthesis	Merck (Darmstadt, GER)
Mikropipetten Puller	P-87 Flaming/Brown	Sutter Instruments (Novato, CA, USA)

Gehirnschnittpräparation

Tierschutz

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und der Direktive 86/609/EEC des Europäischen Rates durchgeführt.

Verwendete Tiere

Für alle Versuche wurden Wurfgeschwister verwendet. Tiere die Anzeichen von Unter- oder Fehlentwicklung aufwiesen wurden von Versuchen ausgeschlossen.

Für Feldpotentialmessungen in der Ratte wurden Tiere mit einem Alter von 60-131 Tagen verwendet.

Für Feldpotentialmessungen in der Maus wurden männliche Tiere mit einem Alter von 26-47 Tagen verwendet.

Für Patch-Clamp-Messungen in der Maus wurden Tiere mit einem Alter von 16-37 Tagen verwendet.

Organentnahme

Der Nager wird mittels Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Der Kopf wird in einer eiskalten Sucrose-Lösung, die zuvor mit Carbogen (Linde; München, GER) begast wurde, freipräpariert. Zur Öffnung des Schädels wird bei älteren Tieren zuerst Entlastungsschnitte vom *Foramen magnum* lateral gemacht, ansonsten wird direkt entlang der *Sutura sagittalis* bis über das *Bregma* hinaus mit einer Schere der Schädel geöffnet und die Knochen nach außen weggeklappt. Mit einem dünnen und leicht gebogenen Spatel werden die Verbindungen zu *Bulbus olfactorius* und Cerebellum abgetrennt und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wird nach seiner Entnahme bis zur Schnittpräparation wieder in mit Carbogen begaster Sucrose-Lösung aufbewahrt.

Hippocampale Schnitte

Für hippocampale Schnitte wird vorgegangen, wie durch Bischofberger beschrieben (Bischofberger et al., 2006). Für Messungen in der Interface-Kammer wird hingegen des Protokolls eine Schnittdicke von 400 µm gewählt.

Prälimbischer Cortex-Schnitte

Für prälimbische Cortex-Schnitte wird das ganze Gehirn mit einem großen Skalpell coronal auf halber Strecke zwischen dem Beginn des *Corpus callosum* und Anfang des Hippocampus in Zwei geteilt, der anteriore Part mit Sekundenkleber in der Schneidekammer auf seine Schnittfläche aufgeklebt und die Schneidekammer sofort mit eiskalter Sucrose aufgefüllt. Für Messungen in der Interface-Kammer wird eine Schnittdicke von 400 μm gewählt; bei Patch-clamp-Versuchen sind es 300 μm .

Es ist möglich aus einem Nagerhirn hippocampale und prälimbische Cortex-Schnitte gleichzeitig anzufertigen, was im Fall der Mauspräparate auch getan wurde.

Messung am Interface-Aufbau

Vor und nach der Messung werden alle Messkammern und Schläuche mit mindestens 0,5 L VE-Wasser gespült, um mögliche Verunreinigungen zu beseitigen. Vor Beginn der Hirnpräparation wird die Messkammer mit zurechtgeschnittenem Linsenreinigungspapier doppelagig ausgelegt; kleinere übriggebliebene Schnipsel werden verwendet, um die Ag/AgCl-Erdungselektroden innerhalb der Messkammer abzudecken und somit befeuchtet zu halten. An die Stelle, auf der später die Hirnschnitte platziert werden, wird ein weiteres quadratisches Stück Linsenreinigungspapier gelegt, um, falls nötig, ein späteres replatzieren der Schnitte zu ermöglichen. Eine aus einer Strumpfhose zurechtgeschnittene dünne Schnur wird am Rand jeder Messkammer verlegt, um die Oberflächenspannung der umspülenden Lösung zu brechen und einen stetigen Abfluss zu garantieren. Die Temperaturregelung wird so eingestellt, dass die Lösung, beim umspülen der Schnitte, in der Mitte der Messkammer 34°C beträgt. Alle Hirnschnitte werden eine Stunde ruhen gelassen, bevor die Messelektroden platziert werden.

Die Pumpgeschwindigkeit für ACSF- und Drogenlösungen wird auf 1,7 mL/min und die Begasungsmenge für Carbogen auf 1,3 L/min justiert.

Die elektrophysiologischen Daten werden über den Verstärker (NPI Electronic; Tamm, GER) mit 0,1 Hz hochpassgefiltert, 1000 Hz tiefpassgefiltert, 1000-fach verstärkt und über Spike2 Version 7.10 (CED; Cambridge, GB) mit 5000 Hz abgetastet und aufgezeichnet. Somit werden die Anforderungen des Nyquist-Shannon-Abtasttheorems erfüllt.

Wenn nicht anders beschrieben, werden für alle Experimente nur männliche Tiere verwendet.

NRG3 delNEO KO-Mäuse

NRG3-Mutanten wurden freundlicher Weise von Frau Prof. Carmen Birchmeier zur Verfügung gestellt. Die Generierung der Mauslinie wurde von Loos *et alii* beschrieben (Loos et al., 2014).

Auswertung und Statistik

Oszillationen am Interface-Aufbau

Für die Analyse der Oszillationen werden die elektroфизиologischen Daten mit einer schnell Fourier-Transformation (FFT) in MatLab R2013a (MathWorks; Natick, MA, USA) in seine Frequenzanteile zerlegt. Als Zeitfenster werden 10 s und das Hamming-Fenster mit der Anzahl von 8192 FFTs gewählt. Da man in allen Aufnahmen das Signal der 50 Hz-Stromnetzfrequenz nicht eliminieren konnte, wird der Bereich von 48-52 Hz von der Analyse ausgeschlossen.

Zum Vergleichen von Unterschieden in Frequenz oder Power zweier Stichproben wird der Median von 100 konsekutiven Werten (das entspricht bei 10 s-Fenstern einer gesamt Zeit 1000 s) gebildet. Bei nicht zusammenhängenden Stichproben wird die Signifikanz mittels des Wilcoxon-Rangsummentest in MatLab R2013a (MathWorks; Natick, MA, USA) geprüft; bei zusammenhängenden Stichproben wird der Wilcoxon-Vorzeichentest verwendet.

Um die Auswirkung von Drogen auf eine bestehende Oszillation zu testen, wird die Stabilität der Oszillation geprüft. Dazu nimmt man die Frequenzdaten, die man aus der FFT erhält. Es werden die Werte 20 min (120 Werte von a 10 s-Fenstern) vor Einwasch des zu testenden Pharmazeutikums als Basis herangezogen und aus jeweils 12 (entspricht einer Aufnahme Dauer von 120 s und ergibt bei 20 min 10 Medianwerte) konsekutiven Werten der Median gebildet. Jeder einzelne, so erhaltene Wert wird durch den Vorherigen dividiert und somit normalisiert (vgl. Abbildung 18). Aus diesen zehn normalisierten Werten wird wiederum der Median gebildet. Sollte dieser übergreifende Median außerhalb der Grenzen von 0,85 bis 1,15 liegen, wird die Oszillation als nicht stabil angenommen und nicht in die weitere Auswertung einfließen (siehe Abbildung 7).

Aufgrund der großen Schwankungen der Power-Werte müssen bei Experimenten mit geringer Stichprobengröße ($n < 20$) die Power-Daten normalisiert werden, um sie gegeneinander vergleichen zu können. Dazu wird als Basisgröße der Median der 100 Werte genommen, die man aus den 1000 s vor Einwasch der zu testenden Substanz erhält und alle Messwerte zu diesem Median in Verhältnis gesetzt.

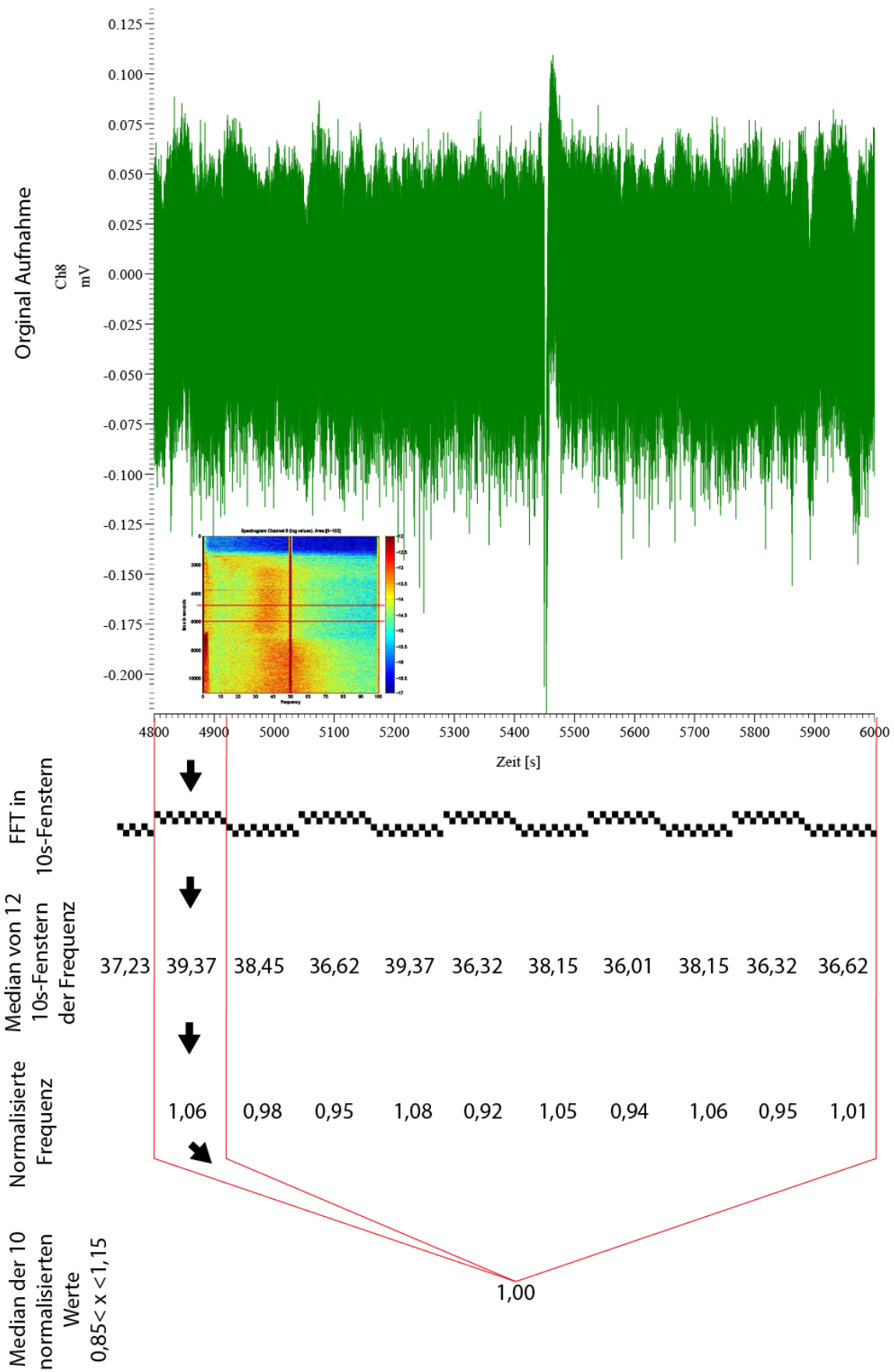


Abbildung 7 Beispiel für Stabilitätskriterium anhand einer Messung im PrL der Ratte. Die roten horizontalen Linien im Powerspektrum zeigen den Bereich der für das Stabilitätskriterium herangezogenen Frequenzen. Einwasch von KA und ACH bei 360 s und zusätzlich ACH und PHYS ab 6000 s

MEA

Die Daten wurden mit 20 kHz gesampelt und jede getestete Kondition für mindestens 1 h mit MC Rack (Multichannel Systems, Reutlingen, GER) aufgenommen.

Für die Analyse von Dynamiken und repetitiven Sequenzen von lokalen Feldpotentialen (LFP) werden die Daten Butterworth-Filter zweiter Ordnung mit 2 Hz Hochpass und 80 Hz Tiefpass gefiltert und die Daten anschließend auf 1 kHz runter gesampelt.

Um LFPs zu detektieren, wird zuerst der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Elektrode über die Gesamte Aufnahmelänge bestimmt. Anschließend werden die Zeitpunkte ermittelt, bei denen die negative Potentialänderung mindestens das Vierfache der Standardabweichung erreicht und die maximale Potentialänderung und ihr Zeitpunkt werden gespeichert. Die Zeitpunkte, Potentialänderung und Elektrodennummer aller Elektroden einer Aufnahme werden in eine Tabelle überführt und nach der Zeit sortiert. Zur Erkennung der räumlich-zeitlichen Muster wird ermittelt, ob innerhalb von 2 ms nach einem LFP noch ein weiteres auftritt. Im Falle eines Auftretens wird wieder in einem Fenster von 2 ms nach dem neuen Ereignis nach einem weiteren gesucht, bis man kein weiteres LFP innerhalb des neu gesteckten Zeitrahmens findet. Die Länge und andere Eigenschaften (z.B. Amplitude der Events, Elektrodenreihenfolge etc.) der so ermittelten Ereignis-Kette werden notiert und die Motive nach Ihrer Kettenlänge sortiert. Muster gleicher Länge werden gegeneinander korreliert (vgl. Abbildung 8 A für Muster der Länge 4). Zur anschaulicheren Darstellung kann man ein Dendrogramm, das, wie ein Stammbaum, die Muster nach ihrer Ähnlichkeit sortiert, nutzen. Zur Analyse wird MatLab R2013a (MathWorks; Natick, MA, USA) verwendet. Die Analyse orientiert sich an den Arbeiten von Beggs und Plenz (Beggs and Plenz, 2003;2004).

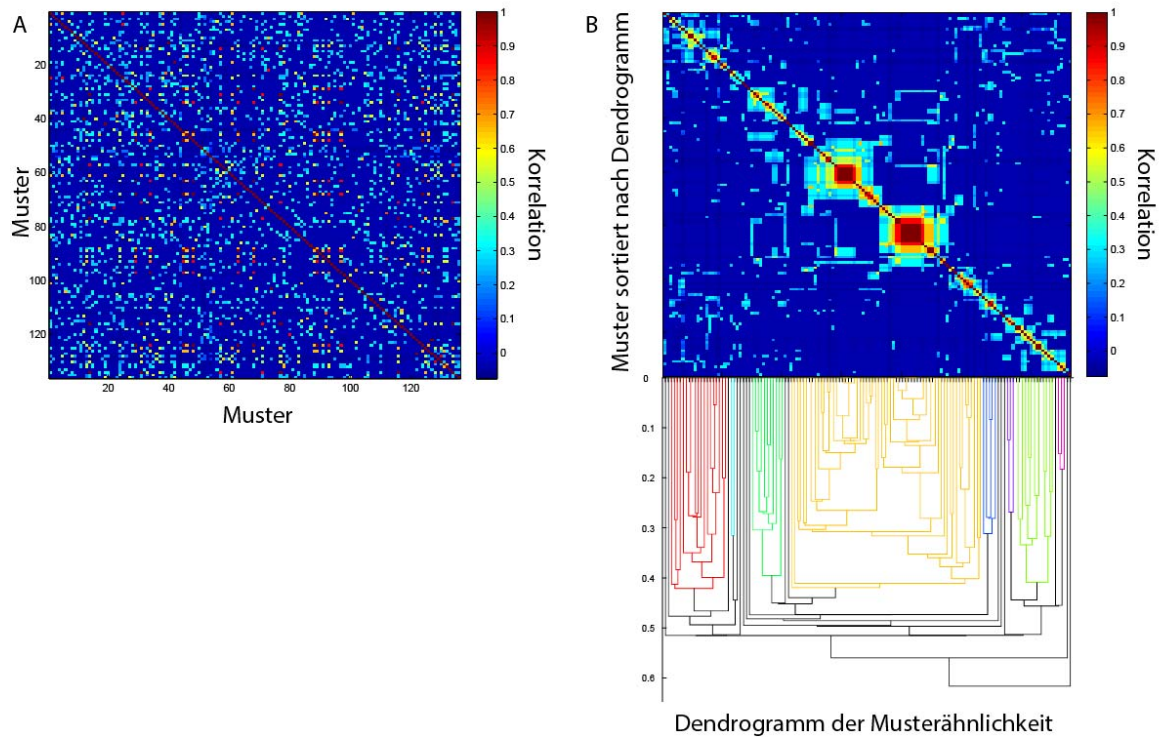


Abbildung 8 Beispielhafte Darstellung der Musteranalyse der Länge 4 **A** Korrelation zwischen den detektierten Mustern **B** Selbe Muster wie in A, allerdings mithilfe eines Dendrogramms der Musterähnlichkeit sortiert

Ergebnisse

Aufbauten

Hexadeca-Oszillations-Aufbau

Uns ist aufgefallen, dass bei der Nutzung einer Interface-Kammer durch einen Experimentator bei der klassischen Hippocampuspräparation es meist nicht möglich ist alle Schnitte sukzessiv zu messen. Wir kamen daher zu dem Schluss, dass sich durch Multiplikation der einzelnen Messstation nicht nur die effektive Arbeitszeit reduzieren lässt, sondern auch Ergebnisausbeute optimieren und Materialausschuss sowie Tierverbrauch reduzieren lässt.

Wir entschieden uns aus mehreren Gründen für einen Aufbau mit 16 Kanälen:

- Die experimentelle Erfahrung hat gezeigt, dass man aus dem Hippocampus einer adulten Ratte bei einer Schnittdicke von 400 μm 16 für Oszillationsexperimente geeignete Schnitte gewinnen kann
- Bei den gängigen Herstellern für elektrophysiologische Analog/Digital-Wandler gab es kein Gerät das mehr als 16 Kanäle aufwies
- Es gab nur wenige kommerziell erhältliche Verstärker mit mehr als 2 Kanälen, die gleichzeitig nicht die Kosten für das Setup exorbitant gesteigert hätten
- Alle Interface-Kammern sollten sich durch das Selbe Stereomikroskop bedienen lassen
- Jede Interface-Kammer sollte auf einem separaten schwingungsgedämpften Tisch untergebracht sein, um Störungen durch arbeiten an einer Kammer nicht auf die anderen zu übertragen

Aus diesen Rationalen folgte der in Abbildung 9 dargestellte Aufbau.

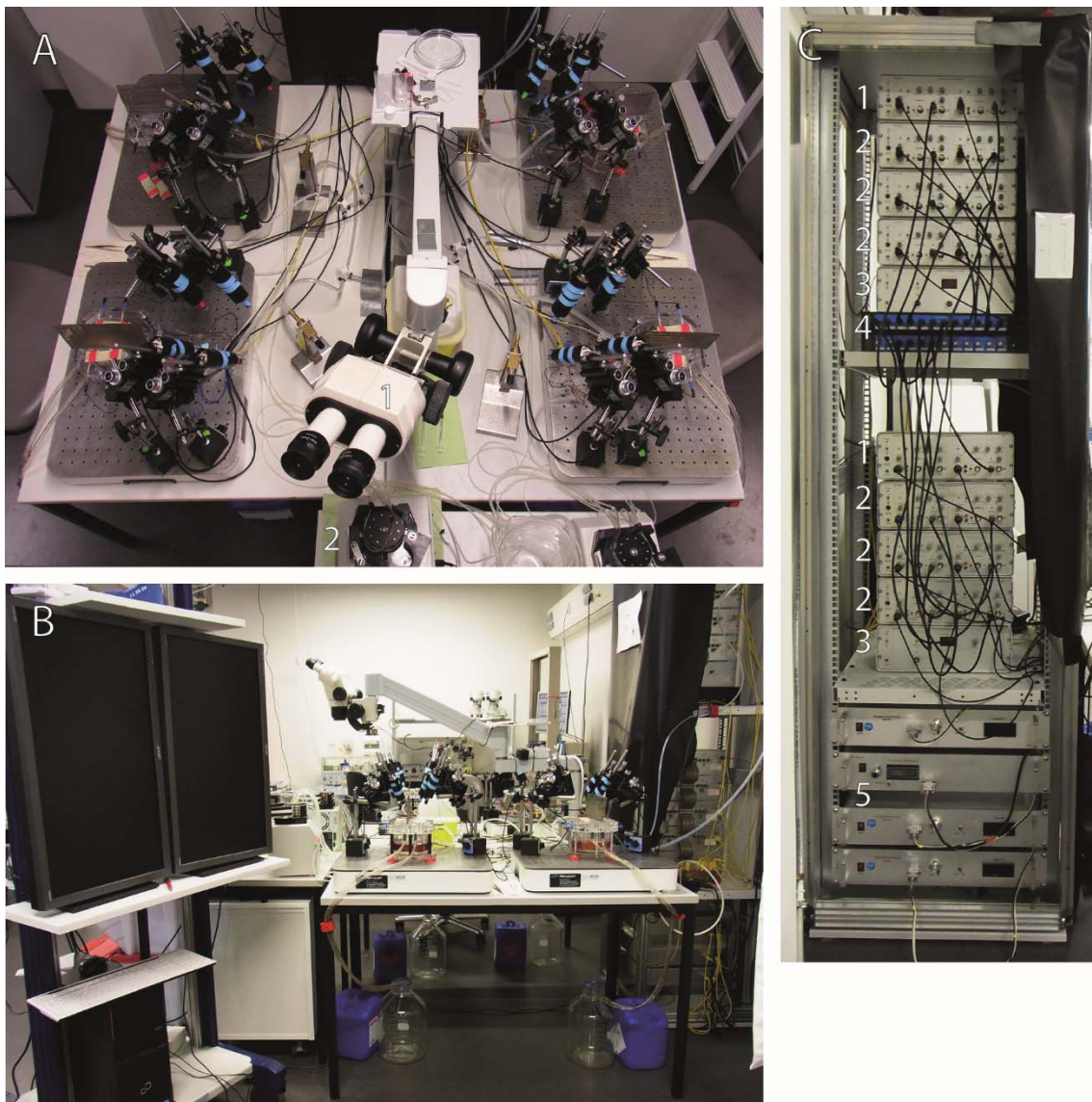


Abbildung 9 Hexadeca-Oszillations-Aufbau **A** Ansicht des Aufbaus von oben: 1. Stemi 2000 2. Minipulse 3 **B** Übersichtsbild des Gesamtaufbaus **C** Ansicht des Turms und der darin installierten Geräte: 1. EXB-EXT-02B 2. EXB-EXT-02BS 3. EXB-HS 4. 1401 Micro 3 & ADC 12 5. Temperaturkontrolle für Interface-Kammern

Der Hexadeca-Oszillations-Aufbau (Abbildung 9 A) besteht aus vier gleichartig konfigurierten Interfacekammern des Haas-Typus (Haas et al., 1979) (vergleiche Abbildung 3). Jede Kammer steht auf einem separaten schwingungsgedämpften Tisch (Newport; Irvine, CA, USA), damit sich die Schwingungen, die beim Hantieren an einer Kammer entstehen, nicht auf die anderen Kammern übertragen können. Die Kammertemperatur wird so eingestellt, dass die ACSF-Lösung bei einer Geschwindigkeit der Pumpe (Gilson; Middleton, WI, USA) von 1,5 mL/min beim Umspülen der Gehirnschnitte 34°C erreicht. Die Carbogenzufuhr (Linde; München, GER) zur Kammer wird über einen Schwebekörper-Durchflussmesser (ABB; Zürich, CHE) auf 1,3 L pro Minute justiert. Jede Kammer ist von vier Mikromanipulatoren (Märzhäuser; Wetzlar, GER) umgeben, was die Aufzeichnung von bis zu vier Gehirnschnitten pro Kammer erlaubt. Zur Aufzeichnung wird das Verstärkersystem EXB-EXT-02 (NPI Electronic; Tamm, GER) verwendet. Der AD/DA-Wandler zusammen mit der ADC12-Erweiterung (CED; Cambridge, GB) ermöglichen die gleichzeitige

Aufzeichnung von 16 Kanälen. Zur Platzierung der Elektroden wird ein auf ein Schwenkarm montiertes Stereomikroskop (Carl Zeiss; Oberkochen, GER) mit einer LED-Lichtquelle (Schott; Mainz, GER) verwendet. Des Weiteren wird zwischen den beiden Lagerungskammern jeder Interface-Kammer ein geerdetes Metallschild beim Messen aufgestellt, um Störungen in der Messung zu reduzieren.

Zur Aufzeichnung der Daten wird Spike2 Version 7.10 (CED; Cambridge, GB) und zur Auswertung MatLab R2013a (MathWorks; Natick, MA, USA) benutzt.

MEA-Aufbau

Zur Untersuchung der Reaktion kleiner Netzwerke und Zellverbände auf elektrische wie pharmakologische Stimulation wurde ein MEA gekauft. Wir entschieden uns für das USB-MEA32-STIM4, welches den Vorteil hat, dass es mit 12 Stimulationselektroden auf dem MEA-Chip versehen ist (siehe Abbildung 5), die man separat ansteuern kann.

Allerdings mussten wir feststellen, dass die elektrische Stimulation für unsere Zwecke nicht ausreichend war. Daher fokussierten wir uns auf Pharmakologische Protokolle und Musteranalyse.

Die Unterbringung des MEAs auf einem schwingungsgedämpften Tisch ist zwar nicht zwangsläufig notwendig, reduziert aber Messfehler im niederfrequenten Bereich von unter 10 Hz und einzelne Peaks verursacht durch Stöße und Bodenschwingung, verursacht durch unachtsames Arbeiten und andere Experimentatoren im Raum.



Abbildung 10 MEA-Aufbau **A** Übersicht des MEA-Aufbaus: 1. Minipulse 3 2. Alpha 37 3. Stemi 2000C 4. CVP 5. TC02 6. Halcionics_i4 7 Fernauslöser für die Kamera **B** Nahaufnahme des MEAs: 1. Stemi 2000C 2. USB-MEA32-STIM4 3. EasyLED Backlights 4. Halcionics_i4

Das USB-MEA32-STIM4 (Multi Channel Systems; Reutlingen, GER) ist leicht erhöht auf einem Kunststoffblock platziert, damit man die LED-Lichtquelle (Schott; Mainz, GER) unter die Aufnahmekammer schieben kann. Das ermöglicht einem bei hoher Lichtintensität die Aufnahme und Dokumentation der Ableitelektroden durch den Hirnschnitt hindurch (vgl. Abbildung 10 B). Das MEA steht auf einem aktiv schwingungsgedämpften Tisch (Accurion; Göttingen, GER), um bei gleichzeitigen Rechnerarbeiten Messstörungen abzumindern. Für die Platzierung des Schnitts und dessen Dokumentation werden das Stemi2000C (Carl Zeiss; Oberkochen, GER) und eine Analog-Digitalkamera mit Fernauslöser (Sony; Minato, JPN) genutzt. Der Gehirnschnitt wird durch eine Vakuumpumpe (Multi Channel Systems; Reutlingen, GER) auf der perforierten Aufnahmekammer fixiert. ACSF wird über eine Zwei-Kanal-Quetschpumpe (Gilson; Middleton, WI, USA) in die Messkammer ein und abgeleitet und mittels eines TC02 (Multi Channel Systems; Reutlingen, GER) auf 35°C erwärmt.

Octa-Patch-Clamp-Aufbau

Da die Patch-Clamp-Technik zeitaufwendig zu erlernen ist, war die Idee einen Aufbau für Multi-Patch-Arbeiten zu generieren, der eine gute Balance zwischen Ergebnisausbeute und Bedienbarkeit für einen einzelnen Experimentator bietet. Auch hier gibt es einige technische Abwägung gegeneinander zu berücksichtigen:

- Die Größe der Mikromanipulatoren und die Form des Mikroskops beschränken die Anzahl der maximal um das Mikroskop platzierbaren Manipulatoren
- Eine nicht zu große Anzahl an Bedienelementen für die Mikromanipulatoren, um die Arbeit mit diesen nicht zu unübersichtlich werden zu lassen
- Kommerzielle Patch-Clamp-geeignete Verstärker mit mindestens zwei Kanälen und Analog/Digital-Wandler mit mehr als vier Ausgabe-Kanälen
- Der teilweise hohe Kostenpunkt der einzelnen Mikromanipulatoren, Verstärker und A/D-Wandler
- Ein aktiver schwingungsgedämpfter Tisch, der das Gesamtgewicht handhaben kann
- Druckapplikation und Messung für die einzelnen Elektrodenhalter
- Kommerzielle Automatisierungskonzepte der Bedienung

Aus diesen Bedingungen entstand der hier aufgezeigte Aufbau mit 8 Mikromanipulatoren (Abbildung 11)

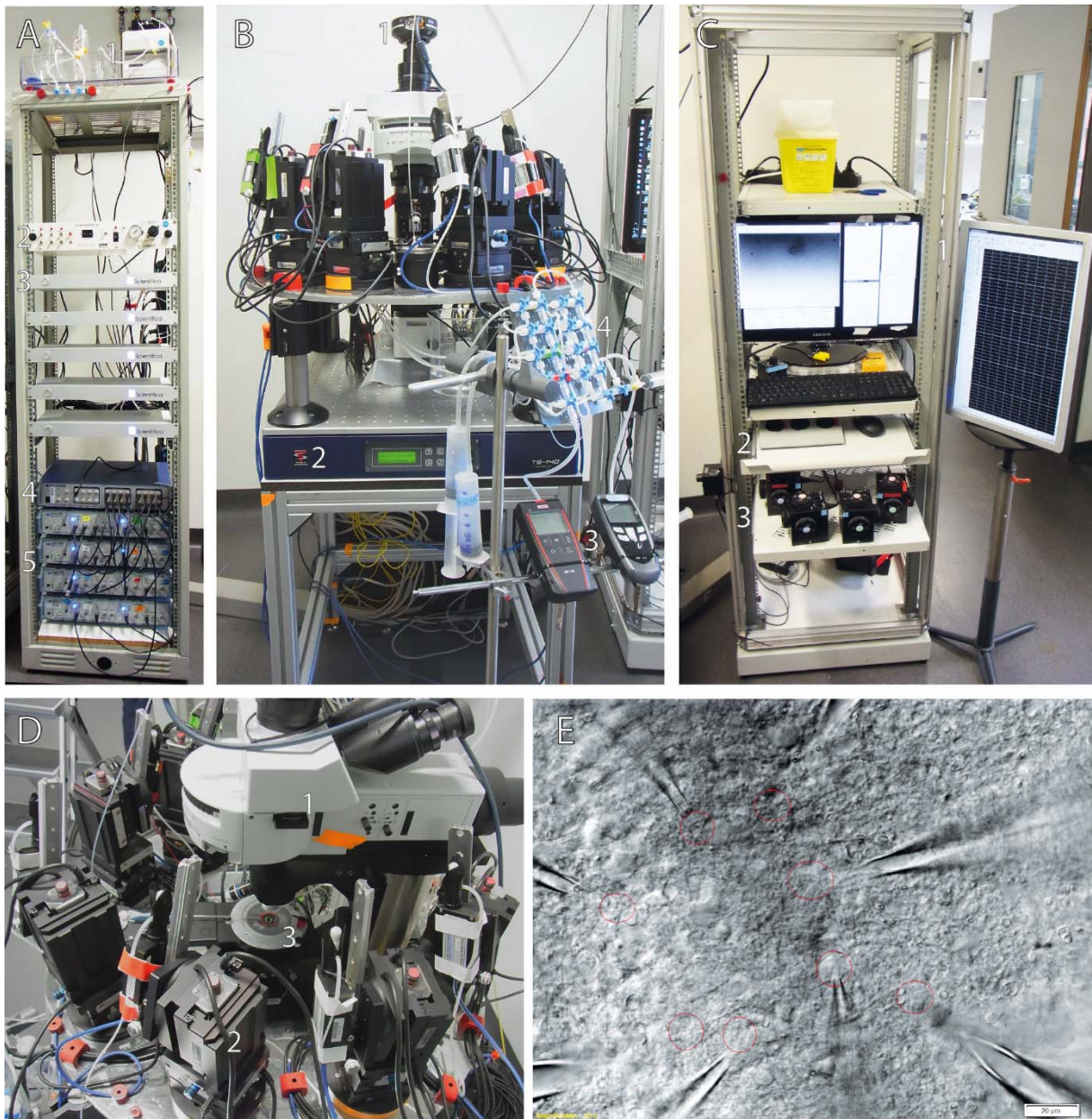


Abbildung 11 Octa-Patch-Clamp-Aufbau **A** Ansicht des Turms und der darin installierten Geräte: 1. Minipulse 3 2. Picospritzer III 3. Steuerungseinheiten für Mikroskop und Mikromanipulatoren 4. DigiData 1550 5. Multiclamp 700B **B** Aufbau der Mikroskopumgebung: 1. XM10 2. TS-140 3. MP 115 & MP 105 4. Ventilsystem zur Druckapplikation auf die einzelnen Patch-Pipetten **C** Ansicht des Turms zur Steuerung des Aufbaus: 1. Zwei Monitore für Kameraansicht und Elektrophysiologiedatenakquirierung 2. Steuerung für XY-Tisch „Universal Motorized Stage (UMS)“ 3. Steuerungen für PatchStar-Mikromanipulatoren **D** Detailansicht des Mikroskopaufbaus: 1. SliceScope mit Olympus-Optik 2. PatchStar 3. Kammer für den zu untersuchenden Gehirnschnitt **E** Aufnahme aller 8 Pipetten im Hirnschnitt. Rote Kreise markieren die anvisierten Zellen. Maßstab 20 µm; Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung

Auf einem aktiv schwingungsgedämpften Tisch (Table Stable; Mettmenstetten, CHR) ist auf einem motorisierten XY-Tisch (Scientifica; Uckfield, GB) ein Mikroskopkörper (Scientifica; Uckfield, GB) angebracht (vgl. Abbildung 11 B). Der Mikroskopkörper ist mit Optik und digital Kamera von Olympus (Shinjuku, JPN) komplementiert. Um das Mikroskop herum befindet sich ein Aluminiumring, auf dem eine dünne Stahlplatte befestigt ist, damit sich die Mikromanipulatoren (Scientifica; Uckfield, GB) mit Magneten rutschfest aufgestellt werden können. Dafür wurde der Fuß des Mikromanipulators mit

selbstklebender Magnetfolie bestückt. Zur kontrollierten Druckapplikation auf die einzelnen Pipetten sind zwei Manometer (Kimo Instruments; Montpon-Ménestérol, FRA) mit einem Dreiwegehahnssystem verbunden (vgl. Abbildung 11 B). Die Temperatur der ACSF, die über eine Tropfenfalle in die Schnittkammer eingeleitet wird, wird mittels des TC01 (Multi Channel Systems; Reutlingen, GER) kontrolliert und durch eine Quetschpumpe (Gilson; Middleton, WI, USA) aus der Schnittkammer (vgl. Abbildung 11 D) wieder abgesaugt. Zur Aufnahme der Daten werden 700B-Verstärker (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA), ein DigiData 1550 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) und pClamp 10 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) verwendet. Zur Arbeiten am Messrechner werden zwei Monitore verwendet, damit man das Kamerabild, die Verstärkersteuerung und die elektrophysiologischen Signale gleichzeitig darstellen kann.

Fazit

Der Aufbau der elektrophysiologischen Analyse-Straße stellte einem viele technische Herausforderungen, vor allem da keine Lösung aus einer Hand von einem Hersteller gab, die unseren Ansprüchen gerecht wurde.

Die technische am einfachsten einzurichtende und monetär günstigste Lösung war das MEA, da wenig extra Zubehör benötigt wurde; aber auch hier mussten viele technische Defizite verbessert und ausgemerzt werden. Sei es die Beseitigung von niederfrequenten Störungen durch die Bewegung der Quetschpumpe und oder des Wasserflusses auf dem Chip, die Beseitigung des 50 Hz-Rauschen oder eine komplette Lieferung defizienter Chips.

Am teuersten und schwierigsten war der Multi-Patch-Clamp-Aufbau in der Umsetzung. Die Integration der vielen unabhängigen Gerätschaften in einen Setup war sehr zeitaufwändig, unter anderem wegen Kompatibilitätsproblemen von Treibern und der räumliche Anordnung und Umsetzung der einzelnen Bestandteile.

Der schwierigste Teil der Umsetzung beim Oszillationsaufbau waren lediglich durbrennende Netzteile und eine platzsparende räumliche Anordnung der Geräte.

In allen Fällen waren die Hersteller sehr Hilfsbereit bei der Lösung der vielen Probleme.

Am Ende zeigte sich nicht nur, dass die Selbstgebauten Lösungen günstiger sind als ein integriertes kommerzielles Gesamtkonzept, sondern auch sehr gut auf die spezifische Nutzung angepasst und für zukünftige modifizierte Verwendung leicht abgewandelt und umgebaut werden können.

Messungen

Im Laufe der Arbeit wurde deutlich, dass sich das Aufbauen der Versuchsapparaturen alleine bewältigen lässt, das Vermessen der Versuchstiere an den unterschiedlichen Aufbauten allerdings nicht mehr eigenhändig in der gegebenen Zeit zu bewerkstelligen ist. Aus diesem Grund konzentrierte ich meine Untersuchungen auf Feldpotentialmessungen; diesen werden daher wesentlich detaillierter in dieser Arbeit ausgeführt.

Experimente am MEA wurden daher von Julia Neugebauer, Patch-Clamp-Experimente am Octa-Patch-Clamp-Aufbau von Yangfan Peng und Patch-Clamp-Experimente an NRG3-KO-Mäusen von Stephanie Braud ausgeführt.

Etablierung eines Oszillationsprotokolls für den PrL in Ratten und Mäusen in Feldpotentialmessungen

Um γ -Oszillationen im PrL der Ratte zu etablieren, richteten wir in der Testphase unseren Fokus auch auf die Motorcortexregion M1, um auszuschließen, dass ein nicht funktionierendes Protokoll ein Artefakt unserer Regionenauswahl ist. In coronalen Schnitten des frontalen Cortexes testen wir erst ohne Erfolg ein klassisches pharmakologisches Protokoll mit 10 μ M ACH und 2 μ M Phys, dass im Hippocampus breite Anwendung findet. Daraufhin versuchten wir ein reines Kainat (KA) basiertes Model mit 400 nM und 800 nM KA, mit allerdings nur mäßigem Erfolg (siehe Tabelle unten). Auch eine Kombination des Hippocampus- und Kainat-Protokolls brachte keine Resultate mit einer zufriedenstellenden Responder-Rate (siehe Tabelle). Erst eine Kombination von 5 μ M Carbamylcholine und 800 nM KA brachte den PrL in Ratten zu einer zuverlässigen γ -Oszillation. Dieses Protokoll wurde ausgiebig im PrL der Ratte getestet (siehe nächstes Kapitel) und anschließend versucht auf Mäuse anzuwenden (siehe übernächstes Kapitel).

		400 nM KA			800 nM KA		
		Responder			Responder		
		gemessen	< 30 Hz	> 30 Hz	gemessen	< 30 Hz	> 30 Hz
PrL		40	0 (0%)	10 (25%)	100	0 (0%)	11 (11%)
M1		10	0 (0%)	1 (10%)	92	2 (2%)	9 (10%)

		10 μ M ACH + 2 μ M Phys + 400nM KA			20 μ M ACH + 2 μ M Phys + 800nM KA		
		Responder			Responder		
		gemessen	< 30 Hz	> 30 Hz	gemessen	< 30 Hz	> 30 Hz
PrL		16	4 (25%)	0 (0%)	44	0 (0%)	2 (5%)
M1		290	64 (22%)	16 (6%)	44	7 (16%)	0 (0%)

Induzierung von γ -Oszillationen mit Kainsäure und Carbamylcholin in männlichen und weiblichen Ratten

Die Kombination von 800 nM Kainsäure (KA) und 5 μ M Carbamylcholinchlorid (CCH) ermöglichte die Generierung von γ -Oszillationen (siehe Abbildung 13). Diese Oszillationen haben im Median eine Frequenz von 39,67 Hz bei Männchen und 38,76 Hz bei Weibchen, mit einer Power von $3,7 \cdot 10^{-4}$ mV² (vgl. Abbildung 13 C und D). In einem Rangsummentest können keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen nachgewiesen werden. Bei den Männchen fingen 41 von 139 (29,5%) getesteten Schnitten an zu oszillieren, bei den Weibchen 42 von 123 (34,15%); das gibt ein gemeinsame Antwortrate von 83 aus 262 (31,68%).

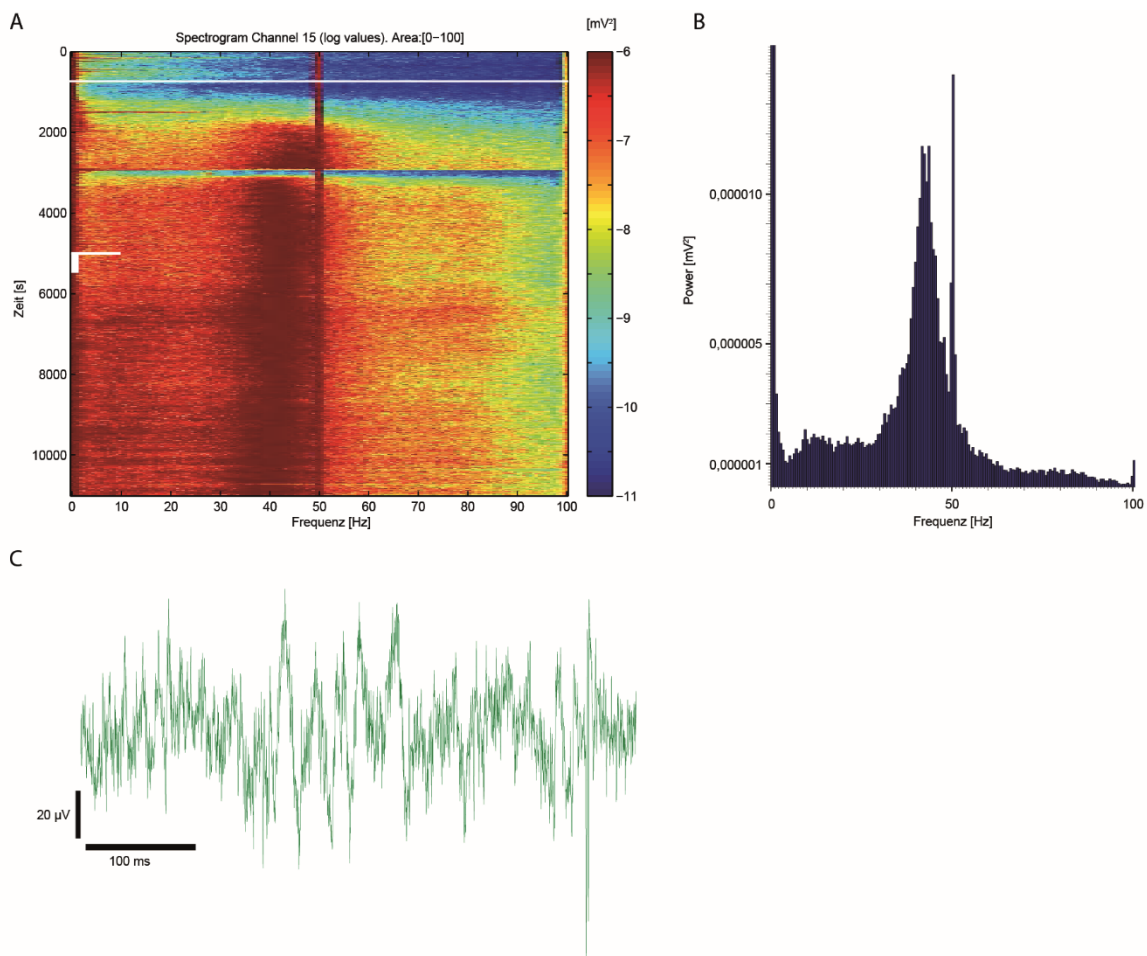


Abbildung 12 Darstellung der Oszillation im PrL der Ratte anhand einer exemplarischen Messung **A** 3D-FFT der gesamten Aufnahme. Durchgezogene weiße Linie markiert den Einwasch der Drogen **B** 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in **A** **C** Teil der Originalaufnahme, Zeitpunkt bei 5000 s markiert durch horizontale Linie am linken Rand in **A**. Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 45 Hz bis 55 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken

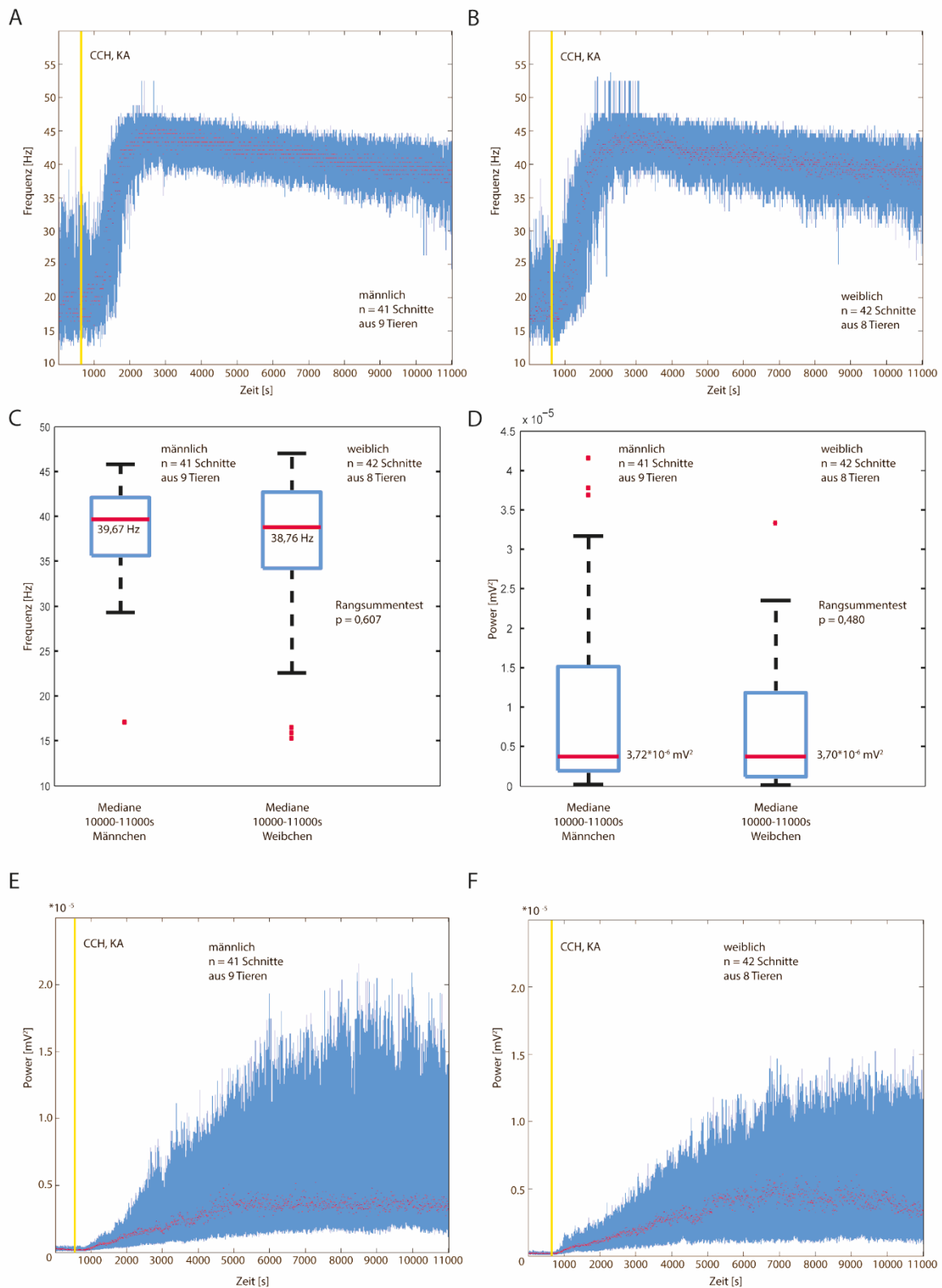


Abbildung 13 Frequenz und Power der Oszillation in männlichen und weiblichen Ratten induziert mit 800 nM KA und 5 µM CCH **A, B** Verteilung der Frequenzen für Männchen und Weibchen **E, F** Verteilung der Power für Männchen und Weibchen: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **C** Frequenzverteilung in Bezug auf die Geschlechter als Boxplot der Mediane in der Zeit von 10000-11000 Sekunden **D** Powerverteilung in Bezug auf die Geschlechter als Boxplot der Mediane in der Zeit von 10000-11000 Sekunden. Sowohl für Frequenz als auch Power zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

Induzierung von Oszillationen mit Kainsäure und Carbamoylcholin in Mäusen

Die Oszillationen im prälimbischen Cortex der Maus werden mit Einwaschen von 800 nM KA und 5 μ M CCH, gleich dem Ratten-Protokoll, induziert; dabei ist der Einwasch so abgestimmt, dass die Pharmazeutika den Hirnschnitt bei 600s erreichen (in der Abbildung 15 durch eine gelbe Linie markiert). Dies führt in den Mäusen zu einer Oszillation, die meistens im α - (7-15 Hz) bis β -Band (15-30 Hz) liegt und einen Median von 14,12 Hz aufweist. 22 von 62 Schnitten (35,48%) wiesen eine Oszillation auf.

Aufgrund der Tatsache, dass es bei Ratten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gab, verwendeten wir nur Männchen für diesen Versuch.

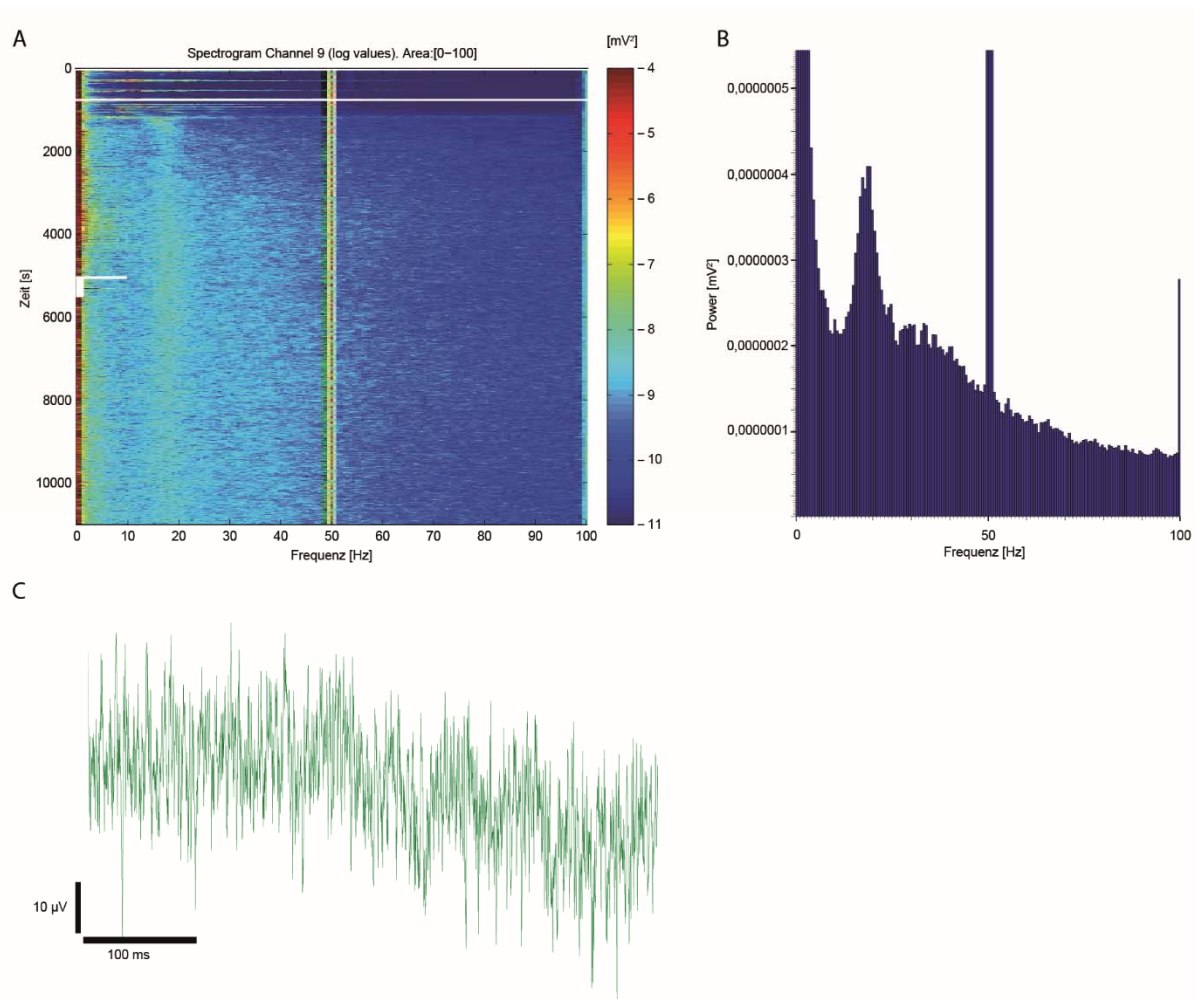


Abbildung 14 Beispielhafte Oszillation im PRL der Maus, induziert mit KA und CCH anhand einer exemplarischen Messung **A** 3D-FFT der gesamten Aufnahme. Durchgezogene weiße Linie markiert den Einwasch der Drogen **B** 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in **A** **C** Teil der Originalaufnahme, Zeitpunkt bei 5000s markiert durch horizontale Linie am linken Rand in **A**. Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 45 Hz bis 55 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken

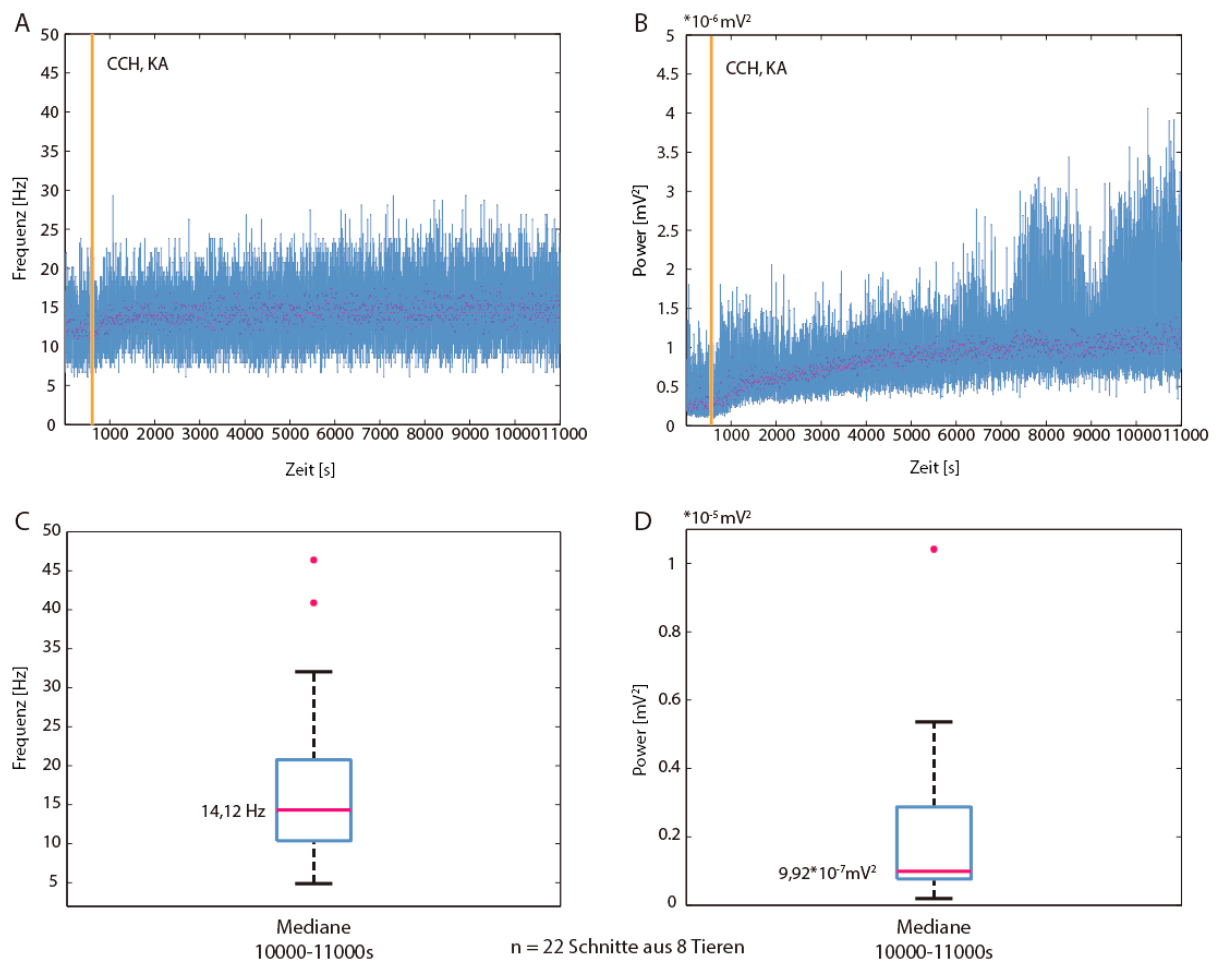


Abbildung 15 Frequenz und Power der Oszillation in Mäusen unter Einfluss von 800 nM KA und 5 μM CCH **A** Verteilung der Frequenzen: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **B** Verteilung der Power: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **C** Boxplot der Mediane für die Frequenz in der Zeit von 10000-11000 Sekunden **D** Boxplot der Mediane für die Power in der Zeit von 10000-11000 Sekunden

Fazit

Sowohl in der Ratte, wie auch der Maus, lassen sich Oszillationen mit 800 nM KA und 5 μM CCH induzieren. Allerdings gibt es große nagerspezifische Differenzen zwischen den Erreichten Frequenzen (Differenz im Median von ca. 25 Hz) und der Power (Unterschied beträgt ca. das 3,7-Fache). Auch scheint die Oszillation im Median in der Ratte gegenüber der Maus mit der Zeit abzunehmen, während die mediane Power nach ca. 6000 s ein Plateau einnimmt. Dies deutet darauf hin, dass es zwischen beiden Nagerspezies grundlegende Unterschiede in der Organisation des PrL gibt, die der Cortexarchitektur, Konnektivität, Rezeptorverteilung, -komposition und -expressionsrate geschult sein können.

Einfluss von cholinergen Agonisten und nikotinischen Antagonisten auf Oszillationen im prälimbischen Cortex von *Rattus norvegicus wistar*

Erhöhung der Oszillationsfrequenz und Power mit ACH und PHYS

Das Beifügen von 10 μM ACH und 2 μM PHYS bei 6000 s beeinflusst die durch 800 nM KA und 5 μM CCH induzierten Oszillation. Die beobachteten Frequenzen erhöhen sich im Median von 39,06 Hz bei 5000-6000 s um 3,66 Hz auf 42,72 Hz bei 10000-11000 s mit einer Signifikanz im Wilcoxon-Vorzeichentest auf 5%-Niveau ($p = 0,0325$) (vgl. Abbildung 17 A und B). Die Power der Oszillation steigt im Median um $0,99 \cdot 10^{-6} \text{ mV}^2$ von $2,65 \cdot 10^{-6} \text{ mV}^2$ bei 5000-6000 s auf $3,64 \cdot 10^{-6} \text{ mV}^2$ bei 10000-11000 s mit einer Signifikanz im Wilcoxon-Vorzeichentest auf 1%-Niveau ($p = 0,0082$) (vgl. Abbildung 17 C-F).

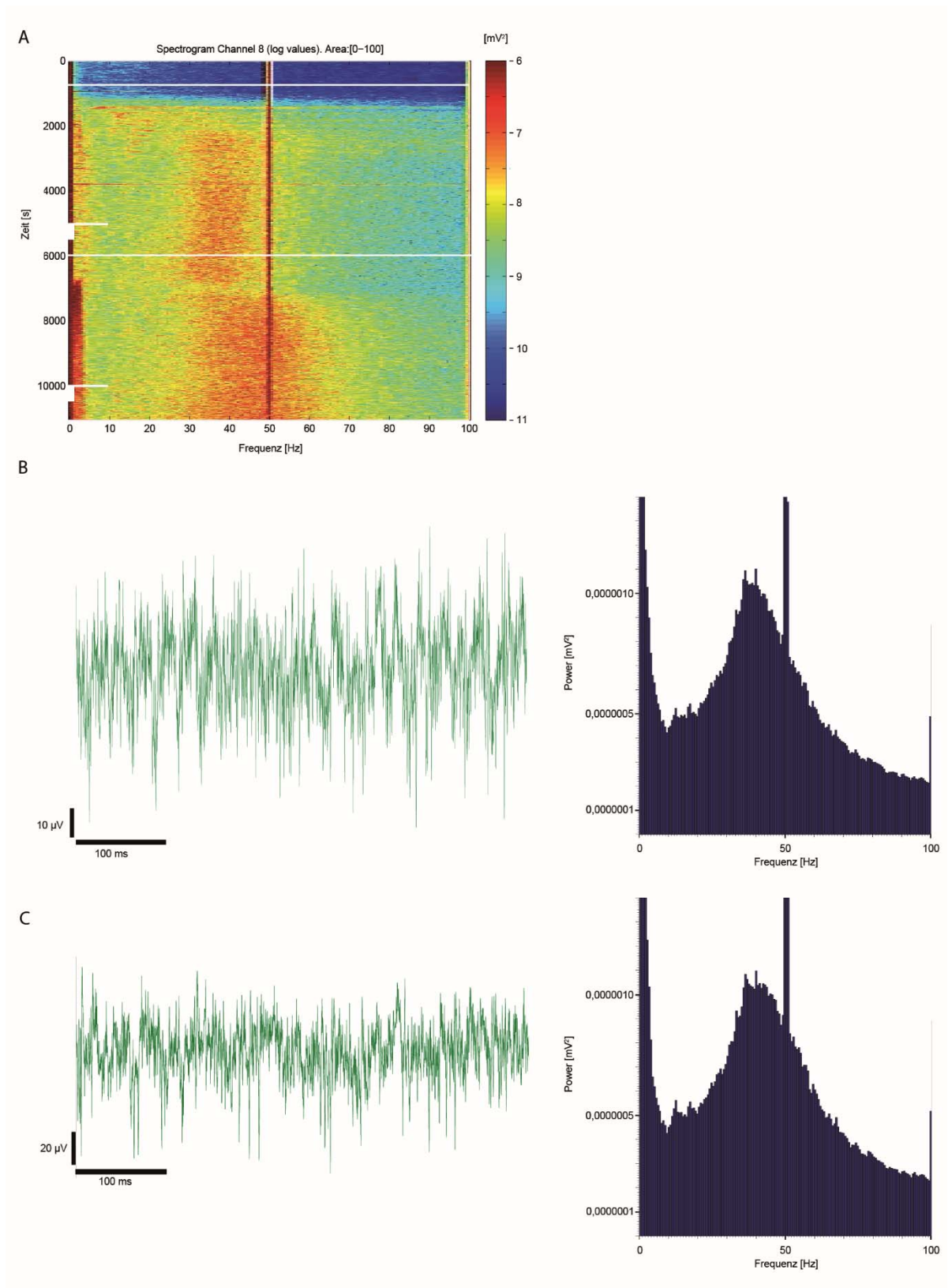


Abbildung 16 Beispielhafte Oszillation im PrL der Ratte anhand einer exemplarischen Messung **A** 3D-FFT der gesamten Aufnahme. Durchgezogene weiße Linie markiert den Einwasch der Drogen. KA und CCH bei 360 s und zusätzlich ACH und PHYS bei 6000 s **B** Teil der Originalaufnahme bei 5000s (markiert durch horizontale Linie am linken Rand in A). Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 45 Hz bis 55 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken. Daneben eine 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in A **C** Teil der Originalaufnahme bei 10000s (markiert durch horizontale Linie am linken Rand in A). Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 45 Hz bis 55 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken. Daneben eine 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in A wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 45 Hz bis 55 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken

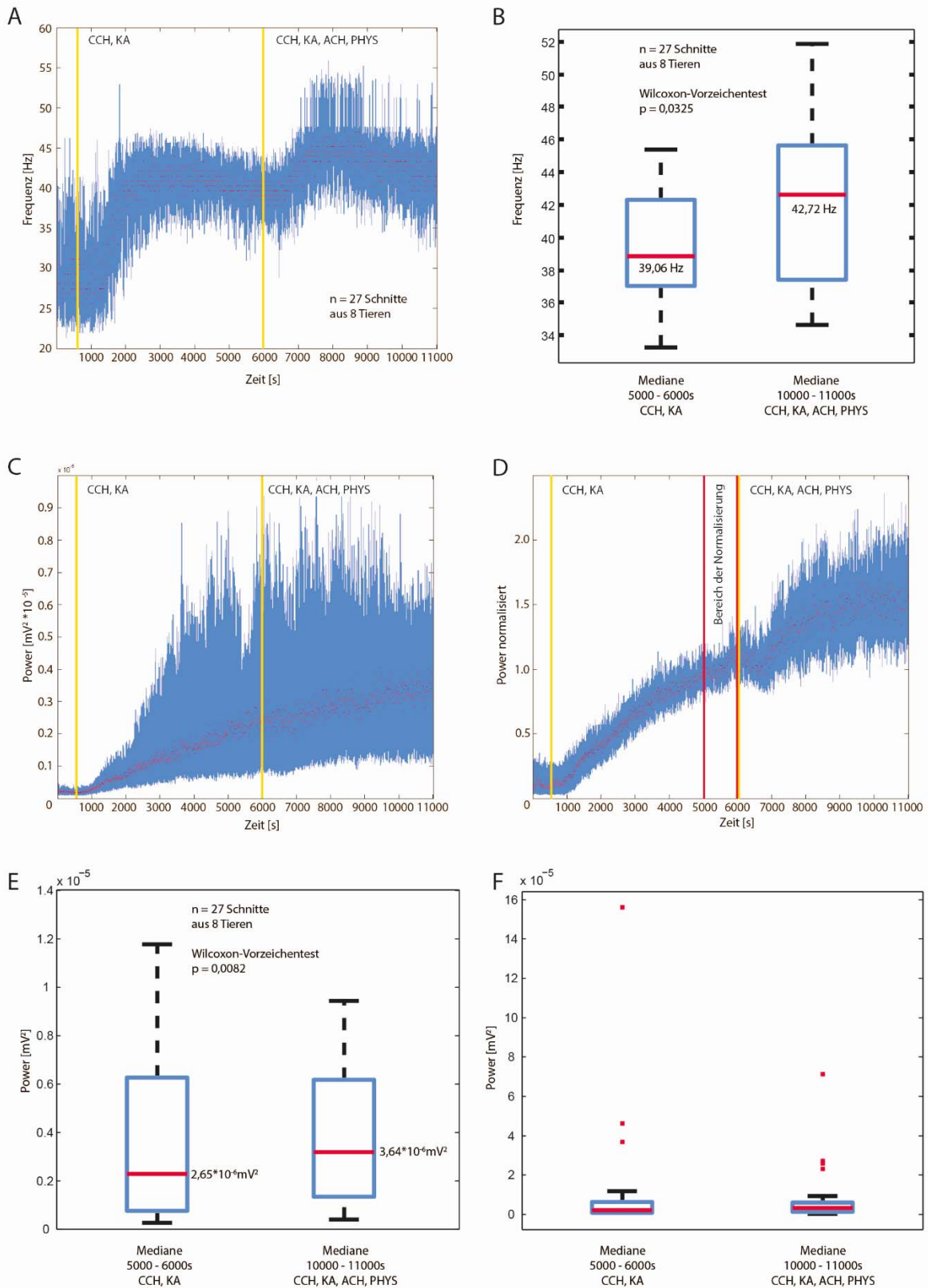


Abbildung 17 Einfluss von $10 \mu M$ ACH und $2 \mu M$ PHYS auf die Oscillation **A** Frequenzänderung der Oscillation durch zusätzlichen Einwasch von ACH und PHYS: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **B** Frequenzverteilung als Boxplot der Mediane in der Zeit von 5000-6000 Sekunden und 10000-11000 Sekunden **C** Poweränderung der Oscillation durch zusätzlichen Einwasch von ACH und PHYS: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **D** normalisierte Darstellung der Daten aus **C** **E** Vergrößerte Darstellung der Powerverteilung als Boxplot der Mediane in der Zeit von 5000-6000 Sekunden und 10000-11000 Sekunden. **F** Vollständige Verteilung der Daten aus **E**

Einfluss von nikotinischen Antagonisten auf mit CCH, KA, ACH und PHYS generierte Oszillationen

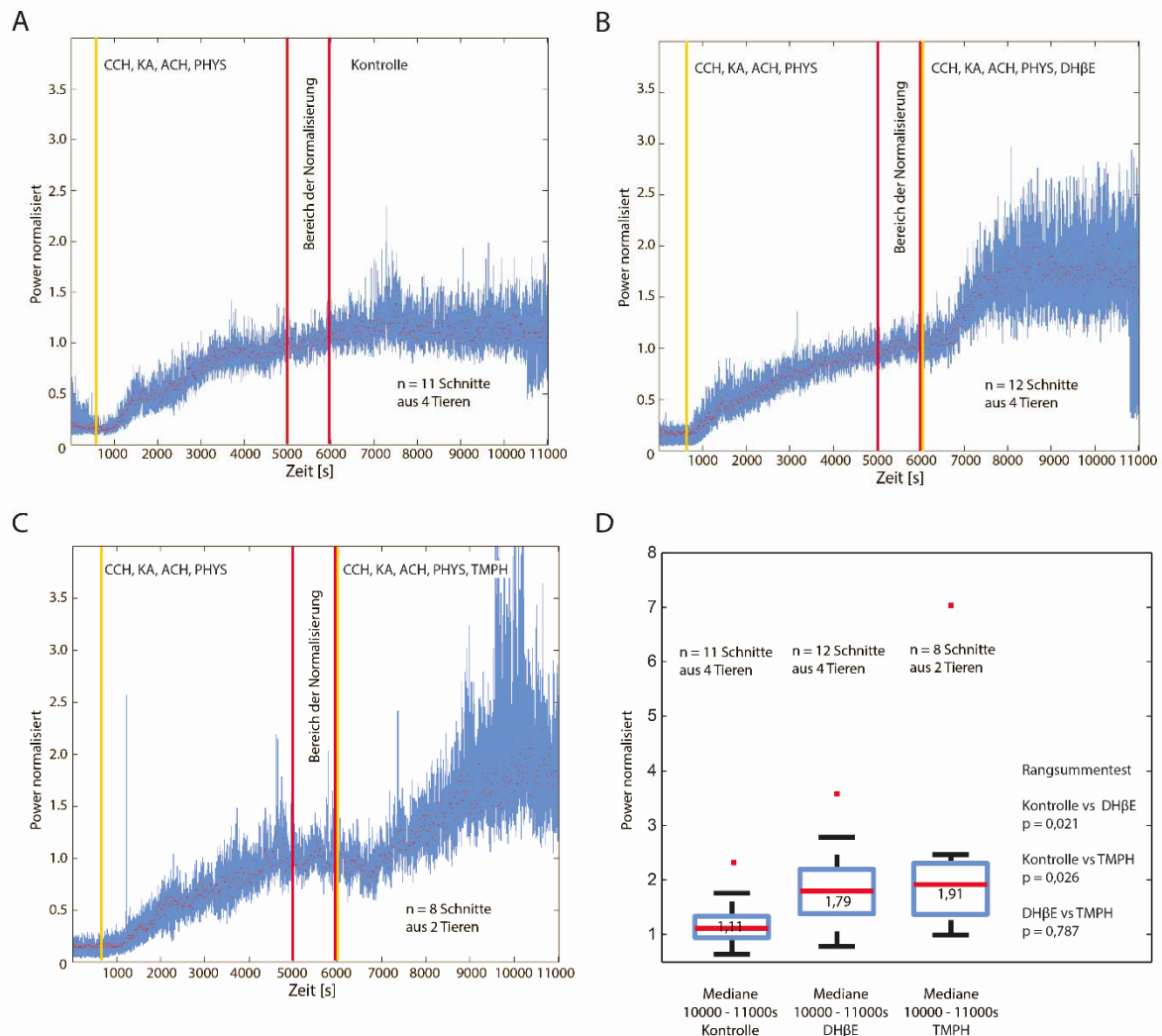


Abbildung 18 Einfluss von nikotinischen Antagonisten auf Oszillationen: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **A** normalisierte Power der CCH, KA, ACH, PHYS induzierten Oszillation ohne Einwirkung von Antagonisten **B** Normalisierte Power unter Einfluss von DHβE ab 6000 Sekunden **C** Normalisierte Power unter Einfluss von TMPH ab 6000 Sekunden **D** Verteilung der Power als Boxplot der Mediane (normalisiert) in der Zeit von 10000-11000 Sekunden

Die Antagonisten Dihydro-β-Erythroidin (DHβE) und Tetramethylpiperidinheptanoat (TMPH) zeigen keinen Einfluss auf die Frequenz der mit KA, CCH, ACH und PHYS induzierten Oszillationen (Daten nicht gezeigt), allerdings haben sie Auswirkungen auf die Power. Da die absolute Power der Oszillationen aufgrund der geringen Anzahl gemessener Oszillationen weit auseinander geht, werden in Abbildung 18 normalisierte Werte verglichen. Aufgrund der Kosten von TMPH und DHβE bei den verwendeten Konzentrationen wurde die Anzahl der Experimente gering gehalten. Vergleicht man die Mediane der letzten 1000 s der Experimente miteinander, zeigt sich eine Signifikanz der Antagonisten gegen die Kontrolle auf 3%-Niveau (DHβE $p = 0,021$; TMPH $p = 0,026$) (vgl. Abbildung 18). Dabei zeigt die Verwendung von DHβE einen Anstieg auf 1,79 und TMPH von 1,91 gegenüber der Kontrolle von 1,11. Der Unterscheid der Antagonisten gegeneinander zeigt keine Signifikanz. Der

muscarinerge Antagonist Oxybutynin bringt mit einer Konzentration von 10 nM die Oszillation innerhalb von 90 min zum Erliegen (Daten nicht gezeigt), was in Einklang mit Messungen im somatosensorischen Cortex von Mäusen steht (Buhl et al., 1998).

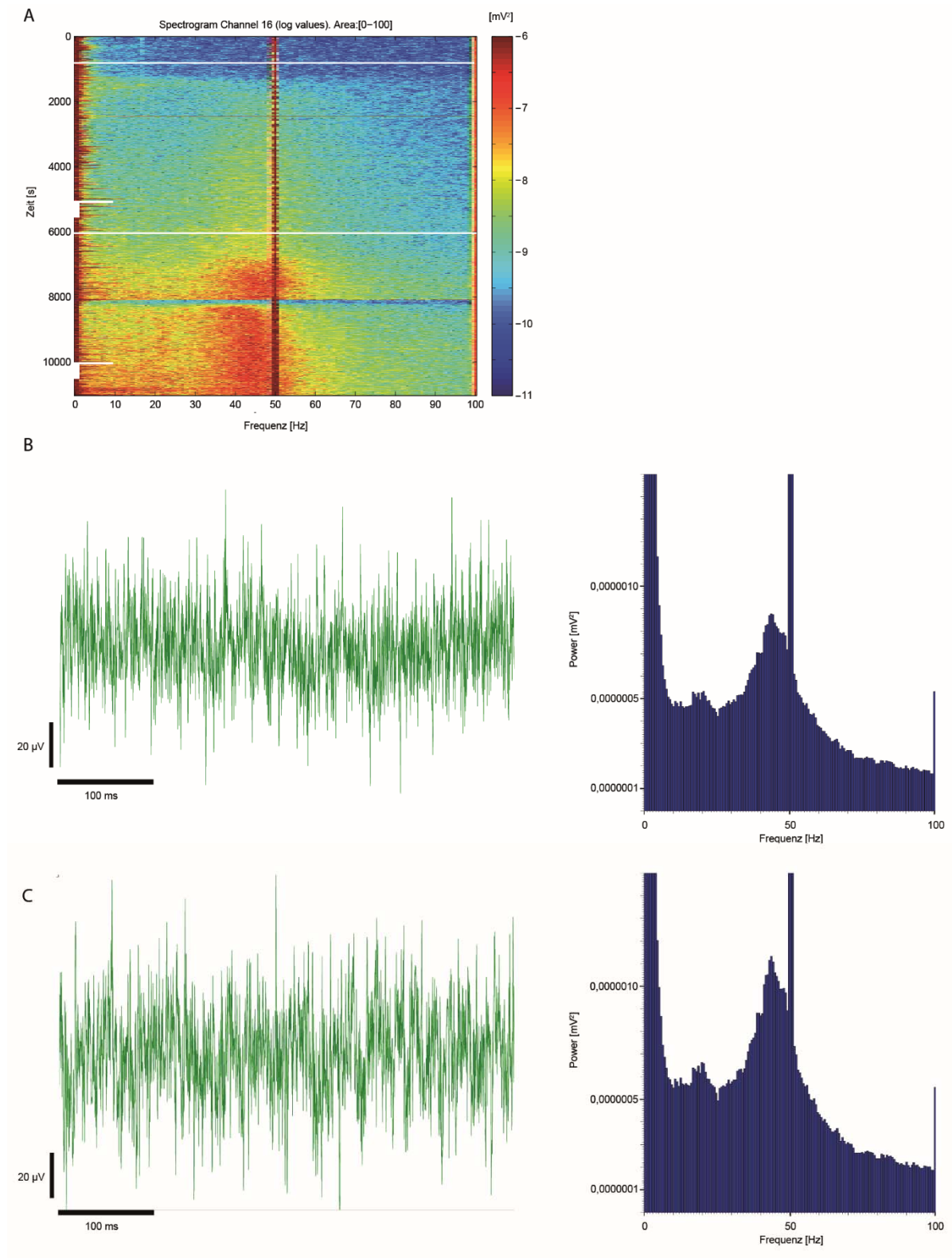


Abbildung 19 Beispielhafte Oszillation im PrL der Ratte anhand einer exemplarischen Messung **A** 3D-FFT der gesamten Aufnahme. Durchgezogene weiße Linie markiert den Einwasch der Drogen. KA, CCH, ACH und PHYS bei 360 s und zusätzlich DH8E bei 6000 s **B** Teil der Originalaufnahme bei 5000s (markiert durch horizontale Linie am linken Rand in A. Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 47 Hz bis 52 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken. Daneben eine 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in A **C** Teil der Originalaufnahme bei 10000s (markiert durch horizontale Linie am linken Rand in A. Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 47 Hz bis 52 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken. Daneben eine 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in A

Fazit

Die Zugabe von nikotinischen Agonisten erhöht sowohl Frequenz als auch Power der Oszillation, während nikotinsche Breitbandantagonisten sich positiv auf die Power im PrL der Ratte auswirken. Dies zeigt, dass cholinerge Agonisten die Oszillation über einen anderen Mechanismus beeinflussen als nikotinsche Breitband Antagonisten.

Oszillationen in NRG3-Knock-Out-Mäusen

Prelimbischer Cortex

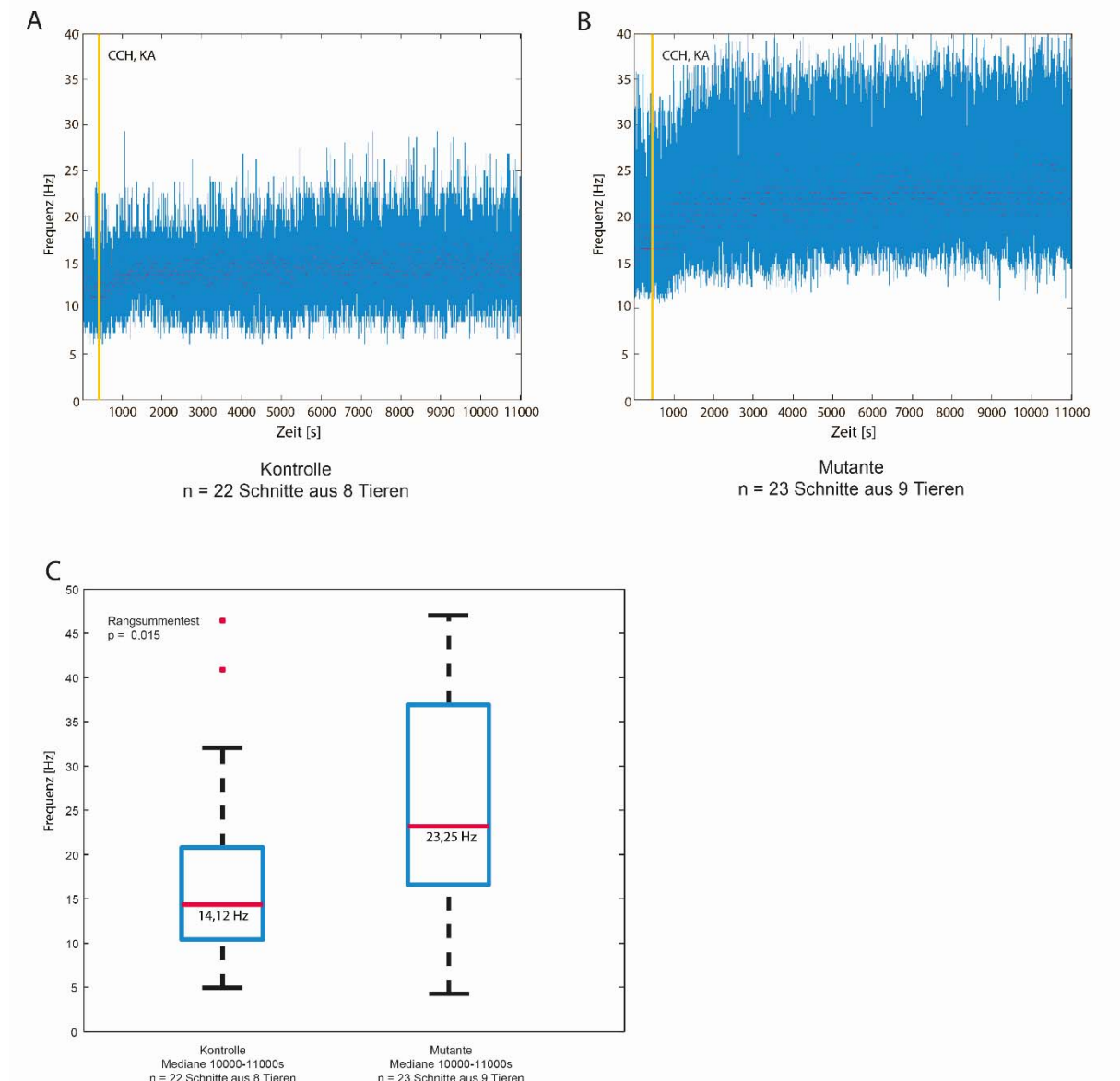


Abbildung 20 Frequenzunterschiede zwischen Kontrolle und Mutante unter Einfluss von 800 nM KA und 5 μ M CCH **A & B** Verteilung der Frequenzen: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **C** Boxplot der Mediane in der Zeit von 10000-11000 Sekunden

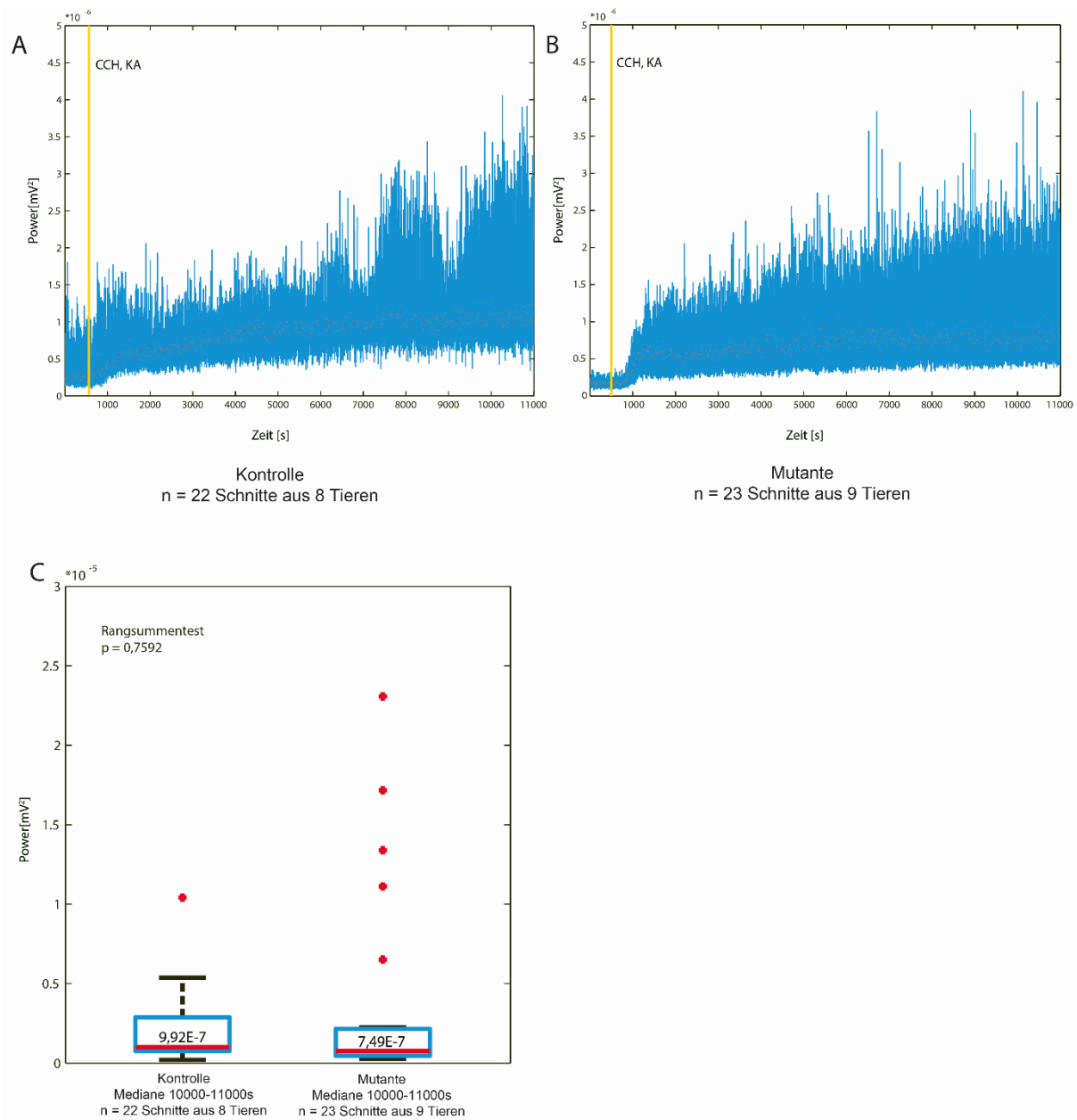


Abbildung 21 Powerunterschiede zwischen Kontrolle und Mutante unter Einfluss von 800 nM KA und 5 μ M CCH **A & B** Verteilung der Power: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **C** Boxplot der Mediane in der Zeit von 10000-11000 Sekunden

Die Oszillationen im prälimbischen Cortex der Maus werden mit dem Einwaschen von 800 nM Kainsäure (KA) und 5 μ M Carbamoylcholinchlorid (CCH), gleich dem Ratten-Protokoll, induziert; dabei ist der Einwasch so abgestimmt, dass die Pharmazeutika den Hirnschnitt bei 600s erreicht (in der Abbildung durch eine gelbe Linie markiert). Dies führt in den Kontrollmäusen zu einer Oszillation, die meistens im α - (7-15 Hz) bis β -Band (15-30 Hz) liegt und einen Median von 14,12 Hz aufweist (vgl. Abbildung 20 A und C). In der Neuregulin-3(NRG3)-Mutante ist diese Form der Oszillation häufiger im β - bis γ -Band (30-100 Hz) anzutreffen, mit einem Median von 23,25 Hz (vgl. Abbildung 20 B und C und Abbildung 22). Testet man die Mediane der letzten 1000s des Experiments in einem Rangsummentest gegeneinander, zeigt sich eine Signifikanz auf 2%-Niveau ($p = 0,015$).

Beim Vergleich der Power der Oszillationen zwischen Kontrolle und Mutante konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,759$) festgestellt werden (siehe Abbildung 21). Power-Werte im prälimbischen Cortex bewegen sich in einer Größenordnung von 10^{-7} bis 10^{-6} mV². In der Mutante oszillierten 23 von 89 gemessenen Schnitten (25,84%).

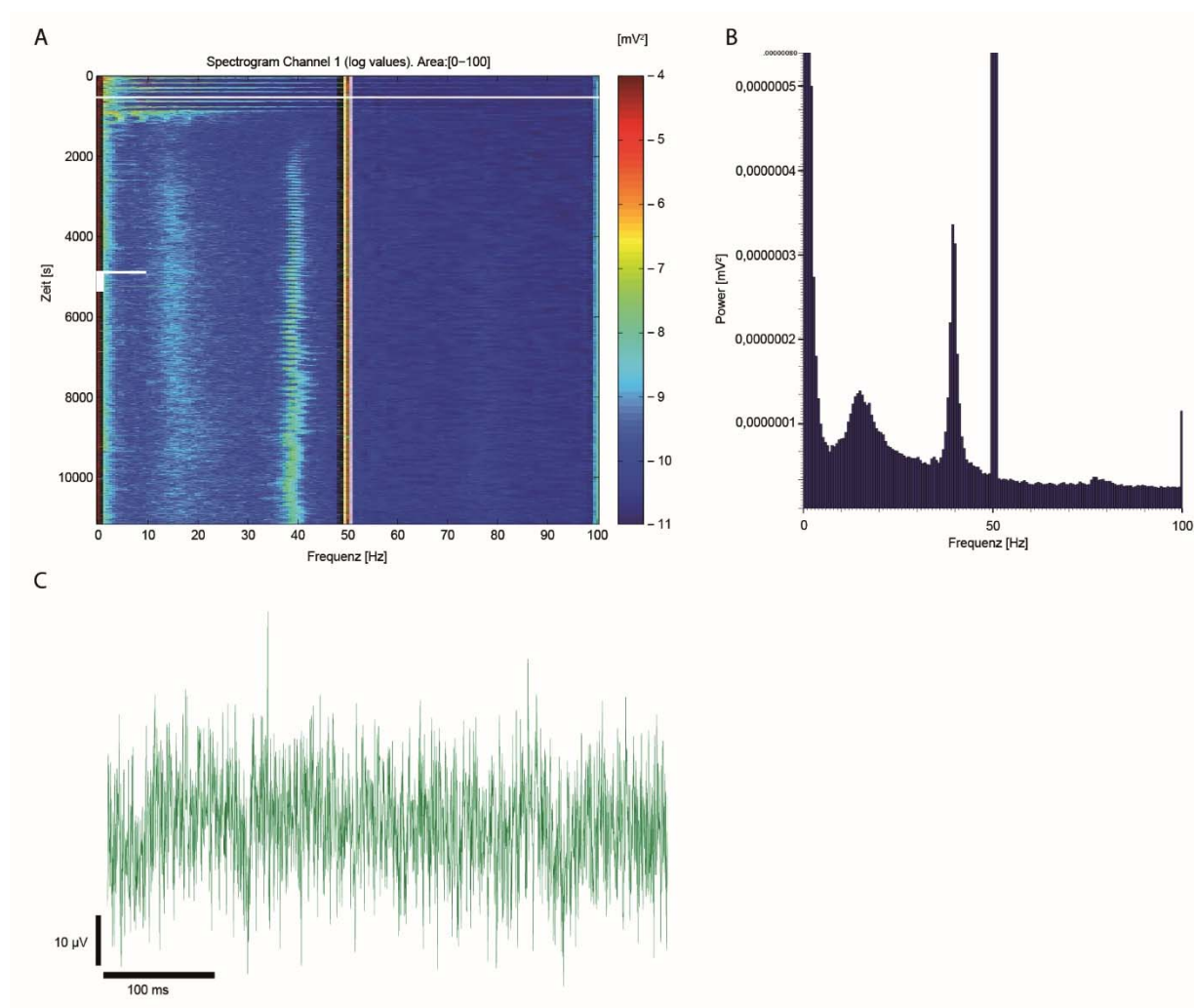


Abbildung 22 Beispielhafte Oszillation im PRL der NRG3-KO-Maus, induziert mit KA und CCH anhand einer exemplarischen Messung **A** 3D-FFT der gesamten Aufnahme. Durchgezogene weiße Linie markiert den Einwasch der Drogen **B** 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in **A** **C** Teil der Originalaufnahme, Zeitpunkt bei 5000 s markiert durch horizontale Linie am linken Rand in **A**. Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 45 Hz bis 55 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken. Zum Vergleich mit der wildtyp Maus siehe Abbildung 14

Hippocampus CA3

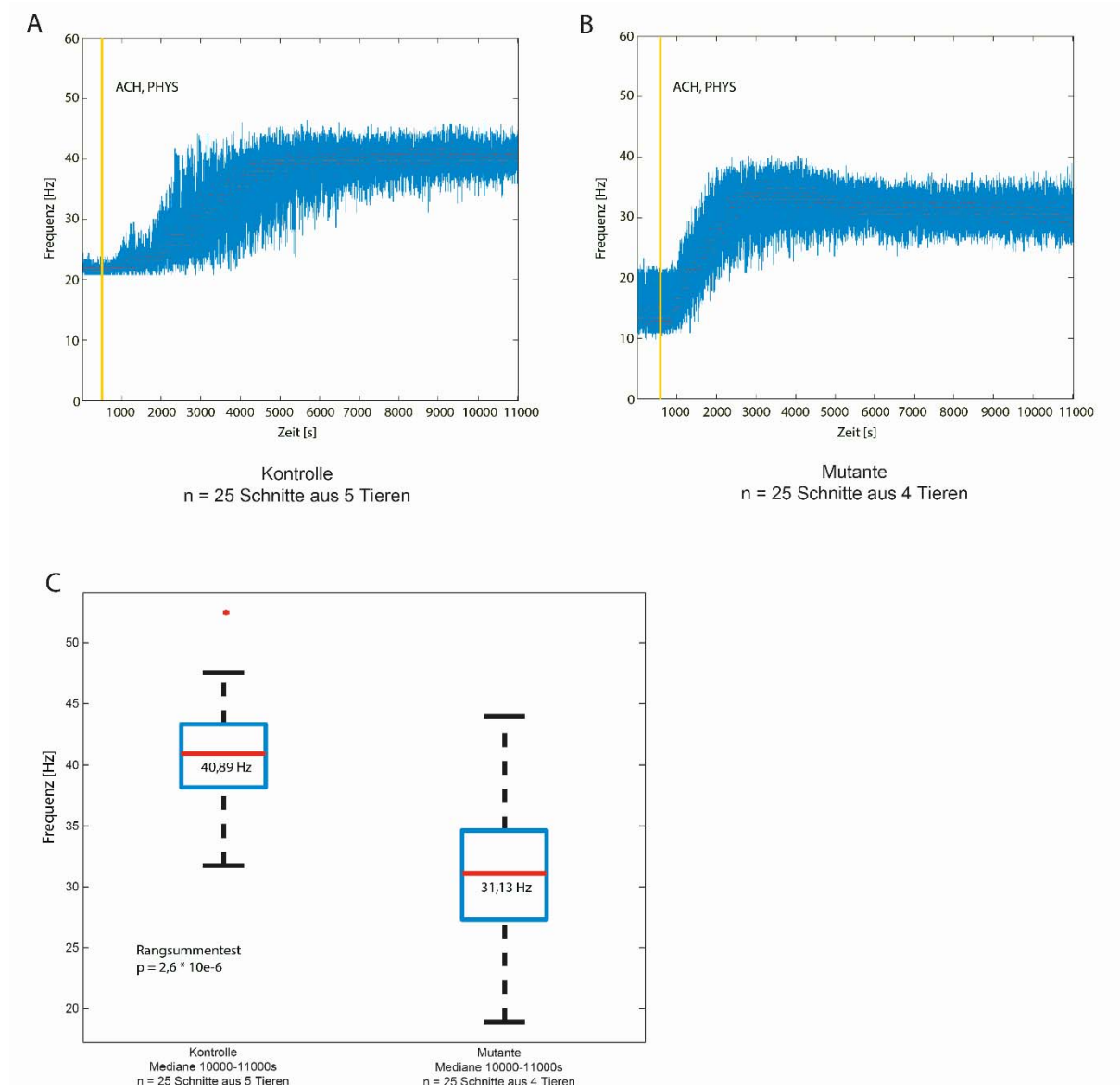


Abbildung 23 Frequenzunterschiede zwischen Kontrolle und Mutante unter Einfluss von $10\mu\text{M}$ ACH und $2\mu\text{M}$ PHYS **A & B** Verteilung der Frequenzen: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **C** Boxplot der Mediane in der Zeit von 10000-11000 Sekunden

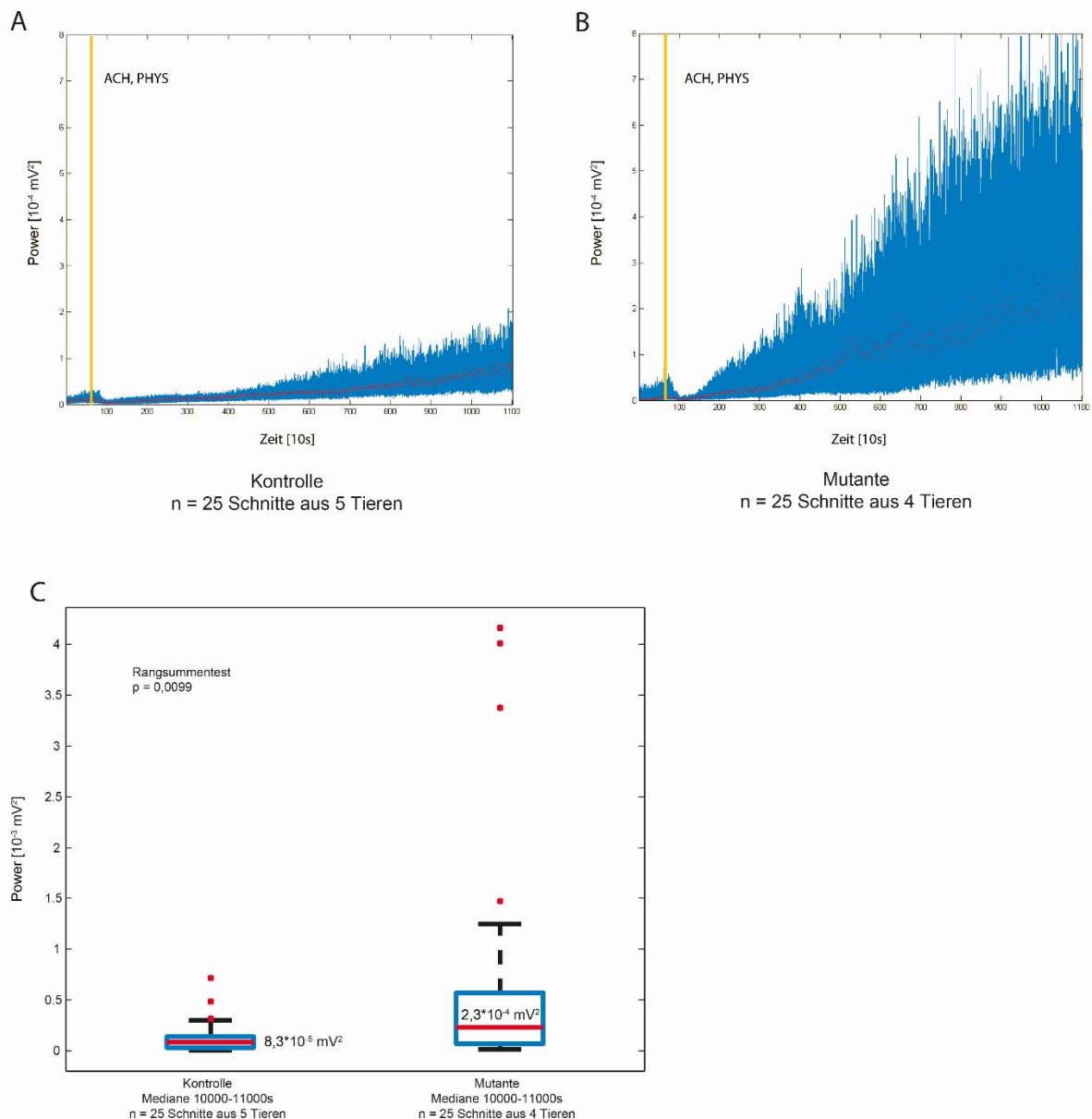


Abbildung 24 Powerunterschiede zwischen Kontrolle und Mutante unter Einfluss von 10 μ M ACH und 2 μ M PHYS **A & B** Verteilung der Power: dargestellt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das 2. und 3. Quartil (Blau) und der Median (rot). Einwasch der Drogen ist durch Linie (gelb) markiert **C** Boxplot der Mediane in der Zeit von 10000-11000 Sekunden

Oszillationen in der CA3-Region des Hippocampus werden durch das Einwaschen von 10 μ M Acetylcholin (ACH) und 2 μ M Physostigmin (PHYS) generiert. Der Einwasch ist so abgestimmt, dass die Pharmazeutika den Hirnschnitt bei 600s erreichen (in der Abbildung durch eine gelbe Linie markiert). In Kontrollmäusen führt das zur einer γ -Oszillation von 40,89 Hz (vgl. Abbildung 23 A und C); in der Mutant wird eine β - bis γ -Oszillation mit einem Median von 31,13 Hz generiert (vgl. Abbildung 23 B und C). Vergleicht man die Mediane des Zeitabschnitts 10000-11000 s einer jeden Aufnahme der beiden Gruppen in einem Rangsummentest gegeneinander, zeigt sich mit einem p-Wert kleiner 1% eine hochsignifikante Differenz ($p = 2,6 \cdot 10^{-6}$).

Betrachtet man die Power der Oszillation, fällt auf, dass, obwohl die Frequenz konstant bleibt, die Power über die Zeit stetig zunimmt (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25). Der Median der Power der

letzten 1000 s der Aufnahmen liegt bei den Kontrollmäusen bei $8,3 \cdot 10^{-5} \text{ mV}^2$ und bei den Mutanten bei $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ mV}^2$. Der Vergleich der beiden Gruppen über den Rangsummentest zeigt, dass der Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante mit $p < 1\%$ hochsignifikant ist ($p = 0,0099$).

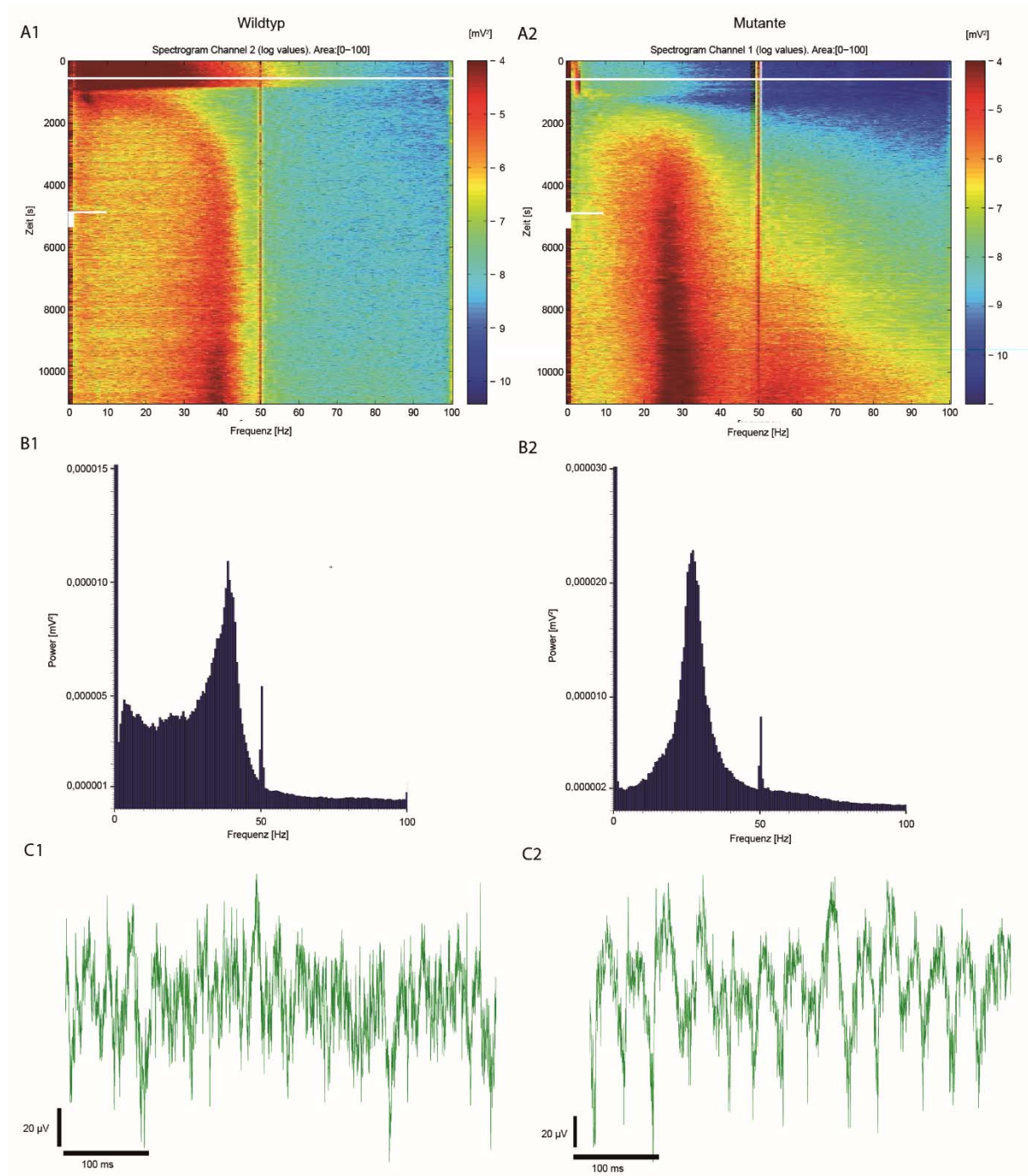


Abbildung 25 Beispielhafte Oszillation in der CA3-Region des Hippocampus in der Maus für Wildtyp und Mutante, induziert mit ACH und PHYS anhand einer exemplarischen Messung **1** Wildtyp **2** Mutante **A** 3D-FFT der gesamten Aufnahme. Durchgezogene weiße Linie markiert den Einwasch der Drogen **B** 2D-FFT von einem 500 s-Fenster markiert durch vertikalen Balken am linken Rand in **A** **C** Teil der Originalaufnahme bei 5000 s, Zeitpunkt markiert durch horizontale Linie am linken Rand in **A**. Aufnahme wurde nachträglich mit einem Butterworth-Notch-Filter der 3ten Ordnung von 48 Hz bis 52 Hz gefiltert, um größere Anteile des 50 Hz-Rauschens zu unterdrücken

Fazit

Sowohl im PrL, wie Hippocampus gibt es hoch signifikante Unterschiede zwischen WT und KO.

Während im PrL die Oszillationsfrequenz gegenüber dem WT um ca. 10 Hz zunimmt, fällt sie im Hippocampus um ca. 10 Hz. Auch ist die Power im Hippocampus um ca. 2,70-fache erhöht gegenüber der Kontrolle.

Messungen am MEA in coronalen PrL-Schnitten von NRG3-Knock-Out-Mäusen

Die ursprüngliche Idee bei der Etablierung eines mehrstufigen Messkonzeptes für akute Hirnschnitte war die effiziente Bestimmung raumzeitlicher Muster von extrazellulären LFPs nach definierter extrazellulärer Stimulation mittels der planaren Stimulationselektroden auf den MEAs. Diese erwiesen sich allerdings für akute Hirnschnitte als zu leistungsschwach. Alternativ wurden spontane raumzeitliche Muster von LFPs durch die Applikation von NMDA (10 μ M) und verschiedenen Konzentrationen von Dopamin pharmakologisch ausgelöst. Diese Muster von LFPs wurden in 10 ms Intervallen zeitlich ausgewertet. Alle LFPs innerhalb eines 10 ms-Intervalls galten als gleichzeitig. Die hier analysierten Muster erstreckten sich auf 3 bis 5 aufeinanderfolgende 10 ms-Intervalle (Länge 3-5). Im Messzeitraum von 1 Stunde kam es bis zu mehreren hundert solcher spontaner Muster der Länge 3-5. Diese Muster wurden daraufhin untersucht, dass für jedes Musterpaar derselben Länge ein Korrelationskoeffizient errechnet wurde. Danach wurde ein Korrelationsindex für jedes Experiment und die jeweilige Länge des Musters gebildet. Dabei wurden die Zahl der Muster mit einem Korrelationskoeffizienten von größer 0,7 mit 0,5 multipliziert und durch die Gesamtzahl der Muster einer Länge dividiert. Dies wurde für jedes Experiment für die Längen 3-5 durchgeführt. Dann wurde der mittlere Korrelationsindex über alle Längen und Experimente einer experimentellen Bedingung bestimmt. Diese Messungen wurden von meiner Kollegin Julia Neugebauer durchgeführt, die sich auf die Nutzung des MEA-Aufbaus spezialisiert hat und die Analyse spontaner Muster vorantreibt.

Die Auswertung der Ergebnisse der NRG3-KO-Mäuse ist in Abbildung 26 dargestellt. Für alle Dopamin-Konzentrationen ergibt sich ein signifikant reduzierter mittlerer Korrelationsindex. Dies deutet daraufhin, dass unabhängig vom Dopamin die Stabilität wiederkehrender Muster, das heißt deren Speicherung im Gewebe reduziert ist in NRG3-KO-Mäusen

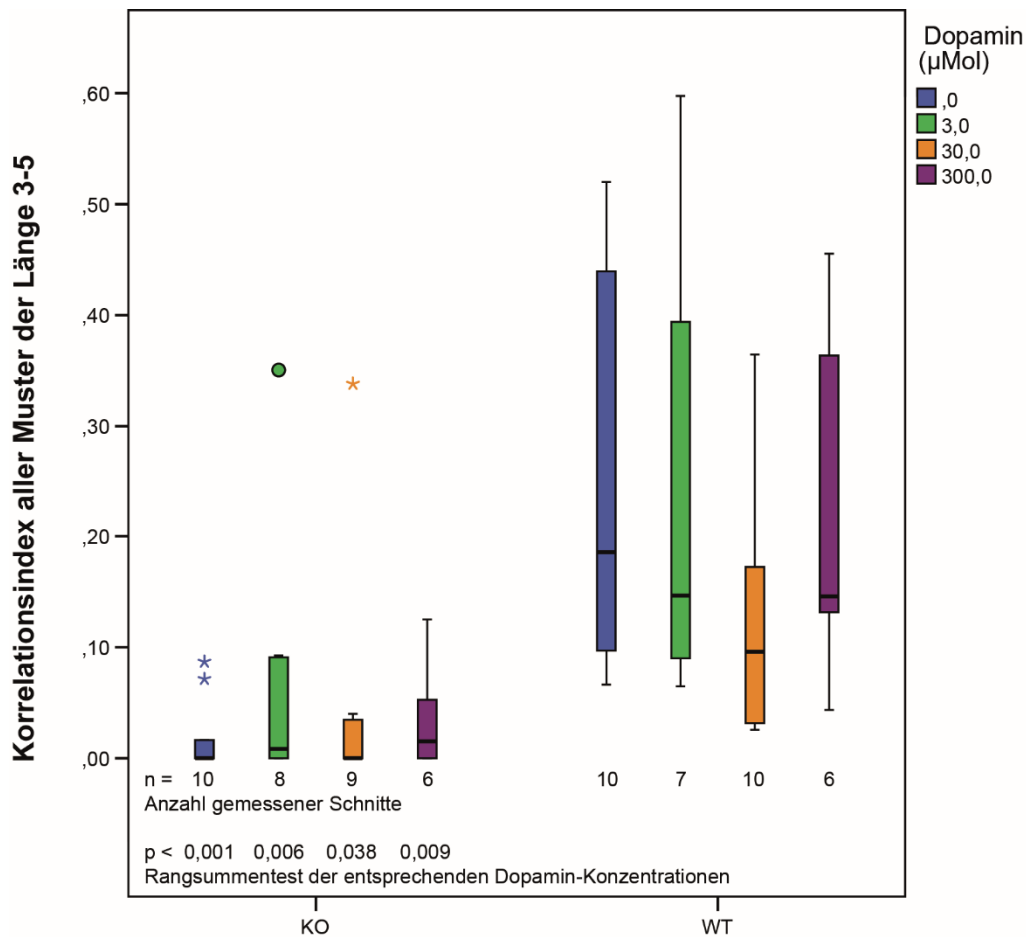


Abbildung 26 Darstellung von stark korrelierenden Mustern der Länge 3-5 im Verhältnis zu allen Mustern der Länge 3-5 bei NRG3-Mutanten und Wildtyp-Mäusen (vorläufige Ergebnisse). Bei allen Konzentrationen von Dopamin in PRL-Schnitten von NRG3-Mutanten kommt es signifikant seltener zu hoch korrelierenden Mustern als bei Wildtyp-Mäusen.

Fazit

Damit kann an diesen Ergebnissen exemplarisch demonstriert werden, dass die MEAs über die Analyse spontaner raumzeitlicher Muster von LFPs geeignet sind, zusätzliche Informationen über den Status von akuten Hirnschnitten zu liefern und somit als weitere Messstufe in der Gesamtanalyse zu dienen.

Patch-Clamp-Experimente an NRG3-KO-Mäusen

Die Benutzung eines Octa-Patch-Systems in großflächigen neuronalen Systemen, wie dem meist sechsschichtigen Neocortex oder dem Präsubiculum, ist hilfreich in der Analyse der Konnektivität. In einem dünnen Zellband wie dem Hippocampus oder *Gyrus dentatus* hilft einem dieser Aufbau allerdings wenig, da man die acht Messpipetten aufgrund sterischer Hinderung nicht nah genug aneinander positionieren kann. Aussagekräftige Konnektivitätsdaten sind über größere Entfernungen

schwerer zu erheben, da mit zunehmender Distanz der Zellen die Wahrscheinlichkeit von durchtrennten Axonen zunimmt. Zudem interessierten wir uns an erster Stelle spezifisch für die Konnektivität von Pyramidenzellen auf PV-positive Interneurone. Hier sind ungezielte Multi-patch-Ableitungen ohne großen Vorteil (siehe unten). Daher wurden für Konnektivitätsmessungen im Hippocampus und Schicht II/III des PrLs an einem weniger kompliziert zu bedienendem Patch-Clamp-Aufbau durchgeführt.

Patch-Clamp im PrL von NRG3-KO-Mäusen (vorläufige Ergebnisse)

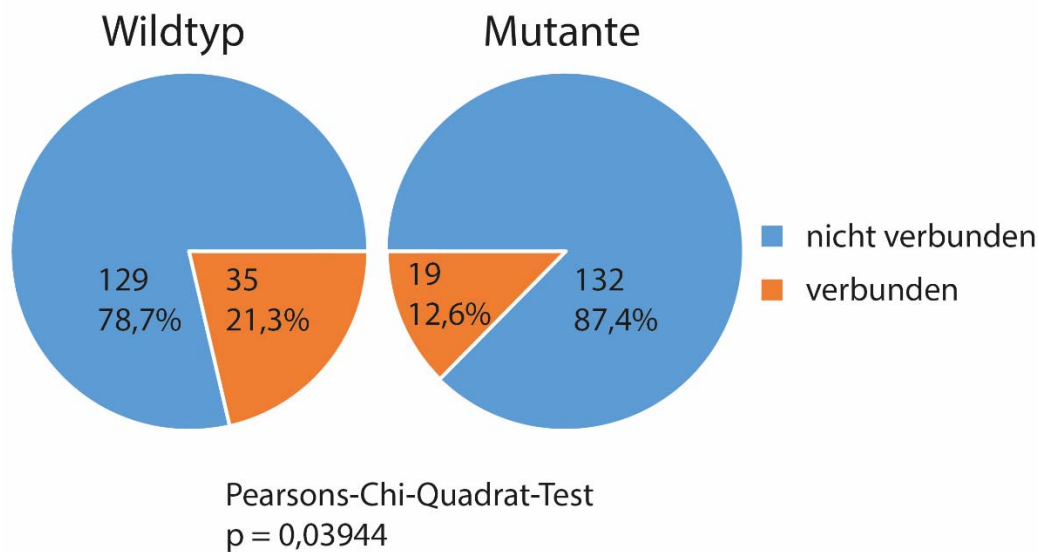


Abbildung 27 Konnektivität in WT und KO im PrL zwischen Pyramidenzellen und PV-positiven Interneuronen p=0,03944 in Pearsons Chi-Quadrat-Test

In Schicht II/III des PrLs von männlichen Maus wurde die Konnektivität zwischen Pyramidenzellen und PV-positiven Interneuronen getestet. Als Screening-Methode dient die lose zellverbundene Stimulation (Barbour and Isope, 2000), die es einem erlaubt mehrere Zellverbindungen zu testen, ohne die Pipette wechseln zu müssen. Expertin für diese Methode ist meine Kollegin Stéphanie Braud, die diese Experimente durchgeführt hat. Die von mir durchgeführte Analyse der Daten ergab, dass während im Wildtyp 21,3 % aller getesteten Pyramidenzellen Verbindungen zu PV-positiven Interneuronen aufweisen es in der Mutante nur 12,6 % sind. In einem Pearsons-Chi-Quadrat-Test ist der Unterschied mit $p = 0,03944$ signifikant (siehe Abbildung 27).

Zur Validierung dieser vorläufigen Ergebnisse werden allerdings noch weitere Zellverbindungen getestet. Des Weiteren wird die Ratio paariger Pulse (PPR) in Interneuronen ausgewertet werden.

Patch-Clamp in der CA1-Region des Hippocampus von NRG3-KO-Mäusen

In Aufnahmen von Miniatur-exzitatorischen-postsynaptischen-Strömen (mEPSC) von Projektionen von Prinzipalneuronen auf schnellfeuernde PV-positive Interneurone in NRG3-KO-Mäusen gemischten Geschlechts konnte kein signifikanter Unterschied in der Frequenz, Amplitude, Steigung, Varianz oder Zeitkonstante τ der Signale in der CA1-Region des Hippocampus zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden.

Darauf wurde die Konnektivität der Pyramidenzellen auf schnellfeuernde Interneurone mittels loser zellverbundener Stimulation (Barbour and Isope, 2000) getestet. Dabei zeigt sich, dass im Wildtyp ca. 26% aller getesteten Prinzipalneurone Verbindungen zu schnellfeuernden Interneuronen aufweisen, während es in der Mutante nur ca. 13% sind (siehe Abbildung 28 F), mit einem p-Wert $< 0,0001$ in einem Pearsons-Chi-Quadrat-Test.

In schnellfeuernden Interneuronen wurde die Ratio paariger Pulse (PPR) ermittelt (siehe Abbildung 28 C, D und E). Dabei zeigt sich ein fast signifikanter Unterschied in der ersten Pulsantwort zwischen WT und Mutante (siehe Abbildung 28 D, G und H) mit $p=0,0736$ in einem Rangsummentest. Die Ratio beider Pulse (siehe Abbildung 28 E) zeigt in einem Rangsummentest mit $p=0,0331$ Signifikanz, wobei diese unter Umständen durch den großen Unterschied des ersten Pulses zustande kommt.

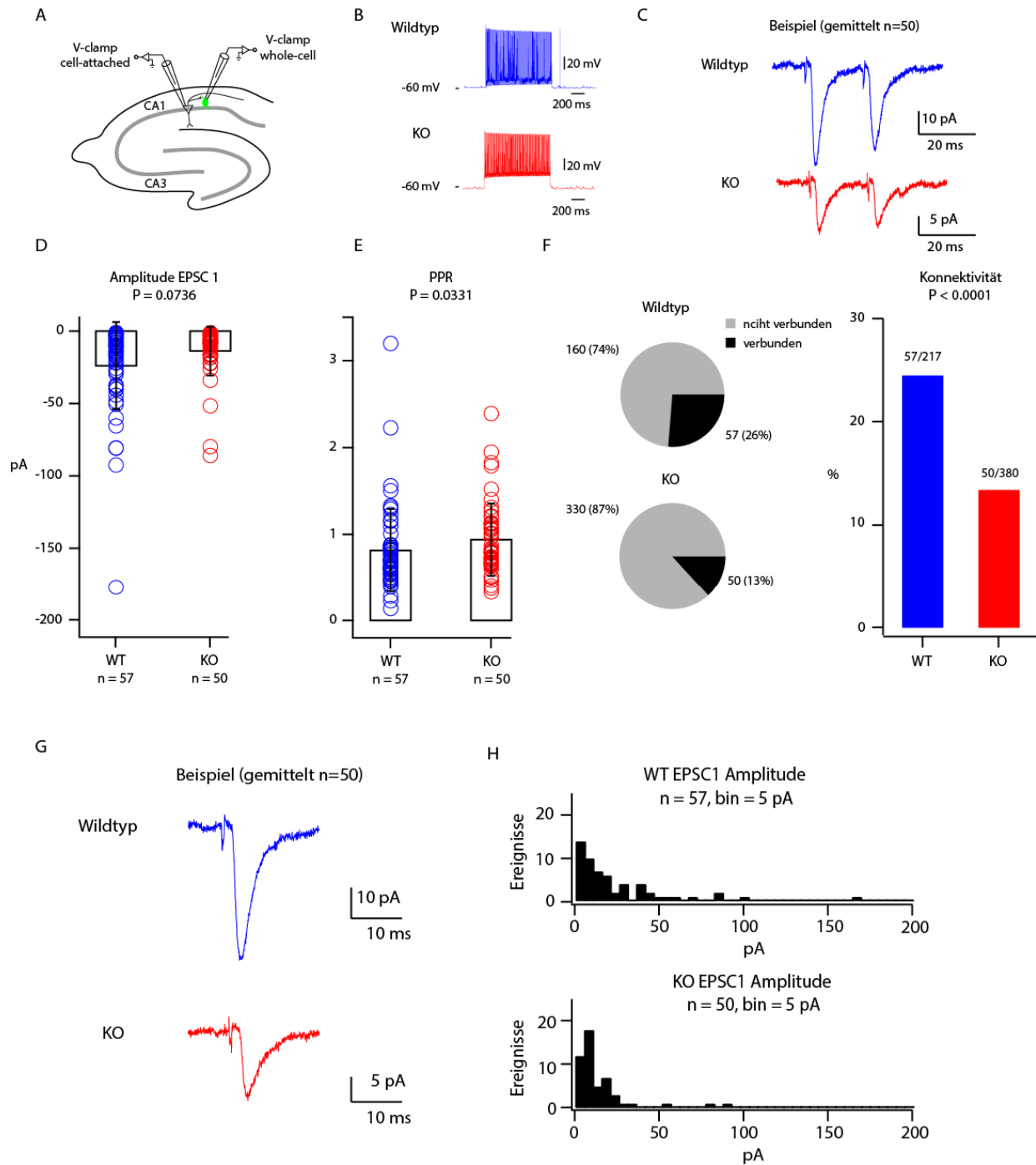


Abbildung 28 PPR und Konnektivität in WT und KO im CA1: **A** Darstellung des Ableitortes für PPR und Konnektivitätsmessungen **B** Beispiele von Pulsantworten schnellfeuernder Interneurone auf Pyramidenzellstimulation in WT und KO **C** Beispiel von PPR **D** Amplitude des ersten Puls als Mittelwert + SEM mit allen Messpunkten $p=0,0736$ in einem Rangsummentest **E** PPR als Mittelwert + SEM mit allen Messpunkten $p=0,00331$ in einem Rangsummentest **F** Konnektivität zwischen Pyramidenzellen und schnellfeuernden Interneuronen $p<0,0001$ in Pearsons Chi-Quadrat-Test **G** Beispiel für Pulsantworten schnellfeuernder Interneurone auf Pyramidenzellstimulation in Konnektivitätsmessungen **H** Histogramm der Amplitude des ersten Puls bei PPR

Fazit

Sowohl im PrL wie Hippocampus ist in KO-Tieren die die Konnektivität zwischen Pyramidenzellen und PV-positiven Interneuronen reduziert um ca. 50 % gegen über WT-Tieren reduziert. Auch ist das

Verhältnis paariger Pulse im Hippocampus signifikant verändert. Im PrL muss diese noch untersucht werden.

Ableitungen am Octa-Patch-Clamp-Aufbau (exemplarisch)

Der hier etablierte Octa-patch-clamp-Aufbau kam für die inhaltliche Analyse der NRG3-KO-Mäuse bisher nicht zum Einsatz, da wir uns gezielt auf die erregende Konnektivität PV-positiver Interneurone fokussiert haben und mit der oben beschriebenen Methodik schneller zum Erfolg kamen. Der Vorteil von acht simultanen Ableitungen ist das Testen von 56 potenziellen Verbindungen. Diese sind aber heterogen, wenn verschiedenen Neuronentypen involviert sind. Untersucht man 2 Zelltypen, wie in unserem Modell der NRG3-KO-Mäuse, sind nur eine kleinere Fraktion der Verbindungen des Interesses enthalten (z.B. 4 Pyramidenzellen in Kombination mit 4 Interneurone ergeben nur 16 getestete Pyramidenzell-Interneuronverbindungen und 40 Verbindungen außerhalb des Interesses). Deshalb war hier der kombinatorische Vorteil des Octa-Patch-Clamp-Aufbaus für unsere Analyse der NRG3-KO-Mäuse weniger nützlich. Der Nutzen ergibt sich bei Netzwerkanalysen, bei denen alle Verbindungen von Interesse sind und wenn es um die Analyse von höheren Konnektivitätsmotiven geht. Betrachtet man die mögliche Motivanzahl von einer Gruppe von drei Zellen, mit zwei möglichen Zelltypen, von den mindestens zwei Zellen miteinander verbunden sind, erhält man unter Berücksichtigung reziproker Verbindungen schon 84 Motive (siehe Abbildung 29)

Der hier etablierte Messaufbau fand daher in einer anderen Studie Anwendung. Die von meinem Kollegen Yan-Fang Peng durchgeführten Experimente im Präsubikulum der Ratte sind in Abbildung 30 exemplarisch dargestellt, um die Funktionalität und das Prinzip des Messaufbaus zu demonstrieren.

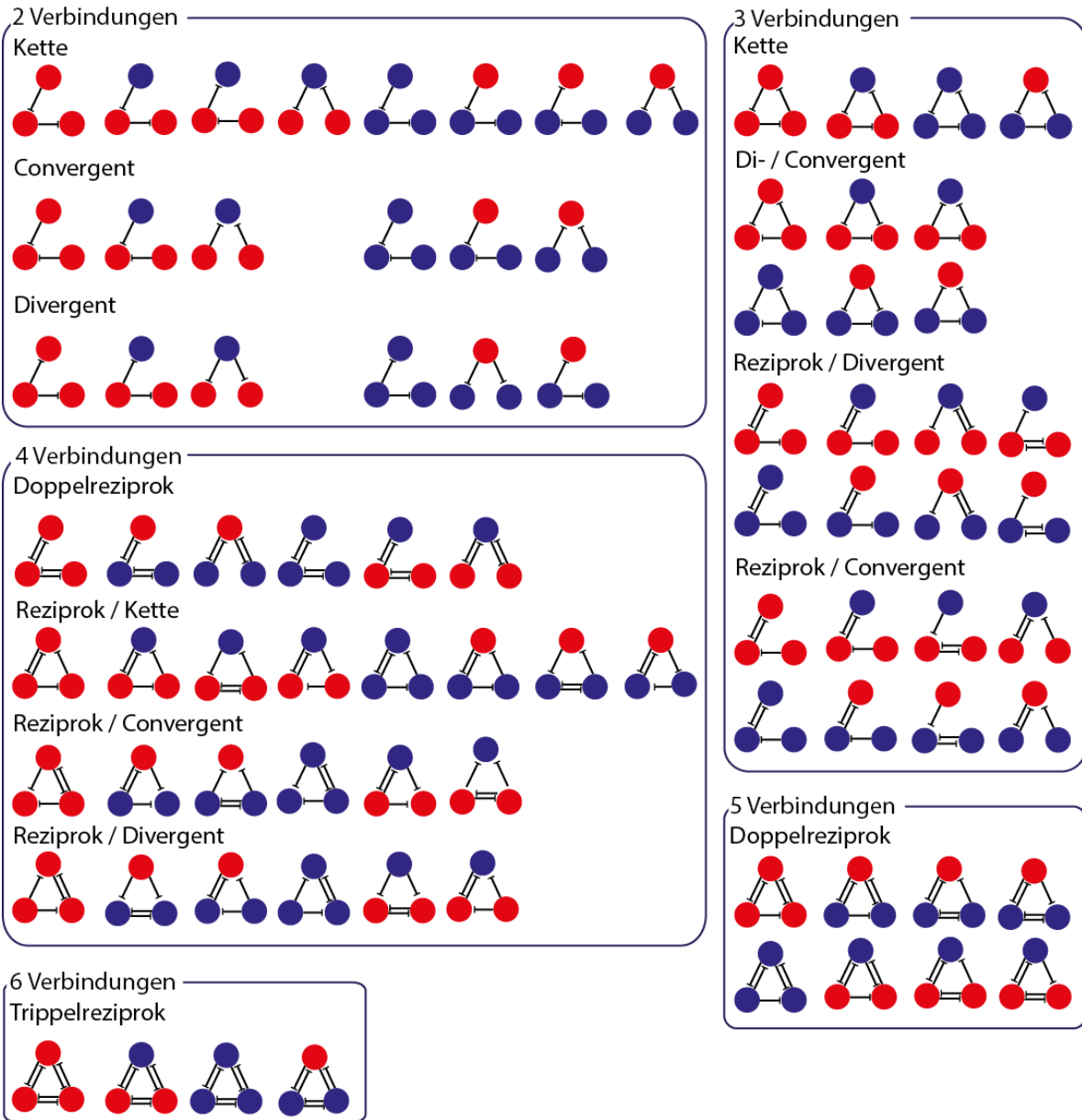


Abbildung 29 Mögliche Tripletkombinationen mit mindestens zwei verbundenen Zellen und zwei Zelltypen ergibt 84 unterschiedliche Motive

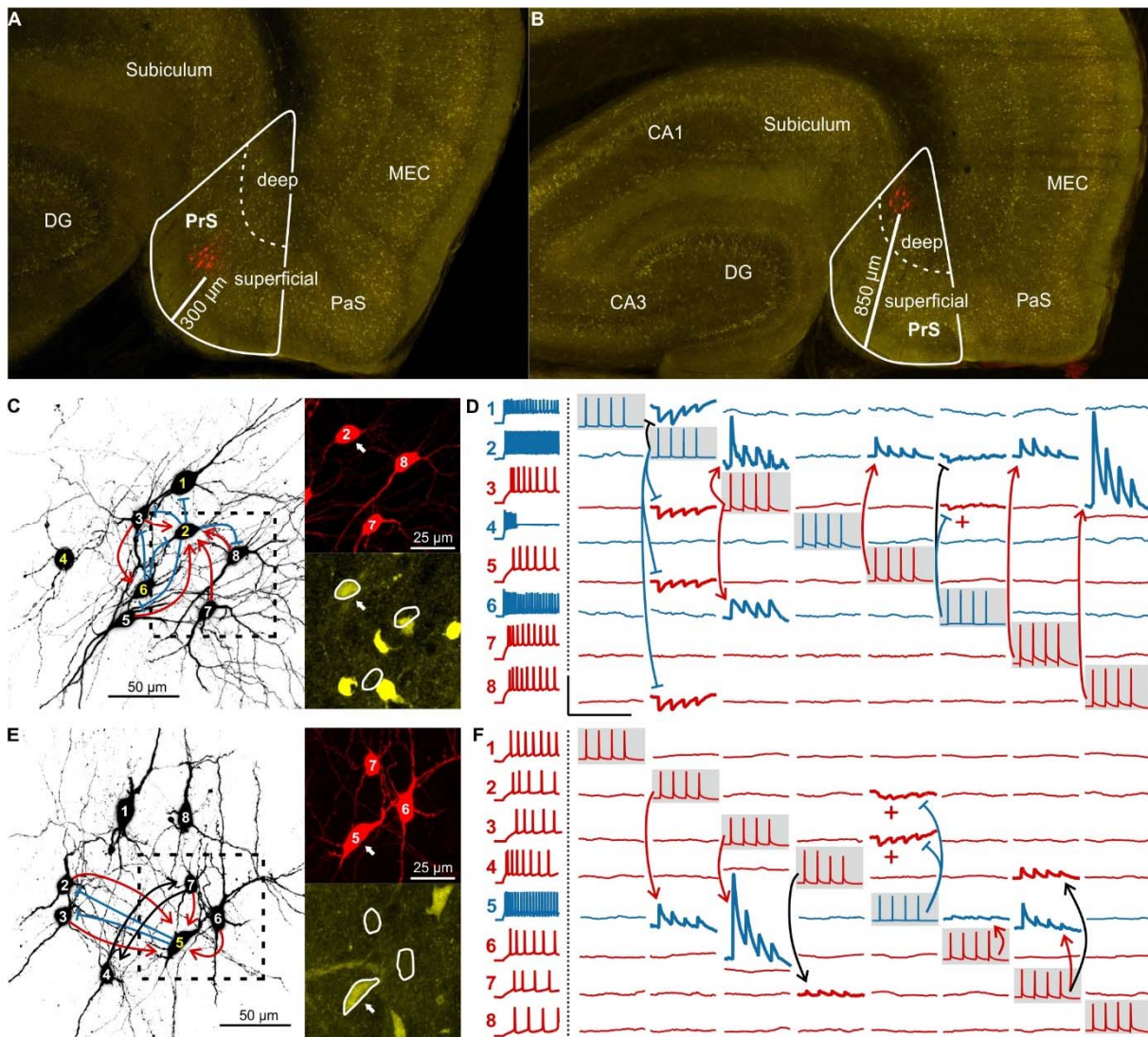


Abbildung 30 Multiple Ableitungen im Präsubiculum der Ratte; aus zukünftiger Veröffentlichung von Peng et alii **A** VGAT-YFP-Fluoreszenzbild des Hippocampus inklusive Gyrus dentatus (DG), CA3, CA1, und Subiculum. Daneben liegt der Parahippocampus mit seinen Subgebieten: Präsubiculum (PrS), Parasubiculum (PaS), und der medioenthorinale Cortex (MEC). In Rot sind die acht oberflächlichen und gleichzeitig vermessenen Zellen, mit Biocytin markiert. Der Abstand zur Oberfläche wird längs der dendritischen Achse gemessen. **B** in Rot sind acht Biocytin gefüllte und gleichzeitig gemessene Zellen in den tiefen Schichten des PrS gezeigt. **C** Links eine vergrößerte Darstellung der Zellen aus A; Pyramidenzellen sind mit weißen, Interneurone mit gelben Zahlen markiert. Blaue Pfeile repräsentieren inhibitorische Projektionen, rote Interneuronexzitation. Rechts ist das Mikroskopbild aus der gestrichelten Box; Rot die Biocytin gefüllten Zellen, gelb YFP-markierte Interneurone. YFP-Postives Interneuron ist mit einem Pfeil Markiert. **D** Gemittelte Aufnahmen der Strom-Klemme der Zellen aus A und C. Zu sehen sind elf synaptische Verbindungen von 56 möglichen getesteten. Das Antwortmuster der getesteten Zellen ist am linken Rand gezeigt. Interneurone sind blau und Pyramidenzellen rot dargestellt. Das mit vier Aktionspotentialen stimulierte Neuron ist mit einer grauen Box unterlegt, die Antworten der anderen Zellen auf die Stimulation sind in derselben Spalte dargestellt. Interneuronexzitation ist mit roten Pfeilen, Pyramidenzelleninhibition mit blauen Pfeilen und Verbindungen des gleichen Zelltypus mit schwarzen Pfeilen dargestellt. **E** Links eine vergrößerte Darstellung der Zellen aus B; Pyramidenzellen sind mit weißen, Interneurone mit gelben Zahlen markiert. Blaue Pfeile repräsentieren inhibitorische Projektionen, rote Interneuronexzitation. Rechts ist das Mikroskopbild aus der gestrichelten Box; Rot die Biocytin gefüllten Zellen, gelb YFP-markierte Interneurone. YFP-Postives Interneuron ist mit einem Pfeil Markiert. **F** Beispiel der Aufgenommenen Zellen aus B und Emit 8 von 56 getesteten synaptischen Verbindungen. Farbgebung und Pfeile wie in D. Maßstab in D und F: Horizontal 250 ms, vertikal 100 mV für Aktionspotentiale, 2 mV für postsynaptische Potentiale.

Diskussion

Oszillationen am Hexadeca-Interface-Aufbau

Oszillationen im Schnittpräparat lassen sich durch mehrere extrinsische Faktoren beeinflussen, wie z.B. Temperatur, Sauerstoffversorgung oder Geschwindigkeit der ACSF-Versorgung (Javedan et al., 2002; Huchzermeyer et al., 2008; Huchzermeyer et al., 2013; Schneider et al., 2015). Daher ist es unverzichtbar diese Parameter für jede einzelne Kammer kontrollieren zu können. Da die Temperatur der ACSF auch abhängig von der Pumpengeschwindigkeit ist, wurde Temperatur, sowie Pumpleistung alle vier Wochen kontrolliert und Verschleißteile, wie z.B. Pumpenschläuche regelmäßig ausgetauscht.

Ein Temperaturschreiber für die Messkammern ist hilfreich, da auf Grund von Spannungsspitzen häufig die Sicherungen der Heizeinheit durchgebrannt sind, und man somit zumindest Teile der Experimente verwerten könnte, die man sonst verwirft, da man nicht weiß, ab welchem Zeitpunkt die Temperatur den Soll-Wert zu stark unterschreitet.

Die Kontrolle der Carbogen-Durchflussrate musste jede Stunde erfolgen, und manchmal nachjustiert werden, der Druck des Hausgases häufig Schwankungen unterlag, verursacht durch stärkere Inanspruchnahme anderer Nutzer derselben Hausleitung. Dieses Problem ließe sich mit einer unabhängigen Gasversorgung vor Ort lösen. Jede Kammer 1,3 L Carbogen die Minute verbraucht. Bei einem Experiment von 3 h mit 4 Kammern entspricht das 936 L Verbrauch ohne die Ruhezeit nach Präparation für die Schnitte mit einzuberechnen. Allerdings muss die Versorgungseinheit dementsprechende Mengen fassen können und die Logistik für dementsprechend häufigen An- und Abtransport für Gasflaschen stimmen, da man ansonsten Gefahr läuft mitten im Experiment kein Gas mehr zu haben oder gegebenenfalls aufgrund von Lieferschwierigkeiten nicht experimentieren zu können.

Der Widerstand der Ableitelektroden lässt sich schwer konstant halten. Erstens variiert die Öffnungsgröße der Glaskapillaren. Zweitens tendieren manche Öffnungen mit zunehmender Messzeit zu verstopfen. Widerstandsmessungen vor und nach Ableitung zeigten, dass der Widerstand von 1 M Ω auf 11 M Ω ansteigen kann. Eine Möglichkeit für dieses Phänomen wäre Mikroglia, die die Pipettenöffnung verstopft. Dies wurde allerdings nicht weiter untersucht. Ein weiteres Problem bei mehreren Ableitungen in einer Kammer ist, dass man die Elektroden nicht zu dicht zu einander setzen kann, ohne dass die eine Pipette das Signal der anderen auffängt. Dabei ist es nicht von Bedeutung, ob die Ableitelektrode im Gewebe oder außerhalb platziert wird. Auch bilden sich an den Glaskapillaren Kondensstropfen, die man ca. alle 20 min vorsichtig entfernen muss, da das Abgleiten der Tropfen auf den Hirnschnitt die Oszillation stören können. Sowohl das Öffnungs-, wie das Signalauffangproblem könnte man mit Platinfaser-Elektroden (Reitboeck, 1983)

lösen. Einerseits wäre der Widerstand der Elektroden uniformer und andererseits könnte man statt Glas eine stärker elektrisch abschirmende Ummantelung wählen. Wenn man für die Ummantelung dabei noch ein Material mit besserer Wärmeleitfähigkeit als Glas wählt, könnte sich vlt. sogar das Problem der Kondensstropfen minimieren lassen.

Der Computer mit 16 Gigabyte Arbeitsspeicher lässt bei einer Abtastrate von 5000 Hz nur eine maximale Aufnahmedauer von ca. 3,5 h, beziehungsweise einer Dateigröße von knapp 2,2 Gigabyte zu. Für längere Aufnahmen braucht man dem entsprechend geringere Abtastraten, weniger Kanäle, einen leistungsstärkeren oder mehrere Computer.

Aus einer adulten Ratte kann man vom Hippocampus oder prälimbischen Cortex (PrL) 16 Schnitte erhalten. Üblicher Weise werden bis zu 4 Schnitte in einer Kammer des Haas-Typus (Haas et al., 1979) parallel vermessen, während die übrigen in einer weiteren Kammer gelagert werden um sukzessiv verwendet zu werden. Wenn eine Messung zwei bis drei Stunden ohne Vor- und Nachbereitungszeit dauert, kann man meist nicht alle Schnitte an einem Arbeitstag für Experimente verwenden, was zu einem unnötigen Verlust des Ausgangsmaterials führt. Die Möglichkeit 16 Schnitte parallel messen zu können erweist sich dabei für uns aus mehreren Gründen als Optimal. Einerseits gibt es wenige Analog-Digital-Wandler, die es einem erlauben 16 - geschweige denn mehr - Kanäle gleichzeitig zu belegen; andererseits kann man bei einer Schnittdicke von 400 μm bei einem Rattengehirn 16 Schnitte aus dem Hippocampus oder dem PrL erhalten oder bei der Maus 8 von jedem der beiden untersuchten Hirnregionen. Das parallele Messen verhindert auch Fehler durch unterschiedliche Lagerungszeiten der Schnitte und führt zu einer maximalen Ausbeute von Versuchsmaterial bei minimaler Verlängerung der Arbeitszeit pro Experimentierzyklus.

Oszillationen im prälimbischen Cortex von *Rattus norvegicus wistar*

Versuche, die im Hippocampus etablierten Oszillationsprotokolle mit 10 μM ACH und 2 μM PHYS (Huchzermeyer et al., 2008) im PrL in Rattenschnitten im postnatalen Alter von >60 Tagen umzusetzen, blieben leider erfolglos. Auch KA bis 800 nM konnte im PrL, im Gegensatz zum Hippocampus (Cunningham et al., 2003), keine Oszillation hervorrufen. Auch die Kombination von 10 μM ACH, 2 μM PHYS und bis zu 800 nM KA blieb erfolglos. In neonatalen coronalen Rattencortexschnitten (Kilb and Luhmann, 2003) und in PrL-Schnitten von Ratten im postnatalen Alter von 14-28 Tagen (van Aerde et al., 2008) ließen sich Oszillationen mit CCH-Konzentrationen von 25 μM induzieren. Da sich CCH schlecht auswaschen lässt (Colgin et al., 2003) und wir Experimente mit nikotinischen Antagonisten durchführen wollten, entschlossen wir uns eine geringe Konzentration von CCH (5 μM) und 800 nM KA auszuprobieren. Mit dieser Kombination ließen sich γ -Oszillationen induzieren, während andere Veröffentlichungen mit einem reinen CCH-Model im PrL

nur Oszillationen im α - bis β -Band generieren konnten (Kilb and Luhmann, 2003; Mansvelder et al., 2006; van Aerde et al., 2008). Die Unterschiede in der Frequenz der Oszillation können einerseits entwicklungsabhängig sein, oder aber wachstumsabhängig bzw. präparationsabhängig, in dem Sinne, dass mit zunehmender Größe des Gehirns und der Zellen die Netzwerkintegrität durch die verschiedenen kortikalen Schichten in einem 400 μ m Schnitt weniger gewährleistet wird. Kilb und Luhmann (Kilb and Luhmann, 2003) konnten zeigen, dass CCH induzierte Oszillationen abhängig von exzitatorischen Netzwerken sind, die sowohl NMDA-Rezeptor als auch muscarinergen Rezeptoren gesteuert sind, während AMPA/Kainsäure-Rezeptorantagonisten und GABA-Rezeptorantagonisten die Oszillation nicht unterbinden konnten. Kurowski *et alii* (Kurowski *et al.*, 2015) konnten zeigen, dass Pyramidenzellen der Schicht V des mPFC von Ratten durch muscarinerge M1-Rezeptoren depolarisiert werden. Dies steht im Einklang mit unserer Observation, dass der M1-3 Antagonist Oxybutynin mit einer Konzentration von 10 nM die Oszillationen zum Erliegen bringt. Auch wenn AMPA/Kainsäure-Rezeptoren nicht nötig sein sollten eine CCH induzierte Oszillation aufrecht zu halten, so ist wohl eine grundlegende Netzwerkexzitation notwendig für Oszillationen. 800 nM KA scheinen dabei stärker exzitatorisch auf das gesamte Netzwerk zu wirken, als 25 μ M CCH. Die stärkere Exzitation kann dabei auch der Grund sein, warum wir im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen Oszillationen mit höherer Frequenz beobachten.

Ein bisher unbeschriebener Effekt in PrL-Oszillationen in der Ratte ist das über die Zeit langsame Absinken der Frequenz (5 Hz im Verlauf von 2,7 h), während die Power nach circa 5000 s ein Plateau erreicht und auch hält (Abbildung 13 A, B, E, F und Abbildung 17). Auch für andere Hirnregionen ist uns eine vergleichbare Beschreibung unbekannt. Auch die Aufnahmen im Maus PrL scheinen nicht einem solchen Effekt zu unterliegen (vgl. Abbildung 20). In Langzeitaufnahmen von Oszillationen im Hippocampus von Mäusen und Ratten bleibt die Frequenz nach Erreichen ihres Maximums stabil (vgl. z.B. Abbildung 23). Dass sich bei der Änderung der Frequenz im PrL der Ratte die Power ein Plateau erreicht und hält, spricht gegen die Annahme, dass sich die Menge an rekrutierten Zellen oder deren Synchronizität im Netzwerk verändert. Es könnte sich um einen metabotropen muscarinergen Rezeptor M1-M3 oder einen kalziumabhängigen über AMPA-Rezeptoren vermittelten Effekt handeln. Eine andere Möglichkeit sind α 7-Rezeptoren, die auf Schicht II/III Pyramidenzellen und schnellfeuernden Interneuronen exprimiert werden oder α 4 β 2-Rezeptoren in Schicht I Interneuronen, und über ihren Kalzium-Einstrom (Seguela et al., 1993; Tapia et al., 2007) Einfluss auf verschiedenen Signalwege ausüben können. Dies muss allerdings erst noch mit den dementsprechenden Drogen oder ACSF mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen geprüft werden.

Auch wenn es einen entwicklungsabhängigen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Expression von nikotinischen Rezeptoren gibt (Alves et al., 2010), können wir keinen Einfluss auf die

Oszillationen in Ratten älter als 60 Tage feststellen (siehe Abbildung 13). Zur Reduzierung der Versuchstiermenge wurden daher in den folgenden Oszillationsversuchen nur Männchen verwendet.

Um später Versuche mit nikotinischen Antagonisten durchführen zu können, testeten wir in wie weit die Gabe von 10 μ M ACH und 2 nM PHYS das CCH/KA-Oszillationsmodell beeinflusst (siehe Abbildung 17). Man erkennt hier beim Vergleich der Mediane zwischen 5000-6000 s und 10000-11000 s eine signifikante Zunahme der Frequenz und eine hochsignifikante Zunahme Power. Dies zeigt, dass mit unserem CCH/KA-Modell noch nicht alle cholinergen Rezeptoren angesprochen und sowohl Frequenz als auch Power cholinerg moduliert werden.

Die nikotinischen Antagonisten TMPH und DH β E haben keinen Einfluss auf die Frequenz der mit CCH/KA/ACH/PHYS induzierten Oszillation. Allerdings führen diese Antagonisten zu einer signifikanten Zunahme der Power (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Einerseits kann das heißen, dass mehr Zellen für die Oszillation rekrutiert werden, wenn man nikotinsche α 4 β 2-Rezeptoren im PrL inhibiert, andererseits könnten die bisher rekrutierten Zellen stärker synchronisiert werden. Es gibt mehrere Verschaltungsmöglichkeiten zwischen Schicht I und Schicht II/III, die das erklären könnten (siehe Abbildung 32). Der Hauptoszillator scheint nicht direkt von α 4 β 2-Antagonisten beeinflusst zu werden. Dies trifft auf die uns bekannte Kombination von Korbzelle und Pyramidenzelle zu, die laut Literatur auch keine α 4 β 2-Rezeptoren aufweist (dos Santos Coura and Granon, 2012; Poorthuis et al., 2013) (siehe Abbildung 31). Für die Rekrutierung von mehr Zellen zur Oszillation gibt es nach dem hier aufgezeigten und der Literatur hergeleiteten Schaltbild zwei Möglichkeiten (siehe Abbildung 32). Entweder gibt es eine direkte Verbindung eines nikotinsch aktivierbaren Schicht I Interneurons auf den Oszillator oder man hat zwei miteinander verbundene nikotinsche Interneuronen, die dann auf den Oszillator projizieren. In beiden Fällen würde die Gabe von α 4 β 2-Antagonisten zur Disinhibition des Netzwerks führen. Im Vergleich zum ersten Fall würde im zweiten Fall die Gabe von nikotinschen Agonisten wahrscheinlich zu einer schwächeren Inhibition und α 4 β 2-Antagonisten zu einer schwächeren Disinhibition des Netzwerks führen. Zur Synchronisationskontrolle bietet sich die Verschaltung eines Interneurons mit α 4 β 2-Rezeptoren mit einem ohne diese Rezeptoren an, das wiederum auf den Oszillator projiziert. Um zu testen, ob Rekrutierung, Synchronisation oder beides gleichzeitig stattfindet, könnte man PrL-Schnitte im MEA unter Verwendung des gleichen Protokolls, wie in den Interface-Kammern benutzt, messen. Da man bei dem von uns verwendeten Oszillationsprotokoll allerdings in circa 1/3 der gemessenen Schnitte Oszillation induzieren konnte, empfiehlt sich die gleichzeitige Ableitung mit einer Feldelektrode zur Kontrolle. Inwieweit die in Abbildung 32 dargestellten Modelle funktionsfähig sind, ließe sich in Simulationsmodellen überprüfen. Inwieweit die hier dargestellte Verschaltung des Netzwerks den Einfluss auf die Oszillation nimmt, ließe sich in Multi-Patch-Clamp versuchen herausfinden. Vorteilhaft wäre es, wenn im Modellorganismus verschiedene Interneuronmarker, wie SOM, PV oder

CCK, mit unterschiedliche Fluoreszenzen markiert wären, um die Identifizierung der verschiedenen Interneurontypen zu erleichtern.

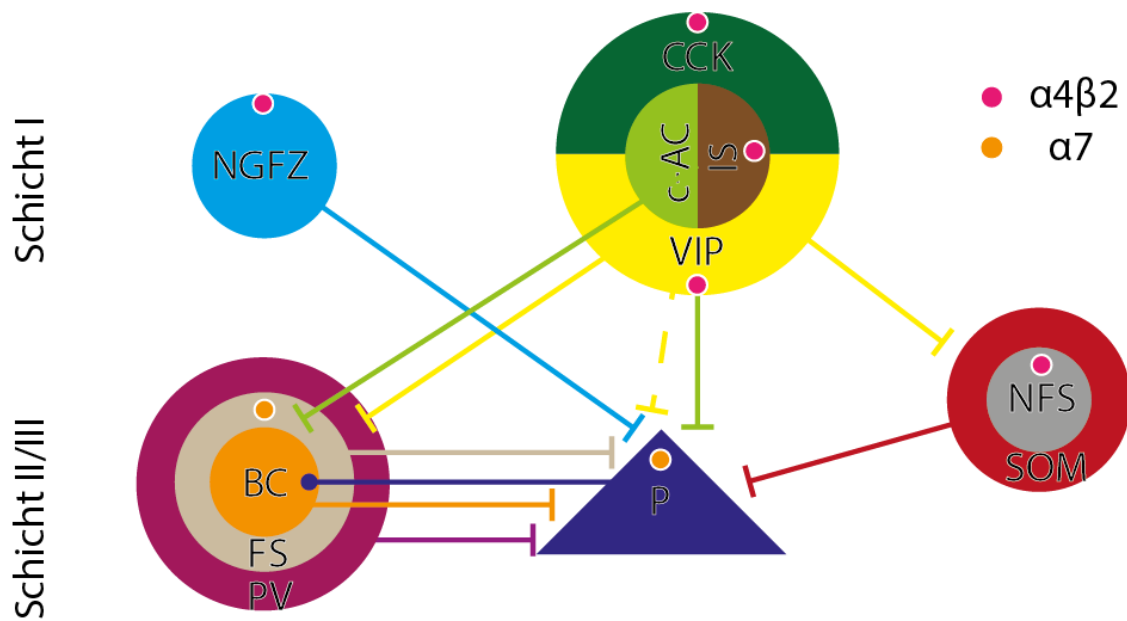


Abbildung 31 Vereinfachte Darstellung der Verschaltung und nAChR-Lokalisation im PrL (nach Abbildung 2) **NGFZ** neurogliaforme Zelle **VIP** vasointestinales Peptid positives Interneuron **c-AC** klassische akkomodierende Zelle **CCK** Cholecystokin positive Zelle **IS** irreguläre feuernde Zelle **BC** Korbzelle **P** Pyramidenzelle **SOM** Somatostatin positive Zelle **PV** Parvalbumin positive Zelle **FS** schnell feuerndes Interneuron **NFS** nicht schnellfeuerndes Interneuron

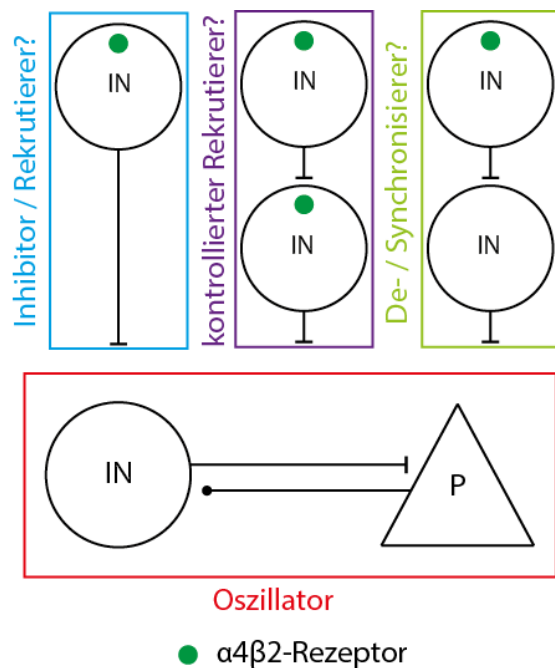


Abbildung 32 Mögliches Model zur Erklärung der nikotinischen antagonist-vermittelten Disinhibition des Netzwerks. **IN** Interneuron **P** Pyramidenzelle

Oszillationen im prälimbischen Cortex von NRG3-Knock-Out-Mäusen

Im PrL der Wildtypmaus ist die Oszillation, im Verhältnis zur Ratte, im Median fast 25 Hz niedriger (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 20). Dies kann einerseits an einem, auf Grund von kleineren Zellkörpern, besser erhaltenem Gesamtnetzwerk liegen, was zu einem höheren Einfluss der tieferen Zellschichten führen könnte, andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Zellen anders verschaltet sind oder die Rezeptoren für ACH und/oder KA anders verteilt sind als bei der Ratte. Im Gegensatz zur Ratte scheint die Frequenz der Oszillation mit der Zeit auch nicht zu sinken, was allerdings auch an den wesentlich niedrigeren gemessenen Frequenzen liegen kann.

In der NRG3-Deletionsmutante ist, im Vergleich zum Wildtyp die Oszillation im Median 9 Hz höher (vgl. Abbildung 20). Im Frontalen Cortex von Mäusen ist die ErbB4-Expression auf Interneurone beschränkt (Neddens et al., 2011). In *post mortem* Studien von Gehirngewebe des präfrontalen Cortex von schizophrenen Patienten wurde ein erhöhtes NRG3-Niveau gefunden (Kao et al., 2010). Außerdem haben Schizophreniepatienten eine geringere oszillatorische Grundaktivität im PFC (Ferrarelli et al., 2008; Ferrarelli et al., 2012). Diese und unsere eigenen Beobachtungen sprechen dafür, dass die höhere Oszillationsfrequenz in der Mutante in einem antiproportionalen Zusammenhang mit der NRG3-Expression oder ErbB4-Aktivierung steht. Das bedeutet, dass ein niedriges NRG3-Niveau und höhere oszillatorische Grundaktivitäten im PFC mit geringerer Impulsivität und Risikobereitschaft einhergehen, was durch Verhaltensexperimente in Mäusen mit NRG3-Überexpression und Injektion von ErbB4-Kinase-Inhibitor in den PFC von Ratten demonstriert werden konnte (Loos et al., 2014; Loos et al., 2016). Für Patienten mit ausgeprägten impulsiven Verhalten, konnte gezeigt werdend, dass mittels transkranieller Stimulation des PFC die Risikobereitschaft in Verhaltenstests gesenkt werden konnte (Cheng and Lee, 2016). Ebenso trägt die Blockade des GABAergen Systems im PFC von Ratten zu erhöhter Risikobereitschaft und Aufmerksamkeitsstörungen bei (St Onge and Floresco, 2010; Paine et al., 2011; Paine et al., 2015). In Verhaltenstests von NRG3-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Mutante Aufmerksamkeitsstörungen und Probleme mit dem sensorischen Gating in präpulsinhibitorischen Test hat (Hayes et al., 2016).

In Experimenten in konditionalen Interneuron-ErbB4-KO-Mäusen, kann gezeigt werden, dass in Interneuronen nach Verlust von ErbB4 mehr Miniatur-exzitatorische-postsynaptische-Signale findet (Del Pino et al., 2013). Durch die Aktivierung von ErbB4 durch Neureguline wird die GABA-Ausschüttung erhöht und dadurch die Funktion von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren unterdrückt (Woo et al., 2007; Chen et al., 2010; Wen et al., 2010; Vullhorst et al., 2015). Die veränderten Feuerraten von Pyramidenzellen und Interneuronen von ErbB4-Mutanten können die erhöhte Oszillationsfrequenz im PrL der NRG3-Mutante erklären (vgl. Abbildung 20) (Del Pino et al., 2013; Yang et al., 2013), allerdings gibt es keine ursächliche Erklärung, wie es dazu kommt. Del Pino et

alii konnten, ebenso wie wir in der NRG3-Mutante, im PrL keinen signifikanten Unterschied in der Power in Aufnahmen mit Feldelektroden zwischen Wildtyp und Mutante feststellen.

Für die verringerte Impulsivität bei Störung des ErbB4-NRG3-Systems ist der PFC verantwortlich (Loos et al., 2014;Loos et al., 2016). Dieses mit der von uns gemessenen erhöhten Oszillationsfrequenz im PrL in den NRG3-KO-Mutanten vereinbar (vgl. Abbildung 20), da eine höhere Frequenz mit höheren mentalen Aufgaben, Integration von Information und Konzentration assoziiert ist (Singer and Gray, 1995;Whittington et al., 2011).

Bisher konnten für ErbB4-Mutanten nur Unterschiede in der Feuerrate von Neuronen und in Synapsendichte festgestellt werden, während für Miniatur postsynaptische Ströme keine Veränderungen festgestellt werden konnten (Del Pino et al., 2013;Yang et al., 2013). Eine Inhibition oder Aktivitätsverlust der Interneurone in den oberen drei Schichten (vor allem I, die vornehmlich aus Interneuronen besteht) des Cortex (vgl. Abbildung 2) könnte eine Ursache für die erhöhte Oszillationsfrequenz sein. Schicht I Interneurone könnten, da sie auf exzitatorische wie inhibitorische Zellen projizieren, Veränderungen in den Feuerraten in Interneuronen und Pyramidenzellen in Schicht II/II erklären. Die genaue Ursache bleibt ungeklärt. Die Untersuchung des Einflusses von „Schicht I“-Interneuronen auf die Oszillation in „Schicht II/III“-generierte Oszillationen mittels multipler Patch-Clamp-Ableitung könnte helfen die Netzwerk- und Verhaltensveränderungen in NRG3-Deletionsmutanten auf zellulärer Ebene zu erklären.

Oszillationen im Hippocampus von NRG3-Knock-Out-Mäusen

Bei Aufnahmen von Feldpotentialen in der CA1-Region konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Frequenz und Power der Oszillation von Kontrolle und Mutante feststellen, nur die Grundaktivität in der Mutante nach FFT-Analyse scheint erhöht. In der CA3-Region ist der Unterschied in beiden Messgrößen signifikant (vgl. Abbildung 23 & Abbildung 24). Während die Frequenz der Mutante im Verhältnis zur Kontrolle im Median um fast 9 Hz fällt, steigt die Power auf über das Doppelte an. Ähnlich wie im PFC, spricht die Veränderung der Frequenz für ein durch NRG3-Mangel verursachtes Ungleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition. Allerdings scheint der Mechanismus im CA3 grundlegend anders zu funktionieren, da die Frequenz im Gegensatz zum PrL abfällt. Dies könnte an den unterschiedlichen Organisationsprinzipien zwischen Allo- und Neocortex liegen. Im Hippocampus scheint der Ort der Innervation der PV-positiven Zellen und der Pyramidenzellen Einfluss auf die γ -Oszillation zu haben (Lasztocki and Klausberger, 2014). Das und die unterschiedlichen Auswirkungen der NRG3-Deletion im PFC und Hippocampus macht es wahrscheinlich, dass die Veränderungen der Oszillation vor allem von Interneuronen stammen, die Einfluss auf den Oszillator haben, und nicht unbedingt der Oszillator selber Veränderungen erfährt.

Des Weiteren steigt die Power in Kontrolle wie Mutante über den gesamten Zeitraum der Aufnahme konstant an, was als Phänomen bisher noch unbeschrieben ist (vgl. Abbildung 24). Dabei ist die Power in der Mutante mehr als doppelt so groß, was für eine Disinhibition des Netzwerkes spricht. Während im PrL in der Ratte (vgl. Abbildung 13) und Maus (Abbildung 15) nach circa 1,5 h ein Plateau in der Power erreicht wird, ist im Hippocampus selbst nach 3 h noch kein maximaler Endwert erreicht. Es stellt sich die Frage, ob die Oszillation stärker synchronisiert wird, ob mehr Zellen rekrutiert werden und wann ein Plateau der Power erreicht wird. Zur Klärung ob mehr Zellen rekrutiert werden und inwieweit sich das oszillierende Feld ausweitet, bieten sich Messungen am MEA an.

In Aufnahmen von Miniatur-exzitatorischen-postsynaptischen-Strömen in schnell feuernden PV-positiven Interneuronen im CA1 konnten wir keinen Unterschied zwischen Wildtyp und NRG3-Mutante feststellen. Andere Arbeiten konnten in ErbB4-Modellen ebenfalls keine Unterschiede feststellen (Del Pino et al., 2013). Es wäre aber durchaus von Interesse mittels Multi-Patch-Clamp aufzubauen zu untersuchen, inwieweit unterschiedliche Interneurontypen von Veränderungen durch einen NRG3-Knock-Out betroffen sind, was der Beitrag der einzelnen Typen zur Modulation der Oszillation ist und ob es Verschiebungen in der Konnektivität oder der Verbindungsmotive (vgl. Abbildung 29) im Verhältnis zur Kontrolle gibt.

MEA

Die Absaugung in den MEA-Kammern bringt durch das Abreißen der Oberflächenspannung am Absaugstutzen und der damit entstehenden Schwingung ein niederfrequentes Artefakt in die Messung. Dies ließe sich vermeiden, indem man die ACSF nicht direkt in der Messkammer selbst absaugen würde, sondern separat in einem Überlaufbecken. Dafür müsste man an dem Überlauf einen Mechanismus zum Brechen der Oberflächenspannung einbauen, wie zum Beispiel eine Nut, die einen kontinuierlichen Abfluss des Wassers ermöglicht. Ein Überlaufbecken hätte auch den Vorteil, dass man den ACSF-Stand in der Messkammer sowohl konstant, als auch niedrig halten kann, was eine bessere Versorgung des Schnittes mit Sauerstoff mit sich bringen würde.

Das USB-MEA32-STIM4 erwies sich allgemein nicht als die beste Entscheidung; und wird vom Hersteller auch nicht mehr produziert. Obwohl es seinen Aufgaben wie beschrieben nachkommt, so fehlen z.B. Eingänge, um die Stimulation durch externe Geräte zu triggern und die Aufnahme damit automatisch einzuleiten. Auch die in den MEA-Chip eingebauten Stimulationselektroden hatten für die von uns einstmals angedachten Stimulationsprotokolle nicht genügend Leistung.

Von Vorteil sind die mit dem MEA-System zu benutzenden pMEA, bei denen zwischen den Ableitelektroden kleine Löcher im Chip sind, wodurch man den Schnitt einfach und ohne zu große

mechanische Belastung mittels Unterdruck fixieren kann. Außerdem ist dadurch ein besserer Kontakt zwischen Elektrode und Hirnschnitt gesichert.

Ähnlich dem Interface-Kammer-Aufbau ließen sich ohne Probleme mehrere MEAs gleichzeitig bedienen. Bei vielen Parametern, wie z.B. der Musteranalyse, ist die Varianz sehr hoch (vgl. Abbildung 26). Mehrere Messstationen helfen einem die Versuchsanzahl zu erweitern und somit validere Aussagen treffen zu können. Das gleichzeitige Messen der Schnitte verhindert auch Messfehler, hervorgerufen durch längere Akutschnittlagerung und bringt somit eine konstantere Schnittqualität mit sich.

Dopamin induzierte Muster im PrL von NRG3-KO-Mäusen

Die signifikant schwächer ausgeprägte Stabilität wiederkehrender Muster von LFPs in den NRG3-Mutanten zeigt, dass die Netzwerkeigenschaften im PrL eine geringere Speicherkapazität für Muster bzw. weniger stabile Eigenschaften bei der Informationsverarbeitung aufweisen.

Dieser Befund weist im Einklang mit den veränderten Oszillationen auf veränderte lokale Netzwerkmechanismen hin, die mit Methoden Zellulärer Aufklärung aufzulösen sind (siehe unten). Die veränderte Leistungsfähigkeit dieser Mutante befindet sich in guter Übereinstimmung zu veränderter Impulsivität und Aufmerksamkeit (Loos et al., 2014; Loos et al., 2016).

Patch-Clamp Messungen

Messungen am Octa-Patch-Clamp-Aufbau

Der Zeitaufwand für eine einzelne Messung nimmt mit der Anzahl an Mikromanipulatoren zu. Das Arbeiten mit acht Manipulatoren ist äußerst anspruchsvoll, allerdings noch von einem Experimentator zu bewältigen. Arbeiten mit zehn Mikromanipulatoren wäre auch noch denkbar, allerdings mit den von uns gewählten Manipulatoren eine große sterische Herausforderung. Alles drüber hinaus lässt sich mehr und mehr nur mit größerer Automation der Arbeitsprozesse vollbringen.

Die programmierbare Position für die Mikromanipulatoren ist eine enorme Arbeitserleichterung und hilft, die acht Pipetten schnell auf eine Ebene in der Patch-Kammer zu bringen, ein Abbrechen der Pipetten zu vermeiden und acht Zellen zügig hintereinander zu Patchen, ähnlich dem von Perin *et alii* beschriebenen Prozess (Perin and Markram, 2013). Nichtsdestotrotz ist die Anwenderfreundlichkeit der meisten Programme nicht sonderlich ausgereift und Bedienbarkeit häufig contra intuitiv. Dies ist ein nicht zu unterschätzendes Problem, da schlecht ausgeführte Programme Lernprozesse verlängern und Problemlösungen bei akuten Software-Komplikationen erschweren. Programme müssen so angepasst werden, dass auch Computer- und Softwareunerfahrene diese ohne große Einführung

bedienen können. Kleinere Mikromanipulatoren als die von uns verwendeten, könnten die Pipettenplatzierung erleichtern und mehr Platz auf dem Tisch schaffen.

Des Weiteren wäre es eine Zeitersparnis, wenn auch das Objektiv bzw. das Mikroskop eine Funktion hätte, auf eine programmierbare Ausgangsposition zurückgefahren werden zu könnte.

Wie Abbildung 29 zeigt, erreicht man mit nur geringen Annahmen, wie 3 Zellen mit 2 verschiedene Zelltypen und mindesten zwei Verbindungen, die keine Zelle im Motiv unverbunden lassen, schon 84 Motivmöglichkeiten. Wenn man die Annahme näher an der Realität anlehnt und noch weitere Interneurontypen (Markram et al., 2004) oder Motive mit mehr Zellen mit ins Spiel bringt, wächst die Anzahl der möglichen Motive schnell auf eine nicht leicht händelbare Größe an.

Aufgrund der vielen möglichen Motive, auch bei wenigen Grundannahmen, kann eine Motivanalyse sehr schnell komplex werden. Dabei bleiben nur zwei Möglichkeiten übrig dem Problem Herr zu werden. Entweder man erhebt genug Daten, was dementsprechend mehr Zeit kostet, oder man beschränkt sich auf sehr einfache Motive. Wenn man zum Beispiel nur Motive mit zwei Verbindungen und maximal zwei unterschiedlichen Zelltypen Berücksichtigt, gibt es nur noch 23 mögliche Motive, was einem die Aussage, ob die Zellverschaltung einer Zufallsverteilung folgt oder nicht, erleichtert.

Patch-Clamp-Analyse in NRG3-KO-Mäusen

Da sich in der Analyse der Miniatur-exzitatorischen-postsynaptischen-Ströme keine signifikanten Unterschiede zeigen ließen, spricht nix für eine Annahme von veränderten exzitatorischen Rezeptorzusammensetzungen auf postsynaptischer Seite oder eine Modulation der Neurotransmitterausschüttung in der Mutante im Verhältnis zum Wildtyp im CA1.

Die Projektionen von Prinzipalneuronen auf schnellfeuernde PV-positive Interneurone im CA1 sowie im PrL scheinen in der Mutante reduziert zu sein. Dieser Kernbefund muss noch durch weitere Messungen erhärtet werden. Der Fund spricht für eine Rolle von NRG3 in der Synapsenbildung zwischen Prinzipal- und Interneuronen, ähnlich der Funktion von NRG1, welches auch ein ErbB4-Ligand ist (Li et al., 2007). Die verringerte Konnektivität könnte auch ein Erklärungsansatz für die niedrigere Oszillationsfrequenz und erhöhte Power im CA3 darstellen (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24); wie genau Oszillation und Konnektivität zusammen hängen, muss aber erst durch weitere Experimente geklärt werden. In Verbindung mit den MEA-Analysen bietet diese Beobachtung einen Erklärungsansatz für die reduzierte Musterstabilität in den NRG3-KO-Mutanten.

Fazit

Auch wenn bisher an den NRG3-KO-Mäusen der Octa-Patch –Messplatz noch nicht zum Einsatz kam, kann die Gesamtanalyse der NRG3-Mutanten als Model dienen, wie ein lokales Gewebe in akuten Hirnschnitten durch ein Mehrstufiges Messverfahren analysiert werden kann. So zeigt die mit hohem experimentelle Durchsatz stattfindende Analyse am Hexa-Deca-Aufbau an, dass in der Mutante oszillatorische Aktivität verändert ist, jedoch in verschiedenen Hirnregionen auf verschiedene Weise. Dies zeigt, dass es grundsätzlich notwendig ist bei neuropsychiatrischen Tiermodell zunächst mit einem größeren Verfahren verschiedene Hirnregionen zu analysieren. Auf der Grundlage dieser Befunde konnten wir für den PrL der NRG3-KO-Mäuse zeigen, dass die Stabilität raumzeitlicher LFP-Muster signifikant reduziert ist und damit eine reduzierte Leistungsfähigkeit dieser Hirnregion anzeigt. Letztlich konnten wir damit zumindest einen zugrundeliegenden Mechanismen im PrL und Hippocampus identifizieren. Dabei handelt es sich um die reduzierte Konnektivität von Prinzipalneuronen auf Interneurone mittels gepaarter Patch-Clamp Ableitungen. Breiter angelegt Octa-patch-analysen sind in Zukunft geplant, da wir für Hippocampus und Neocortex zwar einen gleichen Mechanismus identifiziert haben, die Netzwerkveränderung in den beiden Regionen aber verschieden sind. Dies deutet darauf hin, dass es weitere veränderte Mechanismen geben muss. Insgesamt zeigt aber die bisher durchgeführte Analyse an den NRG3-KO-Mäusen den konzeptionellen Wert eines mehrstufigen Analysekonzeptes für akute Hirnschnitte.

Statistik, Auswertung und anfallende Datenmengen

Ein Problem vieler Veröffentlichungen ist schlechte Reproduktionsfähigkeit der Experimente, häufig wegen niedrigen Versuchszahlen oder schlecht ausgeführter Statistik (Baker, 2016). Die geringe Versuchsanzahl kann auf Grund der großen Streuung (vgl. z.B. Abbildung 13 C & D) von biologischen Systemen zu statistischen Falschaussagen führen. Bei kleinen Versuchsgruppen kann es passieren, dass man zufällig einen hohen Anteil Extrema einer Richtung erhält, was einen dazu verleitet einen Unterschied anzunehmen wo, bei häufigerer Beobachtung, keiner vorhanden ist. Auch die Verwendung des Mittelwertes, der auf der Annahme einer Normalverteilung der Daten –die häufig nicht gerechtfertigt ist - beruht, ist sehr anfällig gegenüber Ausreißern und kann somit zu Falschannahmen der Unterschiedlichkeit zweier Gruppen führen. In Abbildung 13 E & F erkennt man deutlich, dass die Verteilung der Daten auf keinen Fall einer Gauß-Verteilung folgt. Dies zeigt, wie wichtig große Datensätze sind, um die richtige Analysemethode und Darstellung der Daten zu wählen.

Alle drei hier vorgestellten elektrophysiologischen Aufbauten eignen sich für eine Erhöhung der Datenausbeute und können somit die Aussagekraft der statistischen Analyse verbessern und gleichzeitig den zeitlichen Aufwand zum Erreichen höherer Versuchszahlen reduzieren.

Die anfallenden Datenmengen sind zwar noch gering genug, dass sie von einer Person gehandhabt werden können, allerdings wäre eine stärkere Automatisierung der Auswertung und eine Datenbank für Roh- und Metadaten eine große Arbeitserleichterung, auch in Anbetracht zukünftiger noch größer ausfallender Datenmengen - auch im Bezug aufs MEA, mit seiner Vielzahl an Kanälen und möglicher Analyseverfahren.

Ein Auswerteprogramm, das auf nicht proprietärer Software beruht, Dateiformate aller Aufnahmeprogramme verarbeiten und eine Arbeitsauftragsliste abarbeiten kann, wäre ein weiteres hilfreiches Werkzeug, vor allem in Verbindung mit einer Datenbank der Rohdaten. Reanalyse mit neuen Auswertverfahren oder Vergleiche verschiedener Datensets würden erheblich erleichtert.

Tierverbrauch

Der Vorteil des Interface-Kammer-Aufbau ist, dass sich je nach Größe und Spezies viele Schnitte auf einmal messen kann. Aus einem adulten Rattenhirn lassen sich zum Beispiel je 16 Schnitte aus PrL, wie auch Hippocampus gewinnen. Bei Mäusen ist es jeweils 8. Da die unterschiedlichen Präparate auch spezifische ACSF-Kompositionen benötigen, kann man bis zu vier Präparate mit á vier Schnitten gleichzeitig messen. Dies gibt einem die Möglichkeit, vor allem wenn die Hirnregion mit dem Hauptinteresse des Forschers sehr klein ist, gleichzeitig aus demselben Gehirn noch andere Präparate anzufertigen und zu messen. Bei den NRG3-Mäusen wurde grundsätzlich Hippocampus und PrL parallel präpariert und gemessen. Durch vorausschauendes Planen lässt sich damit die Datenausbeute je Versuchstier maximieren und der Tierverbrauch reduzieren.

Dieses lässt sich im Prinzip auch beim MEA-Aufbau anwenden, sofern man genügend MEAs zur Verfügung hat. Aber auch wenn dieses nicht der Fall sein sollte, kann man, aufgrund gleicher verwendeter Schnittdicke, die erhaltenen Präparate zwischen MEA- und Patch-Clamp-Aufbau aufteilen oder, wie beim Interface-Aufbau, zwei verschiedene Präparate aus demselben Nagerhirn anfertigen; allerdings müssen sich dafür zwei Experimentatoren in ihrer Zeitplanung aufeinander abstimmen.

Die Reduzierung des Tierverbrauchs ist dabei vom schwierigeren der gleichzeitig gewonnen Präparate abhängig. Während man zum Beispiel im Hippocampus in ca. 50% der Fälle Oszillationen auslösen kann, sind es im PrL nur ca. 33%. Allerdings gibt es einem die Chance die statistische Analyse des einfacheren Experiments durch Erhöhung der Versuchszahlen zu verbessern, oder ein weitere Hirnregion zu testen.

Ausblick

Die Inkorporation der verschiedenen elektrophysiologischen Messtechniken zu einer Analyse-Straße bietet einem große Vorteile bei der Evaluation von Tiermodellen und Pharmaka. Allerdings ist die Umsetzung einer solchen Analysestraße nur als Teamleistung möglich, da keiner der experimentellen Aufbauten ohne jeweiliges experimentelles Training sicher, zuverlässig und effizient zu bedienen ist. Dennoch können so alle Messungen in einem Labor tierverbrauchsschonend umgesetzt werden. Alle hier etablierten Messmethoden werden heute routinemäßig für verschieden Anwendung im Institut für Neurophysiologie eingesetzt. Dies erlaubt weniger Versuchsvariablen, wie verwendeten Lösungen und Tierhaltungsbedingungen, die von Labor zu Labor und Land zu Land großen Schwankungen und Fehlern unterworfen sind – was bei Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen durchaus bedacht werden muss – sondern auch die für Ergebnisse benötigte Zeit und der Tierverbrauch können reduziert werden. Dabei muss und sollte diese Analyse-Straße in Zukunft nicht nur auf die hier beschriebenen Techniken reduziert bleiben, sondern je nach Interessenlage und Fragestellung um die nötigen Techniken erweitert werden. Optogenetische Methoden wären eine Möglichkeit die elektrophysiologische Seite zu erweitern, aber auch molekularbiologische Techniken, wie z.B. quantitative Einzelzell-PCR spezifischer Zelltypen bieten einem interessante Möglichkeiten für Erweiterungen.

Photostimulation bietet einem die Möglichkeit zeitlich und räumlich präziser Ausführung. Einerseits kann man mit genetischer Manipulation photosensitive Ionenkanäle in spezifische Gewebe oder Zelltypen einbringen, je nach Kanaltyp die unter Lichteinfall die Zelle aktivieren oder inhibieren können. Dafür werden häufig Kanalrhodopsine verwendet. Andererseits lassen sich lichtsensitiven Molekülen mit Neurotransmitter verbinden, die erst bei Verwendung der richtigen Wellenlänge in einen biologisch aktiven Zustand übergehen und somit nur Zellen innerhalb des Lichtkegels beeinflussen können – eine als *Uncaging* bekannte Technik.

Das integrative Konzept der Analyse-Straße für akute Hirnschnitte stellt durch seine Zeitersparnis, Maximierung der Messeinheiten, Fehlervermeidung, Variablenreduzierung und Tierverbrauchsenkung eine gute Lösung zur Optimierung des Erkenntnisgewinns aus Experimenten an akuten Hirnschnitten dar.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau und die Etablierung eines dreistufigen Messkonzepts für elektrophysiologische Arbeiten. Diese Kombination von elektrophysiologischen Messaufbauten zu einer Analyse-Straße sollte es einem ermöglichen, Netzwerke unterschiedlicher Größenordnungen ebenso wie deren Zusammenspiel zu erforschen und dadurch die Wirkmechanismen von Pharmazeutika sowie die Untersuchung transgener Tiermodelle effizienter und schneller zu gestalten. Als Methoden dienten Feldpotentialmessungen, ein Multielektroden Array sowie Patch-Clamp-Messungen.

Für Feldpotential- und Oszillationsmessungen wurde ein Aufbau mit vier Interface-Kammern des Haas-Typs und sechzehn Messelektroden generiert. An diesem wurde erfolgreich ein γ -Oszillationsprotokoll im PrL der Ratte etabliert. Es konnte weiterhin für Oszillationen im PrL gezeigt werden, dass Ratte und Maus unterschiedlich auf dasselbe Protokoll reagieren, dass cholinerge Agonisten die Frequenz und Power, während nikotinsche Antagonisten die Power modulieren, dass Oszillationen in NRG3-KO-Mäusen in PrL und Hippocampus sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden. Außerdem ließ sich durch den Aufbau das Langzeitverhalten von Oszillationen beschreiben und der Tierverbrauch für Oszillationsexperimente reduzieren.

Ein Multielektrodenarray konnte erfolgreich etabliert werden. Bei Messungen von NRG3-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich die Stabilität raumzeitlicher LFP-Muster gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert ist.

Ein Multi-Patch-Clamp-Aufbau mit acht Mikromanipulatoren konnte erfolgreich etabliert werden. Es zeigte sich im Laufe der Arbeit, dass diese Konfiguration perfekt für Konnektivitätsmessungen und Charakterisierung uniformer Areale im Neocortex ist, aber ungeeignet für den Einsatz in dünnen Zellbändern und kleiner Areale ist. Hier bot sich für Konnektivitätsmessungen die „Lose Zellangehaftete Methode“ nach Barbour *et alii* (Barbour and Isope, 2000) an. Mit dieser Methode konnte sowohl im PrL als auch im Hippocampus von NRG3-KO-Mäusen Unterschiede in der Konnektivität zwischen Pyramidenzellen und Interneuronen gegenüber dem Wildtyp effizient festgestellt werden. Damit kann die „lose Zellangehaftete Methode“ als alternative Patch-Clamp-Methode zur Konnektivitätsanalyse gestellt werden.

Diese hier vorgestellte Straße von elektrophysiologischen Messaufbauten ist ein effektives Werkzeug für die Charakterisierung von Pharmaka und genetisch veränderten Tiermodellen und wird mit voranschreitender Automatisierung, günstigerer Technik und Inkorporation weiterer Methoden zunehmend zur Standardisierung der Analyse akuter Hirnschnitte beitragen.

Summary

Aim of this thesis was the establishment of a three-level measurement concept for electrophysiological studies. The combination of electrophysiological setups to a streamlined analyzation pipeline should enable the experimenter to investigate networks of different sizes as well as their interaction, thereby making the study of drugs mode of action or transgenic animal models more efficient and faster. Field potential measurements, multi electrode arrays and patch-clamp will be the methods of choice.

For field potential and oscillation measurements a setup with four Haas-type interface chamber and sixteen electrodes was constructed. A γ -oscillation protocol in PrL of the rat has been successfully established. It could be shown for oscillations in the PrL that rats and mice react differently to the same protocol, that cholinergic agonists modulate frequency and power and nicotinic antagonists only influence power and that oscillations in NRG-KO-mice in PrL and hippocampus significantly differ from the wildtype. Furthermore with this kind of setup long term behavior of oscillations can be described and animal usage reduced.

A multi electrode was established successfully. Measurements in NRG3-KO-mice could show that dopamine induced pattern generation differ from wildtype animals.

A multi-patch-clamp setup with eight micromanipulators was established successfully. Throughout the work with the setup it was shown, that in this configuration was perfect for measurements of connectivity and characterizing uniform areas but is unsuitable for work in thin cell layers and small areas. Here the use of a loose cell attached method after Barbour *et alii* (Barbour and Isope, 2000) for measurements of connectivity was optimal. With this method we could show differences in connectivity between pyramidal cells and interneurons for NRG3-KO-mice compared to wildtype. The loose cell attached method is a reliable alternative patch-clamp-method for connectivity measurements.

With this method we could show differences of connectivity between pyramidal cells and interneurons of NRG3-KO-mice in PrL and Hippocampus compared to wildtype.

This pipeline of electrophysiological setups is an effective tool for the characterization of drugs and genetically modified organisms and with progressing atomization, cheaper technology and incorporation of more methods even extend its beneficialness.

Literatur

- Aitken, P.G., Breese, G.R., Dudek, F.F., Edwards, F., Espanol, M.T., Larkman, P.M., Lipton, P., Newman, G.C., Nowak, T.S., Jr., Panizzon, K.L., and Et Al. (1995). Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Methods* 59, 139-149.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89, 73-120.
- Alves, N.C., Bailey, C.D., Nashmi, R., and Lambe, E.K. (2010). Developmental sex differences in nicotinic currents of prefrontal layer VI neurons in mice and rats. *PLoS One* 5, e9261.
- Arnsten, A.F., and Li, B.M. (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57, 1377-1384.
- Baker, M. (2016). 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature* 533, 452-454.
- Bannister, A.P. (2005). Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res* 53, 95-103.
- Barbour, B., and Isope, P. (2000). Combining loose cell-attached stimulation and recording. *J Neurosci Methods* 103, 199-208.
- Bartsch, T., and Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* 309, 1-16.
- Bean, J.C., Lin, T.W., Sathyamurthy, A., Liu, F., Yin, D.M., Xiong, W.C., and Mei, L. (2014). Genetic labeling reveals novel cellular targets of schizophrenia susceptibility gene: distribution of GABA and non-GABA ErbB4-positive cells in adult mouse brain. *J Neurosci* 34, 13549-13566.
- Beggs, J.M., and Plenz, D. (2003). Neuronal avalanches in neocortical circuits. *J Neurosci* 23, 11167-11177.
- Beggs, J.M., and Plenz, D. (2004). Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures. *J Neurosci* 24, 5216-5229.
- Bekkers, J.M., and Stevens, C.F. (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7834-7838.
- Bischofberger, J., Engel, D., Li, L., Geiger, J.R., and Jonas, P. (2006). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc* 1, 2075-2081.
- Bouyer, J.J., Montaron, M.F., and Rougeul, A. (1981). Fast fronto-parietal rhythms during combined focused attentive behaviour and immobility in cat: cortical and thalamic localizations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 51, 244-252.
- Brombas, A., Fletcher, L.N., and Williams, S.R. (2014). Activity-dependent modulation of layer 1 inhibitory neocortical circuits by acetylcholine. *J Neurosci* 34, 1932-1941.
- Brun, V.H., Otnass, M.K., Molden, S., Steffenach, H.A., Witter, M.P., Moser, M.B., and Moser, E.I. (2002). Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296, 2243-2246.
- Buhl, E.H., Tamas, G., and Fisahn, A. (1998). Cholinergic activation and tonic excitation induce persistent gamma oscillations in mouse somatosensory cortex in vitro. *J Physiol* 513 (Pt 1), 117-126.
- Buzsaki, G., Leung, L.W., and Vanderwolf, C.H. (1983). Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 287, 139-171.
- Calabresi, P., Castrioto, A., Di Filippo, M., and Picconi, B. (2013). New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 12, 811-821.
- Carlin, K.P., and Brownstone, R.M. (2006). Rapid pH and PO₂ changes in the tissue recording chamber during stoppage of a gas-equilibrated perfusate: effects on calcium currents in ventral horn neurons. *Eur J Neurosci* 24, 1353-1358.
- Changeux, J.P. (2012). The nicotinic acetylcholine receptor: the founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* 287, 40207-40215.
- Chen, Y.J., Zhang, M., Yin, D.M., Wen, L., Ting, A., Wang, P., Lu, Y.S., Zhu, X.H., Li, S.J., Wu, C.Y., Wang, X.M., Lai, C., Xiong, W.C., Mei, L., and Gao, T.M. (2010). ErbB4 in parvalbumin-positive

- interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21818-21823.
- Cheng, G.L., and Lee, T.M. (2016). Altering risky decision-making: Influence of impulsivity on the neuromodulation of prefrontal cortex. *Soc Neurosci* 11, 353-364.
- Christophe, E., Roebuck, A., Staiger, J.F., Lavery, D.J., Charpak, S., and Audinat, E. (2002). Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *J Neurophysiol* 88, 1318-1327.
- Chrobak, J.J., and Buzsaki, G. (1998). Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* 18, 388-398.
- Colgin, L.L., Kubota, D., and Lynch, G. (2003). Cholinergic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2872-2877.
- Couey, J.J., Meredith, R.M., Spijker, S., Poorthuis, R.B., Smit, A.B., Brussaard, A.B., and Mansvelder, H.D. (2007). Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron* 54, 73-87.
- Coutlee, C.G., and Huettel, S.A. (2012). The functional neuroanatomy of decision making: prefrontal control of thought and action. *Brain Res* 1428, 3-12.
- Cunningham, M.O., Davies, C.H., Buhl, E.H., Kopell, N., and Whittington, M.A. (2003). Gamma oscillations induced by kainate receptor activation in the entorhinal cortex in vitro. *J Neurosci* 23, 9761-9769.
- Dajas-Bailador, F., and Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25, 317-324.
- Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A.M., and Damasio, A.R. (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264, 1102-1105.
- Del Pino, I., Garcia-Frigola, C., Dehorter, N., Brotons-Mas, J.R., Alvarez-Salvado, E., Martinez De Lagran, M., Ciceri, G., Gabaldon, M.V., Moratal, D., Dierssen, M., Canals, S., Marin, O., and Rico, B. (2013). ErbB4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron* 79, 1152-1168.
- Dickinson, J.A., Kew, J.N., and Wonnacott, S. (2008). Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74, 348-359.
- Dos Santos Coura, R., and Granon, S. (2012). Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychopharmacology (Berl)* 221, 1-18.
- Euston, D.R., Gruber, A.J., and McNaughton, B.L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76, 1057-1070.
- Falls, D.L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284, 14-30.
- Fazzari, P., Paternain, A.V., Valiente, M., Pla, R., Lujan, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marin, O., and Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464, 1376-1380.
- Ferrarelli, F., Massimini, M., Peterson, M.J., Riedner, B.A., Lazar, M., Murphy, M.J., Huber, R., Rosanova, M., Alexander, A.L., Kalin, N., and Tononi, G. (2008). Reduced evoked gamma oscillations in the frontal cortex in schizophrenia patients: a TMS/EEG study. *Am J Psychiatry* 165, 996-1005.
- Ferrarelli, F., Sarasso, S., Guller, Y., Riedner, B.A., Peterson, M.J., Bellesi, M., Massimini, M., Postle, B.R., and Tononi, G. (2012). Reduced natural oscillatory frequency of frontal thalamocortical circuits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 69, 766-774.
- Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L., and Marin, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44, 251-261.
- Fucile, S. (2004). Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1-8.
- Funahashi, S. (2013). Thalamic mediodorsal nucleus and its participation in spatial working memory processes: comparison with the prefrontal cortex. *Front Syst Neurosci* 7, 36.

- Gabbott, P.L., Warner, T.A., Jays, P.R., Salway, P., and Busby, S.J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492, 145-177.
- Gil, Z., Connors, B.W., and Amitai, Y. (1997). Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron* 19, 679-686.
- Gioanni, Y., Rougeot, C., Clarke, P.B., Lepouse, C., Thierry, A.M., and Vidal, C. (1999). Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur J Neurosci* 11, 18-30.
- Golgi, C., Bentivoglio, M., and Swanson, L. (2001). On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). 1886. *Brain Res Bull* 54, 461-483.
- Gotti, C., and Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74, 363-396.
- Gotti, C., Zoli, M., and Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27, 482-491.
- Gray, C.M., Konig, P., Engel, A.K., and Singer, W. (1989). Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* 338, 334-337.
- Guhn, A., Dresler, T., Andreatta, M., Muller, L.D., Hahn, T., Tupak, S.V., Polak, T., Deckert, J., and Herrmann, M.J. (2014). Medial prefrontal cortex stimulation modulates the processing of conditioned fear. *Front Behav Neurosci* 8, 44.
- Haas, H.L., Schaerer, B., and Vosmansky, M. (1979). A simple perfusion chamber for the study of nervous tissue slices in vitro. *J Neurosci Methods* 1, 323-325.
- Hajos, N., Ellender, T.J., Zemankovics, R., Mann, E.O., Exley, R., Cragg, S.J., Freund, T.F., and Paulsen, O. (2009). Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci* 29, 319-327.
- Happe, H.K., Peters, J.L., Bergman, D.A., and Murrin, L.C. (1994). Localization of nicotinic cholinergic receptors in rat brain: autoradiographic studies with [³H]cytisine. *Neuroscience* 62, 929-944.
- Hayes, L.N., Shevelkin, A., Zeledon, M., Steel, G., Chen, P.L., Obie, C., Pulver, A., Avramopoulos, D., Valle, D., Sawa, A., and Pletnikov, M.V. (2016). Neuregulin 3 Knockout Mice Exhibit Behaviors Consistent with Psychotic Disorders. *Mol Neuropsychiatry* 2, 79-87.
- Hirata, Y., and Sawaguchi, T. (2008). Functional columns in the primate prefrontal cortex revealed by optical imaging in vitro. *Neurosci Res* 61, 1-10.
- Hollands, C., Bartolotti, N., and Lazarov, O. (2016). Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Front Neurosci* 10, 178.
- Hou, X.J., Ni, K.M., Yang, J.M., and Li, X.M. (2014). Neuregulin 1/ErbB4 enhances synchronized oscillations of prefrontal cortex neurons via inhibitory synapses. *Neuroscience* 261, 107-117.
- Huchzermeyer, C., Albus, K., Gabriel, H.J., Otahal, J., Taubenberger, N., Heinemann, U., Kovacs, R., and Kann, O. (2008). Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO₂ and concomitant changes in mitochondrial redox state. *J Neurosci* 28, 1153-1162.
- Huchzermeyer, C., Berndt, N., Holzhutter, H.G., and Kann, O. (2013). Oxygen consumption rates during three different neuronal activity states in the hippocampal CA3 network. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 263-271.
- Jackson, J., Ayzenshtat, I., Karnani, M.M., and Yuste, R. (2016). VIP+ interneurons control neocortical activity across brain states. *J Neurophysiol*, jn 01124 02015.
- Javedan, S.P., Fisher, R.S., Eder, H.G., Smith, K., and Wu, J. (2002). Cooling abolishes neuronal network synchronization in rat hippocampal slices. *Epilepsia* 43, 574-580.
- Jiang, X., Shen, S., Cadwell, C.R., Berens, P., Sinz, F., Ecker, A.S., Patel, S., and Tolias, A.S. (2015). Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science* 350, aac9462.
- Jin, J., and Maren, S. (2015). Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. *Front Syst Neurosci* 9, 170.
- Jouhanneau, J.S., Kremkow, J., Dornn, A.L., and Poulet, J.F. (2015). In Vivo Monosynaptic Excitatory Transmission between Layer 2 Cortical Pyramidal Neurons. *Cell Rep* 13, 2098-2106.

- Kao, W.T., Wang, Y., Kleinman, J.E., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Weinberger, D.R., and Law, A.J. (2010). Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15619-15624.
- Kapoor, R., Jaeger, C.B., and Llinas, R. (1988). Electrophysiology of the mammalian cerebellar cortex in organ culture. *Neuroscience* 26, 493-507.
- Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2003). Carbachol-induced network oscillations in the intact cerebral cortex of the newborn rat. *Cereb Cortex* 13, 409-421.
- Krettek, J.E., and Price, J.L. (1977). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J Comp Neurol* 172, 687-722.
- Kurowski, P., Gawlak, M., and Szulczyk, P. (2015). Muscarinic receptor control of pyramidal neuron membrane potential in the medial prefrontal cortex (mPFC) in rats. *Neuroscience* 303, 474-488.
- Lambe, E.K., Picciotto, M.R., and Aghajanian, G.K. (2003). Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 28, 216-225.
- Lasztocki, B., and Klausberger, T. (2014). Layer-specific GABAergic control of distinct gamma oscillations in the CA1 hippocampus. *Neuron* 81, 1126-1139.
- Li, B., Woo, R.S., Mei, L., and Malinow, R. (2007). The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54, 583-597.
- Li, M., Long, C., and Yang, L. (2015). Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Biomed Res Int* 2015, 810548.
- Lipton, P., Aitken, P.G., Dudek, F.E., Eskessen, K., Espanol, M.T., Ferchmin, P.A., Kelly, J.B., Kreisman, N.R., Landfield, P.W., Larkman, P.M., and Et Al. (1995). Making the best of brain slices: comparing preparative methods. *J Neurosci Methods* 59, 151-156.
- Liu, Q., Huang, Y., Xue, F., Simard, A., Dechon, J., Li, G., Zhang, J., Lucero, L., Wang, M., Sierks, M., Hu, G., Chang, Y., Lukas, R.J., and Wu, J. (2009). A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* 29, 918-929.
- Lomazzo, E., Macarthur, L., Yasuda, R.P., Wolfe, B.B., and Kellar, K.J. (2010). Quantitative analysis of the heteromeric neuronal nicotinic receptors in the rat hippocampus. *J Neurochem* 115, 625-634.
- Longart, M., Liu, Y., Karavanova, I., and Buonanno, A. (2004). Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472, 156-172.
- Loos, M., Mueller, T., Gouwenberg, Y., Wijnands, R., Van Der Loo, R.J., Neuro, B.M.P.C., Birchmeier, C., Smit, A.B., and Spijker, S. (2014). Neuregulin-3 in the mouse medial prefrontal cortex regulates impulsive action. *Biol Psychiatry* 76, 648-655.
- Loos, M., Schettters, D., Hoogeland, M., Spijker, S., De Vries, T.J., and Pattij, T. (2016). Prefrontal cortical neuregulin-ErbB modulation of inhibitory control in rats. *Eur J Pharmacol*.
- Lu, C.B., Wang, Z.H., Zhou, Y.H., and Vreugdenhil, M. (2012). Temperature- and concentration-dependence of kainate-induced gamma oscillation in rat hippocampal slices under submerged condition. *Acta Pharmacol Sin* 33, 214-220.
- Mansvelder, H.D., Van Aerde, K.I., Couey, J.J., and Brussaard, A.B. (2006). Nicotinic modulation of neuronal networks: from receptors to cognition. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 292-305.
- Margrie, T.W., Brecht, M., and Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflugers Arch* 444, 491-498.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793-807.
- Meier, S., Strohmaier, J., Breuer, R., Mattheisen, M., Degenhardt, F., Muhleisen, T.W., Schulze, T.G., Nothen, M.M., Cichon, S., Rietschel, M., and Wust, S. (2013). Neuregulin 3 is associated with attention deficits in schizophrenia and bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 549-556.
- Miltner, W.H., Braun, C., Arnold, M., Witte, H., and Taub, E. (1999). Coherence of gamma-band EEG activity as a basis for associative learning. *Nature* 397, 434-436.
- Moretti, M., Zoli, M., George, A.A., Lukas, R.J., Pistillo, F., Maskos, U., Whiteaker, P., and Gotti, C. (2014). The novel alpha7beta2-nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in

- mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization. *Mol Pharmacol* 86, 306-317.
- Morishima, M., Morita, K., Kubota, Y., and Kawaguchi, Y. (2011). Highly differentiated projection-specific cortical subnetworks. *J Neurosci* 31, 10380-10391.
- Mountcastle, V.B. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4), 701-722.
- Murthy, V.N., and Fetz, E.E. (1992). Coherent 25- to 35-Hz oscillations in the sensorimotor cortex of awake behaving monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5670-5674.
- Neddens, J., and Buonanno, A. (2010). Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice. *Hippocampus* 20, 724-744.
- Neddens, J., Fish, K.N., Tricoire, L., Vullhorst, D., Shamir, A., Chung, W., Lewis, D.A., Mcbain, C.J., and Buonanno, A. (2011). Conserved interneuron-specific ErbB4 expression in frontal cortex of rodents, monkeys, and humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 70, 636-645.
- Neher, E., Sakmann, B., and Steinbach, J.H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* 375, 219-228.
- O'keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34, 171-175.
- Olah, S., Fule, M., Komlosi, G., Varga, C., Baldi, R., Barzo, P., and Tamas, G. (2009). Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* 461, 1278-1281.
- Ongur, D., and Price, J.L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10, 206-219.
- Paine, T.A., O'hara, A., Plaut, B., and Lowes, D.C. (2015). Effects of disrupting medial prefrontal cortex GABA transmission on decision-making in a rodent gambling task. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 1755-1765.
- Paine, T.A., Slipp, L.E., and Carlezon, W.A., Jr. (2011). Schizophrenia-Like Attentional Deficits Following Blockade of Prefrontal Cortex GABA(A) Receptors. *Neuropsychopharmacology*.
- Paterson, C., and Law, A.J. (2014). Transient overexposure of neuregulin 3 during early postnatal development impacts selective behaviors in adulthood. *PLoS One* 9, e104172.
- Perin, R., and Markram, H. (2013). A computer-assisted multi-electrode patch-clamp system. *J Vis Exp*, e50630.
- Pi, H.J., Hangya, B., Kvitsiani, D., Sanders, J.I., Huang, Z.J., and Kepecs, A. (2013). Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* 503, 521-524.
- Poletti, M., and Bonuccelli, U. (2012). Orbital and ventromedial prefrontal cortex functioning in Parkinson's disease: neuropsychological evidence. *Brain Cogn* 79, 23-33.
- Poorthuis, R.B., Bloem, B., Schak, B., Wester, J., De Kock, C.P., and Mansvelder, H.D. (2013). Layer-specific modulation of the prefrontal cortex by nicotinic acetylcholine receptors. *Cereb Cortex* 23, 148-161.
- Porter, J.T., Cauli, B., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., and Audinat, E. (1999). Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19, 5228-5235.
- Proulx, E., Piva, M., Tian, M.K., Bailey, C.D., and Lambe, E.K. (2014). Nicotinic acetylcholine receptors in attention circuitry: the role of layer VI neurons of prefrontal cortex. *Cell Mol Life Sci* 71, 1225-1244.
- Ray, J.P., and Price, J.L. (1992). The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol* 323, 167-197.
- Reitboeck, H.J. (1983). Fiber microelectrodes for electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods* 8, 249-262.
- Roopun, A.K., Middleton, S.J., Cunningham, M.O., Lebeau, F.E., Bibbig, A., Whittington, M.A., and Traub, R.D. (2006). A beta2-frequency (20-30 Hz) oscillation in nonsynaptic networks of somatosensory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15646-15650.
- Rossi, M.A., Hayrapetyan, V.Y., Maimon, B., Mak, K., Je, H.S., and Yin, H.H. (2012). Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice. *J Neurophysiol* 108, 1211-1222.

- Sachdev, P.S., McBride, R., Loo, C., Mitchell, P.M., Malhi, G.S., and Croker, V. (2002). Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the forced swim test model of depression in rats. *Biol Psychiatry* 51, 474-479.
- Sakmann, B., and Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46, 455-472.
- Schneider, J., Lewen, A., Ta, T.T., Galow, L.V., Isola, R., Papageorgiou, I.E., and Kann, O. (2015). A reliable model for gamma oscillations in hippocampal tissue. *J Neurosci Res* 93, 1067-1078.
- Schröder, H., Zilles, K., Maelicke, A., and Hajos, F. (1989). Immunohisto- and cytochemical localization of cortical nicotinic cholinergic receptors in rat and man. *Brain Res* 502, 287-295.
- Segal, M., Greenberger, V., and Korkotian, E. (2003). Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity. *Eur J Neurosci* 17, 2573-2585.
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J.A., and Patrick, J.W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13, 596-604.
- Seinfeld, S., Goodkin, H.P., and Shinnar, S. (2016). Status Epilepticus. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a022830.
- Shin, J.D., and Jadhav, S.P. (2016). Multiple modes of hippocampal-prefrontal interactions in memory-guided behavior. *Curr Opin Neurobiol* 40, 161-169.
- Sigurdsson, T., and Duvarci, S. (2015). Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. *Front Syst Neurosci* 9, 190.
- Singer, W., and Gray, C.M. (1995). Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 18, 555-586.
- Sonuga-Barke, E.J., Cortese, S., Fairchild, G., and Stringaris, A. (2015). Annual Research Review: Transdiagnostic neuroscience of child and adolescent mental disorders - differentiating decision making in attention-deficit/hyperactivity disorder, conduct disorder, depression, and anxiety. *J Child Psychol Psychiatry*.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9, 206-221.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171-177.
- Squire, L.R., Stark, C.E., and Clark, R.E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27, 279-306.
- Squire, L.R., Zola-Morgan, J.T., and Clark, R.E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8, 872-883.
- St Onge, J.R., and Floresco, S.B. (2010). Prefrontal cortical contribution to risk-based decision making. *Cereb Cortex* 20, 1816-1828.
- Steinmetz, P.N., Roy, A., Fitzgerald, P.J., Hsiao, S.S., Johnson, K.O., and Niebur, E. (2000). Attention modulates synchronized neuronal firing in primate somatosensory cortex. *Nature* 404, 187-190.
- Steriade, M., Amzica, F., and Contreras, D. (1996). Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous cortical rhythms during brain activation. *J Neurosci* 16, 392-417.
- Stewart, C.V., and Plenz, D. (2006). Inverted-U profile of dopamine-NMDA-mediated spontaneous avalanche recurrence in superficial layers of rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 26, 8148-8159.
- Swaab, D.F., Fliers, E., Hoogendijk, W.J., Veltman, D.J., and Zhou, J.N. (2000). Interaction of prefrontal cortical and hypothalamic systems in the pathogenesis of depression. *Prog Brain Res* 126, 369-396.
- Tapia, L., Kuryatov, A., and Lindstrom, J. (2007). Ca²⁺ permeability of the (alpha4)₃(beta2)₂ stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)₂(beta2)₃ human acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 71, 769-776.
- Tominaga, K., Shibata, S., Hamada, T., and Watanabe, S. (1994). GABA_A receptor agonist muscimol can reset the phase of neural activity rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 166, 81-84.
- Traub, R.D., Jefferys, J.G., and Whittington, M.A. (1997). Simulation of gamma rhythms in networks of interneurons and pyramidal cells. *J Comput Neurosci* 4, 141-150.

- Traub, R.D., Whittington, M.A., Colling, S.B., Buzsaki, G., and Jefferys, J.G. (1996). Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J Physiol* 493 (Pt 2), 471-484.
- Trimble, M. (2016). The intentional brain--a short history of neuropsychiatry. *CNS Spectr* 21, 223-229.
- Turner, J.R., Ray, R., Lee, B., Everett, L., Xiang, J., Jepson, C., Kaestner, K.H., Lerman, C., and Blendy, J.A. (2014). Evidence from mouse and man for a role of neuregulin 3 in nicotine dependence. *Mol Psychiatry* 19, 801-810.
- Uylings, H.B., Groenewegen, H.J., and Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146, 3-17.
- Van Aerde, K.I., Heistek, T.S., and Mansvelder, H.D. (2008). Prelimbic and infralimbic prefrontal cortex interact during fast network oscillations. *PLoS One* 3, e2725.
- Van Eden, C.G., and Uylings, H.B. (1985). Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 241, 253-267.
- Vidal, C., and Changeux, J.P. (1993). Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* 56, 23-32.
- Vullhorst, D., Mitchell, R.M., Keating, C., Roychowdhury, S., Karavanova, I., Tao-Cheng, J.H., and Buonanno, A. (2015). A negative feedback loop controls NMDA receptor function in cortical interneurons via neuregulin 2/ErbB4 signalling. *Nat Commun* 6, 7222.
- Vullhorst, D., Neddens, J., Karavanova, I., Tricoire, L., Petralia, R.S., Mcbain, C.J., and Buonanno, A. (2009). Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus. *J Neurosci* 29, 12255-12264.
- Wada, E., Mckinnon, D., Heinemann, S., Patrick, J., and Swanson, L.W. (1990). The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha 5) in the rat central nervous system. *Brain Res* 526, 45-53.
- Wang, K.S., Xu, N., Wang, L., Aragon, L., Ciubuc, R., Arana, T.B., Mao, C., Petty, L., Briones, D., Su, B.B., Luo, X., Camarillo, C., Escamilla, M.A., and Xu, C. (2014). NRG3 gene is associated with the risk and age at onset of Alzheimer disease. *J Neural Transm (Vienna)* 121, 183-192.
- Wen, L., Lu, Y.S., Zhu, X.H., Li, X.M., Woo, R.S., Chen, Y.J., Yin, D.M., Lai, C., Terry, A.V., Jr., Vazdarjanova, A., Xiong, W.C., and Mei, L. (2010). Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1211-1216.
- Whittington, M.A., Cunningham, M.O., Lebeau, F.E., Racca, C., and Traub, R.D. (2011). Multiple origins of the cortical gamma rhythm. *Dev Neurobiol* 71, 92-106.
- Whittington, M.A., Traub, R.D., and Jefferys, J.G. (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373, 612-615.
- Whittington, M.A., Traub, R.D., Kopell, N., Ermentrout, B., and Buhl, E.H. (2000). Inhibition-based rhythms: experimental and mathematical observations on network dynamics. *Int J Psychophysiol* 38, 315-336.
- Witter, M.P., Canto, C.B., Couey, J.J., Koganezawa, N., and O'reilly, K.C. (2014). Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20120515.
- Witter, M.P., and Moser, E.I. (2006). Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex. *Trends Neurosci* 29, 671-678.
- Witter, M.P., Naber, P.A., Van Haeften, T., Machielsen, W.C., Rombouts, S.A., Barkhof, F., Scheltens, P., and Lopes Da Silva, F.H. (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10, 398-410.
- Woo, R.S., Li, X.M., Tao, Y., Carpenter-Hyland, E., Huang, Y.Z., Weber, J., Neiswender, H., Dong, X.P., Wu, J., Gassmann, M., Lai, C., Xiong, W.C., Gao, T.M., and Mei, L. (2007). Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54, 599-610.
- Wozny, C., and Williams, S.R. (2011). Specificity of synaptic connectivity between layer 1 inhibitory interneurons and layer 2/3 pyramidal neurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex* 21, 1818-1826.
- Yang, J.M., Zhang, J., Chen, X.J., Geng, H.Y., Ye, M., Spitzer, N.C., Luo, J.H., Duan, S.M., and Li, X.M. (2013). Development of GABA circuitry of fast-spiking basket interneurons in the medial prefrontal cortex of erbb4-mutant mice. *J Neurosci* 33, 19724-19733.

- Yau, H.J., Wang, H.F., Lai, C., and Liu, F.C. (2003). Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13, 252-264.
- Zeledon, M., Eckart, N., Taub, M., Vernon, H., Szymanski, M., Wang, R., Chen, P.L., Nestadt, G., Mcgrath, J.A., Sawa, A., Pulver, A.E., Avramopoulos, D., and Valle, D. (2015). Identification and functional studies of regulatory variants responsible for the association of with a delusion phenotype in schizophrenia. *Mol Neuropsychiatry* 1, 36-46.
- Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., and Godowski, P.J. (1997). Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9562-9567.