

## VI Diskussion

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten konnten erstmals *in vitro* spontan im Hippocampus der Maus auftretende *sharp wave–ripple* Komplexe dokumentiert werden; an diesem Modell wurden das Netzwerkverhalten, pharmakologische und zelluläre Eigenschaften von SPWs sowie Mechanismen der Synchronisierung von ~200 Hz (*ripple*)-Oszillationen untersucht.

Die Relevanz der Befunde ergibt sich aus der Tatsache, dass SPWs und *ripples* neben den Theta/Gamma-Oszillationen zu den fundamentalen Mustern von Netzwerkaktivität im Hippocampus gehören (13). Darüber hinaus scheint es sich bei SPW–R um ein evolutionär konserviertes Phänomen zu handeln, da ihre Existenz unter vergleichbaren verhaltensphysiologischen Bedingungen (Non-REM-Schlaf) in verschiedenen Spezies beschrieben wurde: In der Ratte (13), der Maus (31), der Katze (32), dem Schimpansen (33) sowie im Menschen (34-36). Funktionell wird SPW–R eine bedeutsame Rolle im Prozess der Gedächtniskonsolidierung zugeordnet (5, 15-17).

### VI.1 *Sharp wave–ripple* Komplexe *in vitro*; Evaluation.

Der Vergleich zwischen den hier *in vitro* vorgestellten und den aus dem lebenden Tier abgeleiteten SPW–R ergab eine deutliche Übereinstimmung basaler Eigenschaften: Die Dauer von SPWs *in vivo* wurde von Buzsáki (13) mit 30-120 ms angegeben; SPW–R der Maus *in vitro* zeigen im Vergleich dazu nur leicht reduzierte Längen von ~30-100 ms. Die Inzidenz beträgt *in vivo* 0.01-3 Hz (13); das *in vitro*-Modell, bei dem SPWs kontinuierlich und rhythmisch auftreten, zeigt Frequenzen von ~3 Hz ( $2.7 \pm 1.1$  Hz für CA1). Weiterhin sind auch SPWs *in vitro* von kleinamplitudigen Oszillationen überlagert, äquivalent den *in vivo* beobachteten 200 Hz-*ripples* (14). Das Verhalten der Amplituden *in vitro* entlang der „laminaren“ Ausdehnung entspricht ebenfalls dem für die *in vivo*-Analoge beschriebenen (vgl. Tiefenprofile Abb. 7 in (2) und Abb. 2 in (13)).

SPW–R *in vitro* zeigen also in basalen Eigenschaften wie Dauer, Amplituden, Inzidenz, Oszillationsfrequenz und Phasenverhalten eine gute Übereinstimmung mit ihrem *in vivo*-Pendant.

Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass nahezu zeitgleich mit den hier vorgestellten Arbeiten (1, 2) von zwei konkurrierenden Gruppen ähnliche Signale aus Hippocampusschnitten der Ratte beschrieben wurden (37-39).

## VI.2 Die Initiierung von SPW-R.

Wie in Studien am lebenden Tier gezeigt wurde, sind SPWs ein primär intrinsisch im Hippocampus generiertes Phänomen: Weder die Läsionierung des medialen Septums, noch die des entorhinalen Cortex – beides Strukturen, aus denen Hauptafferenzen in den Hippocampus projizieren – führt zu einer Unterdrückung der Generierung von SPWs *in vivo* (13, 40). Vielmehr sind die Amplituden der SPWs unter diesen Bedingungen sogar vergrößert (40). Der gleiche Effekt wurde unter der *i.p.*-Gabe des muscarinischen Antagonisten Atropin beobachtet (13, 40). Es kann also angenommen werden, dass die Hippocampus-Afferenzen – insbesondere die über *Fimbria* und *Fornix* einlaufenden cholinergen – eine SPW-dämpfende Wirkung vermitteln. Insofern muss es nicht verwundern, dass SPW-R prinzipiell im Hippocampuschnitt, aber auch im intakten, isolierten Hippocampus *in vitro* (41) spontan generiert werden können. Die eigentliche Initiierung der SPWs erfolgt nach Buzsáki (5, 13), wie auch hier *in vitro* demonstriert wurde (2), in der Region CA3 mit ihrer ausgeprägten rekurrenten axonalen Kollateralsierung (42), sobald die Wirkung subcorticaler (v.a. cholinerg) Projektionen in den Hippocampus wegfällt.

In den hier vorgestellten Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die Initiierung von *sharp waves* (**i**) ein AMPA-Rezeptor-abhängiger Prozess ist, (**ii**) GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren benötigt, sowie (**iii**) Gap junctions involviert. Resultat (**i**) lässt sich mit der o.g. Hypothese Buzsáki in Einklang bringen, da die rekurrente axonale Kollateralsierung der CA3-Pyramidenzellen durch AMPA-Rezeptoren vermittelt ist (neben NMDA-Rezeptoren, (43)). Resultat (**ii**) – die Blockade von SPW-R durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Gabazine – ist insofern interessant, als sie dem etablierten Modell der Initiierung von SPW-R noch die kritische Beteiligung von GABAergen Interneuronen hinzufügt. Es muss angemerkt werden, dass diese Beobachtung, wie oben dargestellt, aus experimentellen Gründen im CA1-*minislice* gemacht wurde; daher stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit dieser mechanistischen Interpretation („GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte Transmission ist notwendig für die Initiierung von SPW-R“) auf die Region CA3. Gegen einen solchen Einwand können zum einen elektrophysiologische und anatomische Befunde gestellt werden, die eine axonale Kollateralsierung auch bei CA1-Pyramidenzellen nahe legen (wenn auch mit vergleichsweise niedriger Dichte (44)). Andererseits spricht die Tatsache, dass SPW-R in der isolierten Region CA1 generiert werden können (2, 3), *per se* bereits für die Übertragbarkeit.

Welche Mechanismen könnten diesen Befund, der auch GABAerge Interneurone in die Initiierung von SPW–R mit einbezieht, erklären?

Buhl *et al.* (45) sowie Cobb *et al.* (46) konnten zeigen, dass aus Pyramidenzellen abgeleitete IPSPs – ausgelöst durch Eingänge aus *Basket*- und Axo-axonischen Zellen – von post-inhibitorischen *rebound*-Depolarisationen oder -Aktionspotentialen begleitet waren. Dieser Mechanismus war so robust, dass unterschwellige Membranpotential-Oszillationen, aber auch das Entladungsverhalten von mehreren Pyramidenzellen damit synchronisiert werden konnten (46). Aufgrund der Tatsache, dass die axonale Arborisierung von Interneuronen sehr weiträumig ist (45), ist es somit möglich, dass eine kleine Anzahl von Interneuronen eine große Population von Pyramidenzellen orchestriert. Weiterhin wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass gerade (Parvalbumin-positive) *Basket*- und Axo-axonische Zellen Gap junction-gekoppelt sind (47, 48). Diese Tatsache böte eine mögliche Erklärung auch für Resultat (iii), dass pharmakologische Gap junction-Entkopplung zu einer Unterdrückung der spontanen Initiierung von SPW–R führte (2). Ebenso könnte der Befund der reduzierten Inzidenz von SPW–R in Schnitten aus Connexin36-defizienten Tieren (1) damit erklärt werden.

Zusammengenommen weisen diese Resultate also darauf hin, dass die Initiierung von SPW–R nicht nur – wie bisher angenommen – im Netzwerk der rekurrenten Axonkollateralen von CA3-Pyramidenzellen stattfindet, sondern ebenso die Aktion GABAerger Interneurone einschließt.

### **VI.3 Die Synchronisierung hochfrequenter ~200 Hz-Oszillationen.**

In Messungen am lebenden Tier ist gezeigt worden, dass während der SPW-assoziierten *ripple*-Oszillationen bestimmte Interneurone entladen – präferentiell auf den negativen Zyklen der *ripples* (abgeleitet im Stratum pyramidale; 12, 14). Mit juxtazellulären Ableitungen und Zellfärbungen konnten diese Zellen als Parvalbumin-positive *Basket*-Zellen sowie *Bistratified*-Zellen identifiziert werden (19, 20).

Daher ergeben sich folgende Fragen: Leitet sich aus diesen Befunden eine notwendige Bedingung synaptischer Inhibition für die Genese von ~200 Hz-*ripples* ab? Welche Rolle spielt dabei das im Modell von Traub und Bibbig (22) postulierte Netzwerk elektrisch gekoppelter Pyramidenzellaxone?

In den hier vorgestellten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Generierung von Oszillationen im *ripple*-Frequenzband (i) in der Abwesenheit schneller ionotroper (ins-

besondere GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelter) Transmission stattfinden kann und dass sie **(ii)** die Partizipation elektrischer Kopplung einschließt.

Mit dem in (3) verfolgten experimentellen Ansatz – der Induktion von hochfrequenten Oszillationen durch eine kurze K<sup>+</sup>-Puff-Applikation unter der Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren – konnte natürlich keine Aussage zur mechanistischen Rolle von Interneuronen während *ripple*-Oszillationen unter physiologischen Bedingungen gemacht werden. Dagegen sollten Voraussagen des auf Computer-Simulationen basierenden Traub/Bibbig-Modells (22) getestet werden: Nach diesem können im elektrisch gekoppelten Netzwerk von Pyramidenzellaxonen ~200 Hz-Oszillationen generiert werden (siehe auch Einleitung, II.1.2). Tatsächlich waren unter Blockade der synaptischen Inhibition und der schnellen glutamatergen Transmission extrazellulär messbare Oszillationen im *ripple*-Frequenzband induzierbar (3). Die Applikation zweier getesteter Gap junction-Blocker führte zu einer starken Abnahme der Leistungsdichte und der Synchronizität der induzierten ~200 Hz-Oszillationen (Abb. 4D-F in (3)). Für die Generierung von Oszillationen im *ripple*-Frequenzband sind also schnelle synaptische Transmittersysteme nicht notwendig, wohl aber die elektrische Kopplung, evtl. von Pyramidenzellaxonen (22).

Elektrische Kopplung zwischen Prinzipalzellen ist in der Literatur beschrieben worden (49). Gute experimentelle Evidenzen für deren axonale Lokalisation konnten Draguhn *et al.* (50) sowie Schmitz *et al.* (51) liefern: Die vom Computer-Modell (22) vorhergesagten schnellen Präpotentiale (*spikelets*) wurden in beiden Studien gezeigt. Ebenso beobachteten diese Autoren den Übertritt von Fluoreszenzfarbstoff aus abgeleiteten in benachbarte Pyramidenzellen (51). Dennoch steht ein direkter morphologischer Nachweis für die Existenz der postulierten axonalen elektrischen Kopplung nach wie vor aus. Auch konnte im adulten Gewebe in Pyramidenzellen bis *dato* keines der bekannten Connexine nachgewiesen werden. Möglicherweise sind aus Pannexinen gebildete Gap junctions das morphologische Korrelat der postulierten axonalen elektrotonischen Kopplung. Pannexine gehören zu einer unlängst auch im Vertebraten-Gehirn beschriebenen neuen Klasse von Gap junction-formierenden Proteinen, deren mRNA auch in Pyramidenzellen der Region CA1 nachgewiesen wurde (52).

Es muss darauf hingewiesen werden, dass Cx36 – trotz der hier referierten Befunde – keine *absolut notwendige* Rolle in der Generierung von *ripples* zu spielen scheint, da *ripples* auch in den Cx36-KO-Tieren beobachtet werden konnten ((1); siehe auch die Arbeiten von Hormuzdi *et al.* (53) und Buhl *et al.* (54)).

Der zweite in (1) beschriebene Befund, die Abschwächung von 4-AP-induzierter epileptiformer Aktivität im Cx36<sup>-/-</sup>-Gewebe, kann ebenfalls in den oben erwähnten theoretischen Rahmen eingeordnet werden: Die durch 4-AP hervorgerufenen Entladungen werden von Interneuron-Netzwerken generiert (28), deren Synchronisierung im Cx36<sup>-/-</sup>-Tier reduziert ist. Die Verringerung der elektrischen Kopplung zwischen den Interneuronen führt folglich zu der beobachteten Abschwächung der durch sie generierten Populationsentladungen (1). Interessant in diesem Zusammenhang ist das Ergebnis einer weiteren Studie, bei der gezeigt werden konnte, dass 4-AP-induzierte epileptiforme Aktivität *in vivo* durch den Gap junction-Blocker Carbenoxolone deutlich reduziert werden kann (55). Aufgrund dieser experimentellen Befunde ist es denkbar, dass Gap junction-Blocker eine neue therapeutische Option für bestimmte Formen der Epilepsie darstellen (diskutiert auch in Traub *et al.*, 2002, (56)).

Auf der Grundlage der genannten experimentellen Befunde (1-3) und auf dem Hintergrund bestehender Modelle kann also für die Synchronisierung von Oszillationen im *ripple*-Frequenzband festgehalten werden, dass sie **(1)** die elektrische Kopplung von Axonen involviert, da sie unter Blockade schneller chemischer inhibitorischer und exzitatorischer Transmission stattfinden kann; dass **(2)** keines der zurzeit bekannten Connexine an der postulierten elektrischen axonalen Kopplung (22, 50, 56) beteiligt ist und diese Rolle möglicherweise den jüngst auch für Vertebraten beschriebenen Pannexinen zukommt (52); weiterhin wird hypothetisiert, dass **(3)** Cx36-gekoppelte Parvalbumin-positive Interneurone an der Initiierung von spontanen SPW-R *in vitro* beteiligt sind und dass sie **(4)** ebenfalls die Synchronisierung im 4-AP-Epilepsiemodell vermitteln.