

Aus dem Institut für Neurophysiologie
Johannes-Müller-Zentrum für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Gedächtnisassoziierte synchrone Netzwerkoszillationen im
Hippocampus der adulten Ratte *in vitro*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leander Phillip van den Boom

aus Münster

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Dietmar Schmitz
 2. Prof. Dr. med. Denise Manahan Vaughan
 3. Prof. Dr. med. Uwe Heinemann

Datum der Promotion: 09.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1) ZUSAMMENFASSUNG	4
2) EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	5
3) METHODIK	7
4) ERGEBNISSE UND DISKUSSION	11
5) LITERATURVERZEICHNIS	16
6) ANTEILSERKLÄRUNG	18
7) DANKSAGUNG	19
8) EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	20
9) ORIGINALARBEITEN	21

1) Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Stimulationsparadigmen, welche Langzeitpotenzierung induzieren, sharp wave ripple Komplexe (SPW-R) induziert, denen die sukzessive Entladung hippokampaler Neurone zugrunde liegt. Diese SPW-R Komplexe ähneln in ihren Eigenschaften denen spontan auftretender SPW-R: sie entstehen primär in der Subregion CA3 und propagieren über das CA1 zum Subiculum. Dabei hängt ihre Aufrechterhaltung essentiell von AMPA/Kainat Rezeptoren ab, die Induktion hingegen steht in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung der NMDA Rezeptoren. Einmal induziert führt eine Blockade der NMDA Rezeptoren nicht mehr zur Unterbrechung der SPW-R; der exzitatorische Anteil über AMPA/Kainat Rezeptoren reicht zur Aufrechterhaltung aus. Im Gegenzug zur hochfrequenten Stimulation kann eine niederfrequente Reizserie, welche Langzeitdepression induziert, zum Zusammenbruch der SPW-R Komplexe führen. Auf intrazellulärer Ebene zeichnet sich während der SPW-R Komplexe eine dynamische Reorganisation neuronaler Netzwerke ab, die gleichsam Zellen in ein Netzwerk rekrutieren als auch aus dem Zellverband ausschließen kann. Unter dem Einfluß des GABA A Rezeptor Antagonisten Bicucullin werden bereits vorher induzierte SPW-R Komplexe in prolongierte Entladungen mit deutlich höherer Amplitude transformiert. Der Frequenzinhalt der ripples entspricht hier etwa 300 Hz. Als Ausdruck fehlender Inhibition zeigen intrazelluläre Ableitungen von Pyramidenzellen eine wesentlich stärkere und verlängerte Depolarisation mit bis zu 40 Aktionspotentialen während eines SPW-R Komplexes. Insgesamt ähneln diese Eigenschaften denen recurrenter epileptiformer Entladungen (RED), wie sie schon im Menschen oder der Ratte nachgewiesen wurden. In weiteren Experimenten wurde der Einfluß von Serotonin, Dopamin und Norepinephrin auf sowohl tetanisch als auch durch Carbachol oder Kainat induzierte Gammaoszillation untersucht. Die pharmakologisch induzierten Gammaoszillationen wurden durch alle getesteten Monoamine dosisabhängig supprimiert und ihr Frequenzinhalt leicht erhöht. Dieser Effekt wird durch Isoproterenol bei tetanisch und pharmakologisch induzierten Gammaoszillation gleichermaßen simuliert und weist mechanistisch auf einen Zusammenhang mit intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat hin. Bei tetanischer Induktion hingegen werden die Oszillationen unter dem Einfluss der Monoamine augmentiert. Diese Ergebnisse deuten eine Beteiligung anderer Zelltypen bei tetanisch induzierter Gammaoszillation als bei pharmakologischer Induktion an.

2) Einleitung und Zielsetzung

Als physiologisches Korrelat der einfachsten Form von Gedächtnis auf zellulärer Ebene ist heutzutage das Modell der Langzeitpotenzierung (LTP) anerkannt. Es beschreibt die lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung auf einen gleichbleibenden Reiz und stellt damit eine Form der synaptischen Plastizität dar. Neben ausgeprägten intrazellulären Veränderungen sind sogar morphologische Anpassungen in Form von Dendritenwachstum (spines) beschrieben worden, welche häufig genutzte synaptische Verbindungen stärken und somit Informationen und deren Fluss bahnen können. Schließen sich nun einzelne Zellen zu einem Verbund, einem Netzwerk zusammen, so sind sie in der Lage, vorher gespeicherte Informationen über eine synchrone Entladung aus der hippokampalen Formation in höher gelegene kortikale Areale zu transferieren, ein Prozess, der Konsolidierung genannt wird⁽¹⁾. Derart synchrone Entladungen konnten bereits in Rattenexperimenten sowohl *in vivo* vor allem während Ruhephasen oder im slow wave sleep als auch *in vitro* nachgewiesen werden^(2, 3). Zudem konnten weitere *in vivo* Experimente an Ratten zeigen, dass die zuvor gelernten Inhalte in umgekehrter Reihenfolge und zeitlich kondensiert während einer solchen synchronen Entladung abgerufen wurden⁽⁴⁾. Ihre charakteristische Eigenschaft ist eine langsame Depolarisationswelle (sharp wave), welche von einer hochfrequenten Oszillation überlagert wird (ripples). Derartige Netzwerkphänomene sind keinesfalls nur im Hippocampus beobachtet, sondern auch in der Amygdala und in parahippocampalen Regionen wie dem Presubiculum^(5,6). Eine synchrone Netzwerkaktivität, welche den SPW-R Komplexen ähnelt, konnte auch bei Patienten mit Epilepsie nachgewiesen werden, wobei die Oszillationen hier deutlich höher frequent sein konnten⁽⁷⁾. Unter der Vorstellung, dass Gammaoszillationen an der Bindung einzelner Neurone zu funktionellen Netzwerken beteiligt sind und als intrinsischer Rhythmusgeber ein zeitliches Muster für neuronale Aktionspotentiale vorgibt, wodurch die Speicherung von Informationen in neuronalen Netzwerken erleichtert⁽⁸⁾ wird, wurden in einer weiteren Serie von Experimenten schließlich der Effekt von Monoaminen auf sowohl tetanisch als auch pharmakologisch induzierte Gammaoszillationen untersucht. Sollte eine vermehrte Freisetzung von Monoaminen, wie sie schon in Tierexperimenten bei Exploration neuer Situationen beobachtet wurden^(9, 10), nun zu einer Verstärkung dieser Oszillationen führen, könnte dieser Mechanismus zur Gedächtnisformierung beitragen⁽¹¹⁾.

Vor diesem Hintergrund ergeben sich als zentrale Fragestellungen der vorliegenden Arbeit, in wie weit sich Gammaoszillationen durch die Präsenz von Monoaminen variieren lassen, welche zellulären Mechanismen der Entstehung von SPW-R zugrunde liegen, wie sie sich pharmakologisch modulieren lassen und in wie weit sie sich von pathologische Entladungen unterscheiden. In den für diese Dissertationsschrift verwendeten Studien wurden hierzu folgende Untersuchungen durchgeführt:

(1) Anhand eines Modells von tetanisch induzierten SPW-R Komplexen wurden ihre physiologischen Eigenschaften, die für die Entstehung notwendigen Voraussetzungen und die Dynamik hippocampaler Netzwerke analysiert.

(2) Als Abgrenzung zur physiologischen Netzwerkdynamik wurden Untersuchungen an pharmakologisch enthemmten neuronalen Netzwerken durchgeführt, welche pathophysiologisch dem Bild wiederkehrender epileptiformer Entladungen entsprechen.

(3) Unter der Vorstellung, dass Gammaoszillationen bei der Bindung von Neuronen in funktionelle Netzwerke involviert sind, wurden pharmakologische Studien an sowohl durch Carbachol und Kainat als auch durch tetanische Stimulation induzierte Gammaoszillationen durchgeführt.

3) Methodik

Präparation der Hirnschnitte: Wistar Ratten (durchschnittliches Alter zwischen 5 und 8 Wochen) wurden unter tiefer Ether Narkose decapitiert, die Gehirne entnommen und in ein 4 °C kaltes Bad aus carbogeniertem künstlichem Liquor transferiert. Der künstliche Liquor bestand aus: 129 mM NaCl, 21 mM NaHCO₃, 3 mM KCL, 1,6 mM CaCL₂, 1,8 mM MgSO₄, 1,25 mM NaH₂PO₄ und 10 mM Glucose (gesättigt mit 95% O₂ und 5% CO₂). Alle Tierversuche wurden durch die Lageso (G0328/98, G0024/04) zugelassen. Die Präparation horizontaler hippocampaler Hirnschnitte mit einer Dicke von 400 µm wurden unter einem Winkel von 12 Grad in fronto-occipitaler Schnittrichtung mit einem Vibratom (752 M Vibroslice, Campden Instruments, Loughborough, England) vorgenommen. Anschließend wurden sie in eine Interface-Kammer transferiert. Hier wurden die Hirnschnitte mit carbogeniertem künstlichem Liquor umspült (Temperatur; 34-36 °C ± 0,5 °C, Flußrate: 1,6 ml/min, pH: 7,4). Dissektionen zwischen der CA3 und der CA1 wurden mit einem micro cutter (Fine Science Tools) durchgeführt. Vor Beginn der Messungen verblieben die Hirnschnitte mindestens eine Stunde in der Interface-Kammer.

Aufzeichnungen: Die extrazellulären Feldpotentiale wurden im stratum pyramidale der CA1 und CA3b und im Subiculum mit Mikroelektroden, die mit 154 mM NaCL (3-10 MΩ) gefüllt wurden, aufgezeichnet. Konzentrationsänderungen des extrazellulären Kaliums [K⁺]_o wurden mittels einer zweilumigen feldpotential- und ionenselektiven Mikroelektrode aufgezeichnet, deren ionenselektiver Schenkel mit dem Potassium Ionophore Cocktail A (60031; Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) gefüllt wurde. Diese Elektroden wurden nur verwendet, wenn sie auf einen zehnfachen Anstieg der Kaliumkonzentration mit einer Potentialveränderung von 59 ± 2 mV reagierten. Intrazelluläre scharfe Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglas hergestellt (o.d. 1,2 mm) und mit 2.5 M K⁺-Azetat gefüllt. Der Widerstand der Elektrodenspitze lag bei 70 – 90 MΩ. Die intrazellulären Messungen wurden mit einem SEC 05L Verstärker (NPI Instruments, Tamm, Deutschland), die extrazellulären Messungen mit einem hauseigenen Gerät verstärkt. Der low-pass Filter lag bei 1 kHz und die Signale wurden im Falle der extrazellulären Ableitung mit 5 kHz, im Falle der intrazellulären Ableitung mit 10 kHz digitalisiert und über ein CED 1401 Interface (Cambridge Electronic Design) auf einem Computer gespeichert.

Stimulationsprotokoll: Die Oszillationen wurden durch tetanische Stimulation im stratum radiatum der Area CA1 über eine bipolare Platinelektrode (50 μm , 140-200 μm Elektrodenabstand) ausgelöst. Das erste Hochfrequenzstimulationsprotokoll (HFS) bestand aus drei Serien von je 40 Einzelpulsen und einer Dauer von 100 μs . Das Interpulsintervall betrug 10 ms und das Intervall zwischen den einzelnen Serien 40 s. Das zweite Stimulationsprotokoll (TBS) bestand aus 12 Serien mit je 4 Einzelpulsen, wobei die Dauer der Stromapplikation und das Interpulsintervall identisch waren. Lediglich das Intervall zwischen den Serien wurde auf 200 ms gesenkt. In allen Experimenten wurde entweder das erste oder das zweite Stimulationsprotokoll benutzt und alle 5 Minuten wiederholt. Im Falle der tetanisch induzierten Gammaoszillation wurde ein Stimulationsprotokoll mit entweder 40 oder 100 Hz (Serien von 20 - 40 Pulsen mit einer Länge von 100 μs) angewendet, welches alle 5 Minuten wiederholt wurde.

In zusätzlichen Experimenten wurde der Stimulationspunkt in das distale radiatum nahe dem Subiculum, in das stratum moleculare des Gyrus dentatus, in den Hilus oder in das stratum radiatum der CA3 verlegt. Zudem wurden die Moosfasern in coronaren Hirnschnitten über eine monopolare Platinelektrode (20 μm) im stratum radiatum der CA3c stimuliert. Als Kriterium für Moosfaserreizung diente die Facilitierung des Feldpotentials über einen Anstieg der Einzelpulsstimulationsfrequenz von 0,1 auf 1 Hz um mehr als 200%. Ein Reiz wurde dabei mit circa 70% (= 1,8 – 3 V) der Stimulationsintensität gesetzt, die eine maximale Amplitude des Feldpotentials als Antwort in der CA3 und CA1 auslöst. Während der Stimulation wurden Veränderungen in der extrazellulären Kaliumkonzentration $[\text{K}^+]_o$ aufgezeichnet. Im CA3 wurde LTP entweder über eine Hochfrequenzstimulation (HFS) oder über ein Thetaburst Stimulationsprotokoll (TBS) ausgelöst. Eine Langzeitdepression (LTD) hingegen wurde über eine Stimulation mit 1 Hz für 900 s ausgelöst. Dieses Protokoll wurde bis zu dreimal mit einem Abstand von je 10 Minuten wiederholt.

Datenanalyse: Im Falle der Analyse der SPW-R wurde die Stärke der Oszillationen über eine Powerspektrum der Rohdaten in einem Integral zwischen 0 und 400 Hz bestimmt. (Spike 2 Software, Cambridge Electronic Design). Zur Detektion der ripple wurden die Rohdaten in Epochen von 3 Minuten Länge unterteilt und mit einem band-pass Filter (40 - 400 Hz) bearbeitet, wobei der Grenzwert zur Detektion auf den vier- bis sechsfachen Wert der Standardabweichung des Grundrauschens gesetzt wurde. Zur

Detektion der langsamen sharp waves (SPW) wurden die Rohdaten mit einem low-pass Filter (20 Hz) gefiltert. Die zeitliche Aufeinanderfolge von Aktionspotentialen und der ripple Aktivität wurde nach Filterung der Rohdaten mit einem band-pass Filter (40 - 400 Hz) berechnet, indem der zeitliche Abstand zwischen der Spitze eines Aktionspotentials und der nächsten korrespondierenden negativen ripple Spitze bestimmt wurde. Dabei wurde eine hausintern programmierte Software benutzt (H. Siegmund, Institut für Neurophysiologie, Charité). Auto- und Kreuzkorrelationen wurden aus 500 ms Abschnitten berechnet. Die dominante Frequenz wurde aus der ersten und zweiten Spitze des Auto-Korrelogramms bestimmt. Zur Bestimmung der Verzögerung des Signals zwischen zwei Arealen (Latenz) wurde eine Kreuzkorrelation durchgeführt und die Latenz aus dem Abstand der Spitze des Korrelogramms zum Wert $t = 0$ bestimmt. Bei der Analyse der Gammaoszillation wurde ein Powerspektrum über einen Abschnitt von 5 Minuten der durch Carbachol oder Kainat induzierten Oszillation über einen FFT-Algorithmus (schnelle Fourier Transformation) berechnet. Hieraus wurde die Hauptfrequenz und maximale Stärke der Oszillation des jeweiligen Powerspektrums bestimmt. Im Falle der Stimulus induzierten Gammaoszillation betrug der Zeitraum der Analyse 1 s. In jeder Untersuchungsgruppe (control, drug application, wash out) wurden pro Hirnschnitt 5 aufeinanderfolgende Epochen von Gammaoszillationen untersucht. Ihre Hauptfrequenzen und Oszillationsstärken wurden gemittelt, um die individuelle Variabilität der Oszillationen in einem Hirnschnitt auszugleichen. Schließlich wurde aus allen analysierten Hirnschnitten ein Mittelwert gebildet. Zur Bestimmung der Latenz zwischen CA3 und CA1 wurde eine Kreuzkorrelation zwischen CA3 und CA1 über eine Epoche von einer Sekunde aus den Rohdaten beider Areale für jeden Hirnschnitt durchgeführt und daraus ein gemittelter Kreuzkorrelations-Koeffizient errechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit einem one-way ANOVA oder dem Wilcoxon Test bestimmt, wobei $p < 0.05$ als signifikant angesehen wurde.

Substanzen: Alle Substanzen wurden in künstlichem Liquor gelöst und über eine Perfusionspumpe kontinuierlich der Interface-Kammer zugefügt. Dabei wurden die folgenden Substanzen benutzt: 20 μM 6-cyano-7-nitro-quinoline-2,3-dione (CNQX), 50 μM (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin-maleat (MK-801), 200 μM Carbenoxolon (3 β -3-[(3-carboxypropanoyl)oxy]-11-oxoolean-12-en-30-Säure), 50 μM D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanonische Säure (D-AP5), 5 μM Bicuculline-Methiodid (Bicucullin), 5 μM SR-95531 (Gabazin), 100 – 150 nM 2-carboxy-

3-carboxymethyl-4-isopropenyl-pyrrolidin (Kainsäure), 20 μM (2-carbamoyloxyethyl)-trimethylammonium chlorid (Carbachol), 30 – 200 μM 3,4-dihydroxyphenethylamin-hydrochlorid (Dopamin), 30 – 100 μM 5-hydroxytryptamin (Serotonin), 30 – 100 μM (\pm)-Norepinephrine-l-bitartrat-hydrat (Norepinephrin), 50 μM (R,S)-N-ethyl-1-[3-(trifluormethyl)phenyl]propan-2-amin (Fenfluramin), 10 μM (R,S)-3,5-DHPG, 50 μM Forskolin, 100 μM (\pm)-1-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazepin-7,8-diol-hydrochlorid (SKF-38393 hydrochloride), 2 μM (-)-isoproterenol-hydrochloride, 1 μM 8-Brom-3'5'-zyklisches Adenosinmonphosphat (8-Br-cAMP). Um die schnelle Oxidation des gelösten Dopamins (DA) zu verhindern, wurde 1 mM Ascorbinsäure als Antioxidanz in den künstlichen Liquor gegeben.

Zur Analyse des jeweiligen pharmakologischen Effektes wurden sowohl die Inzidenz der SPW-R, die ripple Frequenz, die Frequenz der Gammaoszillation sowie deren Oszillationsstärke unter Kontrollbedingungen während der Applikation und nach dem Auswaschen der Substanz aufgezeichnet.

4) Ergebnisse und Diskussion

Die Applikation einer Serie von Hochfrequenzstimuli im stratum radiatum der CA1 führte zur Induktion einer LTP⁽¹²⁾ und schließlich zur Entstehung repetitiver synchroner Entladungen in Form von SPW-R in der CA3 und CA1 des Hippocampus. Diese so induzierten SPW-R persistierten autonom für die Dauer von maximal 2 Stunden und waren durch eine 30 bis 80 ms dauernde sharp wave charakterisiert, welche von einer Serie kleiner Populationsspiques (ripples) überlagert war. Die Frequenzanalyse dieser ripples ergab ein Frequenzband, das bei 180 Hz lag. Nach weiterer repetitiver Stimulation zeigte sich zwar keine Veränderung der Frequenz der ripples, wohl aber eine Zunahme der Amplitude und der Anzahl der evozierten SPW-R pro Minute, welche nach drei bis fünf Wiederholungen des Stimulationsparadigmas schließlich ein Maximum erreichten. Dabei wurden die SPW-R von einer extrazellulären Kaliumkonzentration begleitet, wie sie unter physiologischen Bedingungen auch in anderen Regionen des Gehirns auftritt⁽¹³⁾. Nach völliger Durchtrennung sämtlicher Fasern, die die Subregionen CA3 und CA1 miteinander verbinden, persistierten die SPW-R in der CA3, wohingegen in der CA1 keine SPW-R mehr nachzuweisen waren. Die SPW-R wurden also zuerst in der CA3 generiert und propagierten mit einer Latenz von 8,5 ms zur CA1. Durch Applikation von AMPA/Kainat Rezeptor Blockern wie CNQX (20 μ M) oder durch pharmakologische Blockade der schnellen elektrischen Übertragung durch gap junctions mit Carbenoxolon (200 μ M) konnten die bereits etablierten SPW-R vollständig unterbrochen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Generation und Aufrechterhaltung der SPW-R abhängig von schneller Synchronisation und exzitatorischer synaptischer Verbindung hippocampaler Neurone ist^(14, 15).

Die Rolle der LTP: Im Gegenzug dazu konnten diese Entladungen nicht durch Antagonisten von NMDA Rezeptoren wie MK-801 (50 μ M) oder D-AP5 (50 μ M) blockiert werden. Wurden diese Substanzen jedoch bereits vor der Induktion der SPW-R appliziert, konnten SPW-R nicht ausgelöst werden. Dieser Zusammenhang macht deutlich, dass zur Entstehung einer SPW-R zunächst die Induktion einer suffizienten LTP⁽¹⁶⁾, zur Aufrechterhaltung aber die Exzitation und Synchronisation einzelner neuronaler Cluster notwendig ist. Mit einem niederfrequenten Stimulationsprotokoll, welches aus 900 Einzelpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz bestand und somit eine

Langzeitdepression induzierte, brachen einmal etablierte SPW-R zusammen und wurden fast vollständig unterdrückt⁽¹⁷⁾. Neben der retrograden Erregung der CA3 über die Schaffer Kollateralen gelang die Induktion der LTP und konsekutiv auch der SPW-R durch repetitive Stimulation mit dem hochfrequenten Stimulationsparadigma über die orthodrome Reizung der CA3 durch die Moosfasern, welche den Gyrus dentatus mit der CA3 verbinden⁽¹⁸⁾. Durch Alteration der Stimulationsfrequenz mit 5, 10, 20 und 50 Hz ließ sich weder eine LTP noch SPW-R in den Schnittpräparaten auslösen⁽¹⁹⁾.

Netzwerkdynamik auf zellulärer Ebene: Intrazelluläre Ableitungen während und nach Induktion von SPW-R zeigten stets prominente inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) oder Sequenzen aus exzitatorischen und frühen inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP-IPSP), aber niemals reine exzitatorische postsynaptische Potentiale, was auf eine starke Beteiligung inhibitorischer Interneurone während der SPW-R hinweist. Des Weiteren konnten vier verschiedene Verhaltensweisen von Neuronen während der Induktion von SPW-R identifiziert werden. Zum einen zeigten die Neurone in über 40% der Fälle einen graduellen Anstieg der EPSP Amplitude und der Anzahl evozierter Aktionspotentiale während einer SPW-R. Den zweitgrößten Anteil mit knapp 38% der untersuchten Zellen bildeten jene Neurone, die mit wachsendem IPSP während der Induktion von SPW-R reagierten und jegliche Generation von Aktionspotentialen unterdrückten. Darüber hinaus imponierten rund 17% der Neurone mit einem graduell reduzierten frühen IPSP und subsequent größeren EPSP, so dass schließlich während der SPW-R Aktionspotentiale ausgelöst werden konnten. In 4% der Neurone jedoch kam es zu einem Anstieg des frühen IPSPs und Reduktion des EPSPs, so dass es hier zu keiner aktiven Teilnahme an den SPW-R kam. Dieses Verhalten auf zellulärer Ebene deckt sich mit der Beobachtung, dass nach Induktion der SPW-R sowohl die Amplitude als auch die Inzidenz der SPW-R bis zu einem gewissen Maximum zunahm und deutet so auf ein plastisches und dynamisches Netzwerk innerhalb der CA3 hin, in dem durch Induktion einer LTP sowohl die exzitatorischen, recurrenten synaptischen Verbindungen im assoziativen Netzwerk der CA3 aber auch die Inhibition durch Interneurone moduliert werden. Neurone können so in einen Verband aus bereits synchronisierten Neuronen aufgenommen aber auch aus diesem ausgeschlossen werden und bieten damit die Voraussetzung für ein plastisches Netzwerk innerhalb der CA3^(3, 20, 21). Allerdings stellte sich die Frage nach

der physiologischen Relevanz dieses Protokolls, und es erwies sich als notwendig zu klären, wieweit diese Ereignisse sich von epileptiformen Entladungen unterscheiden.

Disinhibition des Netzwerks – Ein Epilepsiemodell: Im Gegensatz zu den physiologischen Entladungen einer SPW-R konnten durch die Applikation des GABA A Rezeptor Antagonisten Bicucullin (5 μ M) oder Gabazin (5 μ M) auf naive und tetanisierte Hirnschnitte recurrente epileptiforme Entladungen (RED) ausgelöst werden, die sich in ihren Eigenschaften deutlich von einer SPW-R unterscheiden^(6, 7, 22). Diese Entladungen dauerten bei naiven Hirnschnitten durchschnittlich 169 ms und waren sowohl in ihrer Amplitude mit 6 mV und einer Ripplefrequenz mit durchschnittlich 233 Hz deutlich größer und hochfrequenter als Ripples innerhalb der SPW-R. Sie wurden zusätzlich von einer ausgedehnten Negativierung des Feldes gefolgt. Dabei nahm der Frequenzinhalt der ripples vom Beginn einer RED mit 400 Hz im Verlauf auf unter 200 Hz ab. Bei Hirnschnitten, in denen zuvor SPW-R induziert wurden, war der Frequenzinhalt der ripples mit durchschnittlich 296 Hz noch deutlich höher und der Frequenzabfall innerhalb einer RED milder. Nach Korrelation zellulärer Aktionspotentiale mit den ripples einer RED konnte zum einen gezeigt werden, dass die Anzahl der Aktionspotentiale pro RED immer niedriger als die im Feld aufgezeichneten Anzahl der ripples waren aber die durchschnittlichen 1.6 Aktionspotentiale pro SPW-R deutlich überschritten und zum anderen die Aktionspotentiale in der frühen Phase des RED den ripples um 1 ms vorangingen, wohingegen sich im weiteren Verlauf der RED dieses Verhältnis umkehrte. Dies lässt sich durch die initiale Ausbreitung der Aktivität vom Ursprung und die folgende Prozessierung der Aktivität innerhalb des assoziativen Netzwerks der CA3 erklären. Begleitet wurden die RED von einem extrazellulären Kaliumanstieg, der um ein Zwanzigfaches höher war, als es unter physiologischen Bedingungen vorkommt. Auch die RED brachen nach Applikation des AMPA/Kainat Rezeptor Blockers CNQX wie bei den SPW-R zusammen. Bereits in humanem hippocampalen Gewebe von Patienten mit therapierefraktärer Temporallappenepilepsie konnte gezeigt werden, dass durch antidrome Stimulation ripple Frequenzen von bis zu 400 HZ vorkommen, ohne dass Bicucullin oder Gabazin appliziert wurden⁽²³⁾. Dies deutet auf eine funktionelle Disinhibition hin, die dem Effect von Bicucullin und Gabazin auf bereits induzierte SPW-R oder auf naive Hirnschnitte gleichen. Aufgrund der signifikant höheren ripple Frequenz nach vorangegangener Induktion von SPW-R und der bei Tieren und Menschen, die unter Epilepsie leiden, beobachteten hohen ripple

Frequenzen von >250 Hz, liegt die Vermutung nahe, dass sich wegen unzureichender Inhibition aus physiologischen SPW-R pathologische REDs entwickeln können.

Induktion der Gammaoszillationen: In einer weiteren Serie von Experimenten wurde der Effekt von Monoaminen sowohl auf tetanisch als auch pharmakologisch induzierte Gammaoszillationen untersucht. Durch die Applikation des ionotropen Glutamaterezeptor Agonisten Kainat (100 – 150 nM) konnte in den Subfeldern CA3 und CA1 eine persistente Gammaoszillation mit einer Amplitude von 0,8 – 2 mV in CA3 und 0.15 – 0.3 mV in CA1 sowie einer Frequenz von ca. 40 Hz ausgelöst werden⁽²⁴⁾. Durch die Kreuzkorrelation beider Signale wurde der Ursprung der Oszillationen in der CA3 bestätigt und die Latenz zur CA1 mit 2,7 ms berechnet. Die durch den cholinergen Agonisten Carbachol ausgelösten Gammaoszillationen waren in ihrer Amplitude in der CA3 mit 0.4 – 1 mV und 0.2 – 0.4 mV in der CA1 deutlich kleiner und in ihrer Frequenz mit 30 Hz auch langsamer. Die tetanisch induzierten, transienten Gammaoszillation hingegen wurde durch einen Hochfrequenzstimulus mit 100 Hz für 400 ms im stratum radiatum der CA1 ausgelöst. Bei anfänglich kleiner Amplitude steigerte sich diese im Verlauf auf 3 mV, um dann erneut abzufallen. Ebenso fiel der Frequenzinhalt von anfänglichen 98 Hz auf 67 Hz ab. Durch dieses Stimulationsprotokoll wurde in der CA3 zwar eine LTP ausgelöst, eine Gammaoszillation jedoch nicht.

Modulation über Monoamine: Der Effekt auf durch Kainat bereits etablierte Gammaoszillationen wurde mit den Substanzen NE, 5-HT und DA dosisabhängig untersucht. Alle drei Substanzen waren hierbei in der Lage, in den Subfeldern CA3 und CA1 zum einen die Amplitude der Oszillationen zu verringern, zum anderen aber auch ihre Frequenz leicht zu erhöhen. Im Falle von NE zeigte sich hier in CA3 eine Reduktion der Amplitude auf 25% des normalisierten Ausgangswertes und eine Verschiebung des Frequenzinhaltes von 39 Hz auf 44 Hz. Nach Auswaschen der Substanzen war der Effekt teilweise rückläufig. Ähnliche Ergebnisse wurden für 5-HT und DA auch bei durch CCh induzierten Gammaoszillationen beobachtet. Vorangegangene Untersuchungen zu zellulären Mechanismen der Suppression durch CCh induzierter Gammaoszillationen deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem dopaminergen D1 Rezeptor und der daran gekoppelten Aktivierung der Adenylatcyclase hin, was in einem intrazellulären Anstieg der cAMP Konzentration resultiert⁽²⁵⁾. Um diesen Effekt zu untersuchen wurde der β -Rezeptor Agonist Isoproterol, 8-Br-cAMP und Forskolin, ein Aktivator der Adenylatcyclase verwendet. Alle drei getesteten Substanzen konnten die Amplitude der

durch Kainat induzierten Gammaoszillationen in CA3 und CA1 signifikant reduzieren, so dass hier ein direkter Zusammenhang zwischen intrazellulärem cAMP und Suppression von Gammaoszillation abzulesen ist. Im Falle der tetanisch induzierten Gammaoszillationen konnte ein signifikanter, dosisabhängiger Anstieg der Amplitude, Frequenz und Länge der transienten Oszillation in Anwesenheit der Monoamine NE, 5-HT und DA beobachtet werden. Auch diese Effekte waren nach dem Auswaschen der Substanzen teilweise reversibel. In intrazellulären Ableitungen von Pyramidenzellen der CA1, während tetanisch induzierter Gammaoszillation, generierten alle aufgezeichneten Zellen überschießende Aktionspotentiale bei einem durchschnittlichen Ruhemembranpotential von -64 mV und einem Eingangswiderstand von 36 MΩ. Alle Monoamine führten zu einer signifikanten und reversiblen Hyperpolarisation der Zelle um bis zu 8.4 mV im Falle von DA sowie zu einer signifikanten Reduktion des Eingangswiderstandes der Zellmembran von 36 MΩ auf 24.7 MΩ. Zudem reagierten die Zellen auf Depolarisation mit einer erhöhte Anzahl von Aktionspotentialen (10-30), welche synchron zu den Gammaoszillationen des Feldes waren. In Anlehnung an die intrazellulären Mechanismen der durch Kainat induzierten Gammaoszillationen wurde der Effekt erhöhter intrazellulärer cAMP Konzentration erneut mit den Substanzen Isoproterenol, 8-Br-cAMP und Forskolin untersucht. Durch alle getesteten Substanzen wurde eine signifikante Reduktion der tetanisch induzierten Gammaoszillationen erreicht. Im Falle von Isoproterenol und 8-Br-cAMP kam es zu einem kleinen aber signifikanten Anstieg der Frequenz. Unverändert hingegen war die Dauer der oszillatorischen Aktivität unter den getesteten Substanzen. Im Falle der dopaminergen Modulation konnten die Effekte über den DA- D1 Rezeptor Agonisten SKF-38393 imitiert werden.

Wie bereits in Tierexperimenten *in vivo* gezeigt werden konnte, steigt die Freisetzung diverser Monoamine im Gehirn in Situationen, die ein erhöhtes Aufmerksamkeitsniveau erfordern^(9, 10). Dies ist insbesondere bei der Exploration neuer Umgebungen der Fall. In Zusammenschau mit der Hypothese, dass sowohl persistente Gammaoszillationen (40 Hz) an der globalen Einbindung einzelner Neurone in funktionale Netzwerke beteiligt sind⁽¹¹⁾, als auch dass transiente Gammaoszillationen (70 Hz) in der Lage sind, lokal begrenzte Netzwerke zu formen, kann monoaminerge Modulation zur Bildung von Gedächtnisinhalten beitragen.

5) Literaturverzeichnis

1. Wiltgen BJ, Brown RA, Talton LE, Silva AJ. New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 2004;44(1):101-8.
2. Buzsaki G. Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *J Sleep Res* 1998;7 Suppl 1:17-23.
3. Maier N, Nimmrich V, Draguhn A. Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *J Physiol* 2003;550(Pt 3):873-87.
4. Foster DJ, Wilson MA. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 2006;440(7084):680-3.
5. Ponomarenko AA, Korotkova TM, Haas HL. High frequency (200 Hz) oscillations and firing patterns in the basolateral amygdala and dorsal endopiriform nucleus of the behaving rat. *Behav Brain Res* 2003;141(2):123-9.
6. Bragin A, Engel J, Jr., Wilson CL, Fried I, Buzsaki G. High-frequency oscillations in human brain. *Hippocampus* 1999;9(2):137-42.
7. Bragin A, Wilson CL, Staba RJ, Reddick M, Fried I, Engel J, Jr. Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) in the human epileptic brain: entorhinal cortex. *Ann Neurol* 2002;52(4):407-15.
8. Bibbig A, Traub RD, Whittington MA. Long-range synchronization of gamma and beta oscillations and the plasticity of excitatory and inhibitory synapses: a network model. *J Neurophysiol* 2002;88(4):1634-54.
9. Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P, Alexinsky T. Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci* 1994;14(7):4467-80.
10. Hooks MS, Kalivas PW. Involvement of dopamine and excitatory amino acid transmission in novelty-induced motor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269(3):976-88.
11. Singer W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu Rev Physiol* 1993;55:349-74.
12. Buzsaki G, Haas HL, Anderson EG. Long-term potentiation induced by physiologically relevant stimulus patterns. *Brain Res* 1987;435(1-2):331-3.
13. Kann O, Schuchmann S, Buchheim K, Heinemann U. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *Neuroscience* 2003;119(1):87-100.

14. Draguhn A, Traub RD, Schmitz D, Jefferys JG. Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* 1998;394(6689):189-92.
15. Harris EW, Ganong AH, Cotman CW. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 1984;323(1):132-7.
16. Moser MB, Moser EI. Pretraining and the function of hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 2000;26(3):559-61.
17. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44(1):5-21.
18. Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(11):863-76.
19. Dunwiddie T, Lynch G. Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J Physiol* 1978;276:353-67.
20. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 2001;21(5):565-611.
21. Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 2002;12(5):609-36.
22. Chrobak JJ, Lorincz A, Buzsaki G. Physiological patterns in the hippocampal-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 2000;10(4):457-65.
23. Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, et al. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 2004;24(46):10416-30.
24. Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 1998;394(6689):186-9.
25. Weiss T, Veh RW, Heinemann U. Dopamine depresses cholinergic oscillatory network activity in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2003;18(9):2573-80.

6) Anteilserklärung

Der Promovent Leander van den Boom hatte folgenden Anteil an den Publikationen:

- **Publikation 1:** Behrens et al., Nat Neurosci 2005;8(11):1560-7
(Beteiligung ca. 40%)
Beiträge im Einzelnen: Präparation der Hirnschnitte, Entwicklung der Stimulationsparadigma, Applikation von Carbenoxolone, D-APV, MK801 etc., extracelluläre elektrophysiologische Messungen, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form
- **Publikation 2:** Behrens et al., Eur J Neurosci 2007;25(7):2170-81
(Beteiligung ca. 25%)
Beiträge im Einzelnen: Präparation der Hirnschnitte, Applikation von Bicuculin und Gabazin, extracelluläre elektrophysiologische Messungen, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form
- **Publikation 3:** Wojtowicz AM, van den Boom L et al., Hippocampus 2009;19(3):273-88.
(Beteiligung ca. 65%)
Beiträge im Einzelnen: Präparation der Hirnschnitte, Applikation von Dopamin, Serotonin, Norepinephrine etc., extracelluläre elektrophysiologische Messungen, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form

Prof. Dr. Uwe Heinemann
Betreuender Hochschullehrer

Leander van den Boom
Promovent

7) Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und Worte des Dankes an diejenigen richten, die mich während der Arbeit und ihrer Vollendung angetrieben, unterstützt und inspiriert haben.

Allen voran gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Uwe Heinemann. In den Jahren unserer Zusammenarbeit habe ich ihn nicht nur als ausgezeichneten Wissenschaftler sondern viel mehr noch als Menschen, Gesprächspartner und Querdenker kennengelernt. Immer wieder ist es ihm auf diese ihm so sehr eigene Art und Weise gelungen, mich zu leiten, ohne mich zu drängen, mich zu bremsen, ohne mich zu stoppen und so mich als mein Mentor zu begleiten. Es ist der schmale Grad zwischen Lenken und Loslassen, auf dem eigenständiges Denken gedeiht. Genaugenommen möchte ich mich hierfür bedanken. Und so bleibt das Gefühl am Ende dieser Zusammenarbeit bei einem der Großen der Neurophysiologie gearbeitet haben zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. Christoph Behrens. Seine wissenschaftliche Expertise war Anreiz, seine Ideen und Ansätze waren Inspiration für mich, Neues zu wagen und über Altes, scheinbar bekanntes, erneut kritisch nachzudenken. Über die zahlreichen Stunden im Labor hinaus ist so eine echte Freundschaft gewachsen, für die ich mich an dieser Stelle ganz besonders bedanken möchte.

Darüber hinaus gilt mein Dank all jenen, die in dieser Zeit mich und mein Wirken im Labor direkt oder indirekt beeinflusst haben. Danken möchte ich daher Dr. Siegrun Gabriel und ihrem Mann Herrn Dr. Hans-Jürgen Gabriel für die technische und inhaltliche Unterstützung, Frau Anna Wojtowicz für die Unterstützung zur Entstehung unserer gemeinsamen Publikation, Herrn Dr. Herbert Siegmund für die technische Zusammenarbeit und die zahlreichen Programme zur Auswertung der Daten, Frau Sonja Frosinski, Herrn Sebastian Ivens und Herrn Dr. Alon Friedmann und natürlich all denen, die hier ungenannt bleiben. Ohne die Mithilfe Aller wäre diese Arbeit in der hier vorliegenden Form so nicht möglich gewesen.

8) Eidesstattliche Erklärung

Ich, Leander van den Boom, geb. am 20.10.1979 in Münster, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Gedächtnisassoziierte synchrone Netzwerkoszillationen im Hippocampus der adulten Ratte *in vitro*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 24.06.2010

Leander van den Boom
Promovent

9) Originalarbeiten

1. Behrens CJ, van den Boom LP, de Hoz L, Friedman A, Heinemann U. Induction of sharp wave-ripple complexes in vitro and reorganization of hippocampal networks. *Nat Neurosci* 2005;8(11):1560-7.
2. Behrens CJ, van den Boom LP, Heinemann U. Effects of the GABA(A) receptor antagonists bicuculline and gabazine on stimulus-induced sharp wave-ripple complexes in adult rat hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci* 2007;25(7):2170-81.
3. Wojtowicz AM, van den Boom L, Chakrabarty A, et al. Monoamines block kainate- and carbachol-induced gamma-oscillations but augment stimulus-induced gamma-oscillations in rat hippocampus in vitro. *Hippocampus* 2009;19(3):273-88.