

Aus dem
CharitéCentrum für Grundlagenmedizin
Institut für Neurophysiologie
Direktor Prof. Dr. rer. nat. Jörg R. P. Geiger

Habilitationsschrift

Elektrophysiologie einer marklosen glutamatergen Nervenfasern im Hippokampus der Ratte

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Physiologie,

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Henrik Alle,
geboren am 08.11.1974 in Freudenstadt.

Eingereicht: Juli 2011

Dekanin: Frau Professor Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Alzheimer

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Draguhn

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
2. Eigene Arbeiten	
2.1	
Kombinierte analoge und digitale Kodierung in hippokampalen Moosfasern	7
2.2	
Präsynaptische und axonale GABA _A - und Glycin-Rezeptoren	9
2.3	
Energieeffiziente Aktionspotenziale auf der marklosen Moosfaser	12
2.4	
Effiziente präsynaptische Aktionspotenzialrepolarisation durch K _v 3-Kanäle	14
3. Diskussion	17
4. Zusammenfassung	23
5. Literaturangaben	24
Erklärung	28

Hinweis: in der elektronischen Version sind die Originalpublikationen nicht enthalten, an deren Stelle treten die Abstracts.

Abkürzungen

GABA Gamma-amino-buttersäure

K_vX Spannungsgesteuerter Kaliumkanal der Familie X

1. Einleitung

Nervenzellen von Säugetieren besitzen in der Regel drei anatomisch gut unterscheidbare Kompartimente, den Zellkörper, die davon ausgehenden Dendriten und die vergleichsweise dünne, zunächst marklose Nervenfasern („nichtmyelinisiertes“ Axon), das dem Zellkörper oder zellkörpernah einem Dendriten entstammt (Kandel et al., 2000; Squire et al., 2008), und marklos bleiben oder im weiteren Verlauf myelinisiert sein kann. Das nunmehr klassische - wenn auch historisch nicht älteste - Schema der Signalausbreitung im Zentralnervensystem von Wirbeltieren beinhaltet die Generierung eines Aktionspotenzials im Axoninitialsegment der Nervenzelle bei Überschreiten eines bestimmten Schwellenpotenzials, die aktive Propagation des Aktionspotenzials entlang des Axons, die aktionspotenzial- und calciumabhängige Freisetzung eines Botenstoffes aus den präsynaptischen Strukturen (Boutons), jenseits des synaptischen Spalts die Generierung unterschwelliger postsynaptischer Signale auf Dendriten oder dem Zellkörper nachgeschalteter Nervenzellen mit anschließender passiver Propagation, um bei entsprechender Summation im Axoninitialsegment wieder Aktionspotenziale auszulösen (Kandel et al., 2000; Squire et al., 2008). Dieses klassische Schema hat in den vergangenen Jahren deutliche Erweiterungen erfahren, seit technische Fortschritte es erlaubten, nicht nur am Zellkörper, sondern auch an Dendriten direkte Ableitungen elektrischer Signale vorzunehmen (Übersicht in Stuart & Spruston, 1995). Zum einen wurde beobachtet, daß Aktionspotenziale vom Ort ihrer Entstehung am Axoninitialsegment aus nicht nur ins Axon fortgeleitet werden, sondern auch via Zellkörper in die Dendriten (Stuart & Sakmann, 1994). Zum anderen erkannte man, daß im Dendriten Aktionspotenziale generiert werden können (Martina et al., 2000) bzw. aktive Depolarisationen erfolgen, die aufgrund ihres Alles-oder-Nichts-Verhaltens an klassische Aktionspotenziale erinnern (Übersicht in Spruston, 2008; Larkum et al., 2009). Dies sind bedeutende Entdeckungen im Zusammenhang mit der Vorstellung, wie im Nervensystem Signale und Informationen verarbeitet werden, denn diese aktiven dendritischen Signale

beeinflussen die Informationsverarbeitung im postsynaptischen Neuron und tragen wahrscheinlich mit dazu bei, daß die individuellen Übertragungsstärken von synaptischen Kontakten im Netzwerk der Nervenzellen spezifisch verändert werden können (Spruston, 2008).

Demgegenüber blieb das Bild von elektrischen Signalen bzw. deren Generierung auf Axonen in der Großhirnrinde von Säugetieren bis vor wenigen Jahren unklar. Mangels direkten Meßzugangs zu den überwiegend marklosen Axonen wurden zu deren experimenteller Untersuchung einerseits indirekte Methoden angewandt (z. B. Ruiz et al., 2003; Marder, 2006), andererseits das klassische Modell des ebenfalls marklosen Riesenaxons des Tintenfischs (Hodgkin & Huxley, 1952) auf Axone im Zentralnervensystem von Säugern in modifizierter Form übertragen (Faisal & Laughlin, 2007). Indirekte Meßmethoden erlauben jedoch nur indirekte Schlußfolgerungen, und die Übertragung eines Modells, das an einem bestimmten Modellsystem erstellt wurde, birgt die Gefahr der Unterschiedlichkeit von Modellsystemen. Zum Beispiel sind zwei wesentliche Charakteristika des Tintenfischriesenaxons eine relativ hohe spezifische Membranleitfähigkeit der axonalen Membran in Ruhe und ein Aktionspotenzial, das in seiner Generierung durch einen hohen, sehr unökonomischen Energieverbrauch gekennzeichnet ist (Hodgkin & Huxley, 1952; Hodgkin, 1975). Die technische Entwicklung und die Weiterentwicklung biologischer Präparate erlauben es nun seit wenigen Jahren, von kortikalen Axonen auch direkt elektrisch abzuleiten (Geiger & Jonas, 2000; Shu et al., 2006). So wurden Erkenntnisse zum kortikalen marklosen Axon gewonnen, die aufgrund der bis dahin indirekt erhobenen Daten und Extrapolationen von anderen Modellsystemen unerwartet waren (Alle & Geiger, 2006; Shu et al., 2006; Alle et al., 2009).

Im Laufe der Arbeit an den hier zusammengestellten Projekten rückte die Frage nach Randbedingungen und Prinzipien bei der Entwicklung neuronaler Prozesse zur Erfüllung spezifischer zellulärer Funktionen, wie zum Beispiel des Membranpotenzials oder

Aktionspotenzials, in den Blickpunkt. Zwei Randbedingungen sind geometrischer und biophysikalischer Natur (Laughlin & Sejnowski, 2003). Beispielsweise können Axone aufgrund des Zusammenhangs zwischen Durchmesser und Leitungsgeschwindigkeit nicht beliebig dünn ausfallen, damit zeitliche Verzögerungen der Informationsausbreitung zwischen Nervenzellen eine schnelle, synchrone Prozessierung nicht beeinträchtigen; die Dichte spannungsgesteuerter Ionenkanäle sollte bestimmte Unter- und Obergrenzen nicht unter- bzw. überschreiten, weil im einen Fall die Generierung von Aktionspotenzialen nicht mehr garantiert wäre, im anderen Fall die unerwünschte spontane Entstehung von Aktionspotenzialen kaum oder nicht verhindert werden könnte (Laughlin & Sejnowski, 2003). Eine weitere Randbedingung, die bei der Entwicklung neuronaler Strukturen und Prozesse eine Rolle gespielt zu haben scheint, ist die metabolische Energie, die Organismen selbst ihren Gehirnen wahrscheinlich nicht in beliebiger Menge pro Zeit zur Verfügung stellen konnten; ein Prinzip, welches das Problem der Knappheit nutzbarer Energie in den Griff zu bekommen sucht, ist Effizienz (Laughlin & Sejnowski, 2003).

Zwar wurden diese Randbedingungen erkannt und mögliche Prinzipien zum Umgang damit benannt, gut belegte Beispiele der Umsetzung der Prinzipien in Gehirnen von Säugetieren gibt es aber kaum, außer etwa denen der Miniaturisierung und Strukturierung in sogenannte „Kleine-Welt-Netze“, das heißt lokal hohe, zwischen entfernten Gehirnarealen aber niedrige Konnektivität, und der Möglichkeit, daß neuronale Netzwerke eine Kodierung der Information benutzen, die mit wenigen Aktionspotenzialen auskommt, sogenanntes „sparse coding“ (Laughlin & Sejnowski, 2003). Dahingegen ergibt sich aus der Weise, in der Aktionspotenziale auf dünnen marklosen Axonen gemäß des Modells „Tintenfischriesenaxon“ generiert werden, und den Eigenschaften der axonalen Membran (Hodgkin & Huxley, 1952) offenbar ein Widerspruch zwischen dem angenommenem Prinzip der Effizienz und der biologischen Realisation.

2. Eigene Arbeiten

2.1

Kombinierte analoge und digitale Kodierung in hippokampalen Moosfasern

Die initiale Fragestellung, die zur ersten Arbeit in dieser Reihe führte, stand im Kontext der zu der damaligen Zeit breit untersuchten Funktion präsynaptischer Glutamatrezeptoren des Kainat-Typs (z. B. Schmitz et al., 2001; Darstein et al., 2003). Auf der Suche nach ionotropen, d. h. direkten elektrischen Effekten von auf hippokampalen Moosfaserboutons lokalisierten Kainatrezeptoren ließen sich bei elektrischer Stimulation in der Molekularschicht des Gyrus dentatus im Hippokampus, in der Axone Synapsen mit den Dendriten der Körnerzellen bilden, und gleichzeitig direkter elektrischer Ableitung von Moosfaserboutons, den axonalen Glutamatfreisetzungstellen der Körnerzellen, langsame, transiente und unterschwellige Depolarisationen registrieren. Drei Hypothesen zu deren Generierung wurden aufgestellt. 1. Glutamat, das aus dem abgeleiteten Axon und/oder aus benachbarten, parallel verlaufenden Moosfasern im Stratum lucidum freigesetzt wird, bindet an Glutamatrezeptoren auf dem Moosfaserbouton und verursacht durch Kationeneinstrom die Depolarisation. 2. Kalium, das während propagierender Aktionspotenziale auf den anderen Moosfasern von intra- nach extrazellulär gelangt, depolarisiert das abgeleitete Axon. 3. Elektrisch passiv fortgeleitete, in den Dendriten der Körnerzellen generierte erregende postsynaptische Potenziale führen zu der am Moosfaserbouton beobachteten Depolarisation.

Im Verlaufe der Experimente zur Beantwortung der Fragestellung wurden Hypothesen 1 und 2 falsifiziert, für Hypothese 3 hingegen fanden sich gute Evidenzen. Zusammengefaßt konnte gezeigt werden, daß durch eine überraschend niedrige Membranleitfähigkeit des Axons in Ruhe erregende postsynaptische Potenziale tatsächlich aus der somatodendritischen Domäne der Körnerzelle bis mehrere hundert Mikrometer weit in die Moosfaser hinein passiv fortgeleitet werden können. Von diesen transienten, unterschweligen Depolarisationen

konnte weiterhin gezeigt werden, daß die aktionspotenzialabhängige Glutamatfreisetzung moduliert wird in dem Sinne, daß Aktionspotenziale, die während einer solchen transienten Depolarisation ebenfalls am Moosfaserbouton eintreffen, mehr Glutamat zur Ausschüttung bringen, als wenn die Aktionspotenziale ohne zusätzliche Depolarisation für Glutamatfreisetzung sorgen. Dieser Befund war deshalb so überraschend, weil bis zu diesem Zeitpunkt angenommen wurde, daß in Säugeraxonen Information ausschließlich in Zahl und/oder zeitlichem Abstand von Aktionspotenzialen kodiert werden, aber nicht zusätzlich durch unter-schwellige Membranpotenzialschwankungen (Marder, 2006).

Science 2006 Mar 3;311(5765):1290-3.

Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers.

Alle H, Geiger JR.

Independent Hertie Research Group, Max Planck Institute for Brain Research, D-60528 Frankfurt, Germany.

In the mammalian cortex, it is generally assumed that the output information of neurons is encoded in the number and the timing of action potentials. Here, we show, by using direct patch-clamp recordings from presynaptic hippocampal mossy fiber boutons, that axons transmit analog signals in addition to action potentials. Excitatory presynaptic potentials result from subthreshold dendritic synaptic inputs, which propagate several hundreds of micrometers along the axon and modulate action potential-evoked transmitter release at the mossy fiber-CA3 synapse. This combined analog and action potential coding represents an additional mechanism for information transmission in a major hippocampal pathway.

2.2

Präsynaptische und axonale GABA_A- und Glycin-Rezeptoren

Aus der somatodendritischen Domäne ins Axon passiv fortgeleitete erregene postsynaptische Potenziale sind eine Möglichkeit, wie unterschwellige transiente Membranpotenzialänderungen generiert werden können (siehe 2.1). Wenn bis dato auch keine direkten Evidenzen für einen ionotropen Effekt von Glutamaterezeptoren auf Moosfasern bzw. Moosfaserboutons gefunden werden konnten, so blieben doch als Möglichkeiten andere ligandengesteuerte Ionenkanäle, beispielsweise vom GABA_A-Typ oder Glyzin-Typ. Beide ionotropen Transmitterrezeptoren sind permeabel für Chlorid- und Hydrogencarbonationen (Bormann et al., 1987), und ihr jeweiliges Umkehrpotenzial kann je nach axonalen Chlorid- und Hydrogencarbonatregulationsmechanismen in Bereichen liegen, in denen die Aktivierung dieser Rezeptoren zu Nettoionenströmen und folglich zu Potenzialänderungen der Membran führt, was wiederum die Glutamatausschüttung beeinflussen würde, wie dies an der glutamatergen Calyx von Held im auditorischen Hirnstamm beschrieben wurde (Turecek & Trussel, 2001; Price & Trussel, 2006).

Im Falle der GABA_A-Rezeptoren gab es recht gute indirekte elektrophysiologische Evidenzen für deren Präsenz und Funktionalität auf hippokampalen Moosfasern (Ruiz et al., 2003). Es fehlte jedoch der direkte Nachweis, und unklar blieben auch die Eigenschaften und die Aktivierungsbedingungen des Rezeptors sowie die Quelle des GABA. Die auf den Moosfasern exprimierten GABA_A-Rezeptoren zeigen eine niedrige Affinität für GABA und ihre Dichte ist verglichen mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen sehr niedrig, aber ab juvenilem Alter stabil. Cannabinoidrezeptor-tragende GABAerge Interneurone, wahrscheinlich sogenannte Moosfaser-assoziierte Interneurone (Vida & Frotscher, 2000) konnten als eine Quelle für den Transmitter identifiziert werden, wobei deren Aktivität hoch

sein muß, denn die extrazelluläre GABA-Konzentration wird durch GABA-Transporter auf niedrigem Niveau gehalten.

Die präsynaptischen Glyzinrezeptoren zeichnen sich durch eine höhere Einzelkanalleitfähigkeit als die GABA_A-Rezeptoren aus, sind jedoch in noch niedrigerer Dichte vorhanden, insbesondere bei erwachsenen Tieren. Sie spielen also möglicherweise während der pränatalen und direkt postnatalen Entwicklung des Moosfasersystems eine Rolle.

J Neurosci. 2007 Jan 24;27(4):942-50.

GABAergic spill-over transmission onto hippocampal mossy fiber boutons.

Alle H, Geiger JR.

Independent Hertie Research Group, Max Planck Institute for Brain Research, D-60528 Frankfurt, Germany.

Presynaptic ionotropic GABA_A receptors have been suggested to contribute to the regulation of cortical glutamatergic synaptic transmission. Here, we analyzed presynaptic GABA_A receptor-mediated currents (34 °C) recorded from mossy fiber boutons (MFBs) in rat hippocampal slices. In MFBs from young and adult animals, GABA puff application activated currents that were blocked by GABA_A receptor antagonists. The conductance density of 0.65 mS cm⁻² was comparable to that of other presynaptic terminals. The single-channel conductance was 36 pS (symmetrical chloride), yielding an estimated GABA_A receptor density of 20-200 receptors per MFB. Presynaptic GABA_A receptors likely contain alpha2-subunits as indicated by their zolpidem sensitivity. In accordance with the low apparent GABA affinity (EC₅₀ = 60 µM) of the receptors and a tight control of ambient GABA concentration by GABA transporters, no tonic background activation of presynaptic GABA_A receptors was observed. Instead, extracellular high-frequency stimulation led to transient presynaptic currents, which were blocked by GABA_A receptor antagonists but were enhanced by block of GAT 1 (GABA transporter 1), indicating that these currents were generated by GABA spill-over and subsequent presynaptic GABA_A receptor activation. Presynaptic spill-over currents were depressed by pharmacological cannabinoid 1 (CB1) receptor activation, suggesting that GABA was released predominantly by a CB1 receptor-expressing interneuron

subpopulation. Because GABA_A receptors in axons are considered to act depolarizing, high activity of CB1 receptor-expressing interneurons will exert substantial impact on presynaptic membrane potential, thus modulating action potential-evoked transmitter release at the mossy fiber-CA3 synapse.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Mar 19;393(4):587-91.

Presynaptic glycine receptors on hippocampal mossy fibers.

Kubota H, Alle H, Betz H, Geiger JR.

Independent Hertie Research Group, Max-Planck Institute for Brain Research, D-60528 Frankfurt am Main, Germany.

Presynaptic glycine receptors (GlyRs) have been implicated in the regulation of glutamatergic synaptic transmission. Here, we characterized presynaptic GlyR-mediated currents by patch-clamp recording from mossy fiber boutons (MFBs) in rat hippocampal slices. In MFBs, focal puff-application of glycine-evoked chloride currents that were blocked by the GlyR antagonist strychnine. Their amplitudes declined substantially during postnatal development, from a mean conductance per MFB of approximately 600 pS in young to approximately 130 pS in adult animals. Single-channel analysis revealed multiple conductance states between approximately 20 and approximately 120 pS, consistent with expression of both homo- and hetero-oligomeric GlyRs. Accordingly, estimated GlyRs densities varied between 8-17 per young, and 1-3 per adult, MFB. Our results demonstrate that functional presynaptic GlyRs are present on hippocampal mossy fiber terminals and suggest a role of these receptors in the regulation of glutamate release during the development of the mossy fiber-CA3 synapse.

2.3

Energieeffiziente Aktionspotenziale auf der marklosen Moosfaser

Betrachtet man die Generierung des wahrscheinlich berühmtesten, wiewohl berechneten Aktionspotenzials in der Literatur der Neurophysiologie, Abbildung 17 der Publikation „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve“ von A. L. Hodgkin & A. F. Huxley (1952), stellt man mit Hilfe von Abbildung 18C derselben Publikation unmittelbar fest, daß sich die Natriumein- und Kaliumauswärtsströme während des Aktionspotenzials an einem gegebenen Ort auf dem marklosen Tintenfischriesenaxon zeitlich stark überlappen. Natriumionen und Kaliumionen, die jedoch zeitgleich am selben Ort die Seite der Membran wechseln, tragen nicht zur Umladung der Membran bei, bleiben also ohne elektrischen Effekt. Um nach dem Aktionspotenzial den gleichen Zustand der Ladungsverteilung wieder herzustellen wie zuvor, müssen unter Energieaufwand entsprechend große Ladungsmengen mit Hilfe der Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase auf die jeweils andere Seite der Membran gepumpt werden. Diese Ladungsmengen sind bei 18 °C drei- bis viermal so hoch wie bei einem Signal, das durch perfekte Trennung des Natriumeinwärtsstroms vom Kaliumauswärtsstroms generiert werden würde (Hodgkin, 1975). Eine Literaturrecherche ergab damit zusammenhängend zwei weitere interessante Punkte. Zum einen sah die Ladungsbilanz von Aktionspotenzialen, die für marklose Axone von Säugern simuliert wurden, ähnlich schlecht wie für das Tintenfischriesenaxon aus (z. B. Faisal & Laughlin, 2007), zum anderen wurde diese ungünstige Ladungsbilanz Berechnungen zugrunde gelegt, die sich mit den Energieausgaben eines Organismus für individuelle aktivitätsabhängige Prozesse in der Großhirnrinde beschäftigten (Attwell & Laughlin, 2001). Zeitgleiche Vorarbeiten für das Projekt, das unter 2.4 beschrieben wird, deuteten aber bereits an, daß solch eine ineffiziente Generierung des Aktionspotenzials zumindest für die hippokampale Moosfaser nicht zutrifft, was

Konsequenzen für Energiebudgetberechnungen, Interpretationen von auf energieumsetzenden Prozessen beruhenden Gehirndarstellungsverfahren, Ionenkanalmodellierungen und die universitäre Lehre¹⁾ haben könnte. Um die Bedeutung dieses Problems etwas zu verdeutlichen, seien zwei anatomische Daten genannt (Braitenberg & Schüz, 1998). Ein Kubikmillimeter grauer Hirnsubstanz enthält ca. vier Kilometer größtenteils markloser Axone, auf denen Aktionspotenziale generiert werden, und ungefähr 400 Meter Dendriten, an denen teilweise ebenfalls Aktionspotenziale entlanglaufen. Diese Längen entsprechen bei mittleren Durchmessern von 0,3 Mikrometern für Axone bzw. 0,9 Mikrometern für Dendriten Flächen von ca. 3800 bzw. 1100 Quadratmillimetern pro Kubikmillimeter grauer Substanz, welche wiederum gleichbedeutend mit Quadraten von ca. 6 bzw. ca. 3 Zentimetern Kantenlänge pro Kubikmillimeter sind.

Science 2009 Sep 11;325(5946):1405-8.

Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers.

Alle H, Roth A, Geiger JR.

Independent Hertie Research Group, Max-Planck-Institute for Brain Research, 60528 Frankfurt, Germany.

Action potentials in nonmyelinated axons are considered to contribute substantially to activity-dependent brain metabolism. Here we show that fast Na^+ current decay and delayed K^+ current onset during action potentials in nonmyelinated mossy fibers of the rat hippocampus minimize the overlap of their respective ion fluxes. This results in total Na^+ influx and associated energy demand per action potential of only 1.3 times the theoretical minimum, in contrast to the factor of 4 used in previous energy budget calculations for neural activity. Analysis of ionic conductance parameters revealed that the properties of Na^+ and K^+ channels are matched to make axonal action potentials energy-efficient, minimizing their contribution to activity-dependent metabolism.

2.4

Effiziente präsynaptische Aktionspotenzialreparisation durch K_v3 -Kanäle

In der vorigen Arbeit wurde gezeigt, daß die Generierung und Propagation des Aktionspotenzials auf der hippokampalen Moosfaser nur die ca. 1,3-fache statt der bis dato zu vermutenden 3- bis 4-fachen Ladungs- bzw. Energiemenge verglichen mit der theoretischen Mindestmenge benötigt. Die Kosten des Aktionspotenzials stellten sich als gering heraus im Vergleich zu den Kosten der durch dieses Aktionspotenzial verursachten Vorgänge der synaptischen Transmission zwischen der Moosfaser und glutamatergen und GABAergen postsynaptischen Neuronen. Computersimulationen zeigten, daß die Natrium- und Kaliumkanäle ein Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten bzw. Deaktivierungsverhalten zeigen, welches bezüglich der Ladungs- bzw. Energieeffizienz optimiert ist. Ein interessanter Befund der Simulationen war, daß gleichzeitig mit den optimierten Leitfähigkeitseigenschaften die Leitfähigkeitsdichten für Natrium und Kalium in der Membran, die nötig sind, die De- bzw. Repolarisation zu bewerkstelligen, geringer wurden, was nichts anderes bedeutet, als daß auch infrastrukturell ein Gewinn im Sinne von Energieausgaben oder zumindest von Effizienz gegenüber den bisherigen Modellen zu erwarten ist.

Die Vorhersage über die Dichte der Kaliumleitfähigkeit auf der Moosfaser und die molekulare Identität der Kaliumkanäle, die für die schnelle und präzise Repolarisation des Aktionspotenzials verantwortlich sind, wurden in der folgende Arbeit adressiert. Von der Identität der Kaliumkanäle hängt die erforderliche physikalische Kanalproteindichte in der Membran ab, denn Kaliumkanalfamilien unterscheiden sich in Eigenschaften wie Einzelkanalleitfähigkeit, maximale Offenwahrscheinlichkeit, Verfügbarkeit beim Ruhemembranpotenzial und Rekrutierung während eines so extrem kurzen Signals wie des Aktionspotenzials, also in der Aktivierungskinetik. Es stellte sich heraus, daß Kaliumkanäle

der Familie K_v3 die Hauptrolle bei der Aktionspotenzialrepolarisation spielen, daß K_v1 -Kanäle ebenfalls beitragen, aber zusätzlich eine Funktion bei der Ruhemembranpotenzialeinstellung haben, und daß calcium- und zugleich spannungsgesteuerte Kaliumkanäle mit sehr hoher Einzelkanalleitfähigkeit nur dann eine Rolle spielen bei der Repolarisation, wenn K_v3 -Kanäle gehemmt sind. Weil K_v3 -Kanäle verglichen mit K_v1 -Kanälen etwa zehnmal effektiver zur Repolarisation beitragen, spart die Präsenz von K_v3 -Kanälen etwa 50 % Kanalproteine ein im Vergleich zu einer Situation ohne diese Kanalfamilie.

J Neurosci. 2011 Jun 1;31(22):8001-12.

Sparse but highly efficient K_v3 outpace BK_{Ca} channels in action potential repolarization at hippocampal mossy fiber boutons.

Alle H, Kubota H, Geiger JR.

Institut für Neurophysiologie and Cluster of Excellence NeuroCure, Charité
Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany.

Presynaptic elements of axons, where action potentials (APs) cause release of neurotransmitter, are sites of high densities and complex interactions of proteins. We report that the presence of K_v3 channels in addition to K_v1 at glutamatergic mossy fiber boutons (MFBs) in rat hippocampal slices considerably limits the number of fast, voltage-activated potassium channels necessary to achieve basal presynaptic AP repolarization. The approximately 10-fold higher repolarization efficacy per K_v3 channel compared to presynaptic K_v1 results from a higher steady-state availability at rest, a better recruitment by the presynaptic AP due to faster activation kinetics, and a larger single channel conductance. Large-conductance calcium- and voltage-activated potassium channels (BK_{Ca}) at MFBs give rise to a fast activating/fast inactivating and a slowly activating/sustained K^+ current component during long depolarizations. However, BK_{Ca} contribute to MFB-AP repolarization only after presynaptic K_v3 have been disabled. The calcium chelators EGTA and BAPTA are equally effective in preventing BK_{Ca} activation, suggesting that BK_{Ca} are not organized in nanodomain complexes with presynaptic voltage-gated calcium channels. Thus, the functional properties of K_v3 channels at MFBs are tuned both to promote brevity of presynaptic APs

limiting glutamate release and at the same time to keep surface protein density of potassium channels low. Presynaptic BK_{Ca} channels are restricted to limit further increases of the AP half-duration in case of K_v3 hypofunction, because rapid membrane repolarization by K_v3 combined with distant calcium sources prevent BK_{Ca} activation during basal APs.

3. Diskussion

Obwohl der größere Anteil der Axone im Säugerkortex marklos ist, war bis vor kurzem wenig über deren Physiologie bekannt. Das Modellsystem, von dem viele Eigenschaften auf andere marklose Axone übertragen wurden, war das Riesenaxon des Tintenfischs (Hodgkin & Huxley, 1952). Bis heute illustrieren die klassischen Arbeiten die meisten entsprechenden Kapitel in Lehrbüchern; wichtige Zellparameter und Modelle spannungsgesteuerter Ionenkanäle, die auf diese Arbeiten zurückgehen, werden in Computersimulationen der theoretischen Neurobiologie benutzt. Nicht zuletzt dienen diese Daten und Modelle als Grundlage für Kalkulationen von Energieumsatzverteilungen im Säugergehirn und daher auch für Interpretationen der Signalursache bei funktionellen bildgebenden Verfahren. Die Forschungsarbeiten an der hippokampalen Moosfaser von Säugern zeigen nun, daß sowohl passive Membraneigenschaften dieser marklosen Axone (Alle & Geiger 2006) als auch deren wichtigste aktive Signale, die dem Aktionspotenzial zugrundeliegenden Ionenströme (Alle et al. 2009; Alle et al., 2011), gravierende Unterschiede zum Riesenaxon des Tintenfischs aufweisen.

Der Befund einer im Gegensatz zu bisherigen Annahmen sehr niedrigen spezifischen Ruhemembranleitfähigkeit markloser Axone bedeutet, daß die Informationsweiterleitungs- und Verarbeitungskapazität von Axonen höher sein könnte als die klassischerweise in Säugeraxonen angenommene „digitale“ Abbildung von Information durch „Alles-oder-Nichts“-Aktionspotenziale. Unterschwellige synaptische Potenziale, die somatodendritisch generiert werden, können aufgrund der resultierenden großen Längskonstante passiv bis zu 1 mm vom Zellkörper entfernten präsynaptischen Terminalien propagiert werden, wo sie die aktionspotenzialgetriggerte Glutamatfreisetzung modulieren und damit die Membranpotenzialhistorie vor Generierung des Aktionspotenzials kodieren (Alle & Geiger, 2006). Ein identisches Phänomen wurde im selben Jahr an Axonen von und zwischen neokortikalen Schicht-5-Pyramidenzellen beschrieben (Shu et al., 2006), und seither auch an anderen

Synapsen (Bouhours et al., 2011; Zhu et al., 2011). Der genaue Mechanismus der Erhöhung der Glutamatausschüttung bei Kombination von unter- und überschwelligem Signal an der Moosfaser ist nicht geklärt, ausgeschlossen wurden Veränderungen der präsynaptischen Aktionspotenzialform und Veränderungen des aktionspotenzial-induzierten präsynaptischen Calciumeinstroms durch die transiente unterschwellige Depolarisation. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde der grundsätzlicher Befund an der Moosfaser bestätigt, und zusätzlich eine Veränderung des zytosolischen Calciums vor dem Eintreffen des Aktionspotenzials durch die langsame Depolarisation als Ursache ausgeschlossen (Scott et al., 2008).

Die in der Arbeit von 2007 und 2011 erstmals direkt nachgewiesenen axonalen und präsynaptischen GABA_A- und Glyzinrezeptoren stellen eine weitere Möglichkeit dar, wie zentrale marklose Axone transient depolarisiert werden können, um dann bei koinzidentem Auftreten von Aktionspotenzialen die Glutamatausschüttung zu modulieren. Gemeinhin werden die intraaxonalen Chloridkonzentrationen im Vergleich zu somatischen und dendritischen Kompartimenten als eher hoch eingeschätzt, etwa im Bereich von 20 mMol/l (Price & Trussel, 2006). Dies hätte zur Folge, daß die Aktivierung von GABA_A- oder Glyzinrezeptoren auf Axonen und präsynaptischen Elementen eine Depolarisation verursachen würde.

Funktionell nähert sich damit die axonale der dendritischen Domäne in Bezug auf das Vorhandensein unterschwelliger, elektrotonisch über beträchtliche Strecken propagierender Signale und das Vorhandensein ionotroper Transmitterrezeptoren, genauso wie sich umgekehrt im Dendriten Aktionspotenziale fanden, die zuvor als axonale Signale betrachtet wurden (Stuart & Sakmann, 1994). Noch globaler betrachtet nähern sich damit Nervenzellen des Zentralnervensystems von Säugern funktionell Neuronen im Nervensystem von Invertebraten (Marder, 2006).

Eine weitere Konsequenz der Arbeit aus dem Jahr 2006 ist die Feststellung, daß die Energieausgaben für die Erhaltung des axonalen Ruhemembranpotenzials (siehe Alle et al.

2009) verglichen mit der Situation am Riesenaxon des Tintenfischs mindestens 10-fach niedriger sind. Im Zustand tiefer Anästhesie sind Aktionspotenzialgenerierung und synaptische Transmission extrem reduziert, das negative Membranpotenzial aber bleibt erhalten. In diesem Zustand sinkt der Energieumsatz bzw. die Sauerstoffaufnahme des Gehirns um ca. 50 % (Lassen, 1959), was erahnen läßt, daß ein Ruhemembranpotenzial mit den spezifischen Kosten pro Fläche, wie sie im Tintenfischriesenaxon zu finden sind, aktive neuronale Kommunikation im Säugerhirn bei einer fixierten maximalen Energieversorgung vermutlich stark einschränken würde.

Die neurobiologische Systemebene betreffend ist die Verteilung der Energiekosten im Kortex des Säugerhirns in den vergangenen Jahren wieder in den Fokus des Interesses gerückt, da einige nichtinvasive Methoden zur funktionellen Untersuchung des Gehirns auf aktivitätsabhängigen Änderungen des Energieverbrauchs basieren, z. B. die funktionelle Kernspintomographie, die Nahinfrarotspektroskopie oder die Positronen-Emissionstomographie. Bisherige Berechnungen legten nahe, daß Aktionspotenziale, insbesondere auf marklosen Nervenfasern, im aktivitätsabhängigen Energiebudget stark zu Buche schlagen (Attwell & Laughlin, 2001). Die Autoren gingen dabei in Anlehnung an die Arbeiten von Hodgkin & Huxley davon aus, daß das Aktionspotenzial etwa 3- bis 4-mal so viel Energie „verbraucht“ wie theoretisch notwendig. An der hippokampalen Moosfaser konnte gezeigt werden, daß dies keineswegs der Fall ist, sondern daß Aktionspotenziale nur etwa 1,3-mal so viel Energie wie theoretisch erforderlich umsetzen. Dieser Befund stimmt mit Interpretationen systemischer in-vivo Experimente überein, die den Ort des höchsten Energieumsatzes bei neuronaler Aktivität den Synapsen bzw. postsynaptischen Dendriten zuordnen (z.B. Niessing et al., 2005; Übersicht in Logothetis, 2008).

Die Einsicht, daß Aktionspotenziale gleicher Form und Ausbreitungsgeschwindigkeit durch sehr unterschiedliche zugrundeliegende Natrium- und Kaliumströme generiert werden können (Alle et al. 2009), hat außerdem wichtige Implikationen für das Erstellen und die

Validitätskontrolle von Ionenkanalmodellen, die nicht nur die durch artifizielle Spannungssprungprotokolle hervorgerufenen Ströme, sondern auch die dem physiologischen Signal „Aktionspotenzial“ zugrundeliegenden Ströme reproduzieren können sollten (wie z. B. in Schmidt-Hieber & Bischofberger, 2010).

Der Befund energieeffizienter Aktionspotenziale in zentralen glutamatergen Neuronen von Säugern wurde an verschiedenen anderen Präparaten verifiziert, wenngleich bisher nur am Zellkörper (Carter & Bean, 2010; Hasenstaub et al., 2010), was etwas trivial erscheinen mag, da die somatischen Aktionspotenziale wahrscheinlich aufgrund einer niedrigen Kaliumleitfähigkeitsdichte und/oder einer anderen Kaliumkanalausstattung eine wesentlich größere Halbwertsdauer besitzen und damit den Natriumkanälen mehr Zeit und bessere Bedingungen zur Inaktivierung gegeben werden. Allerdings unterscheiden sich die Natriumkanäle von Zellkörper und Axon möglicherweise in ihrer Untereinheitenzusammensetzung und damit ihren funktionellen Eigenschaften. Und zumindest am Zellkörper gibt es Unterschiede in der Effizienz zwischen glutamatergen Prinzipalneuronen und GABAergen, mit hoher Frequenz aktionspotenzialgenerierenden Interneuronen bzw. zerebellären Purkinjezellen, die beide eine Effizienz zwischen der des Tintenfischriesenaxons und der der Prinzipalneurone aufweisen (Carter & Bean, 2010). Nicht klar ist, ob dies auch für die axonalen und präsynaptischen Domänen dieser GABAergen Nervenzellen zutrifft.

Ein möglicher Grund, weshalb das Aktionspotenzial des Tintenfischriesenaxons so wenig effizient generiert wird, könnte dem Umstand geschuldet sein, daß dieses Axon eine anatomische Spezialisierung ist. Der extrem große Durchmesser von bis zu einem Millimeter entsteht durch das Verschmelzen von sehr vielen, sehr dünnen, marklosen Axonen, wovon jedes zunächst von einem kleinen Zellkörper im Ganglion stellatum ausgeht, um dann nach wenigen hundert Mikrometern mit anderen zu verschmelzen (Young, 1939). Für eine gegebene Temperatur hat das Aktionspotenzial des Riesenaxons eine sehr kurze

Halbwertsdauer im Vergleich zu Aktionspotenzialen von Säugern, was darauf hindeutet, daß die Kaliumleitfähigkeitsdichte relativ hoch ist. Dies wiederum könnte erklären, warum die Natriumkanäle unvollkommen inaktivieren und damit den Einstrom von Natrium auch während später Phasen des Aktionspotenzials ermöglichen (Hodgkin & Huxley, 1952; Carter & Bean, 2009).

Die in der Arbeit von 2009 gemachte Vorhersage über die Dichte der Kaliumleitfähigkeit auf der Moosfaser und die molekulare Identität der Kaliumkanäle, die für die schnelle und präzise Repolarisation des Aktionspotenzials verantwortlich sind, wurden in der folgenden Arbeit adressiert. Die Untersuchung dieser Kaliumkanäle und damit der Repolarisation des präsynaptischen Aktionspotenzials ist von großer biologischer Bedeutung, weil die Repolarisation eine wichtige Determinante der synaptischen Übertragungsstärke darstellt (Augustine, 1990; Borst & Sakmann, 1999; Geiger & Jonas, 2000): die abfallende Flanke des Signals bestimmt den durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle vermittelten Calciumeinstrom in den Moosfaserbouton, der das Signal zur vesikulären Freisetzung von Glutamat darstellt (Geiger & Jonas, 2000).

Von der Identität der Kaliumkanäle hängt die erforderliche physikalische Kanalproteindichte in der Membran ab, weil sich Einzelkanalleitfähigkeit, maximale Offenwahrscheinlichkeit, Verfügbarkeit beim Ruhemembranpotenzial und Rekrutierung während des extrem kurz dauernden Signals „Aktionspotenzial“ zwischen den Kaliumkanalfamilien deutlich unterscheiden können. Wie im Falle der akuten Generierung des Aktionspotenzials durch die Wechselwirkung und das Zusammenspiel zwischen Membranpotenzial, Membranleitfähigkeiten und Transmembranströmen deutet die axonale Expression von spezialisierten K_v3 -Kanälen darauf hin, daß hippokampale Körnerzellen Signale so effizient wie möglich generieren. Die Effizienz ergibt sich hierbei aus einer relativ hohen Einzelkanalleitfähigkeit, einer sehr niedrigen Dauerinaktivierung bei Ruhemembranpotenzialen zwischen -75 mV und -80 mV und einer sehr schnellen Aktivierungskinetik in Membranpotenzialbereichen knapp

oberhalb der Aktivierungsschwelle der spannungsgesteuerten Natriumkanäle. Die Verzögerung der K_v3 -Aktivierung ist genau darauf abgestimmt, gerade nicht mit der Depolarisation durch die Natriumkanäle zu interferieren (Alle et al., 2009).

Zusammengenommen weisen die dargestellten Arbeiten darauf hin, daß die Minimierung von Energieausgaben bzw. die Maximierung der Prozesseffizienz für eine gegebene Funktion auf marklosen Axonen im metabolisch äußerst intensiven Säugerkortex ein vereinheitlichendes Prinzip darstellt, das die Realisierung zentraler biophysikalischer und biologischer Prozesse ermöglicht und mitbestimmt (siehe auch Laughlin & Sejnowski, 2003; Hasenstaub et al., 2010).

4. Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Arbeiten an der marklosen hippocampalen Moosfaser, dem Axon der Körnerzelle im Gyrus dentatus, ist die Generierung unter- und überschwelliger elektrischer Signale. Unterschwellige Depolarisationen im Axon können durch passive Propagation erregender postsynaptischer Potenziale auftreten, die im Bereich der Dendriten und des Somas der Körnerzelle durch postsynaptische Ströme generiert wurden. Den entscheidenden Beitrag leistet die hohe axonale Längskonstante von etwa $450\ \mu\text{m}$ für diese transienten Signale. Die passiv propagierten, transienten Depolarisationen führen zu einer Zunahme der aktionspotenzialabhängigen Glutamatfreisetzung um einen Faktor von im Mittel 1,4.

Ein weiterer Mechanismus, durch den unterschwellige elektrische Signale auf dem Axon generiert werden können, ist die Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle. Auf der Moosfaser gefunden werden konnten ionotrope GABA_A-Rezeptoren und Glyzinrezeptoren.

Die beiden neueren Arbeiten beschäftigen sich mit *dem* überschwelligen Signal im Nervensystem, dem Aktionspotenzial. Dieses Signal auf der marklosen Moosfaser im Hippokampus wird in sehr viel effizienterer Weise generiert als auf dem marklosen Riesenaxon des Tintenfischs bzw. als in Modellsimulationen für marklose kortikale Axone. So benötigt das hippocampale Säugeraxon gerade einmal ungefähr die 1,3-fache Energie des theoretischen Minimums, im Gegensatz zu einem Faktor von 3 oder höher des Tintenfischriesenaxons bzw. der Modelle. Die hohe Effizienz ergibt sich aus der Optimierung von Eigenschaften der Ionenkanäle, die für die Generierung des Aktionspotenzials verantwortlich sind. Im Falle der repolarisierenden Kaliumkanäle wurde die Identität der beteiligten Kanalfamilien untersucht. K_v3-Kanäle tragen durch ihre spezialisierten Eigenschaften wesentlich dazu bei, die physikalische Dichte der Kaliumkanäle insgesamt niedrig zu halten.

5. Literaturangaben

Alle, H., Geiger, J.R.P. (2006) Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science* 311, 1290–1293.

Alle, H., Geiger, J.R.P. (2007) GABAergic spill-over transmission onto hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27, 942-950.

Alle, H., Roth, A., Geiger, J.R.P. (2009) Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 325, 1405–1408.

Alle, H., Kubota, H., Geiger, J.R.P. (2011) Sparse but highly efficient K_v3 outpace BK_{Ca} channels in action potential repolarization at hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 31, 8001-8012.

Attwell, D., Laughlin, S.B. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metabol* 21, 1133-1145.

Augustine, G.J. (1990) Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. *J Physiol (Lond)* 431:343–364.

Bormann, J., Hamill, O.P., Sakmann, B. (1987) Mechanisms of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons. *J Physiol (Lond)* 385, 243-286.

Borst, J.G.G., Sakmann, B. (1999) Effect of changes in action potential shape on calcium currents and transmitter release in a calyx-type synapse of the rat auditory brainstem. *Phil Trans R Soc Lond B* 354:347–355.

Bouhours, B., Trigo, F.F., Marty, A. (2011) Somatic depolarization enhances GABA release in cerebellar interneurons via a calcium/protein kinase C pathway. *J Neurosci* 31, 804-815.

Braitenberg, V., Schüz, A. (1998) *Cortex: statistics and geometry of neuronal connectivity*. Second edition (Springer, Berlin).

Carter, B.C., Bean, B.P. (2009) Sodium entry during action potentials of mammalian neurons: incomplete inactivation and reduced metabolic efficiency in fast-spiking neurons. *Neuron* 64, 898-909.

Darstein, M., Petralia, R.S., Swanson, G.T., Wenthold, R.J., Heinemann, S.F. (2003) Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 23, 8013-8019.

Faisal, A.A., Laughlin, S.B. (2007) Stochastic simulations on the reliability of action potential propagation in thin axons. *PLoS Comp Biol* 3, e79, doi:10.1371/journal.pcbi.0030079.

Geiger, J.R.P., Jonas, P. (2000) Dynamic control of presynaptic Ca^{2+} inflow by fast-inactivating K^+ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28, 927-939.

Hasenstaub, A., Otte, S., Callaway, E., Sejnowski, T.J. (2010) Metabolic cost as a unifying principle governing neuronal biophysics. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 12329-12334.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation of nerve. *J Physiol* 117, 500-544.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000) Principles of neural science. Forth edition (McGraw-Hill, New York).

Hodgkin, A.L. (1975) The optimum density of sodium channels in an unmyelinated nerve. *Phil Trans R Soc Lond B* 270, 297-300.

Larkum, M.E., Nevian, T., Sandler, M., Polsky, A., Schiller, J. (2009) Synaptic integration in tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a new unifying principle. *Science* 325, 756-760.

Lassen, N.A. (1959) Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev* 39, 183-238.

Kubota, H., Alle, H., Betz, H., Geiger, J.R.P. (2010) Presynaptic glycine receptors on hippocampal mossy fibers. *BBRC* 393, 587-591.

Laughlin, S.B., Sejnowski, T.J. (2003) Communication in neuronal networks. *Science* 301, 1870-1874.

Logothetis, N.K. (2008) What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* 453, 869-878.

Marder, E. (2006) Extending influence. *Nature* 441, 702-703.

Martina, M., Vida, I., Jonas, P. (2000) Distal initiation and active propagation of action potentials in interneuron dendrites. *Science* 287, 295-300.

Niessing, J., Ebisch, B., Schmidt, K.E., Niessing, M., Singer, W., Galuske, R. (2005) Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* 309, 948-951.

Price, G.D., Trussell, L.O. (2006) Estimate of the chloride concentration in a central glutamatergic terminal: a gramicidin perforated-patch study on the Calyx of Held. *J Neurosci* 26, 11432-11436.

Ruiz, A., Fabian-Fine, R., Scott, R., Walker, M.C., Rusakov, D.A., Kullmann, D.M. (2003) GABA_A receptors at hippocampal mossy fibers. *Neuron* 39, 961-973.

Schmidt-Hieber, C., Bischofberger, J. (2010) Fast sodium channel gating supports localized and efficient axonal action potential initiation. *J Neurosci* 30, 10233-10242.

Schmitz, D., Mellor, J., Nicoll, R.A. (2001) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291, 1972-1976.

Scott, R., Ruiz, A., Henneberger, C., Kullmann, D.M., Rusakov, D.A. (2008) Analog modulation of mossy fiber transmission is uncoupled from changes in presynaptic Ca²⁺. *J Neurosci* 28, 7765-7773.

Shu, Y., Hasenstaub, A., Duque, A., Yu, Y., McCormick, D.A. (2006) Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature* 441, 761-765.

Spruston, N. (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9, 206-221.

- Squire, L.R., Bloom, F.E., Spitzer, N.C., du Lac, S., Gosh, A., Berg, D. (2008) *Fundamental Neuroscience*. Third edition (Academic Press of Elsevier, San Diego).
- Stuart, G., Sakmann, B (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367, 69-72.
- Stuart, G., Spruston, N. (1995) Probing dendritic function with patch-pipettes. *Curr Op Neurobiol* 5, 389-394.
- Turecek, R., Trussell, L.O. (2001) Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 411, 587-590.
- Vida, I., Frotscher, M. (2000) A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1275-1280.
- Young, J.Z. (1939) Fused neurons and synaptic contacts in the giant nerve fibres of cephalopods. *Phil Trans R Soc Lond B* 229, 465-503.
- Zhu, J., Jiang, M., Yang, M., Hou, H., Shu, Y. (2011) Membrane potential-dependent modulation of recurrent inhibition in rat neocortex. *PLoS Biol* 9, e1001032.

Erklärung

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 22.06.2011

Henrik Alle