
Methodik und Anwendung der Scanning
Photostimulation zur Analyse der neuronalen
Konnektivität im medialen entorhinalen Cortex.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Dr. med. Michael Hans Karl Bendels

aus

Andernach am Rhein

2. November 2011

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2008 bis 2010 am Bernstein-Zentrum für Computational Neuroscience in München unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. C. Leibold und am Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité in Berlin unter Betreuung von Herrn Professor Dr. D. Schmitz.

Gutachter:

1. Professor Dr. Martin Nawrot
2. Professor Dr. Christian Leibold

Disputation am 17.01.2012

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	xi
1 Methodik der Scanning Photostimulation	1
1.1 Überblick	1
1.2 Konzeptionelle Schwächen der Photostimulation	4
1.2.1 Hotspot-Soma-Relation	6
1.2.2 Spontane synaptische Hintergrundaktivität	8
1.2.3 Reproduzierbarkeit der Aktivierung	11
1.3 Der Detektionsalgorithmus	12
2 Detection of input sites in photostimulation data	15
3 Konnektivitätsanalyse im MEC	27
3.1 Übersicht	27
3.2 Der Entorhinale Cortex (EC)	27
3.2.1 Allgemein	27
3.2.2 Histologie	28
3.2.3 Regionale Aufteilung	29
3.2.4 Extrinsische Konnektivität	30
3.2.5 Intrinsische Konnektivität	33
3.2.6 Fragestellung	34
4 Analysis of excitatory microcircuitry in the MEC	35
5 Diskussion	45
5.1 Algorithmische Detektion	45
5.1.1 Single-Point-Ansätze	45
5.1.2 Detektion präsynaptischer Somata unter Ausnutzung räumlicher Korrelationen	49

5.2	Konnektivitätsanalyse im MEC	51
5.2.1	Funktionelle Aspekte	52
5.3	Kritik und Ausblick	58
5.3.1	Die klassische Photostimulation als Übergang	58
5.3.2	Das Nervensystem als verteilter Algorithmus	59
5.3.3	Die Zukunft der Photostimulation	63
	Zusammenfassung	73
	Abstract	75
	Assoziierte Publikationen	77
	Abkürzungsverzeichnis	79
	Literaturverzeichnis	81

Meinen Eltern
in großer Dankbarkeit!

Einleitung

'If you don't understand the function, do the structure'. So lautete der Vortragstitel des Medizin-Nobelpreisträgers Bert Sakmann auf dem diesjährigen 61. Treffen der Nobelpreisträger in Lindau am Bodensee (2011). Seinen Vortrag widmete der Neurophysiologe jener wissenschaftstheoretischen Erkenntnis, die besagt, dass der Schlüssel zum funktionellen Verständnis biologischer Systeme im Wissen um deren Anatomie liegt - eine wechselseitige Beziehung, die sich auf allen räumlichen Größenordnungen organischer Systeme widerspiegelt:

So determiniert die Quartärstruktur eines Rezeptormoleküls unmittelbar dessen Sensitivität auf Botenstoffe (*molekulare Ebene*). Das Fehlen jeglicher Organellen im Erythrocyten erlaubt diesem - unterstützt durch ein sehr elastisches Cytoskelett - eine extreme Verformbarkeit und sichert damit die lebensnotwendige Sauerstoffversorgung auch jener Kapillargebiete, deren Durchmesser kleiner sind als der Durchmesser eines unverformten Erythrocyten (*subzelluläre Ebene*). Die das Funktionsgewebe des Knochens aufbauenden Osteoblasten ordnen sich dynamisch entlang der wichtigsten den Knochen durchlaufenden Krafttrajektorien an (*zelluläre Ebene*) (in modifizierter Form aus Bendels (2007a)).

Es ist deshalb plausibel anzunehmen, dass auch die Funktionsaufklärung neuronaler Systeme entscheidend an das Wissen um deren strukturellen Aufbau gebunden ist. Dabei lassen sich aus methodischer Sicht zwei Arbeitsebenen identifizieren: Zum einen gilt es, die zellulären Eigenschaften, im wesentlichen Morphologie und Rezeptorbestückung der unterschiedlichen Nervenzelltypen zu charakterisieren und, auf dieser Basis, ihr Ausgangssignal als Funktion des aktuellen Zustandes und afferenter Signale zu beschreiben. Zum anderen ist es notwendig, die Konnektivitätsprinzipien der synaptisch-gekoppelten Neurone funktionell abzubilden. Nur das Zusammenwirken beider Arbeitsebenen schafft die Grundlagen

zur Identifikation und Charakterisierung neuronaler Funktionseinheiten, der sogenannten Mikroschaltkreise (Silberberg *et al.*, 2005).

Bei näherer Betrachtung beider Ansätze kristallisiert sich ein deutliches Ungleichgewicht in der Methodenmächtigkeit heraus: Während die zelluläre Struktur- und Funktionsbeschreibung - im wesentlichen eine Domäne der zellulären Neurophysiologie - auf Basis eines etablierten Methodenspektrums einen großen wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn aufzuweisen hat, der bis zur detaillierten mathematischen Modellierung der Biophysik einzelner Neurone reicht (Johnston & Wu, 1995), sind die meisten neuronalen Schaltkreise bis heute weder anatomisch beschrieben noch funktionell verstanden. Ein wichtiger Grund hierfür liegt u.a. in der enormen Komplexität der synaptischen Organisation: so unterhält beispielsweise eine corticale excitatorische Nervenzelle eines Säugetierhirns rund 14 000 synaptische Kontakte zu benachbarten und räumlich entfernteren Neuronen (Benninghoff *et al.*, 1994). Es ist evident, dass konventionelle anatomische und elektrophysiologische Methoden dieser Komplexität nicht gewachsen sind:

So können anatomische Techniken, wie die Golgi-Technik (Somogyi, 1990), immunhistochemische Färbungen (Beall & Lewis, 1992), anterograde und retrograde Tracing-Methoden (Lanciego *et al.*, 2000), die Elektronen- (Alonso-Nanclares *et al.*, 2005) und Ultramikroskopie (Dodt *et al.*, 2007) zwar die Existenz und das allgemeine Muster synaptischer Verbindungen aufzeigen, genaue Aussagen jedoch über den aktuellen funktionellen Zustand einer synaptischen Verbindung, über ihre Polarität, Stärke, Plastizität und schließlich über ihre exakte zelluläre Herkunft lassen sie für gewöhnlich nicht zu (in modifizierter Form aus Bendels (2008b)). Physiologische Methoden wie die Kreuzkorrelation zwischen den Aktivitäten zweier oder mehrerer Neuronen- oder Neuronengruppen (Hata *et al.*, 1993) können diese Fragen zwar partiell beantworten, aber in der Regel nur für ausgewählte Teilabschnitte, wie zwei recurrent verknüpfte Neurone (Feldmeyer *et al.*, 1999).

Eine Technik, die versucht, diese offenkundige 'Methodenlücke' ansatzweise zu schließen und eine Brücke zwischen Anatomie und Physiologie zu bauen, ist die Scanning Photostimulation (Callaway & Yuste, 2002), deren Prinzip erstmals im Jahr 1994 von Larry Katz und Matthew Dalva von der Duke Universität Durham (USA) vorgestellt wurde (Katz & Dalva,

1994). Sie kombiniert die fokale photochemische Aktivierung eines Transmitters und damit naheliegender neuronaler Strukturen mit der simultanen elektrophysiologischen Ableitung von einem oder mehreren Neuronen. Bei geeigneter Anwendung kann dieses Paradigma dazu genutzt werden, die funktionelle Konnektivität von Nervenzellen in lebenden Hirnschnitten großflächig zu bestimmen.

Nicht zuletzt aufgrund ihrer methodischen Vielseitigkeit und einfachen, kostengünstigen Integration in bestehende Mikroskopsysteme fand die Scanning Photostimulation in den letzten Jahren auch in Deutschland ihre Verbreitung, so u.a. in Düsseldorf (Schubert *et al.*, 2001) und Freiburg (Boucsein *et al.*, 2005). Auf Anregung des Arbeitsgruppenleiters, Professor Dietmar Schmitz, begannen wir im Jahr 2006 am Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité mit der Entwicklung und Verifikation eines Scanning-Photostimulationssystems, dessen Besonderheit neben der flexiblen Definition räumlich ausgedehnter Punktraster in der Bereitstellung einer integrativen Steuerungssoftware zur Durchführung des Experimentes lag (Bendels *et al.*, 2008a).

Die Verifikation des Systems zeigte ein zuverlässig funktionierendes System mit einem insgesamt nur marginalen Verbesserungsbedarf in den Bereichen von Hard- und Software. Weitaus kritischer stellte sich die Situation jedoch in der Analyse der gewonnenen Daten dar. Liessen sich direkte Aktivierungsdaten einer Einzelzelle problemlos ermitteln und interpretieren, dokumentierten die eigentlichen Kartierungsdaten in Wiederholungsmessungen eines identischen Areals eine sehr hohe punktspezifische Variabilität (Korrelation $\rho = 0.3$), die unabhängig von der gewählten Quantifizierungsmethode war und insgesamt keine zuverlässige Aussage zur tatsächlichen Konnektivität zuließ (Bendels *et al.*, 2008a).

Als Hauptursache für die hohe Intertrial-Variabilität ließ sich die spontane synaptische Hintergrundaktivität mit deutlicher Reduktion des Signal-Rausch-Abstandes in den Kartierungsdaten identifizieren; ein bereits von anderen Autoren vormals beschriebenes, jedoch bis dato ungelöstes Problem.

In Anbetracht dessen war es uns nicht möglich, Messdaten zur Konnektivität von Stern- und Pyramidenzellen aus dem medialen entorhinalen Cortex (MEC) in geeigneter Weise zu analysieren; vielmehr waren wir gezwungen, die Datenanalyse dahingehend zu optimieren, dass eine reliable

Detektion präsynaptischer Neurone ungeachtet einer z.T. sehr hohen synaptischen Hintergrundaktivität möglich wird. Die Arbeit wird aufzeigen, dass unter Ausnutzung räumlicher Korrelationen innerhalb der Kartierungsdaten ein derartiger Algorithmus zur Detektion präsynaptischer Neurone realisiert werden kann. Dessen Entwicklung, Verifikation und Bewertung wird Gegenstand des ersten Abschnitts der Dissertation (Kapitel 1 und 2) sein.

Nach diesem 'Proof-of-methods' der Datenanalyse waren wir dann in der Lage, die grundlegenden intrinsischen Konnektivitätsprinzipien der beiden Hauptzellen des medialen entorhinalen Cortex, der Sternzelle und der Schicht-II- und -III-Pyramidenzellen des medialen entorhinalen Cortex zu bestimmen, jener Region also, die als Haupteingangsstruktur der Hippocampusformation eine wichtige Bedeutung in der Etablierung des corticalen Kurz- und Langzeitgedächtnisses zuteil wird (Kapitel 3 und 4).

In der abschließenden Diskussion (Kapitel 5) werden die gewonnenen Erkenntnisse in den bisherigen Wissensstand, insbesondere zur Funktion des entorhinal-hippocampalen Netzwerkes, eingeordnet. Francis Crick formulierte 1979 in einem Artikel des Scientific-American-Magazins den Wunsch nach einer Methode zur selektiven Aktivierung ausgewählter Neurone - 'by which all neurons of just one type could be inactivated, leaving the others more or less unaltered', zitiert in Fenno *et al.* (2011). Der letzte Abschnitt der Arbeit wird aufzeigen, dass die Photostimulation in geeigneter Modifikation und in Kombination mit anderen Technologien, insbesondere bildgebender und optogenetischer Verfahren, dieses erwünschte Potential zur Analyse der dynamischen Interaktion neuronaler Mikroschaltkreise und damit der zugrundeliegenden verteilten Algorithmen besitzt.

Danksagung Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Christian Leibold und Herrn Professor Dietmar Schmitz für alle gebotenen Möglichkeiten, Ihre Unterstützung und ihren fachlichen wie menschlichen Rat in allen Lagen!

Insbesondere meinem direkten Betreuer, Herrn Professor Leibold, bin ich für die perfekte Betreuung während all der Jahre zu großem Dank verpflichtet!

Darüberhinaus möchte ich Herrn Dr. Friedrich Jochenning und Herrn Dr. Prateep Beed für die kompetente Durchführung der Photostimulationsexperimente ganz herzlich danken!

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Martin Nawrot für seine technischen Hilfestellungen bei der Entwicklung des Photostimulations-Systems und seiner Bereitschaft, diese Arbeit als Erstgutachter zu betreuen.

Abschließend möchte ich noch Herrn Professor Klaus Obermayer für seine stetige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren und nicht zuletzt, meinem Vater - nunc est bibendum! - für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Berlin, im Herbst 2011

Michael Bendels.

Kapitel 1

Methodik der Scanning Photostimulation

1.1 Überblick

Die Scanning-Laser Photostimulation, ursprünglich von Katz & Dalva im Jahr 1994 vorgestellt, stellt heute eine etablierte Methode zur Bestimmung der funktionellen Konnektivität in akuten Hirnschnitten dar (Callaway & Yuste, 2002). Der Erfolg der Methode basiert im wesentlichen auf ihrem einfachen Prinzip:

Während man von einem einzelnen Neuron, dem sog. *Zielneuron*, ableitet, induziert man über die photolytische Aktivierung eines exzitatorischen Transmitters (meist Glutamat) an ausgewählten Raumpunkten im Hirnschnitt eine überschwellige *direkte* Aktivierung der dort ortsständigen Neurone. Deren überschwellige Aktivierung in Form eines oder mehrerer Aktionspotentiale ist genau dann am Zielneuron messbar, wenn eine funktionell relevante synaptische Verbindung zwischen beiden Neuronen besteht; in einem solchen Fall wird das Zielneuron *indirekt*, d.h. trans-neural stimuliert; vgl. Abbildung 1.1.

Auf Basis der räumlichen Korrespondenz zwischen Stimulationsort und überschwellig-aktiviertem potentiell präsynaptischem Neuron führt das konsequente Abtasten (*Scanning*) von Raumpunkten im Präparat zur Offenlegung einer afferenten Innervationskarte für das Zielneuron; vgl. Abbildung 1.2.

Hierbei wird pro Stimulationsschritt nur eine begrenzte Anzahl von Neuronen überschwellig aktiviert, so dass die Triggerung einer interneuronal-

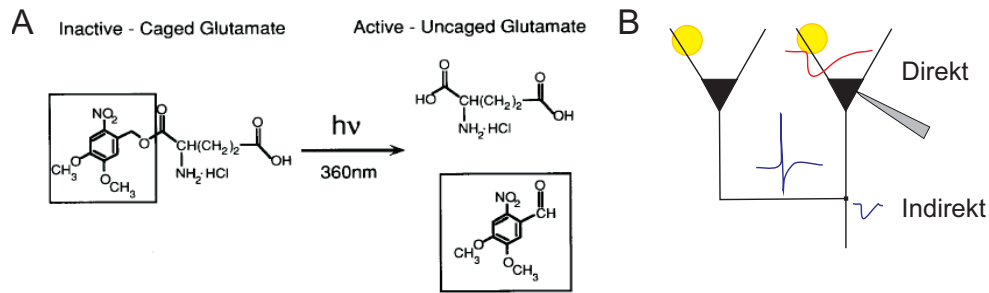


Abbildung 1.1: (A) Photolytische Aktivierung von Glutamat. Der Transfer von Lichtenergie aus dem ultravioletten Frequenzbereich führt zum Aufbrechen der kovalenten Bindung zwischen einer inaktivierenden Caging-Gruppe (Rechteck) und dem Neurotransmitter Glutamat. Das Glutamat wird freigesetzt, entfaltet seine originäre Wirkung an den spezifischen Rezeptoren und durchläuft die substanzspezifischen Degradationsprozesse. Diffusionsprozesse an der Freisetzungsstelle führen dazu, dass die Photostimulation wiederholt an gleicher Stelle ablaufen kann (in modifizierter Form aus Katz & Dalva (1994) und Bendels (2008b) entnommen). (B) Direkte und indirekte Stimulation. Eine direkte Stimulation erfolgt über die unmittelbare Aktivierung dendritischer Rezeptoren an dem gepatchten Neuron. Die indirekte Stimulation der Zielzelle geschieht über die überschwellige Aktivierung einer präsynaptischen Zelle mit nachfolgender Auslösung eines postsynaptischen Signals an dem gepatchten Neuron, der sog. Zielzelle. Da die direkte Aktivierung mit einer zur Einzelsynapse vergleichsweise größeren Transmitterfreisetzung einhergeht, besitzen direkte Signale i. d. R. eine größere Amplitude, langsamere Zeitkonstanten und führen insgesamt zu einem größeren Stromfluss über die Zellmembran. Obgleich mehrere dendritische Abschnitte im Zuge einer einzelnen Stimulation erregt werden können, ist in der Regel nur ein direktes Signal unmittelbar nach Lichtapplikation und noch vor den indirekten Signalen an der Zielzelle messbar, wohingegen indirekte Signale - oftmals Resultat einer Aktionspotential-Serie - zeitversetzt und meist in Gruppen auftreten (s. Abbildung 1.2). Abbildung aus Bendels *et al.* (2008a) entnommen.

propagierten Aktivität im Sinne einer epileptischen Erregbarkeitssteigerung vermieden wird. Hierdurch wird sichergestellt, dass die gemessene Innervationskarte ausschließlich die *monosynaptischen* Afferenzen der Zielzelle dokumentiert.

Auf diese Art erweitert die Scanning Photostimulation konzeptionell bisherige anatomische und physiologische Verfahren zur Analyse der neuronalen Konnektivität (Thomson & Lamy, 2007) um die Möglichkeit der großflächigen funktionellen Charakterisierung nervaler Verbindung, d.h. neben der eigentlichen topographischen Herkunft der synaptischen Verbindungen sind zusätzlich deren Polarität und synaptische Stärke ermittelbar; vgl. Abbildung 1.2.

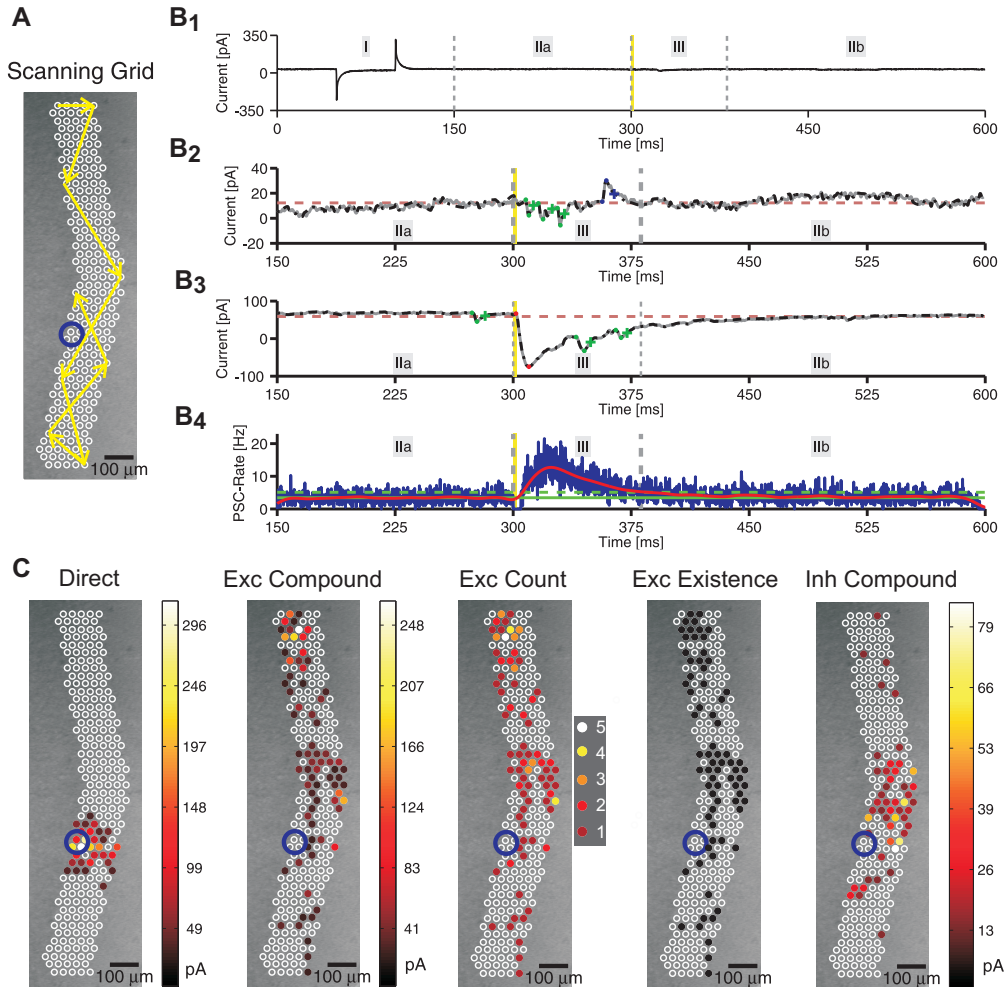


Abbildung 1.2: Synopsis Single-point-Analysis. (A) Die fokale Photostimulation erfolgt anhand eines definierten (hier: intralaminären) Punktrasters. Das Soma des Zielneurons ist mit einem blauen Kreis gekennzeichnet. (B) PSC-Detektion und Klassifikation. (B₁) An jedem Stimulationspunkt wird ein punktspezifisches Signal von 600 ms Dauer aufgenommen und nachfolgend in vier Zeitintervalle (I, IIa, III und IIb) aufgeteilt. Das Zeitintervall I wird zur Dokumentation der zeitlichen Entwicklung der Aufnahmeparameter genutzt. Zu Beginn von Zeitintervall III, zum Zeitpunkt $t=300$ ms, wird der Lichtstimulus (gelber Balken) appliziert (Dauer 2 ms). PSCs in III werden als photo-induziert, in II als spontan-generiert gewertet. (B₂, B₃) PSCs werden algorithmisch detektiert und in direkte PSCs (rot), indirekte EPSCs (grün) und indirekte IPSCs (blau) klassifiziert. Das aufgenommene Signal in (B₃) zeigt ein spontanes EPSC. (B₄) Zur Definition der Dauer von Zeitintervall III ist die durchschnittliche punktspezifische PSC-Rate als Funktion der Zeit aufgetragen (blaue Balken) und zusätzlich mit einem Gauss-Filter geglättet (rote Funktion). Die mittlere Rate von Zeitintervall II definiert die spontane PSC-Rate von 3.6 Hz (grüne durchgezogene Linie). Jenes Zeitfenster, in welchem die PSC-Rate eine Standardabweichung ($\sigma_r=1.8$ Hz) oberhalb der durchschnittlichen spontanen PSC-Rate (gestrichelte grüne Linie) liegt, definiert Zeitintervall III ($\Delta t=81.2$ ms); Abbildung aus Bendels *et al.* (2008a) entnommen. (C) Topographische Darstellung der photo-induzierten PSC-Typen. Die Compound- (Summe der PSC-Amplituden) und Count- (Anzahl der PSCs) Darstellungen zeigen ein hohes Maß an Korrelation.

Dies stellt eine wichtige konzeptionelle Erweiterung dar: einerseits zu anatomischen Methoden, die oftmals nur allgemeine Struktur- und Innervationsprinzipien aufdecken können, andererseits zu konservativen physiologischen Verfahren, die zwar eine funktionelle Charakterisierung der nervalen Verbindung erlauben, jedoch in der Regel nur für ausgewählte Teilbereiche, wie zwei recurrent miteinander verknüpfte Nervenzellen (z.B. Paarableitung, Feldmeyer *et al.* (1999)).

Das Anwendungsspektrum der Photostimulation bleibt dabei per se nicht nur auf die Analyse der intrinsischen Konnektivität corticaler Areale beschränkt, wie sie etwa in den Arbeiten von Schubert *et al.* (2001; 2003; 2006); Shepherd *et al.* (2003); Brivanlou *et al.* (2004); Jin *et al.* (2006) und Bendels *et al.* (2008a) anzutreffen ist. Auch die intranucleäre Konnektivität subcorticaler Kerngruppen, wie die des Colliculus superior (Pettit *et al.*, 1999), des Ncl. suprachiasmaticus (Strecker *et al.*, 1997) oder auch des Ncl. reticularis thalami (Lam *et al.*, 2006) kann photostimulatorisch dargestellt werden. Unter der Voraussetzung einer fasererhaltenden Präparation ist gleichermaßen auch die Analyse räumlich ausgedehnter Projektionssysteme möglich, wie z.B. des Tractus olfactorius, der olfactorischen Projektion vom Bulbus olfactorius in die primären olfactorischen Cortices.

Es sei vermerkt, dass die Grundidee der Photostimulation, die schalterartige, räumlich und zeitlich begrenzte photoenergetische Aktivierung eines Moleküls für eine Vielzahl anderer Fragestellungen nutzbar ist - z.B. zur Charakterisierung der dendritischen Rezeptorbestückung (Dodt *et al.*, 1998). Eine ausführlichere Diskussion hierzu findet sich in Bendels (2007a).

1.2 Konzeptionelle Schwächen der Photostimulation

Ungeachtet ihrer methodischen Stärke haftet der Scanning Photostimulation ein wichtiger konzeptioneller Nachteil an, der unmittelbar mit der Art der Lichtapplikation und damit eng mit dem experimentellen Design des Setups verknüpft ist:

Im überwiegenden Teil der Fälle wird die Lichtapplikation mit sogenannten 1-Photonen-Systemen bewerkstelligt. In derartigen Mikroskopsystemen nutzt man das vorhandene Objektiv, um im umgekehrten Lichtweg den stimulierenden Lichtstrahl im Präparat zu focussieren resp. zu positionieren. Ein derartiges Vorgehen ist aufgrund der nachträglichen

Integrierbarkeit in existierende Mikroskopsysteme und der einfachen Repositionierung des Lichtstrahls flexibel und kosteneffizient, exemplarisch verweisen wir auf unser Setup, dargestellt in Abbildung 1.3.

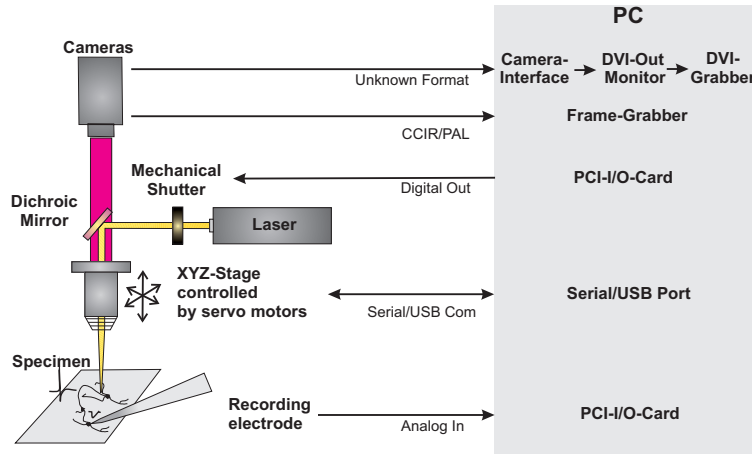


Abbildung 1.3: Setup und Kommunikationsdesign. Das Setup (links) wird über einen Personal-Computer (rechts) gesteuert. Der von einem Laser generierte Lichtstrahl wird über ein flexibles Fiberglaskabel in die Mikroskopoptik geleitet, dort über einen Kaltlichtspiegel in den Lichtweg des Mikroskops reflektiert und anschließend mithilfe des Objektivs fokussiert. Der Lichtzugang zum Präparat wird über ein externes mechanisches Shutterssystem kontrolliert, welches über eine rechnerinterne PCI-I/O-Karte gesteuert wird. Die Mikroskopoptik und damit auch der Laserspot werden über einen motorisierten XYZ-Verschiebetisch gesteuert. Die stöempfindliche Messapparatur kann somit unbeweglich verharren. Die wechselseitige Kommunikation zwischen XYZ-Tisch und Computer geschieht über die Serial- alternativ über die USB-Schnittstelle. Das analoge Signal der Aufnahmeelektrode wird über eine PCI-I/O-Karte punktspezifisch digitalisiert. Zur optischen Kontrolle des Experiments können unterschiedliche Kamerasysteme kombiniert werden. Deren Ausgangssignal wird dabei entweder von einer Framegrabber-Karte direkt eingelesen (CCIR/PAL-Format), alternativ - bei einem unbekanntem Datenformat - über den Umweg der Digitalisierung des gesplitteten Monitor-Out-Signals dem Steuerprogramm zugeführt (DVI-Format); in modifizierter Form aus Bendels *et al.* (2008a) entnommen.

Im Gegensatz zu 2-Photonensystemen, die eine kugelförmige Aktivierungsregion in der Tiefe des Schnittes besitzen und damit zur gezielten Aktivierung einzelner Neurone genutzt werden können (Shoham *et al.*, 2005), entsteht durch die einfache Focussierung des Lichtstrahls ein doppelkegelförmiges Raumvolumen mit einer größerer Lichtstreuung und damit einer deutlich geringeren räumlichen Präzision; vgl. Abbildung 1.4.

Insgesamt ist damit eine zuverlässige und robuste Aktivitätskontrolle der potentiell präsynaptischen Neurone im und in naher Umgebung des Lichtkegels nicht zu gewährleisten.

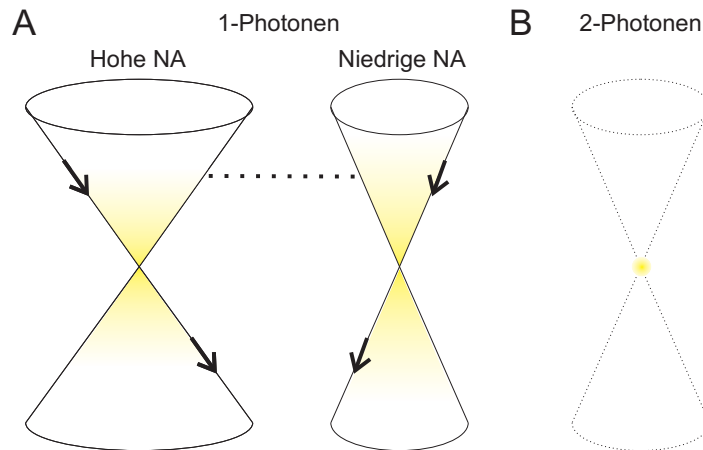


Abbildung 1.4: Vergleichende Darstellung der Lichtintensitätsverteilung in 1- und 2-Photonen-Systemen. **(A)** In 1-Photonen-Systemen findet sich eine doppelkegel-förmige Verteilung der Lichtintensität mit einem Maximum auf Höhe der Brennpunktebene. Der entstehende Intensitätsgradient ist umso größer, je niedriger die numerische Apertur des Objektivs ist. Die natürliche Streuung des Lichtes im lebenden Gewebe und die rasche Diffusion des aktivierten Transmitters verschlechtern die räumliche Genauigkeit der Zellaktivierung. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass Konnektivitätsanalysen für gewöhnlich in einer tiefen Ebene des Schnittpräparates angefertigt werden (nach einer Abbildung aus Koetter *et al.* (2005)). **(B)** Grundlage des 2-Photonen-Verfahrens ist die Verwendung niedrig-energetischer Photonen aus dem Infrarot-Bereich, die aufgrund ihres niedrigen Energiegehaltes das Gewebe ohne Induktion thermischer Schäden und nur gering gestreut durchwandern können. Zur photolytischen Aktivierung müssen nun jedoch zwei niedrigerenergetische Photonen nahezu simultan auf eine Caging-Gruppe treffen. Dies passiert aus statistischen Gründen nur im innersten Bereich des Lichtkegels auf Höhe der Focussierungsebene. Die räumliche Auflösung der Stimulation kann hierdurch - vor allem in der Tiefe des Präparates - deutlich erhöht werden.

Dies hat für die Acquisition, Analyse und Interpretation der Daten wichtige Konsequenzen:

1.2.1 Hotspot-Soma-Relation

Zum einen kann es zu einer unerwünschten überschwellig direkten Aktivierung eines Neurons kommen, auch wenn dessen Soma weit ausserhalb des Lichtkegels liegt. Dies vollzieht sich über die Stimulation jener mitunter weit verzweigten dendritischen Areale, die in Berührung mit dem Freisetzungsvolumen des Transmitters kommen und die aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften (u.a. der Rezeptorbestückung) in der Lage sind, das Neuron überschwellig zu aktivieren (*Hotspots*).

Diese offensichtliche Verletzung der experimentellen Grundannahme, vom Ort der Stimulation auf die Lokalität des präsynaptischen Zellso-mas schließen zu können, kann ohne den Einsatz zusätzlicher, methodisch

anspruchsvoller Verfahren (vgl. hierzu Nikolenko *et al.* (2007)) nicht restauriert werden.

Vielmehr ist es notwendig, mithilfe initialer Kalibrationsexperimente für *jeden* potentiell präsynaptischen Zelltyp eine räumliche *Hotspot-Soma-Relation* als Funktion der applizierten Lichtenergie statistisch abzuschätzen. Neben der so gewonnenen räumlichen Auflösung des Gesamtsystems (meist finden sich rund 75% der evozierten Aktionspotentiale innerhalb einer perisomatischen Umgebung von 75-150 μm), erfasst man so zusätzlich das Erregbarkeitsniveau des jeweiligen Zelltyps in Form einer durchschnittlichen Anzahl von evozierten Aktionspotentialen; vgl. Abbildung 1.5.

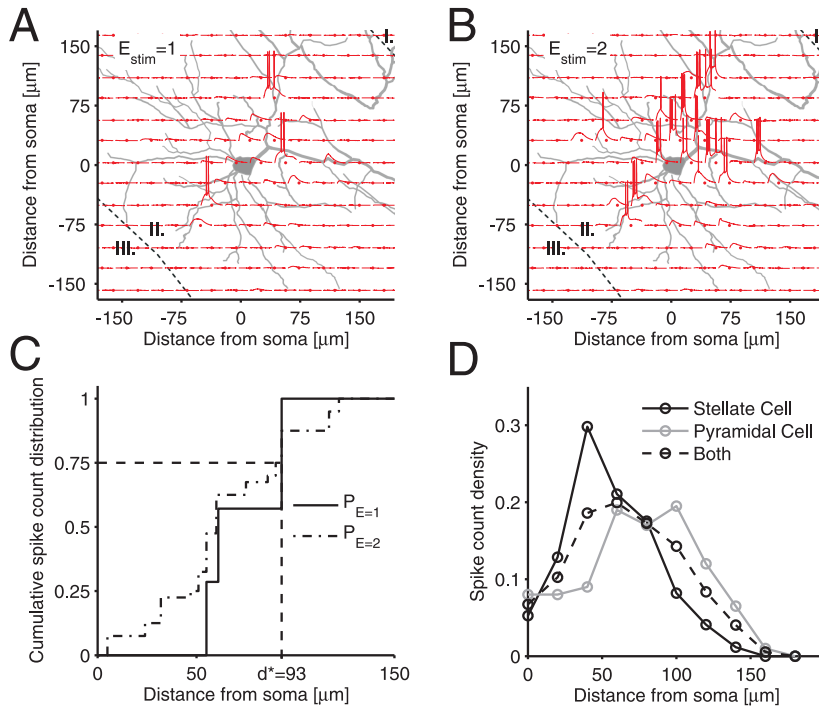


Abbildung 1.5: Photo-induziertes direktes Aktivierungsprofil. **(A)** Charakterisierung des photo-induzierten Aktivierungsprofils einer current-clamped Sternzelle des MEC als Funktion der Laserspot-Position relativ zum Zellsoma. Die Stimulation erfolgt anhand eines hexagonalen Punktrasters (Gridsize $\sim 30 \mu\text{m}$). Die punktspezifische zeitliche Entwicklung des Membranpotentials ist in topographischer Ordnung abgebildet. Überschwellige Aktivierungen werden hauptsächlich perisomatisch evoziert. **(B)** Wie in (A), nur mit einer Stimulationsenergie von $E_{stim}=2$. Alle in (A) identifizierten Hotspots zeigen ein höheres Aktivierungslevel, und vormals grenzwertig unterschwellige Aktivierungen sind nun überschwellig. **(C)** Die kumulative Spike-Count-Verteilung als Funktion der Entfernung vom Stimulationspunkt. Der kritische Wert d^* definiert jene Entfernung vom Soma, in welcher 75 % aller Spikes hervorgerufen werden. **(D)** Spike-Count-Verteilung als Funktion der Distanz für beide exzitatorischen Zelltypen separiert und vereint betrachtet, bei einer Laserenergie von $E_{stim}=1$; in modifizierter Form aus Bendels *et al.* (2008a) entnommen.

Eine valide Aussage betreffend der Konnektivität ist nur dann zulässig, wenn alle ortsständigen, potentiell präsynaptischen Neurone ähnliche Aktivierungseigenschaften besitzen.

1.2.2 Spontane synaptische Hintergrundaktivität

Zum anderen und als ebenso kritisch stellt sich die Herausforderung dar, die photoinduzierten postsynaptischen Signale am Zielneuron zu identifizieren. Da die überschwellige Aktivierung präsynaptischer Zellen nicht präzise in ihrem Zeitverlauf dokumentierbar ist, kann ihre Identifikation an der Zielzelle z.B. durch die Anwendung einer Kreuzkorrelation (Zeiten der Aktionspotentiale gegen jene der postsynaptischen Signale) nicht erfolgen. Dies ist von großer Relevanz, da ein Einzelneuron - eingebettet in corticale Mikroschaltkreise - einer systemimmanenten spontanen synaptischen Hintergrundaktivität ausgesetzt ist. Diese findet ihre überwiegende Ursache in der intrinsischen corticalen Dynamik (MacLean *et al.*, 2005) und wird mit Fortgang des Experimentes durch die großvolumige photolytische Transmitter-Aktivierung bei gleichzeitiger Reduktion intakter inhibitorischer Interneurone noch weiter verstärkt. In Abhängigkeit der untersuchten Hirnregion, des spezifischen Zelltyps und anderer peristatischer Faktoren wie z.B. der Qualität des Schnittpräparates (insbesondere: Intaktheit der Neurone) variiert diese in einem Bereich von 2 Hz bis 10 Hz. Dies ist umso gravierender, als dass per definitionem zahlenmäßig nur *ein* photoinduziertes postsynaptisches Signal ausreichend ist, um die überschwellige Aktivierung eines präsynaptischen Neurons und damit eine funktionell relevante Verbindung zu dokumentieren. Bei einer Abtastfrequenz von rund 0.5-1 Punkten/s wird offensichtlich, dass die eigentliche Information über die afferente Konnektivität eines Neurons in einem nur ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnis vorliegt.

Dieses Problem wurde von einigen Autoren auf dem Gebiet der Photostimulation beschrieben (Callaway, 2002; Shepherd *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2003) und diverse Lösungsansätze zur Vermeidung bzw. nachträglichen Korrektur der Spontanaktivität vorgeschlagen:

Reduktion der Spontanaktivität Die naheliegendste Option einer Unterdrückung der Spontanaktivität z.B. durch die Verwendung speziell angepasster Nährlösungen, etwa durch den Zusatz höherkonzentrierter divalen-

ter Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , führte nur in vereinzelten Berichten zu einer messbaren Reduktion der Spontanaktivität (Shepherd *et al.*, 2003).

Clustering der synaptischen Signale Auch die Idee einer algorithmischen Trennung von spontanen und photoinduzierten PSCs anhand ihrer biophysikalischen Kennwerte zeigte sich in eigenen Arbeiten als nicht durchführbar. Diese Nicht-Trennbarkeit liegt in der Tatsache begründet, dass das Auftreten spontaner PSCs nicht auf einen synaptischen Untergruppentyp beschränkt bleibt.

Punktspezifische Normierung Ein oft gewählter Ansatz besteht in der punktspezifischen Normierung des Messsignals durch Subtraktion der durchschnittlichen Spontanaktivität (Schubert *et al.*, 2003; Bendels *et al.*, 2008a). Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen eines kontinuierlichen Maßes zur Beschreibung der punktspezifischen synaptischen Konnektivität, meist in Form eines Summenwertes (Amplituden, Integral des Stromflusses um seinen Mittelwert). Es zeigt sich jedoch, dass dieses Vorgehen de facto lediglich zu einer räumlichen Schärfung (Absenkung des Profils) der präsynaptischen Ursprungsareale und damit zur Identifikation überdurchschnittlich stark ausgeprägter synaptischer Verbindungen führt; vgl. Abbildung 1.6.

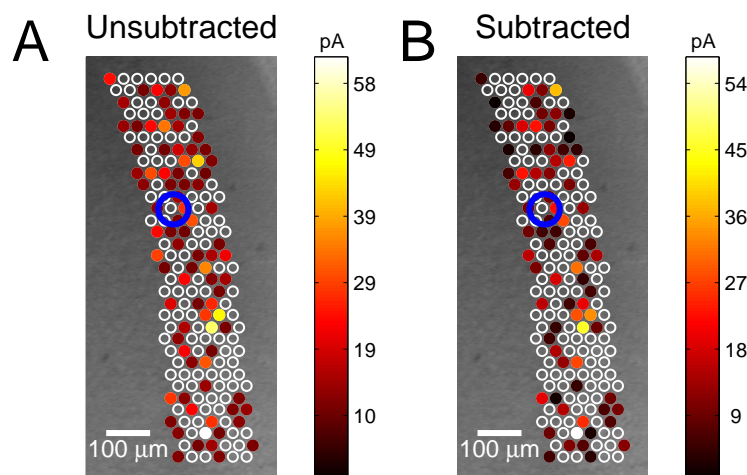


Abbildung 1.6: Subtraktion der Hintergrundaktivität. (A) Topographische Darstellung des photoinduzierten synaptischen Compound-Signals; das Soma des Zielneurons ist durch einen blauen Kreis dargestellt. (B) Zur Korrektur der Spontanaktivität findet eine punktspezifische Subtraktion der Spontanaktivität statt. Insgesamt führt dies zu einer Absenkung des Aktivitätsprofils mit dem Verschwinden einzelner schwacher synaptischer Signale im Sinne einer Profilschärfung (aus Bendels *et al.* (2008a)).

Trial-Average Ein hierzu alternativer Weg ist die punktspezifische Mittelwertbildung über mehrere Stimulationsdurchläufe, der sogenannte Trial-Average (Callaway, 2002): Hinsichtlich der Durchführung des Experimentes gilt, dass sowohl die Neurotoxizität von Licht und aktiviertem Transmitter als auch die oftmals photoinduzierte, verzögert-einsetzende lokale Inhibition eine zeitlich unmittelbare Restimulation nicht erlauben, sondern vielmehr ein pausierendes Zeitinterall zwischen zwei ortsgleichen Stimulationen erforderlich machen. Dessen Dauer richtet sich u.a. nach der Menge der Transmitterfreisetzung und der Größe des aktivierten Raumvolumens.

Konsequenterweise setzt die Anwendung eines punktspezifischen Trial-Average-Wertes ein experimentelles System voraus, welches die Fähigkeit zur räumlich-exakten Abtastung der Untersuchungsregion besitzt. Doch selbst unter Gewährleistung dieser Anforderungen ist die Durchführung dessen aufgrund der zeitkritischen Situation während der Experimente in der Praxis nur bedingt realisierbar, kann ein Stimulationsdurchlauf bei einer Interstimuluszeit von rund 2 s in Abhängigkeit der Größe des zu untersuchenden Areals leicht 30-40 Minuten in Anspruch nehmen. Abgesehen von zeitlichen Nicht-Stationaritäten in der Slice-Beschaffenheit ist davon auszugehen, dass in der überwiegenden Anzahl der Fälle, vor Beendigung des zweiten Durchlaufs, der Messkontakt zur Zelle verloren gegangen ist.

Weiterhin problematisch ist die unter Verwendung eines inaktivierten Transmitters schwierige und unsichere Kontrolle der potentiell präsynaptischen Zellen; zwar zeigen die direkten Kalibrationsexperimente eine reliable und gut reproduzierbare Aktivierung (vgl. Abbildung 1.7a), jedoch kann häufig der Mechanismus der AP-Generierung - ohne den Einsatz spezieller Methoden wie der Optogenetik mit Expression von light-gated Ionenkanäle - nicht sicher kontrolliert werden. Insgesamt ist also keine hinreichend exakte Reproduzierbarkeit der Versuchsdurchläufe zu gewährleisten.

Ein letzter Ansatz schließlich ignoriert auf der Basis einer kontinuierlichen Quantisierung die Spontanaktivität. Man argumentiert, dass der Anteil der Spontanaktivität an der Karte insgesamt als gering einzuschätzen ist. Offensichtlich werden aber durch dieses Vorgehen nur jene Areale reliabel detektiert, die zu einer deutlichen indirekten Aktivierung der Zielzelle führen, also konkret durch multiple Spikes eines Neurons oder singuläre

Aktionspotentiale mehrerer simultan aktivierter präsynaptischer Neurone. Dieses Verfahren verstößt jedoch konzeptionell gegen die Regel, dass ein einzelnes postsynaptisches Signal ein ausreichender Indikator für die Aktivierung eines präsynaptischen Neurons ist.

1.2.3 Reproduzierbarkeit der Aktivierung

Wie eigene Vorarbeiten zeigen (Bendels *et al.*, 2008a), ist die Identifikation präsynaptischer Zellen aufgrund des niedrigen Signal-Rausch-Abstandes - ungeachtet verschiedener z.T. kombinierter Korrekturmaßnahmen - nicht ohne weiteres möglich. Evident wird dies bei Wiederholungsmessungen desselben Areals, die, im Gegensatz zur direkten Aktivierung, ein sehr hohes Maß an Variabilität aufweisen; vgl. Abbildung 1.7.

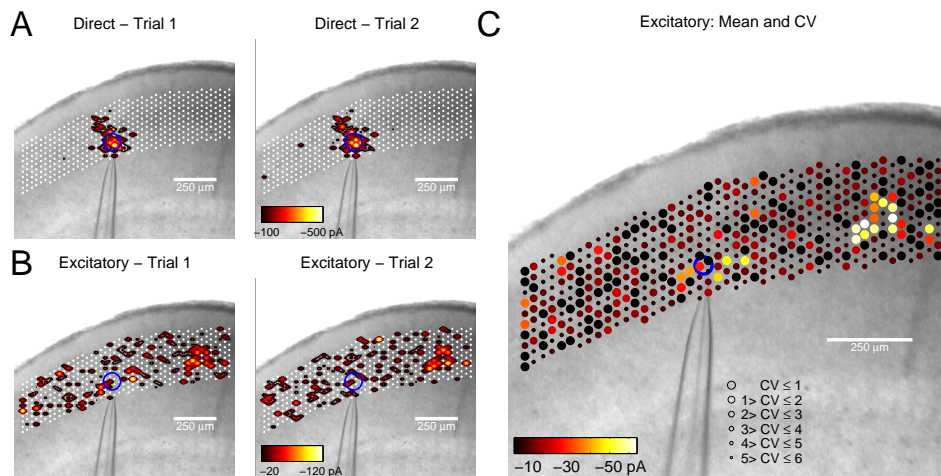


Abbildung 1.7: Reproduzierbarkeit der Aktivierung. (A) Direkte Aktivierung einer Sternzelle des MECs (Soma als blauer Kreis) als Funktion des Stimulationspunktes dargestellt für zwei von vier Versuchen mit identischem Stimulationsablauf. Das direkte Aktivierungsprofil ist für beide Versuche beinahe identisch in Amplitude und räumlicher Ausdehnung. (B) Die gleiche Darstellung wie in (A) für das excitatorische indirekte Compound-Signal, welches eine größere Intertrial-Variabilität aufweist. (C) Topographische Darstellung für Mittelwert und Variationskoeffizient (CV) des punktspezifischen excitatorischen indirekten Compound-Signals gemittelt über alle Versuche ($n_{\text{trials}} = 4$). Die Größe von Mittelwert und CV werden durch Farbe und Radius des korrespondierenden Stimulationspunktes repräsentiert. Signale mit großen Amplituden besitzen meist eine niedrige Intertrial-Variabilität (=großer Radius); aus Bendels (2008b) entnommen.

Diese Intertrial-Variabilität ist derart hoch (Korrelation von 0.3), dass es berechtigt erscheint, die Frage nach der grundsätzlichen Einsetzbarkeit der Methode kritisch zu diskutieren. De facto erlaubt das bisherige Vorgehen in der Analyse der Daten - gerade in Hirnregionen mit einer hohen

Spontanaktivität - lediglich eine valide Aussage über die Existenz und Polarität (exzitatorisch vs. inhibitorisch) der Verbindungen, weiterführende quantitative Aussagen z.B. über die regionale Verteilung der Afferenzen erweisen sich jedoch - streng genommen - als nicht zulässig.

Als ausgewiesener Schwachpunkt lässt sich in allen bisherigen Arbeiten die Datenanalyse identifizieren. Sie bleibt auf eine Single-Point-Analyse beschränkt, d.h. die Analyse endet mit der punktspezifischen Quantifizierung des stark rauschbehafteten synaptischen Eingangs, z.B. in Form des synaptischen Summenpotentials (Compound-PSC). Eine weitergehende räumliche Interpretation der Daten, mit dem Ziel der Extraktion der realen Konnektivitätsverhältnisse, wird jedoch nicht vorgenommen.

Doch, auf welcher Basis könnte eine wie auch immer geartete räumliche Interpretation erfolgen?

Hierzu hilft der Blick auf die Kalibrationsexperimente der präsynaptischen Zelle: Diese zeigen, dass Hotspots, also jene dendritischen Punkte, von denen eine überschwellige Aktivierung induzierbar ist, meist in einer bestimmten räumlichen Beziehung zueinander stehen (Hotspot-Aggregate), z.B. perisomatisch an den proximalen Dendriten.

Aufbauend auf dieser Beobachtung wird im folgenden ein neuartiger Algorithmus zur reliablen Detektion präsynaptischer Neurone aus Scanning-Photostimulations-Daten vorgestellt.

1.3 Der Detektionsalgorithmus

Auf Basis einer amplitudenfremen, binären Afferenzkarte, die die Existenz photoinduzierter Potentiale dokumentiert, identifiziert der Algorithmus all jene Regionen, in denen mit hoher statistischer Signifikanz mindestens ein präsynaptisches Soma lokalisiert ist (sogenannte *Hit-Points*). In einem zweiten Schritt wird, ausgehend von den Hit-Points und unter Zuhilfenahme der direkten Kalibrationskerne, die Anzahl präsynaptischer Neurone geschätzt. Das Besondere an dem Algorithmus ist die Tatsache, dass er auf Basis eines Single-Trial-Ansatzes reliable Ergebnisse liefert, d.h. eine Mittelwertbildung über mehrere Versuche ist nicht erforderlich. Dies stellt eine wichtige Zeitersparnis dar und ermöglicht so die Analyse großflächiger Areale. Die Reliabilität der Detektion wird durch die Analyse der Intertrial-Variabilität und durch TTX-Experimente (Blockade der synap-

tischen Transmission) aufgezeigt. Als Proof-of-Methods wird der Algorithmus exemplarisch auf die Sternzelle des entorhinalen Cortex angewandt.

Der nun folgende wissenschaftliche Artikel, im Oktober 2010 im **Journal of Neuroscience Methods** veröffentlicht, wird aufzeigen, dass ungeachtet eines niedrigen Signal-Rausch-Abstandes der punktspezifischen Messwerte durch Einsatz des neuen Algorithmus auch in einem 1-Photonen-System reliable, d.h reproduzierbare afferente Innervationskarten generiert werden können.

Kapitel 2

Detection of input sites in scanning photostimulation data based on spatial correlations

Aus Gründen des Urheberrechtsschutzes kann die Veröffentlichung des wissenschaftlichen Artikels an dieser Stelle nicht erfolgen; es wird auf die Originalquelle verwiesen:

Bendels MH, Beed P, Schmitz D, Jochenning FW, Leibold C. (2010). Detection of input sites in scanning photostimulation data based on spatial correlations. *Journal of Neuroscience Methods*, 192, 286-295.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705098>

Kapitel 3

Konnektivitätsanalyse im MEC

3.1 Übersicht

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein neuartiges Verfahren zur algorithmischen Detektion präsynaptischer Neurone aus Photostimulations-Daten vorgestellt. Im folgenden werden diese methodischen Erkenntnisse ausgenutzt, um die funktionelle Einbettung der Schicht-II/III-Hauptzellen des medialen entorhinalen Cortex (MEC) zu bestimmen. Konkret wird nach einer einführenden Vorstellung des entorhinalen Cortex die intra- und interlaminäre Konnektivität der Sternzellen (ausschließlich in Schicht II lokalisiert) und der Pyramidenzellen in den Schichten II und III ermittelt.

3.2 Der Entorhinale Cortex (EC)

3.2.1 Allgemein

Der entorhinale Cortex (EC) liegt im basalen medialen Temporallappen und wird cytoarchitektonisch und funktionell der parahippocampalen Region zugeordnet. In seiner topographischen Ausdehnung entspricht er den Hirnarealen 28 und 34 nach Brodmann, beim Menschen besitzt er in seiner rostro-caudalen Ausdehnung eine Länge von rund 2.6 cm. Sein Name leitet sich von den Begriffen entos (=innerhalb) und rhinal (= zum Riechen gehörend) ab; hiermit wird die räumliche Einbettung des EC in die angrenzenden paläocorticalen olfactorischen Cortices beschrieben. Konkret wird er ventral von der Fissura rhinalis, dorsal vom peri- und postrhinalen

Cortex und medial vom piriformen Cortex topographisch begrenzt (Canto *et al.*, 2008; Amaral & Witter, 1989).

Eine besondere funktionelle Beziehung besitzt der EC zu der sich anschließenden Hippocampusformation, bestehend aus Gyrus dentatus, Cornu ammonis (CA) und Subiculum. So stellt er die Haupteingangsstruktur für die Hippocampusformation dar und empfängt gleichermaßen einen Teil der hippocampalen Ausgangsinformation.

Aufgrund einer Vielzahl reziproker Verknüpfungen, die der EC zusätzlich mit corticalen (bevorzugt mit assoziativen Cortices) und subcorticalen Strukturen unterhält, fungiert er damit insgesamt als vermittelnde Übergangsstruktur (Interface), die corticale und subcorticale temporo-spatiale Erregungsmuster zusammenführt, in die Hippocampus-Formation propagiert und einen Teil der hippocampal generierten Ausgangsmuster an die Ursprungsareale topographisch geordnet zurücksendet (Fell *et al.*, 2001).

Damit ist der EC funktionell in das hippocampale System zur Etablierung des corticalen Kurz- und Langzeitgedächtnisses eingebettet; seine beidseitige Läsion, z.B. im Rahmen eines M. Alzheimer (Berlit, 2006) oder einer fortgeschrittenen Temporallappenepilepsie (Loiseau *et al.*, 1983), führt klinisch zu einer anterograden Amnesie.

3.2.2 Histologie

Im Einklang mit dieser hodologisch-funktionell begründeten Vermittlerrolle besitzt der EC histologisch eine mesocorticale Lamination; zeigt also auch histologisch ein Übergangsbild zwischem dem Grundaufbau des sechsschichtigen Iso- und dem dreischichtigen hippocampalen Allocortex.

So besitzt der EC zwar feinstrukturell einen sechsschichtigen Aufbau, jedoch sind die Schichten I und IV zellfrei; letztgenannte Schicht trägt den Namen *Lamina dissecans*: sie ist besonders im medialen EC gut ausgebildet und trennt die oberflächlichen (II und III) von den tiefen (V und VI) Zellschichten.

Lediglich die zweite Zellschicht beherbergt zwei morphologisch unterscheidbare excitatorische Zelltypen: die Stern- und Pyramidenzellen (L-II-Pyramidenzellen). In den übrigen Zellschichten (III, V und VI) finden sich ausschließlich Pyramidenzellen in unterschiedlicher Größe. Aufgrund ihrer räumlich recht konstanten Stratifizierung differenziert man innerhalb der Zellschicht V ergänzend zwei weitere Schichten, die Schicht L5a

(mittelgroße Pyramidenzellen) und die Zellschichten L5b/c (kleine Pyramidenzellen) (Canto *et al.*, 2008).

Die Aktivität der excitatorischen Hauptzellen wird durch eine große Anzahl variantenreich konfigurierter inhibitorischer Interneurone kontrolliert (Kumar *et al.*, 2007; Johnston & Amaral, 2004).

3.2.3 Regionale Aufteilung

Konnektivitätsanalysen und cytoarchitektonische Analysen führten unabhängig voneinander zu einer topographischen Grobunterteilung des EC in einen medialen und lateralen Anteil (MEC und LEC). Topographisch umfasst der LEC - der eine dünnere Schicht-II mit einer sehr ausgeprägten zellnesterartigen Anordnung der Hauptzellen, der sogenannten Cluster bzw. Patches (Abbildung 3.1, Burgalossi *et al.* (2011); Beall & Lewis (1992)) und einer nur angedeuteten Ausprägung der Lamina dissecans aufweist - die rostromedialen Bereiche des EC, während der MEC die caudomedialen Abschnitte repräsentiert (Insausti *et al.*, 1997; Dolorfo & Amaral, 1998b).

Alternative Systematisierungen führten, in Abhängigkeit der gewählten Methodenkombination, zu einer wesentlich detaillierten Parzellierung des EC's: Beall & Lewis (1992) gelang es, durch die kombinierte Analyse der Afferenzen des EC und der morphologischen und chemischen Charakteristika seiner ortsständigen Neurone, fünf Unterregion zu identifizieren (olfactorisches Feld, rostrales Feld, intermediäres Feld, kaudales Feld und kaudal-begrenzendes Feld). Eine rein auf Konnektivitätsanalysen mittels retro- und anterograden Tracing-Methoden aufbauenden Einteilung förderte hingegen sechs abgrenzbare Regionen zutage (Insausti *et al.*, 1997).

Da der EC - wie im folgenden dargestellt - mit den unterschiedlichsten corticalen und subcorticalen Strukturen reziprok interagiert, überrascht seine regionale Spezialisierung mit Ausbildung morphologisch-abgrenzbarer Zellzusammenschlüsse in den oberflächlichen Schichten nicht: Sie scheinen das Resultat einer an den jeweiligen Modus operandi der reziprok-verknüpften Kontaktregion ausgerichteten biophysikalisch-morphologischen Anpassung, und damit das morphologische Korrelat von parallel in den Informationsfluss eingebetteten Funktionsmodulen.

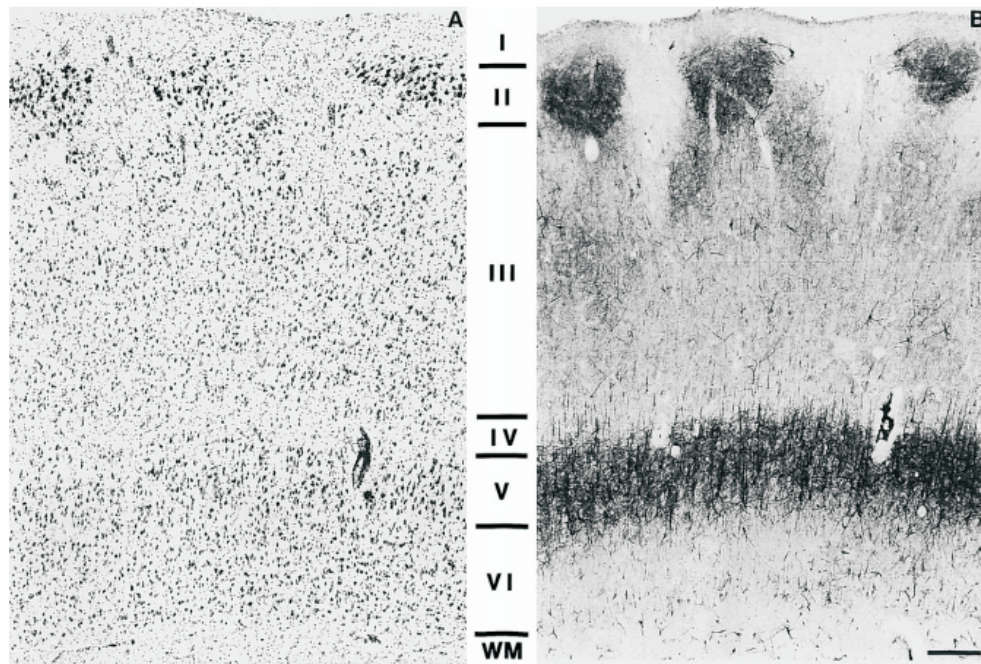


Abbildung 3.1: Histologische MEC-Organisation. (A) Die Nissl-Färbung zeigt deutlich eine räumliche Aggregation der ortsständigen Nervenzellkörper in Schicht-II; es entstehen Zellnester (Cluster, Patches). Die Lamina dissecans (Schicht IV) ist - charakteristisch für den medialen Anteil des ECs - deutlich ausgeprägt. (B) Die Neurofilament-Protein-Immunreaktion (NFP-IR) weist eine deutliche Reaktivität in den Schichten II und V auf und bestätigt gleichermaßen die Existenz hodologischer Funktionseinheiten in der Schicht-II. WM = weisse Substanz, aus Beall & Lewis (1992).

3.2.4 Extrinsische Konnektivität

Die extrinsische Konnektivität des EC ist durch eine nahezu durchgängige Reziprozität mit vielen corticalen (so u.a. zu allen assoziativen Cortexarealen) und subcorticalen Regionen charakterisiert. Man schätzt, dass 20-30% der afferenten Verbindungen, die insgesamt gegenüber den efferenten Verbindungen stärker ausgebildet sind, einen corticalen, die übrigen einen subcorticalen Ursprung haben (Kerr *et al.*, 2007).

Unabhängig von seiner Parzellierung unterhält der gesamte EC intensive reziproke Verknüpfungen mit dem piriformen Cortex. Während der LEC jedoch zusätzlich mit der Inselregion und frontalen Cortexarealen interagiert (Burwell & Amaral, 1998), besitzt der MEC ausgeprägte Verbindungen zu parieto-occipitalen Cortexarealen und dem Cingulum (Kerr *et al.*, 2007). Subcortical steht der gesamte EC afferent mit dem dorsalen Thalamus und der Area tegmentalis ventralis, reziprok mit der Amygdala

und schließlich rein efferent mit dem Ncl. accumbens in Verbindung (Finch *et al.*, 1995); vgl. Abbildung 3.2.

Hieraus ist ersichtlich, dass auf den EC insgesamt ein polymodaler Eingang, bestehend aus sensorischer, motorischer, vegetativer und emotionaler Information, konvergiert (Amaral & Witter, 1989).

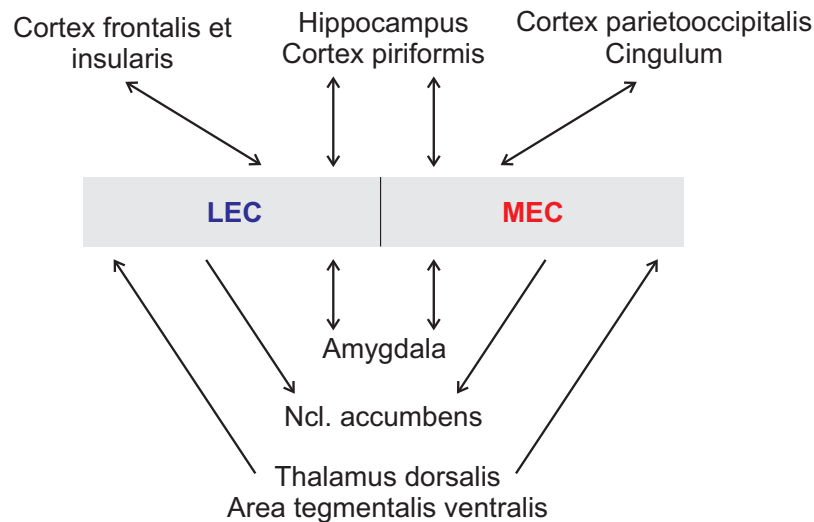


Abbildung 3.2: Extrinsische Konnektivität des EC. Schematische Darstellung der wichtigsten Verbindungen zwischen EC, unterteilt in LEC und MEC, und corticaler (oben) bzw. subcorticaler (unten) Strukturen.

In seiner Funktion als wichtigste Eingangsstruktur der Hippocampus-Formation propagiert der EC diese bevorzugt in den superficialen Schichten des EC einlaufenden polymodalen Afferenzen in Form des *Tractus perforans* an die Hippocampus-Region weiter. Der überwiegend glutamaterge *Tractus perforans* stellt die wichtigste hippocampale Afferenz dar; er durchdringt ('*perforans*') das Subiculum und bildet am Gyrus dentatus und im Cornu ammonis synaptische Kontakte aus (Witter *et al.*, 2000). Dabei enden die Efferenzen aus den Schicht-II-Hauptzellen vornehmlich an den Körnerzellen des Gyrus dentatus (rund 70% der insgesamt 3600-5600 Synapsen; Patton & McNaughton (1995)) und an den CA3-Pyramidenzellen, während die Axone aus den Schicht-III-Pyramidenzellen bevorzugt in die CA1-Region und das Subiculum projizieren. Neuere Studien belegen, dass die Integration der entorhinalen Afferenzen an der Körnerzelle unabhängig von der eigentlichen dendritischen Lokalität der Synapse ist; verantwortlich hierfür sind nicht-lineare Attenuierungs- und Aug-

mentierungsprozesse (Krueppel *et al.*, 2011) entlang der gleichermaßen langen wie dünnen dendritischen Ausläufer, die so charakterisierend für die Morphologie der Körnerzelle sind (Amaral *et al.*, 2007).

Die quantitative Bedeutung des Tractus perforans für die Hippocampus-Formation wird bei seiner isolierten Läsion ersichtlich: der Verlust der entorhinalen Fasern im Zuge der sekundären Waller'schen Degeneration führt an den hippocampalen Zielregionen zu einer Reduktion der Synapsen um bis zu 90% (Bergmann *et al.*, 1997; Schmadel, 2004).

Der Tractus perforans repräsentiert den ersten Abschnitt des rein exzitatorischen trisynaptischen (para)hippocampalen Schaltkreises, der seine Fortsetzung in den Axonen der Körnerzellen des Gyrus dentatus findet; diese terminieren als *Moosfasern* an den proximalen Dendriten der Pyramidenzellen der CA3-Region (2.Synapse). Ein Teil der von dort ausgehenden axonalen Fortsätze endet als *Schaffer-Kollateralen* an den CA1-Pyramidenzellen (3.Synapse), deren Aktivität über das Subiculum in die corticalen und subcorticalen Ursprungsgebiete zurückgeführt wird.

Ein Teil des subiculären und CA1-Ausgangs gelangt zusätzlich bevorzugt in die tiefen Schichten (V/VI) des EC und wird von dort gleichermaßen an die entsprechenden Ursprungsareale rückverteilt (Kohler, 1985; van Haften *et al.*, 1995; Kloosterman *et al.*, 2003b). Insgesamt führt dies zum Schluß des (sub)cortico-entorhino-hippocampalen Kommunikationskreises; vgl. Abbildung 3.3.

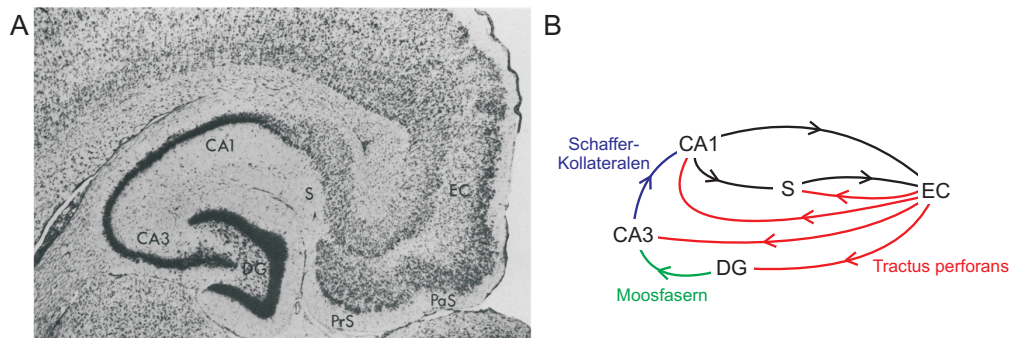


Abbildung 3.3: Räumlich-funktionelle Beziehung von Hippocampusformation und entorhinalem Cortex. (A) In diesem Thionin-gefärbten Horizontalschnitt sind der entorhinale Cortex (EC) und die Hippocampus-Formation mit Gyrus dentatus (DG), CA1/3-Regionen und Subicularkomplex bestehend aus Subiculum (S), Para- und Prä-subiculum (PrS, PaS) gut abgrenzbar; Abbildung aus Amaral & Witter (1989) entnommen. (B) Vereinfachende schematische Darstellung der interarealen Konnektivität.

3.2.5 Intrinsische Konnektivität

Interlaminäre Konnektivität

Hinsichtlich der intrinsischen Konnektivität des EC zeigt sich, dass ein Teil der hippocampalen Ausgangsinformation von den tiefen Schichten in die oberflächlichen Zellschichten propagiert wird (Kloosterman *et al.*, 2003a). Diese deutlich ausgeprägte ascendierende interlaminäre Projektion wirkt excitatorisch in gleichen Anteilen sowohl auf die inhibitorischen Interneurone als auch auf die excitatorischen Hauptzellen (van Haef-ten *et al.*, 2003): funktionell resultiert insgesamt eine kombinierte Feed-forward-Inhibition und -Excitation der oberflächlichen Schichten (Kohler, 1986; Dolorfo & Amaral, 1998a;b). Rückprojektionen im Sinne descendierender Verbindungen wurden bisher nicht beschrieben, vielmehr durchlaufen die axonalen Fortsätze der oberflächlichen Schichten auf ihrem Weg zu extraentorhinalen Zielen ohne synaptische Kollateralisierung die tiefen Schichten des EC's (Kohler, 1986).

Darüber hinaus existieren anatomische und neurophysiologische Studien, die auf eine reziproke interlaminäre Verknüpfung der Schicht-V mit den Schicht-VI-Neuronen und der Schicht-II- mit den Schicht-III-Neuronen hinweisen (Canto *et al.*, 2008; Kohler, 1986; Tolner *et al.*, 2005).

Intralaminäre Konnektivität

Antero- und retrograde Tracingstudien zeigen eine ausgeprägte intralaminäre axonale Arborisation mit Ausbildung synaptischer Kontakte in allen Schichten des EC's. Hierbei zeigt sich, dass die intralaminäre räumliche Ausdehnung in den tieferen Schichten größer ist (Kohler, 1986). Mithilfe elektrophysiologischer Paarableitungen wurde eine Quantisierung der Verbindungswahrscheinlichkeit zwischen den excitatorischen Hauptzellen vorgenommen (Dhillon & Jones, 2000): Den höchsten intralaminären Konnektivitätsgrad besitzen demnach die Neurone in Schicht-V mit einer Verbindungs-Wahrscheinlichkeit von $p=0.115$ bei $n=89$ Paarableitungen. Für die Schicht-III-Neurone wurde ein Konnektivitätsgrad von $p=0.084$ bei $n=202$ Paarableitungen ermittelt. Ungeachtet der ausgeprägten axonalen Arborisation in Schicht II liessen sich bei $n=135$ Paarableitungen keine funktionellen Verbindungen nachweisen. Im Gegensatz hierzu dokumentiert eine neuere Studie von Kumar *et al.* (2007) unter Anwendung der

Scanning-Photostimulation auch das Vorliegen recurrenter Verbindungen innerhalb der oberflächlichen Schichten II und III.

3.2.6 Fragestellung

Anknüpfend an den bisherigen Wissensstand versucht die nun folgende Untersuchung unter Anwendung der Scanning-Photostimulation die funktionelle Einbettung der excitatorischen Schicht-II und Schicht-III-Hauptzellen in das intrinsische Netzwerk des MEC zu charakterisieren. Dabei beschränkt sich die Analyse regional auf den medialen EC. Es wird zelltyp-spezifisch das quantitative Verhältnis der intra- und interlaminären monosynaptischen Konnektivität bestimmt. Weiterhin wird versucht, die räumliche Organisation der interlaminären axonalen Ascension aus den tiefen Schichten zu verstehen: Lassen sich hodologisch vertikal organisierte Module im Sinne isocorticaler Minicolumnen (Mountcastle, 1997) als Korrelat der morphologisch darstellbaren Patches (Burgalossi *et al.*, 2011; Beall & Lewis, 1992) identifizieren, oder zeigt sich eher ein räumlich-disseminierter Verbund von Neuronen, wie man sie in paläocorticalen Regionen wie dem piriformen Cortex antrifft (Wiegand *et al.*, 2011)?

Der nun folgende Artikel - im Dezember 2010 im Journal *Neuron* erschienen - versucht eine Antwort auf diese Fragen zu geben.

Kapitel 4

Analysis of excitatory microcircuitry in the medial entorhinal cortex reveals cell-type-specific differences

Aus Gründen des Urheberrechtsschutzes kann die Veröffentlichung des wissenschaftlichen Artikels an dieser Stelle nicht erfolgen; es wird auf die Originalquelle verwiesen:

Beed P*, Bendels MH*, Wiegand H, Leibold C, Jochenning FW*, Schmitz D* (2010). Excitatory microcircuitry in the medial entorhinal cortex reveals cell-type specific differences. *Neuron*, Dez 22; 68(6):1059-66

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172609>

Kapitel 5

Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Methodik und Anwendung der Scanning Photostimulation zur Bestimmung der funktionellen Konnektivität von Nervenzellen in akuten Hirnschnitten.

Basierend auf räumlichen Korrelationen in der photochemischen Aktivierung eines einzelnen Neurons wurde im ersten Teil der Arbeit ein Algorithmus zur reliablen Detektion präsynaptischer Neurone in Photostimulationsdaten entwickelt und validiert. Im nachfolgenden zweiten Teil wurde dieser dazu genutzt, die intrinsischen Verbindungseigenschaften der excitatorischen Hauptzellen der oberen Schichten des medialen entorhinalen Cortex (MEC, Schichten II und III) zu bestimmen.

5.1 Algorithmische Detektion

5.1.1 Single-Point-Ansätze

Der Algorithmus zur Detektion präsynaptischer Zellen stellt eine Erweiterung bisheriger Single-Point-Ansätze dar: Ein Single-Point-Ansatz versucht ohne weitere räumliche Interpretation, die Analyse der Konnektivität einzig mit der punktspezifischen Quantisierung des stark rauschbehafteten synaptischen Eingangs, z.B. in Form des synaptischen Summenpotentials (Compound-PSC), zu bewerkstelligen.

Vorteile

Die Vorteile eines Single-Point-Ansatzes liegen in seiner intuitiven Anwendung und einfachen Implementation; im einfachsten Fall kann das Integral über den Mittelwert als punktspezifisches Maß dienen (Schubert *et al.*, 2003). Die amplitudenbasierte Quantisierung erlaubt weiterhin die Charakterisierung der Stärke der synaptischen Verbindung als Funktion ihres Ortes.

Nachteile

Ein offensichtlicher Nachteil der Single-Point-Analyse mit ihrem amplitudenkontinuierlichen Maß ist die direkte Abhängigkeit von den nicht-stationären Messparametern (z.B. des Eingangswiderstandes). Auch induzieren präsynaptische Mehrfachentladungen (Doublets/Triplets) einen deutlichen Bias, der in Wiederholungsmessungen meist nicht sicher reproduzierbar ist und zu Schwierigkeiten in der Interpretation der Ergebnisse führt.

Darüber hinaus zeigt sich insgesamt, dass die inherente, spontane Hintergrundaktivität mit einem Single-point-Ansatz in der Regel nicht beherrschbar ist - und dies ungeachtet diverser, z.T. kombinierter Korrekturmaßnahmen, wie einer versuchten Separation von spontaner und photo-induzierter Aktivität, einer punktspezifischen Normierung des Messsignals, der Verwendung speziell angepasster Nährlösungen zur Reduktion der Spontanaktivität oder schließlich der Berechnung eines Trial-Average auf Basis wiederholter Messungen.

Es zeigt sich, dass ausreichend valide Ergebnisse mit einer Single-Point-Analyse damit nur für den Fall stabiler Messbedingungen und einer nur sehr niedrigen Hintergrundaktivität zu erwarten sind. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass selbst isocorticale Areale, mit einer erfahrungsgemäß niedrigeren Hintergrundaktivität, Spontanraten von mindestens 1-2 Hz aufweisen (Schubert *et al.*, 2003). In den epileptogenen, stark rekurrent verknüpften (para)hippocampalen und paläocorticalen Arealen sind regelhaft Spontanraten von 5 bis 10 Hz anzutreffen.

Schätzung der präsynaptischen Zelldichte

Ein wichtiges Kernproblem in der Anwendung eines Single-Point-Verfahrens bleibt die Schwierigkeit der Interpretation der resultierenden Karten: Diese illustrieren die aufgrund von Absorptionseffekten nicht-linear superponierten Hotspot-Areale der präsynaptischen Neurone und nicht - wie eigentlich erwünscht - deren Somata. Eine Möglichkeit, die präsynaptische Zelldichte linear abzuschätzen und damit auch die Lokalität der präsynaptischen Somata zu identifizieren, ist die Deconvolution mit dem durchschnittlichen direkten Aktivierungsprofil der Neurone; zur Veranschaulichung des Prinzips verweisen wir auf Abbildung 5.1.

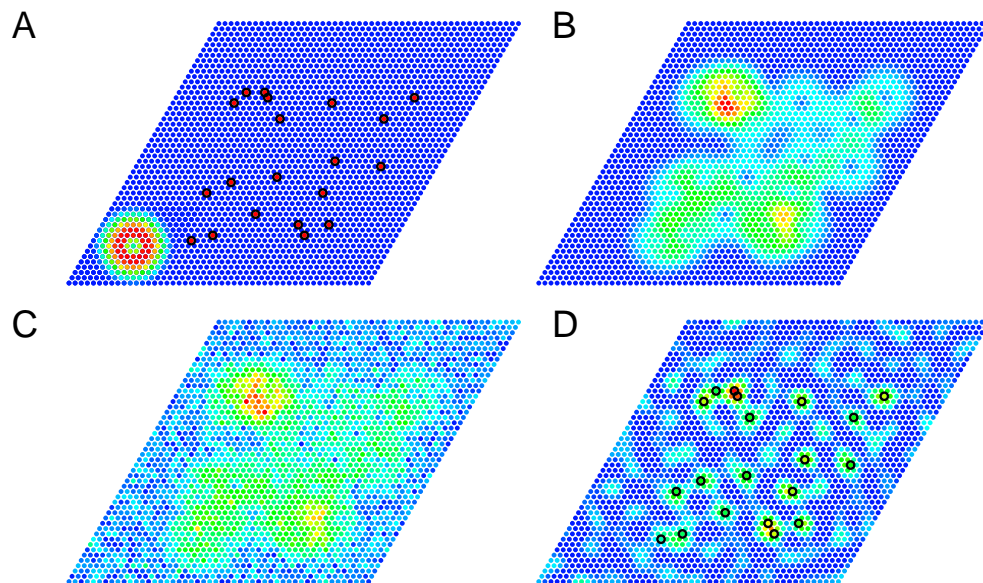


Abbildung 5.1: Prinzip der linearen Schätzung der präsynaptischen Zelldichte. (A) Auf einer virtuellen Karte wird durch die randomisierte Verteilung neuronaler Somata (rote Punkte) eine Zelldichte ϱ (mit der Einheit Zellen/ μm^2) erzeugt. Die Neurone besitzen das unten links dargestellte durchschnittliche räumliche Aktivierungsprofil $\kappa(x)$. (B) Die Compound-Current-Density j wird durch die lineare Superposition $j(x) = \int dy \kappa(x-y) \varrho(y)$ modelliert; es entsteht eine Karte, die der rauschfreien PSC-Compound-Karte realer Kartierungsexperimente entspricht. (C) In einem dritten Schritt wird - zur Imitation der Spontanaktivität - punktwise ein Zufallswert linear superponiert; in diesem Beispiel mit einer resultierenden SNR von 2.66 dB. (D) Die Deconvolution mit dem durchschnittlichen Aktivierungsprofil $\kappa(x)$ erlaubt die Schätzung der präsynaptischen Zelldichte ϱ und die Identifikation der neuronalen Somata in Form der Maxima des resultierenden Profils.

Das Verfahren zur linearen Schätzung der präsynaptischen Zelldichte macht die Definition eines durchschnittlichen direkten Aktivierungspro-

files erforderlich. Im Gegensatz zu dem hier vorgestellten Detektionsalgorithmus, der auf Basis eines Testfensters (=perisomatischer Bereich, in dem statistisch die überwiegende Anzahl der Hotspots auftreten) operiert, definiert das Aktivierungsprofil die reale räumliche Verteilung der direkten Erregbarkeit der Neurone. Die Schwierigkeit liegt nun darin, ein durchschnittliches Aktivierungsprofil zu definieren, ungeachtet der z.T. sehr variablen Profilausprägung unter den verschiedenen Zelltypen (polare vs. radiär-symmetrische Dendritenausprägung), aber auch innerhalb eines Subtyps (variierende räumliche Verkippung der dendritischen Ebene, interindividuelle Zellvariabilität). Es überrascht deshalb nicht, dass dieser Ansatz zur Schätzung der präsynaptischen Zelldichte in eigenen Arbeiten am MEC mit seinen recht unterschiedlichen Zelltypen keinen signifikanten Informationsgewinn erbrachte. Eine große Unzulänglichkeit ist die Tatsache, dass das entstehende Zelldichteprofil, wie in Abbildung 5.2 dokumentiert, präsynaptische Somata ausserhalb des Stimulationsareals und damit u.U. auch ausserhalb des Schnittpräparates ausweist.

Insgesamt bleibt damit die Anwendung aller Single-Point-Ansätze auf Hirnareale mit einer niedrigen Hintergrundaktivität beschränkt; sie erlaubt eine semiquantitative Analyse der Afferenzen (Polarität, Existenz von Verbindungen). Weiterführende Interpretationen, gerade im Hinblick auf die Lokalität und Anzahl präsynaptischer Zellen, sind aus genannten Gründen in ihrer Aussagekraft sehr eingeschränkt.

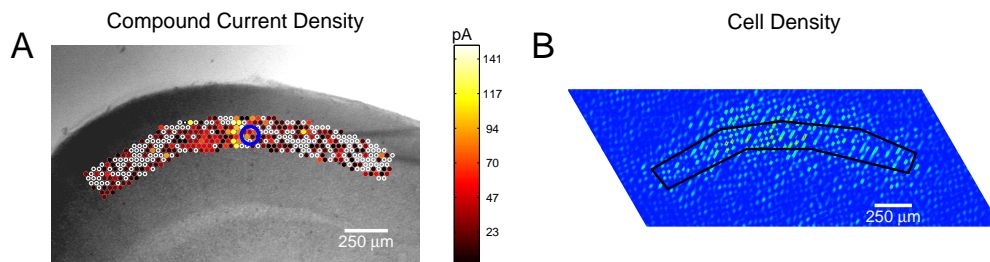


Abbildung 5.2: Versuch der linearen Schätzung der Zelldichte. (A) Beispiel einer Compound-Current-Density j und ihrer resultierenden präsynaptischen Zelldichte (B). Aufgrund der Vielzahl der lokalen Maxima, die z.T. ausserhalb der Schnittebene liegen, können präsynaptische Somata nicht zuverlässig identifiziert werden; in modifizierter Form aus Bendels *et al.* (2007b).

5.1.2 Detektion präsynaptischer Somata unter Ausnutzung räumlicher Korrelationen

Der hier vorgestellte Detektionsalgorithmus erweitert die bisherigen Single-Point-Ansätze um die Möglichkeit der räumlichen Interpretation der Afferenzkarte. Hierdurch gelingt die reliable Detektion präsynaptischer Zellen ungeachtet einer z.T. sehr hohen synaptischen Hintergrundaktivität. Da nur ein PSC pro Stimulationspunkt ein ausreichender Indikator für die überschwellige Aktivierung einer präsynaptischen Zelle ist, verwendet der Algorithmus als primäre Eingangsgröße die binäre Codierung der Afferenz. Per constructionem wird die algorithmische Detektion hierdurch unabhängig von den zeitlich-variierenden Ableitungsparametern, dem spezifischen Feuerverhalten präsynaptischer Neurone und, oberhalb einer Minimalamplitude, auch von der synaptischen Übertragungsstärke. Jene Punkte, von denen im Experiment ein photo-induziertes PSC induzierbar war, heißen *On*-Punkte.

Unter Berücksichtigung der Spontanrate überprüft der Algorithmus für jeden Stimulationspunkt die Nullhypothese, dass die Anzahl der *On*-Punkte innerhalb des perisomatischen Testfensters rein zufällig generiert wurde. Dabei dokumentiert die Inspektion der Daten, dass die der Berechnung zugrundegelegte Poisson-Verteilung der Spontanaktivität sehr gut mit der Realität übereinstimmt.

Durch dieses Vorgehen lassen sich sogenannte *Hit*-Punkte identifizieren; diese kennzeichnen jene Punkte, in denen die Nullhypothese widerlegt wurde, d.h. in denen rein statistisch mindestens ein Soma einer präsynaptischen Zelle liegt. Per definitionem kann dabei ein Stimulationspunkt als *Hit*-Punkt ausgewiesen werden, obwohl er kein *On*-Punkt ist, d.h. von ihm selbst kein photo-induziertes PSC ausgeht. Übertragen auf die Geometrie der Zelle entspricht dies einer Transmitter-Sensitivität, die dendritisch höher ist als unmittelbar am Zellsoma. Es zeigt sich, dass ungeachtet einer z.T. sehr hohen synaptischen Hintergrundaktivität die Detektion der *Hit*-Punkte zuverlässig und robust erfolgt. Während die *On*-Punkt-Karten in Wiederholungsmessungen lediglich eine lineare Korrelation ρ_{on} von nur rund 0.2 aufweisen, zeigen die resultierenden *Hit*-Punkt-Karten ein hohes Maß an Ähnlichkeit ($\rho_{\text{hit}} = 0.7$).

Ausgehend von den *Hit*-Punkten wurde nachfolgend unter Zuhilfenahme eines Bayes-Schätzers die Anzahl der zugrundeliegenden präsynapti-

schen Neurone geschätzt. Für die Sternzelle des entorhinalen Cortex fand sich eine intralaminäre Schicht-II-Konnektivität von rund 34 Zellen/mm². Aufgrund fehlender Vergleichszahlen ist eine weitergehende Interpretation dieser präsynaptischen Zelldichte nicht möglich.

Ergänzend zur intralaminären Analyse der präsynaptischen Zelldichte sind je nach Fragestellung andere topographische Aufteilungen denkbar, z.B. eine perisomatische Quadrantenanalyse. Die Möglichkeit zur Reduktion der excitatorischen und inhibitorischen Konnektivitätsexperimente auf einen Zahlenwert in Form der Zelldichte setzt den Anwender in die Lage, simplifizierend unterschiedliche formalpathologische Krankheitsmodelle, wie z.B. zur Epilepsie oder Schizophrenie mit gesunden Kontrollgruppen zu vergleichen.

Ein besonderer algorithmischer Parameter ist das sogenannte *Testfenster*; es charakterisiert jene zweidimensionale perisomatische Region, in der statistisch gesehen, die überwiegende Anzahl der direkten APs photostimulatorisch auslösbar ist. Form und Größe des Testfensters (Kerne) gewinnt man durch die direkte Kalibration der ortsständigen Neurone. Unseren Untersuchungen haben wir als Testfenster eine perisomatische Kreisfläche mit einem Radius von 90 μm zugrundegelegt. Angepasst an die zu analysierende Hirnregion kann das Testfenster jedoch individuell in Form und Ausrichtung (z.B. senkrecht zur Sliceoberfläche) variiert werden. Hierdurch wird es möglich, auch jene Hirnareale zu untersuchen, bei denen regulär die Hotspots isoliert an einem apikalen Dendritenabschnitt liegen; vgl. Abbildung 5.3.

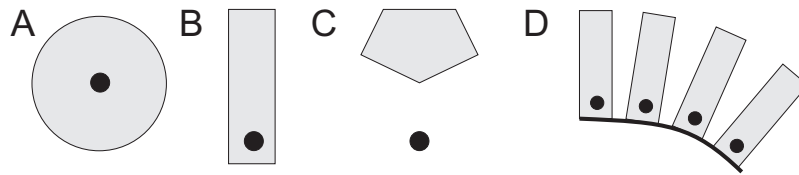


Abbildung 5.3: Variation des Testfensters in Form und Ausrichtung. Das Testfenster charakterisiert jene zweidimensionale perisomatische Region, in der statistisch gesehen, die überwiegende Anzahl der direkten APs ausgelöst werden. (A) Kreisförmiges Testfenster. Der Mittelpunkt liegt auf dem Soma. Aufgrund der Rotationssymmetrie ist eine Ausrichtung am Präparat nicht notwendig. (B) Rechteckiges Testfenster perisomatisch und oberhalb des Zellsomas, z.B. einem polaren Neuron mit einem apikalen Dendriten entsprechend. (C) Ähnlich wie in (B) nur mit einer Transmitter-insensitiven Region am proximalen apikalen Dendriten. (D) Ausrichtung eines rechteckigen Testfensters senkrecht zur Sliceoberfläche entsprechend der vermuteten Ausrichtung der ortsständigen Neurone.

Nachteile des Detektionsalgorithmus Die Nachteile des Verfahrens sind eng mit der Definition des durchschnittlichen Testfensters verbunden: Zum einen müssen Form und Ausrichtung der direkten Aktivierungsprofile aller ortsständigen Neuronentypen bekannt sein. Dies stellt jedoch insofern keine wesentliche Einschränkung für die Anwendbarkeit dar, da für die Zukunft zu erwarten ist, dass das Transmitter-spezifische photochemische Aktivierungsprofil der Neurone zu einem feste Bestandteil ihrer Charakterisierung wird (Simonnet *et al.*, in Vorbereitung). Zum anderen muss, trotz einer mitunter hohen Variabilität der Testfenster, ein durchschnittliches Testfenster approximativ definiert werden.

Unabhängig des verwendeten Auswertalgorithmus steht die Aussagekraft der Ergebnisse in einem direkten Verhältnis zur Slicepräparation, die möglichst struktur- und faserschonend anzufertigen ist. Die Ergebnisse bekommen grundsätzlich eine höhere Aussagekraft, wenn ihre Unabhängigkeit von der spezifischen Schnittrichtung dargelegt wird.

Insgesamt ermöglicht der Algorithmus durch die Offenlegung der monosynaptischen Afferenzen die Analyse der funktionellen Konnektivität eines Einzelneurons.

5.2 Konnektivitätsanalyse im MEC

Das entwickelte Gesamtsystem, bestehend aus Scanning Photostimulation und algorithmischer Detektion, wurde dazu genutzt, die intrinsische Konnektivität der Sternzelle (in Schicht II lokalisiert) und der Schicht-II- und -III-Pyramidenzellen des MECs zu bestimmen.

Ausgehend von der Verteilung der Hit-Punkte, die jene Regionen definieren, in denen mit hoher statistischer Signifikanz mindestens ein präsynaptisches Zellsoma liegt, lässt sich ableiten:

Intralaminäre Schicht-II-Verbindungen sind - entgegen dem Paarableitungsbefund von Dhillon & Jones (2000) - eindeutig nachweisbar. Ein Grund für diese offenkundige Diskrepanz zwischen beiden Resultaten könnte darin liegen, dass die Paarableitungen nur in der unmittelbaren, konnektionsfreien Umgebung der ersten Zelle etabliert wurden.

Es zeigt sich weiter, dass für alle Zelltypen die intralaminären Afferenzen im Vergleich zu den ascendierenden interlaminären Afferenzen stärker ausgebildet sind: Konkret haben 84% der Sternzell- und 68% der Schicht-

II-Pyramidenzell-Afferenzen einen intralaminären Ursprung. Die Relation zwischen der ascendierenden interlaminären und der intralaminären Afferenz ist damit bei der Pyramidenzelle signifikant höher.

Weiterhin ist der Ursprung des ascendierenden interlaminären Eingangs an der Vertikalachse des Neurons orientiert. Die Breite (definiert als 70% aller Eingänge) des so entstehenden funktionellen vertikalen Moduls ist zelltyp- und *nicht* schichten-spezifisch und unterscheidet sich signifikant: Für die Sternzelle findet sich eine Breite von rund 210 μm , für die Schicht-II- und -III-Pyramidenzellen rund 470 μm . Interessanterweise entspricht die Breite des interlaminären Eingangs der Sternzelle ungefähr jener mittleren Zellclusterbreite, die durch histologische Färbetechniken (Nissl-Färbung, Cytochrom-Oxidase, NFP) abgrenzbar ist (Burgalossi *et al.*, 2011; Beall & Lewis, 1992).

Auffällig ist ein lediglich für die Schicht-III-Pyramidenzellen nachweisbarer asymmetrischer medialer Offset der tiefen Eingangs-Cluster. Dieser zeigt sich in seiner Ausprägung in leichter Korrelation mit der Entfernung der Pyramidenzelle von der Sliceoberfläche ($\rho=0.38$). Eine funktionelle Interpretation dieses Befundes ist schwierig; möglicherweise ist er ein Resultat ontogenetischer Entwicklungsphasen, auch die Möglichkeit eines Schnittartefaktes sollte nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Signifikante Unterschiede in der synaptischen Übertragungsstärke (PSC-Amplitude) zwischen inter- und intralaminärer Afferenzen liessen sich nicht nachweisen.

5.2.1 Funktionelle Aspekte

Der entorhinale Cortex (EC) stellt die Eingangsstruktur zur hippocampalen Formation dar. Polymodale corticale und subcorticale Afferenz konvergieren auf die oberflächlichen Schichten des ECs und werden von dort topologisch geordnet in die Hippocampus-Formation propagiert. Ein Teil des hippocampalen Ausgangs wird in die tiefen Schichten des ECs und von dort an die corticalen und subcorticalen Ursprungsareale zurückgeführt (van Strien *et al.*, 2009). Quantitativ zeigt sich dabei für den EC eine stärkere Ausbildung der Afferenzen gegenüber den Efferenzen. Darüber hinaus wird ein Teil des hippocampalen Ausgangs direkt und indirekt über die tiefen Schichten des ECs an die oberflächlichen Schichten des ECs weitergeleitet. Die ascendierenden interlaminären Verbindungen lassen, wie

in der Arbeit aufgezeigt, vertikale Funktionseinheiten entstehen, und es erfolgt auf Höhe aller Schichten deren intermoduläre Kommunikation. Die funktionelle Bedeutung dieser rein ascendierenden interlaminären Konnektivität ist spekulativ; unter informationellen Gesichtspunkten kommt es in den oberflächlichen Schichten des ECs zu einer Konvergenz zeitlich-älterer hippocampaler Ausgangsinformation mit neuerer Eingangsinformation.

Reetablierung isocorticaler räumlich-zeitlicher Aktivitätsmuster

Man vermutet, dass eine wesentliche Eigenschaft der isocorticalen Informationsverarbeitung in der sequentiellen zeitlich-räumlichen Aktivierung isocorticaler verticaler Funktionseinheiten, sogenannter Module, liegt (Singer, 2011). Die zeitlich dauerhafte Etablierung derartiger Muster-Spuren geschieht dabei über plastische Synapsen. Eine unabdingbare Bedingung zur Etablierung einer persistierenden synaptischen Gewichtung stellt die wiederholte, gleichartige Aktivierung der beteiligten Synapsen dar. Doch wie ist es möglich, ein Muster bzw. eine Sequenz von Mustern, die etwa infolge eines primär-sensorischen oder -motorischen Eingangs induziert wurden, wiederholt - und in Abwesenheit des sensorischen bzw. motorischen Musters - zu generieren?

Formal ist hierzu ein neurales System notwendig, das die räumlich-zeitliche isocorticale Aktivität - unabhängig ihrer Herkunft - in assoziierter Form speichert und bei Bedarf - etwa bei nur inkompletter Darbietung oder zur primären Stabilisierung - als rekonstruiertes Musterecho an die isocorticalen Arealen zurückspiegelt. Erst die repetitive Rekonstruktion der isocorticalen Aktivität induziert sekundär die Ausbildung einer persistierenden synaptischen Gewichtung; zum Aufbau eines singulären Musters bzw. zur Etablierung einer Mustersequenz. Dies ermöglicht dem Isocortex die autonome, d.h. rein lokale, Reetablierung eines räumlich-zeitlichen Aktivitätsmusters. Formal würde dieser Vorgang das biophysikalische Korrelat zur Überführung von deklarativen Arbeitsgedächtnisinhalten in das Kurzzeitgedächtnis darstellen (Eichenbaum, 2004).

Für die Reetablierung des isocorticalen Aktivitätsmusters ist es entscheidend, dass innerhalb dieser Transmissionsschleife nicht nur die assoziative Speicherung der konvergenten polymodalen Aktivitäten und ihrer zeitlichen Abfolge - möglicherweise auf Basis einer eigenen Zeitsignatur und unter Ausnutzung synaptischer Lang- und Kurzzeitplastizität (Lei-

bold *et al.*, 2008) - sondern gleichermaßen die Konservierung ihrer topologischen Herkunft erfolgen muss.

Es ist berechtigt anzunehmen, dass diese Funktion durch das entorhinale-hippocampale Netzwerk realisiert wird:

Konkret scheint die eigentliche Speicherung der räumlich-zeitlichen Aktivitätsmuster im Hippocampus stattzufinden, während der EC als hippocampale Eingangsstruktur den konvergierenden polymodalen Eingang in geeigneter Form zusammenführt. Ausgehend von beiden Strukturen wird dann - im Sinne eines Stellwerkes - die topische Rückpropagation der ausgehenden Aktivität und damit die isocorticale Reetablierung der Muster bewerkstelligt; vgl. Abbildung 5.4. Ähnlich dieser isocorticalen Interaktionsschleife scheint der Hippocampus auch für die Zustandsrekonstruktion subcorticaler Areale (vegetativer und emotionaler Zustand) verantwortlich zu sein.

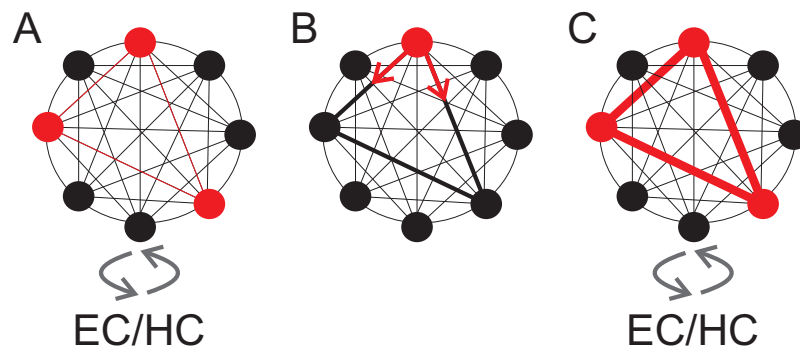


Abbildung 5.4: Reetablierung eines singulären isocorticalen Aktivitätsmusters mit Ausbildung einer persistierenden synaptischen Gewichtung. (A) Die isocorticale Aktivität wird kontinuierlich in das entorhinale-hippocampale System (EC/HC) propagiert, gespeichert und bei Bedarf - etwa bei nur inkompletter Darbietung oder zur primären Stabilisierung - als rekonstruiertes Musterecho an die Ursprungsareale zurückgespiegelt. In dieser schematischen Darstellung repräsentieren Kreise die isocorticalen Funktionseinheiten (rot aktiv, schwarz inaktiv), die Dicke der Verbindungen ihre korrespondierende synaptische Gewichtung. Die repetitive Rekonstruktion der isocorticalen Aktivität induziert sekundär die Ausbildung einer persistierenden synaptischen Gewichtung (verbreiterte Linien, B), so dass bei inkompletter Musteraktivität der Isocortex selbstständig das ursprünglich gespeicherte Muster rekonstruieren kann (C). Formal stellt dieser Vorgang das funktionelle Korrelat zur Überführung von Arbeitsgedächtnisinhalten in das Kurzzeitgedächtnis dar. Die erneute Miteinbeziehung des EC/HC-Systems zur Stabilisierung des Musters führt zu einer weiteren Verfestigung der Synapsengewichtung (Überführung ins Langzeitgedächtnis?).

Anhand dieses Bildes und unter Berücksichtigung der zum Isocortex vergleichsweisen geringen Zellausstattung der Hippocampus-Formation (geschätzte unilaterale excitatorische Zellanzahl: Granularzellschicht 1.2 Millionen, CA3-Region 250 000; aus West *et al.* (1991)) ist ersichtlich, dass Konvergenz und Kompression der Information in den zuführenden Strukturen (Cingulum, Peri-, Post- und Entorhinaler Cortex) und im Hippocampus selbst stattfinden müssen. Die morphologisch und funktionell anzutreffenden Neuronencluster innerhalb des ECs stellen unter diesem Gesichtspunkt möglicherweise parallel in den Informationsfluss integrierte spezialisierte Funktionseinheiten dar, die mit ihren jeweiligen iso- bzw. subcorticalen Arealen interagieren (Burgalossi *et al.*, 2011). Aus informationstechnischer Sicht gilt weiter, dass die multimodale isocorticale Information während ihrer Passage durch das entorhinale-hippocampale Netzwerk, initial zwecks Speicherung resp. Rekonstruktion in amodale Informationseinheiten überführt wird (*Kompression*), um nachfolgend zur Rückprojektion mit ihrer ursprünglichen Modalität wieder ausgestattet zu werden (*Dekompression*).

Die Zusammenführung der polymodalen afferenten Information innerhalb des Hippocampus findet ein eindrückliches morphologisches Korrelat in Form zahlreicher auf die CA3-Pyramidenzelle konvergierender direkter und indirekter entorhinaler Afferenzen, deren Synapsen eine ausgeprägte Langzeitplastizität (LTP, Bliss & Collingridge (1993)) besitzen und damit funktionell eine Assoziation der Afferenzen zu amodalen Mustern, gleichermaßen deren Speicherung und - unterstützt durch die recurrente Netzwerkarchitektur - auch deren Rekonstruktion (Treves & Rolls, 1994) ermöglichen.

Innerhalb des Hippocampus entsteht hierdurch ein relationaler, amodaler Speicher, der die zeitlich-räumliche Beziehung iso- bzw. subcorticaler Muster abbildet (Eichenbaum, 2004).

Topographische Neurone

Eine besondere Eigenschaft des entorhinalen-hippocampalen Netzwerks ist das Vorkommen sogenannter *topographischer Neurone*, deren gemeinsames Charakteristikum eine direkte Abhängigkeit ihrer Aktivität vom Ort oder der räumlichen Orientierung des Individuums ist: Die sogenannten *Gridzellen* des MEC's zeichnen sich dadurch aus, dass sie beim Durchlaufen

einer Umgebung innerhalb regelmäßig verteilter, hexagonal-geformter Regionen den sog. Grids feuern (Hafting *et al.*, 2005). Der Schicht II des MEC wird der größte Anteil von Gridzellen zugerechnet (Sargolini *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den hippocampalen *Ortszellen* (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), die ähnlich eines rezeptiven Feldes nur an bestimmten Orten innerhalb einer Umgebung feuern, sind die Gridzellen kontextinsensitiv, d.h. in allen Umgebungen aktiv, und dies unabhängig anderer externer Schlüsselreize. Neben den Gridzellen wurde über das Vorhandensein sogenannter entorhinaler *Kopfrichtungszellen*, integrierender Zellen, die die Gridzellinformation und Kopfrichtung vereinen (*Conjunctive-Cells*), und *Border-Cells* (Solstad *et al.*, 2008) berichtet, deren Aktivität durch geometrische Wände modulierbar ist; die beiden erstgenannten Zelltypen finden sich akzentuiert in den Schichten III und V des MEC (Sargolini *et al.*, 2006).

Das Vorhandensein dieser topographischen Neurone wurde von einigen Autoren als ein wichtiges Indiz für die Rolle des entorhinalen-hippocampalen Netzwerks als eigenständiges neurales Navigationssystem (kognitive Karte, O'Keefe & Nadel (1978)) angesehen (Hafting *et al.*, 2005; Moser & Moser, 2008; Smith & Mizumori, 2006) und mit Spekulationen über dessen mechanistische Grundlagen versehen (Giocomo *et al.*, 2011).

Im Kontext der oben dargelegten Funktion des entorhinalen-hippocampalen Netzwerkes als Echopropagator neuronaler Erregungsmuster erscheint diese zuge dachte Funktion jedoch fragwürdig. So ist es plausibel anzunehmen, dass die Repräsentation von Ortsdaten, ähnlich der Identifikation einzelner sensorischer Objekte, im Isocortex selbst generiert wird. Im Sinne der geschilderten isocorticalen-hippocampalen Interaktionsschleife wird eine Kopie der durch Aufmerksamkeitsprozesse gewichteten aktuellen isocorticalen Erregung an die Hippocampus-Formation protokolliert; hierzu gehört die aktuelle Position als ein wichtiger, kontinuierlich aktualisierter Parameter. Es überrascht also nicht, dass innerhalb des entorhinalen Konvergenzalgorithmus jene Ortsdaten ihre Repräsentation finden müssen: dies ist jedoch nicht als Zeichen einer (para)hippocampalen Ortsberechnung resp. -aktualisierung - wie von Moser & Moser (2008) vorgeschlagen - zu werten, sondern vielmehr als Ausdruck des Konvergenzalgorithmus zur Etablierung eines relationalen Speichers (Eichenbaum, 2004). Hierfür spricht auch die extrahippocampale Existenz topographischer Neu-

rone, wie z.B. von Kopfrichtungszellen, die im dorsalen Praesubiculum, im Ncl. mamillaris lateralis, im Striatum, im lateralen dorsalen Thalamus und im retrosplenialen Cortex nachzuweisen sind (Taube, 2009).

Aus methodisch-experimenteller Sicht ist es weiterhin offensichtlich, dass innerhalb des entorhinalen-hippocampalen Systems die Identifikation der in Wachphasen *stetig aktualisierten* (und damit nach hippocampal propagierten) Ortsdaten aufgrund ihrer direkten Abhängigkeit von messbaren externen Umweltreizen sich ungleich einfacher gestaltet als z.B. die Identifikation höherer kognitiver, nicht-räumlicher Objekte, für die i.d.R. das externe Korrelat fehlt und deren Existenz nicht zeitkontinuierlich ist. Darüber hinaus erleichtert die neuronale Konvergenz innerhalb des entorhinalen-hippocampalen Systems im Vergleich zur distributiven Codierung des Isocortex den Nachweis einzelner objektrepräsentierender Neurone (Großmutterneuron).

Die anzutreffende regionale Spezifität der Zellen erscheint damit eine direkte Folge der topographischen Organisation des isocortical-entorhinalen-hippocampalen Netzwerkes zu sein; so ist konkret die ausschließliche Nachweisbarkeit von Gridzellen im MEC ein Hinweis auf die exklusive Konvergenz der isocorticalen Ortsinformation auf diese Region.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass im Hippocampus sowohl räumliche als auch nicht-räumliche Aktivität im Sinne eines amodalen relativen Speichers (Eichenbaum 1999) repräsentiert wird. Die hochgradige Redundanz der Repräsentation topographischer Information - bei räumlichen Aufgaben zeigen laut Solstad *et al.* (2008) alleine rund 10% der MEC-Zellen die Charakteristika einer Borderzelle - kann als ein Hinweis auf die großen Kapazitätsreserven dieses relationalen Speichers während räumlicher Aufgabenstellungen (sprich: Orientierung) angesehen werden.

Die Bestätigung dieser Annahme setzt für die Zukunft die Entdeckung entorhinaler-hippocampaler Neurone voraus, deren Aktivität anderweitig modulierbar ist, einerseits, in Anlehnung an das Konvergenzprinzip, durch unterschiedliche Objekte (fehlende Exklusivität der Codierung) und, andererseits, durch nicht-räumliche Information, wie in Arbeiten von Moita *et al.* (2003) und (Wood *et al.*, 1999) für auditorischer bzw. olfaktorische Objekte bereits aufgezeigt.

5.3 Kritik und Ausblick

5.3.1 Die klassische Photostimulation als Übergang

Der hier vorgestellte Algorithmus und das Photostimulations-System bedingen einander: Das in seiner Funktion als Ein-Photonen-System operierende Photostimulations-System erlaubt im Allgemeinen nicht die gezielte Stimulation einzelner Neurone, sondern führt zur Aktivierung mehrerer Neurone innerhalb eines Volumenabschnitts. Konzeptionell kommt es damit nicht zur direkten Offenlegung synaptischer Verbindungen zwischen zwei Neuronen, sondern zwischen einem ausgesuchten Volumenabschnitt und dem Zielneuron. Durch die Anwendung des Algorithmus kann diese methodische Schwäche, wie in der Arbeit gezeigt, teilweise korrigiert werden. Beide Verfahren können helfen, einfache Grundprinzipien in der Innervation aufzudecken, wie z.B. die intrinsische Organisation corticaler Regionen oder die Konnektivität zwischen zwei Kernarealen. Ungeachtet dessen bleibt die Scanning Photostimulation - auf dieser Entwicklungsstufe - mit deutlichen Einschränkungen behaftet:

So bleibt die Analyse stets auf die sequentielle Offenlegung monosynaptischer Kontakte begrenzt. Weiterhin gilt, dass aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur selektiven Aktivierung ausgewählter präsynaptischer Neurone keine zelltyp-spezifische Analyse vorgenommen werden kann (z.B. eine isolierte Analyse der MEC-Sternzell-Recurrenz). Eine weitere wichtige Limitation der Scanning-Photostimulation, die ja das Abtasten eines Hirnabschnittes mit einer *konstanten* und nicht zell-spezifischen Lichtenergie umschreibt, stellt die Tatsache dar, dass die Kartierung einer Hirnregion nur sinnvoll ist, wenn die Zellen ähnliche Aktivierungseigenschaften besitzen (perisomatische Aktivierungsregion *und* Anzahl der Aktionspotentiale). Diese Anforderung kann jedoch nicht per se garantiert werden, sondern muss durch initiale Kalibrationsexperimente nachgewiesen werden. Die Notwendigkeit dieser Maßnahme dokumentieren die deutlich variierenden direkten Aktivierungsprofile der excitatorischen Hauptzellen des piriformen Cortex; vgl. Abbildung 5.5.

Zusammenfassend gilt, dass, trotz enormer experimentell-methodischer Anstrengung, der erzielte Wissensgewinn hinsichtlich der Informationsverarbeitung innerhalb neuronaler Systeme insgesamt als nur rudimentär einzuschätzen ist. Insbesondere gelingt nicht die Erfassung der dynamischen

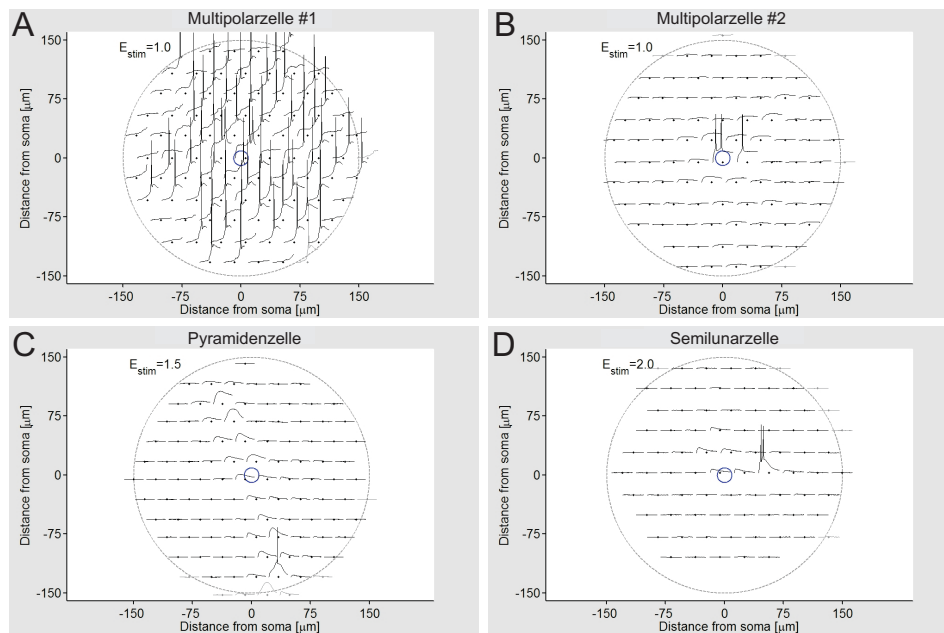


Abbildung 5.5: Direkte Aktivierungsprofile der Hauptzellen des piriformen Cortex. Sowohl innerhalb als auch zwischen den Zelltypen lassen sich hochvariable photoinduzierte Aktivierungsprofile ableiten. Während die erste Multipolarzelle (A) eine große perisomatische Aktivierungsregion aufweist, besitzen Pyramidenzellen (C) und Semilunarzellen (D) eine kleine Aktivierungsregion, ungeachtet einer höheren Lichtenergie, E_{stim} . Die Anzahl der evozierten APs/Stimulationspunkt ist für alle drei Zelltypen näherungsweise gleich (rund 1-2 APs/Hotspot). Die große Varianz der Aktivierungsprofile innerhalb der Multipolarzelle (exemplarisch eine zweite Multipolarzelle in B) weist auf eine bis dato unbekannt Subtypisierung innerhalb dieser Zellgruppe hin.

neuronalen Interaktion. Deren Offenlegung ist jedoch zwingend notwendig zum Verständnis der corticalen Mikroschaltkreise und damit der zugrundeliegenden formallogischen Ebene in Form verteilter Algorithmen, was folgender konzeptioneller Einwurf veranschaulichen soll.

5.3.2 Das Nervensystem als verteilter Algorithmus

Aus informationstechnologischer Sicht stellt das Nervensystem die biophysikalische Realisation vieler verteilter Algorithmen dar. Im Hinblick auf die Funktionsweise neuraler Systeme scheint es sinnvoll zu sein, für diesen aus der theoretischen Informatik stammenden Begriff (Lynch, 1996) eine verallgemeinerte Definition zu entwerfen: Unter einem *verteilten Algorithmus* versteht man ganz allgemein die Interaktion autonomer Prozesse zur algorithmischen Lösung einer Aufgabe.

Die formallogische Beschreibung eines verteilten Algorithmus setzt die Turing-Vollständigkeit der autonomen Prozesse voraus (z.B. in Form einer von-Neumann-Architektur), d.h. die Prozesse können jede berechenbare Funktion realisieren. Die Kommunikation der autonomen Prozesse erfolgt über Nachrichten entlang in der Praxis meist fehlerbehafteter Transmissionskanäle.

Im Äquivalent hierzu ist das Grundbauelement des Nervensystems das Neuron, ein polar gegliedertes Rechenelement mit Eingangs- (Dendrit) und Ausgangsstruktur (Axon), über die der überwiegende Teil der interneuronalen, ebenfalls fehlerbehafteten Kommunikation erfolgt. Die bevorzugt in der neuralen Ontogenese auftretenden Gap junctions mit Schaffung eines funktionellen neuronalen Syncytiums, spielen in unserer Betrachtung keine Rolle.

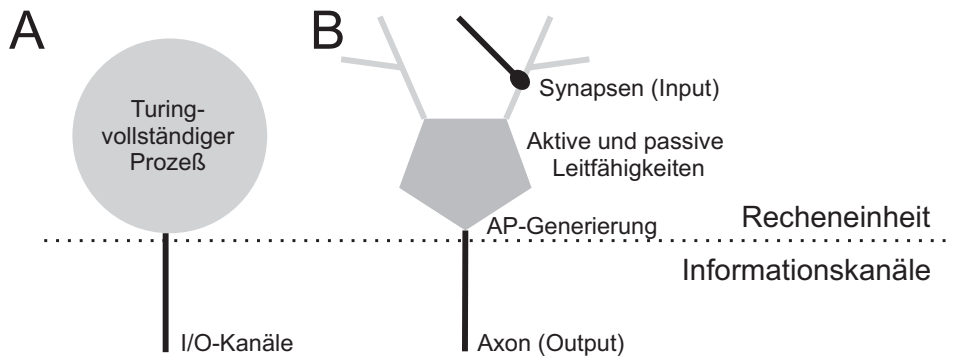


Abbildung 5.6: Formallogischer vs. neuronaler Prozeß. (A) Ein formallogischer Prozeß ist durch eine turing-vollständige Recheneinheit gekennzeichnet, die über potentiell fehlerbehaftete Transmissionskanäle mit anderen Prozessen kommuniziert. (B) Ein Neuron ist ein polar gegliedertes Rechenelement mit Eingangs- (Dendrit) und Ausgangsstruktur (Axon), über die der überwiegende Teil der interneuronalen, ebenfalls fehlerbehafteten Kommunikation erfolgt. Das Neuron besitzt keine Turing-Vollständigkeit und weist damit eine reduzierte Berechnungsmächtigkeit auf.

Das biophysikalische neuronale Äquivalent eines verteilten Algorithmus bezeichnet man als *Mikroschaltkreis*: Hierunter versteht man eine Gruppe von Neuronen, die durch ihre konzertierte Interaktion eine logische Einheit mit einer definierten Eingangs- und Ausgangsinformation formen.

Das Ziel der Hirnforschung ist letztendlich die Erkenntnis über die Funktionsbedeutung ('computational role') der unterschiedlichen verteilten Algorithmen im Sinne ihrer formallogischen Beschreibung, über ihre übergeordnete Koordination und schließlich über ihre biophysikalische Realisation in Form von Mikroschaltkreisen. Dies beinhaltet ebenfalls den

Versuch, pathologisch-klinische Zustandsbilder auf algorithmische Abnormalitäten zurückzuführen.

Das Kernproblem in der Analyse neuronaler Mikroschaltkreise besteht nun darin, dass ein formallogischer Prozess durch eine turing-vollständige Recheneinheit gekennzeichnet ist, während die Rechenkapazität eines Neurons nur turing-*unvollständig* ist. Aus dieser reduzierten Berechnungsmächtigkeit des Neurons folgt unmittelbar, dass eine 1:1-Überführung des formallogischen Algorithmus auf ein System mit Neuronen et vice versa nicht bzw. nur in seltenen Einzelfällen möglich ist, wie folgendes Beispiel aufzeigt:

Man stelle sich vor, dass eine zusammenhängende Gruppe autonomer Prozesse entscheiden soll, wer von ihnen den höchsten Wert trägt (der z.B. den Aktivierungsgrad eines Neurons widerspiegelt). Zur Lösung dieses Problems ('Leader-Election'-Problem in der theoretischen Informatik) gibt es diverse algorithmische Möglichkeiten; die einfachste besteht darin, dass jeder Prozess den maximalen, bisher empfangenen Wert speichert (initial den eigenen Wert) und in jeder Runde diesen Wert über die Kommunikationskanäle (Kanten) an die Nachbarprozesse innerhalb des zusammenhängenden Graphen propagiert. Nach *diameter* Runden ernennt sich jener Prozess zum 'Leader', dessen eigener Wert mit dem gespeicherten Maximalwert übereinstimmt; alle übrigen Prozesse attribuieren sich als 'Non-Leader' (FloodMax-Algorithmus) (Lynch, 1996). Ein wichtiges Merkmal dieses exemplarischen Beispiels ist die algorithmische Gleichheit der Prozesse: die Prozesse besitzen ein einheitliches algorithmisch-definiertes Prozedere, können jedoch aufgrund unterschiedlicher Start- bzw. Empfangswerte differierende Zustände einnehmen. Die Turing-Mächtigkeit der Prozesse wird an dem Lösungsalgorithmus unmittelbar ersichtlich; zu seiner Realisation benötigt jeder Prozess u.a. einen Speicher und eine arithmetisch-logische Vergleichseinheit.

Versucht man diesen sehr einfachen Algorithmus mithilfe von Nervenzellen zu realisieren (**Synthese**), gilt es, den algorithmischen Informationsfluss (im wesentlichen Zustände, Berechnungen und Nachrichten) in das plastische neuronale System mit seinen zeitlich variierenden Zustandsparametern (neuronale Aktivität, zelluläre Eigenschaften und Konnektivität) ähnlich einer Abbildung zu transferrieren. Vereinfachend nehmen wir an, dass - entgegen den realen Bedingungen - die Elemente zeitsyn-

chron interagieren (in realitas sind hierfür neuronale Oszillationen als Zeitrahmen notwendig (Singer, 2011)) und die Nachrichtenkanäle ausfallsfrei funktionieren (kein synaptischer Transmissionsausfall). Gleichmaßen soll die Tatsache, dass in einem neuronalen System Nachrichten keine einfachen Zahlenwerte, sondern vielmehr zeitliche Aktivitätsmuster darstellen, deren Nachrichtenwert erst im Kontext des individuellen Synapsen- und Zielneuron-Zustandes offenbar wird, hier ebenfalls keine weitere Beachtung finden.

Aufgrund der fehlenden Turing-Mächtigkeit der Neurone gilt es, grundlegende Designkriterien zu treffen, wie z.B. die Art der Repräsentation und Speicherung quantitativer Zustände, gleichmaßen die Beantwortung der Frage, inwieweit die im Algorithmus geforderten *prozessinternen* Vergleiche und Berechnungen von einem *Einzelneuron* - etwa durch synaptische Prozesse - realisiert werden können oder hierzu die Interaktion mehrerer Neurone notwendig ist. Letztgenannter Weg - im überwiegenden Teil der Fälle notwendig - führt zum Aufbrechen der 1:1-Relation von Prozess und Neuron. Hierbei kommt es zwingend zur Aufhebung der algorithmischen Prozessgleichheit in Form einer funktionellen Partionierung der Neurone: es entstehen Zustandsneurone, Rechenneurone, Ergebnisneurone, Ausgangsneurone und andere funktionelle Neuronentypen.

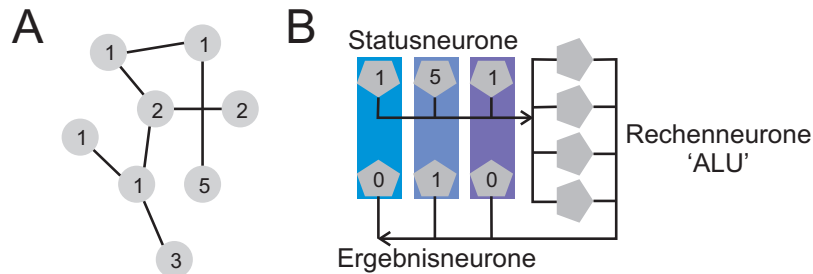


Abbildung 5.7: Formallogischer vs. neuronaler verteilter Algorithmus. **(A)** Eine zusammenhängende Gruppe von autonomen Prozessen (Kreise) soll entscheiden, wer von ihnen den höchsten Wert trägt (Zahlenwert). Zur Lösung dieser Aufgabe ('Leader-Election'-Problem) gibt es diverse algorithmische Möglichkeiten wie z.B. der FloodMax-Algorithmus (Lynch, 1996). Die Kommunikation der Prozesse erfolgt dabei über Kommunikationskanäle (Kanten). **(B)** Die Realisation des Algorithmus mithilfe von Nervenzellen führt aufgrund ihrer fehlenden Turing-Mächtigkeit zum Aufbrechen der 1:1-Relation von formallogischem Prozess und Neuron. Hierbei kommt es zwingend zu einer funktionellen Partionierung der Neurone: es entstehen Zustandsneurone, Rechenneurone (ALU = Arithmetisch-logische Einheit) und Ergebnisneurone, die in diesem Beispiel den Zustandsneuronen funktionell zugeordnet sind.

Entsprechend dieser Überlegungen erfordert der umgekehrte Weg, die formallogische Beschreibung eines vorliegenden neuronalen Mikroschaltkreises (**Analyse**), initial, die Identifikation der unterschiedlichen neuronalen Funktionstypen und, nachfolgend, die Echtzeitprotokollierung der algorithmisch relevanten biophysikalischen Kenngrößen wie Aktionspotentiale und neuronale Aktivität. Erst durch diese formallogische Beschreibung erhalten die biophysikalischen Kenngrößen einen gruppenspezifischen Informationswert; z.B. Modalität und Nachrichtenwert einer Aktionspotential-Serie.

5.3.3 Die Zukunft der Photostimulation

Im Kontext dieser Überlegungen ist es evident, dass die heutige Neurowissenschaft technisch-methodisch sehr weit davon entfernt ist, den oben genannten Anforderungen der Echtzeitprotokollierung relevanter biophysikalischer Größen gerecht zu werden.

Ungeachtet dessen besteht die begründete Hoffnung, dass die gezielte Weiterentwicklung der Photostimulation und ihre Kombination mit anderen Methoden das Potential einer Zukunftstechnologie zur dynamischen Analyse neuronaler Mikroschaltkreise besitzt. Diese Ansicht gründet sich auf folgende experimentell-methodische Verbesserungsmöglichkeiten:

1. **Zeitliche Präzision** (niedrig- vs. hochfrequent): Durch Einsatz eines, der Mikroskop-Optik vorgeschalteten, akustisch-optischen Deflektors (AOD) kann eine hochfrequente Repositionierung (aktuell bis 20 kHz) des aktivierenden Lichtstrahls vorgenommen werden. Technisch wird das Licht hierbei durch Schallwellen, die meist von einem Piezo-Element innerhalb eines Tellurium-Dioxid -(TeO₂)-Kristalls generiert werden, abgelenkt. Entsprechend der physikalischen Gesetze, kann die Ablenkung nur in eine Richtung erfolgen; zur Positionierung des Lichtes auf einer Ebene finden sich deshalb meist zwei hintereinander geschaltete, orthogonal zueinander stehende AOD-Elemente; vgl. Abbildung 5.8. Als Beispiel für eine derartige Modifikation vgl. Shoham *et al.* (2005).

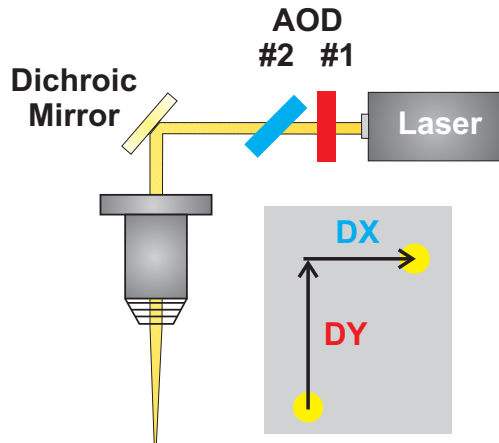


Abbildung 5.8: Hochfrequente Lichtpositionierung durch Einsatz von AODs. Durch Einsatz eines, der Mikroskop-Optik vorgeschalteten, akustisch-optischen Deflektors (AOD) kann eine hochfrequente Repositionierung (aktuell bis 20 kHz) des aktivierenden Lichtstrahls vorgenommen werden. Entsprechend der physikalischen Gesetze, kann die Ablenkung nur in eine Richtung erfolgen; zur Positionierung des Lichtes finden sich deshalb meist zwei hintereinander geschaltete, orthogonal zueinander stehende AOD-Elemente, die zur Aufspannung der Stimulationsebene führen (Inset). Die Kontrolle der 3.Dimension erfolgt über die Brennebene der Mikroskopoptik.

2. **Räumliche Präzision** (1-Photonen- vs. 2-Photonenaktivierung): Aufgrund ihrer hohen räumlichen Präzision ermöglicht die 2-Photonenaktivierung die gezielte Stimulation einzelner Neurone; ein Scanning-Modus, d.h. das Abtasten von Raumpunkten entfällt. Hierdurch gelingt es auch, einzelne Ebenen innerhalb des Präparates räumlich getrennt voneinander zu analysieren.
3. **Einsatz optischer Methoden:** Das Anwendungspotential der Photostimulation ist durch die Kombination mit optischen Verfahren erheblich steigerbar: Zum einen erlaubt die Verwendung fluoreszenzoptischer Farbstoffe die Identifikation präsynaptischer Zellsomata und damit ihre räumlich-präzise 2-Photonen-Stimulationen. Zum anderen wird es möglich, stimulationsbegleitend die präsynaptische Zellerrregung darzustellen. So führt beispielsweise die Applikation des Zellmembran-durchgängigen Indo-1-Acetoxymethylesters (Indo-1-AM) zur fluoreszenzoptischen Darstellung der Zellsomata und damit der potentiell präsynaptischen Aktionspotentiale innerhalb der beladenen Zellen (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Hierdurch kann b.B. eine individuelle online-Anpassung der Lichtenergie zur kontrollierten über-

schwelligen Aktivierung des einzelnen Neurons vorgenommen werden; dies stellt in Hirnarealen mit Neuronen unterschiedlicher Photosensitivität ein unabdingbarer Faktor zur Durchführung von Konnektivitätsexperimenten dar. Technisch realisierbar wird eine so geartete Kombination aus Bildgebung und Photostimulation beispielsweise durch eine rasche, schalterartige Energieanpassung des Lichtapplikationssystems (hohe Lichtenergie zur Stimulation, niedrige Lichtenergie zur Bildgebung); beispielhaft sei hier auf Nikolenko *et al.* (2007) verwiesen.

4. **Postsynaptische Aktivitätserfassung:** Ein wichtiger limitierender Faktor in der Anwendung der Photostimulation ist die Notwendigkeit der Etablierung einer Messapparatur, die gleichermaßen sensitiv wie stabil genug ist, einzelne synaptische Potentiale über einen längeren Zeitraum hin zu detektieren. Man erreicht dies durch Whole-patch-clamp Ableitungen an einem oder mehreren Zielneuron(en). Es wird eine zukünftige Aufgabe sein, die optischen Bildgebungsverfahren so anzupassen, dass auch sie eine simultane Aktivitätserfassung der postsynaptischen Signale an einzelnen oder multiplen Neuronen ermöglichen. Letztgenannte Option wäre ein entscheidender Schritt zur Offenlegung der dynamischen Interaktion neuronaler Elemente.

5. **Einsatz optogenetischer Methoden:** Sowohl die zeitliche als auch die räumliche Präzision des Setups sind nicht nur abhängig von der Art der Lichtapplikation, sondern gleichermaßen vom photoenergetisch zu aktivierenden Agens. Durch den Einsatz optogenetischer Methoden kann die räumlich-zeitliche Präzision der Stimulation grundlegend erhöht werden: Das Prinzip der Optogenetik ist die genetische Modifikation ausgewählter Zellen mit dem Ziel der Expression optisch-kontrollierbarer zellulärer Moleküle, die schalterartig die zeitlich hochpräzise Kontrolle der Zelle ermöglichen. In ihrem Ursprung basiert die Optogenetik auf den Arbeiten des deutschen Biologen und Biophysikers Georg Nagel, Würzburg, und der Entdeckung von Channelrhodopsin-1 (ChR1, bei Prokaryoten) und Channelrhodopsin-2 (ChR2, bei Eukaryoten) (Nagel *et al.*, 2002; 2003). Bei den Channelrhodopsinen handelt es sich um unspezifische

light-gated Kationen-Kanäle, die durch blauwelliges Licht aktivierbar sind und zu einer Depolarisation der Zelle führen. Neben den excitatorischen Channelrhodopsinen wurden inhibitorische Chlorid-spezifische Kanäle/Pumpen in Form von Halorhodopsinen (HR) entwickelt, die über orangewelliges Licht aktivierbar sind, wie z.B. die light-driven Chlorid-Pumpe (NpHR) des Halobacterium *Natronomonas pharaonis* (Zhang *et al.*, 2007). Das Arsenal der Kanäle/Pumpen wird komplementiert durch die Rhodopsin-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (OptoXRs), welche, je nach genetischer Ausstattung, unterschiedliche Zielprotein-Konzentrationen intracellulär alterieren können (cAMP, DAG, IP3); ihre Aktivierung erfolgt über grünwelliges Licht; vgl. Abbildung 5.9.

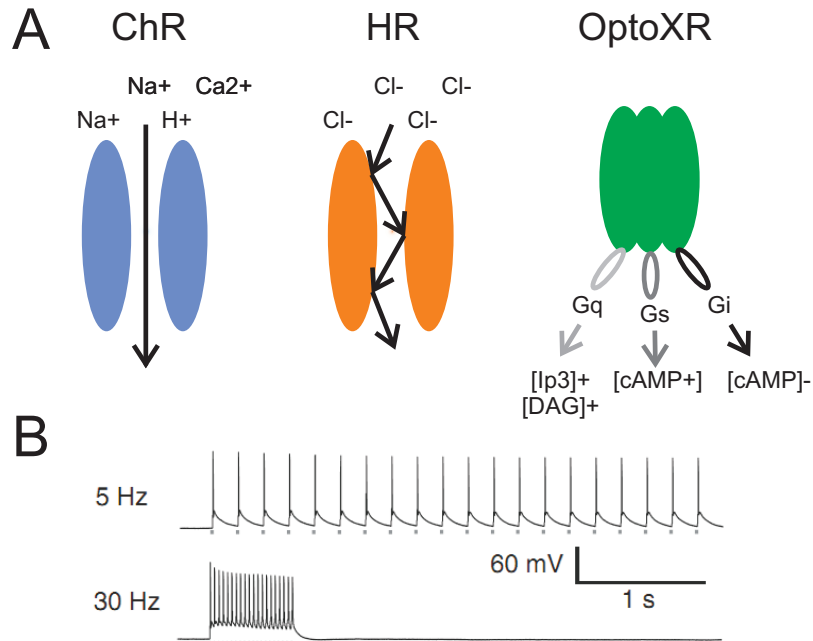


Abbildung 5.9: Optogenetische Kanäle/Pumpen zur Kontrolle neuronaler Aktivität. (A) Channelrhodopsine (*ChR*) sind unspezifische light-gated Kationen-Kanäle, die durch blauwelliges Licht aktivierbar sind und zu einer Depolarisation der Zelle führen. Demgegenüber handelt es sich bei Halorhodopsinen (*HR*) um Chlorid-spezifische Pumpen, die eine Inhibition der Zelle bewirken. Die Gruppe der Rhodopsin-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*OptoXR*) alteriert in Abhängigkeit ihrer intracellulären Loops unterschiedliche Zielprotein-Konzentrationen (cAMP, DAG, IP3); ihre Aktivierung erfolgt über grünwelliges Licht; Abbildung nach Fenno *et al.* (2011). (B) Präzises Entrainment der neuronalen Aktivität eines ChR2-tragenden Neurons im current-clamped Modus an die Frequenz der Lichtreize (Punkte); Abbildung in modifizierter Form aus Boyden *et al.* (2005).

Eine wichtiges Anwendungsprinzip in der Optogenetik liegt in der Möglichkeit zur selektiven genetischen Modifikation ausgewählter Nervenzellgruppen, z.B. in Form einer Schicht- (Arenkiel *et al.*, 2007) oder Areal-Spezifität (Han *et al.*, 2009). Ein alternatives genetisches Modifikationsmuster stellt das sog. Circuit-Targeting dar; dies beschreibt die transsynaptische antero- bzw. retrograde genetische Modifikation eines Mikroschaltkreises, z.B. mithilfe eines neurotrophen Virus (Wickersham *et al.*, 2007).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Optogenetik besteht in der individuellen Anpassung der Absorptionsspektren der optogenetischen Moleküle; diese ermöglicht es, die Aktivität verschiedener Moleküle unabhängig voneinander mit verschieden-farbigem Lichtquellen zu kontrollieren.

Zusammenfassend gilt, dass durch die selektive Ausstattung einzelner Neurone mit genetisch-modifizierten light-gated Kanälen ihre zeitlich hochpräzise biophysikalische Steuerung mittels Licht möglich wird. So dokumentieren erstmals Arbeiten von Boyden *et al.* (2005) an hippocampalen Neuronen die reliable optische Kontrolle der neuronalen Aktionspotential-Generierung auf einer Zeitskala im Millisekunden-Bereich. Die Frequenz der AP-Generierung kann bis zu einer Rate von 30 Hz durch Anpassung der applizierten Lichtenergie reliabel kontrolliert werden (Wang *et al.*, 2007); vgl. Abbildung 5.9b.

Unter Berücksichtigung dieses methodisch-technischen Fortschritts wird es möglich sein, einerseits die zellulären Eigenschaften der Neurone zu verstehen, d.h. ihr Ausgangssignal als Funktion ihres aktuellen Zustandes und afferenter Signale zu beschreiben, andererseits Konnektivität, Informationswert und dynamische Interaktion der Neurone sowohl in-vitro als auch in-vivo abzubilden:

Analyse der neuronalen Ausgangsfunktion

In konsequenter Weiterentwicklung ursprünglicher Experimente zur Rezeptordichte-Bestimmung (Dodt *et al.*, 1998) ermöglicht die *direkte* Stimulation der Zelle (AOD und 2-Photonen-Technik) die Analyse der zellulären dynamischen dendritischen Integration (Shoham *et al.*, 2005), also die Bestimmung der neuronalen Ausgangsfunktion als Funktion ihres hochfrequenten

dendritischen Eingangs, vgl. Abbildung 5.10a. Dies beinhaltet auch die Analyse aktiver dendritischer Attenuations- und Augmentationsprozesse mit langsameren Repositionierungsfrequenzen (Krueppel *et al.*, 2011).

Weiterhin ist die hochfrequente *indirekte* Stimulation eines Neurons, z.B. durch die Anwendung von 'frozen noise' als Stimulationsmuster (Boucsein *et al.*, 2005) möglich. Voraussetzung hierfür ist die reliable Kontrolle der präsynaptischen Aktionspotential-Generierung, die durch den Einsatz optogenetischer Methoden noch einmal deutlich verbessert werden kann; vgl. Abbildung 5.10b. In Erweiterung zur dendritischen Stimulation inkorporiert das zuletzt genannte Experiment zusätzlich die Reliabilität der synaptischen Übertragung. Bisherige Untersuchungen hierzu zeigen, dass die interneuronale Informationskette (synaptische Transmission, dendritische Integration und Transduktion) eine überraschend hohe Reliabilität aufweist (Boucsein *et al.*, 2005; Shoham *et al.*, 2005).

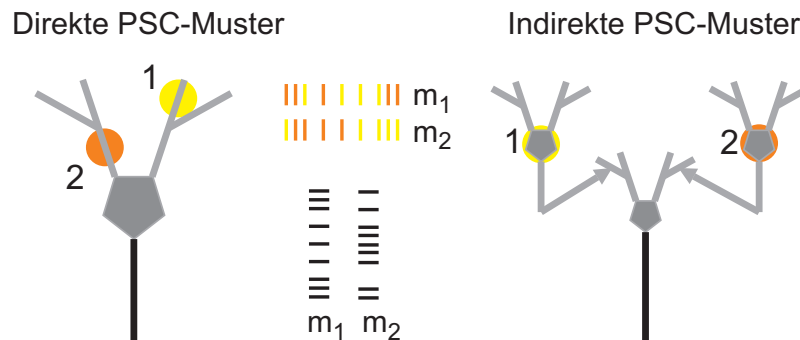


Abbildung 5.10: Analyse der neuronalen Ausgangsfunktion. **(Links)** Die direkte hochfrequente Stimulation der Zielzelle (Axone schwarz) ermöglicht die Analyse des Transduktionsprozesses als Funktion räumlich-zeitlich variierender Muster; im Beispiel an den dendritischen Positionen 1 und 2, mit einer der Lokalität entsprechenden farblichen Codierung der Muster. Die evozierten AP-Muster sind vertikal in Form schwarzer Balken dargestellt. **(Rechts)** Die hochfrequente indirekte Stimulation der Zielzelle erlaubt die Analyse des Transduktionsprozesses als Funktion der zeitlich-variierenden überschweligen Aktivierung präsynaptischer Neurone an den Positionen 1 und 2.

Zusammenfassend gilt, dass unter Anwendung der genannten technischen Modifikationen schon heute die Möglichkeit besteht, die Ausgangsfunktion einer Nervenzelle in Abhängigkeit ihres aktuellen Zustandes und des zu variierenden Eingangs (je nach Methode dendritisch bzw. synaptisch) experimentell *in vitro* zu charakterisieren.

Analyse von Konnektivität und dynamischer Interaktion

Die Analyse der neuronalen Konnektivität wird durch die hochpräzise räumlich-zeitliche Zellaktivierung (2-Photonen-System und Optogenetik) in Kombination mit optischen Methoden, die u.a. die Lokalität und Aktivität präsynaptischer Neurone darstellen können, erheblich verbessert und konzeptionell erweitert. Zur Veranschaulichung dessen sei hier prozessartig eine mögliche Form der kombinierten Anwendung der genannten Methoden skizziert; vgl. Abbildung 5.11:

Zur Bestimmung der funktionellen Konnektivität werden in einem ersten Schritt die ortsständigen neuronalen Somata fluoreszenzoptisch mit einem Calcium-Indikator markiert. Auf Basis dieser Darstellung erfolgt dann die automatische Erfassung ihrer Raumkoordinaten zur räumlich-selektiven Stimulation dieser potentiell präsynaptischen Neurone. Während der nachfolgenden optischen Stimulation erlaubt die begleitende Messung des Fluoreszenzlevels die ausreichend präzise Dokumentation einer überschweligen präsynaptischen Aktivierung und damit die individuelle Anpassung der Lichtenergie. Durch die optogenetische Modifikation der Neurone gelingt weiterhin die präzise Induktion präsynaptischer Aktionspotential-Muster, deren Identifikation am Zielneuron unter Anwendung der Kreuzkorrelation, auch in einer rauschbehafteten Umgebung, problemlos möglich ist.

Die Ausweitung dieser Konnektivitätsexperimente in Form eines Multirecordings von mehreren Zielzellen bei gleichzeitiger hochfrequenter musterartiger Aktivierung präsynaptischer Neurone ermöglicht dann durch Inspektion der resultierenden Spike-Rasterplots die Analyse der dynamischen neuronalen Interaktion innerhalb eines Mikroschaltkreises und schafft damit die Voraussetzung zur Offenlegung der formallogischen algorithmischen Ebene; vgl. Abbildung 5.11f.

Rückgreifend auf die oben dargestellte Funktionspartitionierung der Neurone innerhalb eines Mikroschaltkreises (vgl. Abschnitt 5.3.2) wird es dabei eine zukünftige Aufgabe sein, eine äquivalente funktionspezifische optogenetische Modifikation der Neurone zu realisieren. Durch die Anwendung randomisiert-variiender Farbspektren können dann die einzelnen Zellen innerhalb einer Funktionsgruppe durch Verwendung entsprechender Lichtquellen konzertiert aktiviert werden (Abbildung 5.11g).

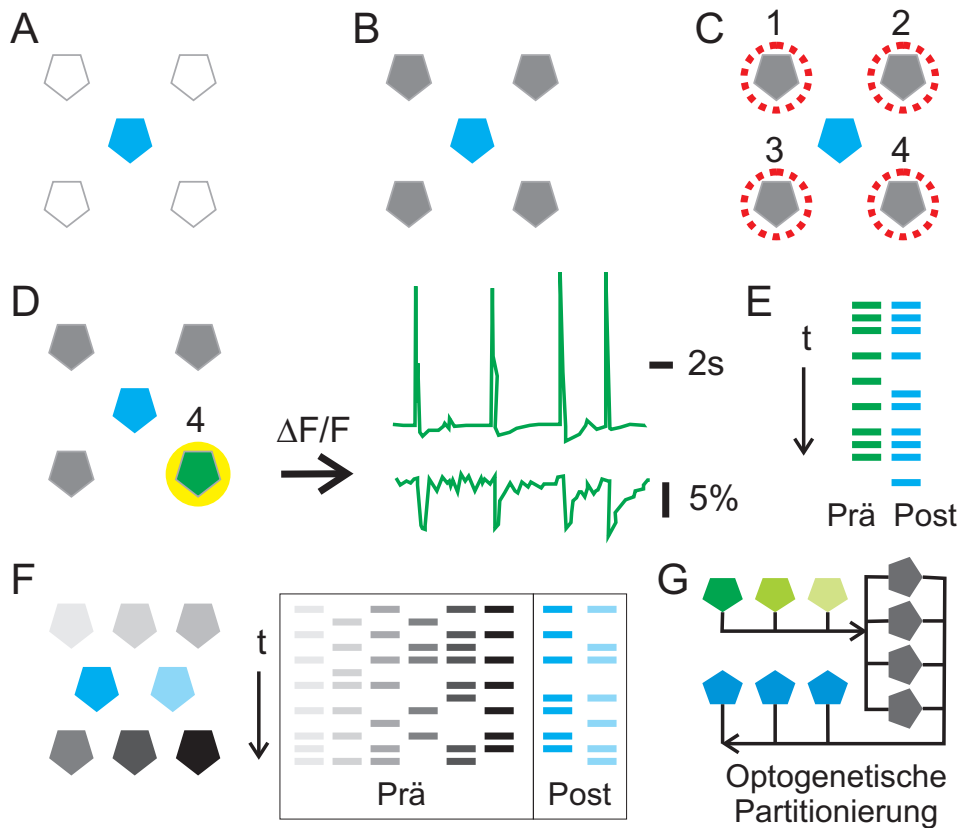


Abbildung 5.11: Analyse von Konnektivität und dynamischer neuronaler Interaktion (A) Zur Bestimmung der funktionellen Afferenz einer ausgewählten Zielzelle (blau) werden in einem ersten Schritt die ortsständigen Somata der Neurone fluoreszenzoptisch mit einem Calcium-Indikator markiert (grau, B). (C) Auf Basis dieser Darstellung erfolgt die Erfassung der Raumkoordinaten (rote Kreise) der potentiell präsynaptischen Neurone zur räumlich-selektiven Stimulation. (D) Während der optischen Stimulation erlaubt die begleitende Messung des Fluoreszenzlevels ($\Delta F/F$, unterer Trace) die ausreichend präzise Dokumentation einer überschwelligeren präsynaptischen Aktivierung, wie der exemplarische Vergleich mit der zeitlichen Entwicklung des (während der Messung unbekannt) Membranpotentials zeigt (oberer Trace). (E) Durch die optogenetische Modifikation der Neurone gelingt die präzise Induktion präsynaptischer AP-Muster (hier 'SOS'), deren Identifikation am Zielneuron unter Anwendung der Kreuzkorrelation problemlos ist, ungeachtet störender Einflüsse, wie synaptischer Transmissionsausfälle und spontaner synaptischer Signale. Die zeitliche Ausrichtung von Send- und Empfangsmuster ('Prä' bzw. 'Post') erfolgte unter Korrektur der konstanten interneuronalen Transmissionsverzögerung. (F) Multirecording (Zielzellen blau) und eine hochfrequente musterartige Aktivierung präsynaptischer Neurone (grau) ermöglichen anhand der resultierenden Spike-Rasterplots die Analyse der dynamischen neuronalen Interaktion innerhalb eines Mikroschaltkreises. (G) Die optogenetische Partitionierung eines Mikroschaltkreises entsprechend der Funktionszugehörigkeit der beteiligten Neurone ermöglicht eine funktionsgeordnete Analyse. In diesem Beispiel fungieren die Ergebnisneurone als Zielneurone (blau): deren Ausgangsaktivität wird als Funktion der Aktivierung der isoliert optogenetisch-modifizierten Statusneurone (Grüntöne) ermittelt. Die Rechenneurone (grau) bleiben unverändert. Aufgrund einer z.B. randomisierten Varianz der individuellen Farbspektren können die einzelnen Zellen durch Verwendung entsprechender Grünton-Lichtquellen konzertiert gesteuert werden.

In-vivo Photostimulation

Durch Anpassungen in der technisch-experimentellen Ausstattung kann die Photostimulation auch für in-vivo-Anwendungen erschlossen werden: So gilt es in erster Linie, die lichtinduzierten thermischen Gewebsschäden durch Verwendung niedrigerenergetischer Lichtquellen, wie z.B. lichtemittierender Dioden (LED), zu vermeiden. Unterstützt wird dieser Schritt durch die Entwicklung einer neuen, lichtsensitiveren Generation photosensibler Moleküle (Berndt *et al.*, 2011).

Durch diesen Modifikation wird neben der Analyse der Mikroschaltkreise in ihrer realen funktionellen Einbettung (Kravitz *et al.*, 2010) auch ihre gezielte Manipulation realisierbar, wie z.B. erste Arbeiten von Abbott *et al.* (2009) zur photostimulatorischen Kontrolle des kardiovaskulären Systems über die Stimulation des retrotrapezoiden Nucleus mit nachfolgender Beschleunigung des Atemcyclus aufzeigen. Letztgenanntes Vorgehen, d.h. das selektive An- und Abschalten ausgewählter neuronaler Projektionssysteme, besitzt zweifelsohne das Potential eines zukünftigen Therapieansatzes und kann helfen, bisherige interventionelle Verfahren zur funktionellen Korrektur von Systemdegenerationen, wie die Elektrostimulation bei M.Parkinson (Klostermann *et al.*, 2010), abzulösen.

Fazit Insgesamt dokumentieren diese Überlegungen das große Zukunftspotential der Photostimulation sowohl für grundlagenorientierte Fragestellungen als auch für klinische Anwendungen. Insbesondere bei der Analyse neuronaler Mikroschaltkreise kann die Photostimulation in Kombination mit anderen Technologien einen wichtigen konzeptionellen Beitrag leisten.

Doch, *selbst wenn* eine Technologie wie die Photostimulation es irgendwann tatsächlich möglich macht, relevante Kenngrößen, wie den biophysikalischen Zustand der Neurone, ihre Konnektivität und die empfangenen Nachrichten in ihrer Gesamtheit, abzubilden, stellt es immer noch eine große Herausforderung dar, die formal-logische algorithmische Ebene aus der biophysikalischen Implementation herauszulesen. Die Schaffung der theoretischen Grundlagen zur wechselseitigen Überführung eines formallogischen Algorithmus in einen neuronalen Mikroschaltkreis stellt eine unabdingbare Voraussetzung zur Funktionsaufklärung neuraler Systeme dar.

Zusammenfassung

Die Scanning-Photostimulation stellt eine etablierte Methode zur Analyse der funktionellen monosynaptischen Konnektivität in akuten Hirnschnitten dar. Licht-induzierte synaptische Signale dienen hierbei als Indikatoren für die überschwellige Aktivierung präsynaptischer Neurone. Ein solcher Ansatz erfordert die eindeutige Unterscheidung zwischen photo-induzierten und spontanen synaptischen Signalen. In dieser Arbeit wird ein neuartiger Algorithmus zur reliablen Detektion präsynaptischer Neurone vorgestellt, ungeachtet einer hohen synaptischen Hintergrundaktivität von bis zu 10 Hz. Auf Basis einer amplitudenfreien, binären Afferenzkarte, die die Existenz photoinduzierter Potentiale dokumentiert, identifiziert der Algorithmus anhand räumlicher Korrelationen all jene Regionen, in denen mit hoher statistischer Signifikanz mindestens ein präsynaptisches Soma lokalisiert ist (*Hit-Points*). Das Besondere an dem Algorithmus ist die Tatsache, dass er auf Basis eines Single-Trial-Ansatzes trotz eines niedrigen Signal-Rausch-Abstandes reliable Ergebnisse liefert. Die Reliabilität der Detektion wird durch die Analyse der Intertrial-Variabilität und durch TTX-Experimente dokumentiert. Ausgehend von den Hit-Punkten wird nachfolgend unter Zuhilfenahme eines Bayes-Schätzers die Anzahl der zugrundeliegenden präsynaptischen Neurone geschätzt. Für die Sternzelle des entorhinalen Cortex findet sich eine intralaminäre Schicht-II-Konnektivität von rund 34 Zellen/mm².

Nach diesem 'Proof-of-methods' der Datenanalyse wurden die grundlegenden intrinsischen Konnektivitätsprinzipien der beiden Hauptzellen des medialen entorhinalen Cortex, der Sternzelle und der Schicht-II- und -III-Pyramidenzellen des medialen entorhinalen Cortex bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Zelltypspezifische Organisation des ascendierenden interlaminären Eingangs: Die räumliche Ausdehnung des Eingangs ist für Sternzellen signifikant kleiner (210 μm) als für Pyramidenzellen (470 μm); darüber hinaus zeigten ausschließlich die Afferenzen zur Schicht-III-Pyramidenzellen einen zur vertikalen Zellachse orientierten asymmetrischen Offset.

Abschließend wird ein Ausblick auf das Potential der Photostimulation in Kombination mit anderen Technologien, insbesondere optogenetischer Verfahren, zur Analyse der dynamischen Interaktion neuronaler Mikroschaltkreise und damit der zugrundeliegenden verteilten Algorithmen gegeben.

Abstract

Scanning photostimulation is a well-established method for studying the functional microcircuitry in brain slices. Light-evoked responses are thereby taken as an indicator for a connected presynaptic partner. Such an approach thus requires a clear distinction between the photo-evoked and the spontaneous responses. Here we show that, for a data set from entorhinal cortex layer II with high spontaneous synaptic rates of up to 10 Hz, it is possible to identify presynaptic sites. The underlying detection algorithm is based on the finding that a presynaptic cell has several neighboring activation sites, resulting in the clustered appearance of specific photo-evoked inputs. The main idea behind this approach is to identify 'hit' locations at which the number of intracellularly recorded synaptic events is significantly larger as expected from the hypothesis of statistical independence. The algorithm works without making use of amplitude information of the synaptic signals and for single trials, i.e., each site is stimulated only once. As a proof-of-methods the hit maps are tested upon reliability by repeated stimulations and by blocking synaptically mediated responses via TTX. Furthermore, based on the hit density of surrogate data, we devise a Bayesian formalism to estimate the number of presynaptic partners. In these simulations we find good agreement between estimated and real number of input cells, which shows that the hit density can be used as a reliable measure for afferent connectivity.

The combination of both, photostimulation and detection algorithm enables use to investigate the functional microcircuitry of two main cell types of the medial entorhinal cortex, the stellate and pyramidal cells. We found cell-type-specific intralaminar and ascending interlaminar feedback inputs. The ascending interlaminar inputs display distinct organizational principles depending on the cell-type and its position within the superficial lamina: the spatial spread of inputs for stellate cells is narrower than for pyramidal cells, while inputs to pyramidal cells in layer 3, but not in layer 2, exhibit an asymmetric offset to the medial side of the cell's main axis.

Finally, we will review the current and future capabilities of photostimulation in combination with other techniques such as optogenetics for studying neuronal microcircuits and the underlying distributed logical algorithms.

Assoziierte Publikationen

Bendels MH, Beed P, Schmitz D, Jochenning FW, Leibold C. (2010). Detection of input sites in scanning photostimulation data based on spatial correlations. *Journal of Neuroscience Methods*, 192, 286-295.

Anteil: Mitarbeit an Methodenentwicklung, Datenanalyse und Abbildungen.

Beed P*, **Bendels MH***, Wiegand H, Leibold C, Jochenning FW, Schmitz D (2010). Excitatory microcircuitry in the medial entorhinal cortex reveals cell-type specific differences. *Neuron*, Dez 22; 68(6):1059-66 (*: gleichberechtigte Erstautorenschaft).

Anteil: Mitarbeit an Datenanalyse und Abbildungen.

Abkürzungsverzeichnis

ALU	Arithmetisch-logische Einheit
AOD	Akustisch-optischer Deflektor
AP	Aktionspotential
b.B.	bei Bedarf
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ChR	Channelrhodopsin
DAG	Diacylglycerol
EC	Entorhinaler Cortex
HR	Halorhodopsin
IP3	Inositol-triphosphat
LEC	Lateraler entorhinaler Cortex
LED	Lichtemittierende Diode
LTP	Long-term potentiation
MEC	Medialer entorhinaler Cortex
NFP-IR	Neurofilament-Protein-Immunreaktion
OptoXR	Rhodopsin-G-Protein-gekoppelter Receptor
PSC	Postsynaptic current (=postsynaptischer Strom)
resp.	respective

Literaturverzeichnis

- Abbott, S. B., Stornetta, R. L., Fortuna, M. G., Depuy, S. D., West, G. H., Harris, T. E., & Guyenet, P. G. 2009. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *J. Neurosci.*, **29**(May), 5806–5819.
- Alonso-Nanclares, L, Garbelli, R, Sola, R G, Pastor, J, Tassi, L, Spreafico, R, & DeFelipe, J. 2005. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. **128**(Pt 1), 158–73.
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**, 571–591.
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.*, **163**, 3–22.
- Arenkiel, B. R., Peca, J., Davison, I. G., Feliciano, C., Deisseroth, K., Augustine, G. J., Ehlers, M. D., & Feng, G. 2007. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*, **54**(Apr), 205–218.
- Beall, M. J., & Lewis, D. A. 1992. Heterogeneity of layer II neurons in human entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.*, **321**(Jul), 241–266.
- Bendels, M. H., Johenning, F. W., Beed, P., Leibold, C., & Schmitz, D. 2007b. High-spatial-resolution photostimulation for mapping the synaptic connectivity of large brain regions. *Poster at: SFN 2007, San Diego*.
- Bendels, M. H., Beed, P., Leibold, C., Schmitz, D., & Johenning, F. W. 2008a. A novel control software that improves the experimental workflow of scanning photostimulation experiments. *J. Neurosci. Methods*, **175**(Oct), 44–57.

- Bendels, MH. 2007a. Entwicklung und Verifikation eines Laser-Photostimulations-Systems zur Analyse neuronaler Konnektivität in Hirnschnitten. Diplomarbeit. *Technische Universität Berlin*.
- Bendels, MH. 2008b. Langsame Netzwerkoszillationen in exzitatorisch verknüpften neuronalen Netzwerken. Dissertation. *Humboldt Universität Berlin*.
- Benninghoff, A., D., Drenckhahn., & Zenker, W. 1994. *Anatomie*. Vol. 2. Urban und Fischer Verlag.
- Bergmann, M., Post, A., Rittel, I., Bechmann, I., & Nitsch, R. 1997. Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat. *Exp Brain Res*, **117**(Oct), 80–86.
- Berlit, P. 2006. *Klinische Neurologie*. Springer.
- Berndt, A., Schoenenberger, P., Mattis, J., Tye, K. M., Deisseroth, K., Hegemann, P., & Oertner, T. G. 2011. High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**(May), 7595–7600.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**(Jan), 31–39.
- Boucsein, Clemens, Nawrot, Martin, Rotter, Stefan, Aertsen, Ad, & Heck, Detlef. 2005. Controlling synaptic input patterns in vitro by dynamic photo stimulation. *J Neurophysiol*, **94**(4), 2948–58.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.*, **8**(Sep), 1263–1268.
- Brivanlou, Iman H, Dantzker, Jami L M, Stevens, Charles F, & Callaway, Edward M. 2004. Topographic specificity of functional connections from hippocampal CA3 to CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(8), 2560–2565.
- Burgalossi, A., Herfst, L., von Heimendahl, M., Forste, H., Haskic, K., Schmidt, M., & Brecht, M. 2011. Microcircuits of functionally identified neurons in the rat medial entorhinal cortex. *Neuron*, **70**(May), 773–786.
- Burwell, R. D., & Amaral, D. G. 1998. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **398**(Aug), 179–205.

- Callaway, Edward M. 2002. Cell type specificity of local cortical connections. *J Neurocytol*, **31**(3-5), 231–237.
- Callaway, Edward M, & Yuste, Rafael. 2002. Stimulating neurons with light. *Curr Opin Neurobiol*, **12**(5), 587–92.
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. 2008. What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast.*, **2008**, 381243.
- Dhillon, A., & Jones, R.S. 2000. Laminar differences in recurrent excitatory transmission in the rat entorhinal cortex in vitro. *Neuroscience*, **99**, 413–422.
- Dodt, H U, Frick, A, Kampe, K, & Zieglgansberger, W. 1998. NMDA and AMPA receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *Eur J Neurosci*, **10**(11), 3351–3357.
- Dodt, Hans-Ulrich, Leischner, Ulrich, Schierloh, Anja, Jahrling, Nina, Mauch, Christoph Peter, Deininger, Katrin, Deussing, Jan Michael, Eder, Matthias, Zieglgansberger, Walter, & Becker, Klaus. 2007. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, **4**(4), 331–6.
- Dolorfo, C. L., & Amaral, D. G. 1998a. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J. Comp. Neurol.*, **398**(Aug), 49–82.
- Dolorfo, C. L., & Amaral, D. G. 1998b. Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, **398**(Aug), 25–48.
- Eichenbaum, H. 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, **44**(Sep), 109–120.
- Feldmeyer, D., Egger, V., Lubke, J., & Sakmann, B. 1999. Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex. *J. Physiol. (Lond.)*, **521 Pt 1**(Nov), 169–190.
- Fell, J., Klaver, P., Lehnertz, K., Grunwald, T., Schaller, C., Elger, C. E., & Fernandez, G. 2001. Human memory formation is accompanied by rhinal-hippocampal coupling and decoupling. *Nat. Neurosci.*, **4**(Dec), 1259–1264.
- Fenno, L., Yizhar, O., & Deisseroth, K. 2011. The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.*, **34**, 389–412.

- Finch, D. M., Gigg, J., Tan, A. M., & Kosoyan, O. P. 1995. Neurophysiology and neuropharmacology of projections from entorhinal cortex to striatum in the rat. *Brain Res.*, **670**(Jan), 233–247.
- Giocomo, L. M., Moser, M. B., & Moser, E. I. 2011. Computational models of grid cells. *Neuron*, **71**(Aug), 589–603.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**(Mar), 3440–3450.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, **436**(Aug), 801–806.
- Han, X., Qian, X., Bernstein, J. G., Zhou, H. H., Franzesi, G. T., Stern, P., Bronson, R. T., Graybiel, A. M., Desimone, R., & Boyden, E. S. 2009. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron*, **62**(Apr), 191–198.
- Hata, Y., Tsumoto, T., Sato, H., Hagihara, K., & Tamura, H. 1993. Development of local horizontal interactions in cat visual cortex studied by cross-correlation analysis. *J Neurophysiol*, **69**(1), 40–56.
- Insausti, R., Herrero, M. T., & Witter, M. P. 1997. Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus*, **7**, 146–183.
- Jin, Xiaoming, Prince, David A, & Huguenard, John R. 2006. Enhanced excitatory synaptic connectivity in layer v pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex in rats. *J Neurosci*, **26**(18), 4891–4900.
- Johnston, Daniel, & Amaral, David G. 2004. *The synaptic organization of the brain*. Vol. 5. Oxford University Press, Inc. Chap. 11, pages 455–498.
- Johnston, Daniel, & Wu, Samuel M. 1995. *Foundations of cellular neurophysiology*. MIT Press.
- Katz, L C, & Dalva, M B. 1994. Scanning laser photostimulation: a new approach for analyzing brain circuits. *J Neurosci Methods*, **54**(2), 205–218.
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C., & Burwell, R. D. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*, **17**, 697–708.

- Kloosterman, F., Van Haeften, T., Witter, M. P., & Lopes Da Silva, F. H. 2003a. Electrophysiological characterization of interlaminar entorhinal connections: an essential link for re-entrance in the hippocampal-entorhinal system. *Eur. J. Neurosci.*, **18**(Dec), 3037–3052.
- Kloosterman, F., Witter, M. P., & Van Haeften, T. 2003b. Topographical and laminar organization of subicular projections to the parahippocampal region of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **455**(Jan), 156–171.
- Klostermann, F., Wahl, M., Marzinzik, F., Vesper, J., Sommer, W., & Curio, G. 2010. Speed effects of deep brain stimulation for Parkinson’s disease. *Mov. Disord.*, **25**(Dec), 2762–2768.
- Koetter, R., Schubert, D., Dyhrfeld-Johnsen, J., Luhmann, H. J., & Staiger, J. F. 2005. Optical release of caged glutamate for stimulation of neurons in the in vitro slice preparation. *J Biomed Opt*, **10**, 11003.
- Kohler, C. 1985. Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I. The subicular complex. *J. Comp. Neurol.*, **236**(Jun), 504–522.
- Kohler, C. 1986. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J. Comp. Neurol.*, **246**(Apr), 149–169.
- Kravitz, A. V., Freeze, B. S., Parker, P. R., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., & Kreitzer, A. C. 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, **466**(Jul), 622–626.
- Krueppel, R., Remy, S., & Beck, H. 2011. Dendritic integration in hippocampal dentate granule cells. *Neuron*, **71**(Aug), 512–528.
- Kumar, Sanjay S, Jin, Xiaoming, Buckmaster, Paul S, & Huguenard, John R. 2007. Recurrent circuits in layer II of medial entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, **27**(6), 1239–1246.
- Lam, Ying-Wan, Nelson, Christopher S, & Sherman, S Murray. 2006. Mapping of the functional interconnections between thalamic reticular neurons using photostimulation. *J Neurophysiol*, **96**(5), 2593–2600.
- Lanciego, J L, Wouterlood, F G, Erro, E, Arribas, J, Gonzalo, N, Urra, X, Cervantes, S, & Gimenez-Amaya, J M. 2000. Complex brain circuits studied via simultaneous and permanent detection of three transported neuroanatomical tracers in the same histological section. *J Neurosci Methods*, **103**(1), 127–35.

- Leibold, C., Gundlfinger, A., Schmidt, R., Thurley, K., Schmitz, D., & Kempfer, R. 2008. Temporal compression mediated by short-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**(Mar), 4417–4422.
- Loiseau, P., Strube, E., Broustet, D., Battellochi, S., Gomeni, C., & Morselli, P. L. 1983. Learning impairment in epileptic patients. *Epilepsia*, **24**(Apr), 183–192.
- Lynch, Nancy A. 1996. *Distributed Algorithms*. San Francisco, CA, USA: Morgan Kaufmann Publishers Inc.
- MacLean, J. N., Watson, B. O., Aaron, G. B., & Yuste, R. 2005. Internal dynamics determine the cortical response to thalamic stimulation. *Neuron*, **48**(Dec), 811–823.
- Moita, M. A., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J. E., & Blair, H. T. 2003. Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning. *Neuron*, **37**(Feb), 485–497.
- Moser, E. I., & Moser, M. B. 2008. A metric for space. *Hippocampus*, **18**, 1142–1156.
- Mountcastle, V. B. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain*, **120** (Pt 4)(Apr), 701–722.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., & Hegemann, P. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, **296**(Jun), 2395–2398.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., & Bamberg, E. 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**(Nov), 13940–13945.
- Nikolenko, V., Poskanzer, K. E., & Yuste, R. 2007. Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits. *Nat. Methods*, **4**(Nov), 943–950.
- O’Keefe, J., & Dostrovsky, J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.*, **34**(Nov), 171–175.
- O’Keefe, John, & Nadel, Lynn. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press, <http://www.cognitivemap.net/>.

- Patton, P. E., & McNaughton, B. 1995. Connection matrix of the hippocampal formation: I. The dentate gyrus. *Hippocampus*, **5**, 245–286.
- Pettit, D L, Helms, M C, Lee, P, Augustine, G J, & Hall, W C. 1999. Local excitatory circuits in the intermediate gray layer of the superior colliculus. *J Neurophysiol*, **81**(3), 1424–7.
- Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B. L., Witter, M. P., Moser, M. B., & Moser, E. I. 2006. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science*, **312**(May), 758–762.
- Schmadel, Silke. 2004. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zur Auswirkung neonataler Läsionen des entorhinalen Cortex auf kognitive Leistungen adulter Ratten. *Dissertation*, Universität Bremen.
- Schubert, D, Staiger, J F, Cho, N, Kotter, R, Zilles, K, & Luhmann, H J. 2001. Layer-specific intracolumnar and transcolumnar functional connectivity of layer V pyramidal cells in rat barrel cortex. *J Neurosci*, **21**(10), 3580–3592. In Vitro.
- Schubert, D, Kotter, R, Zilles, K, Luhmann, H J, & Staiger, J F. 2003. Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. *J Neurosci*, **23**(7), 2961–70.
- Schubert, D, Kotter, R, Luhmann, H J, & Staiger, J F. 2006. Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer va in the primary somatosensory cortex. *Cereb Cortex*, **16**(2), 223–236.
- Shepherd, Gordon M G, Pologruto, Thomas A, & Svoboda, Karel. 2003. Circuit analysis of experience-dependent plasticity in the developing rat barrel cortex. *Neuron*, **38**(2), 277–289.
- Shoham, Shy, O'Connor, Daniel H, Sarkisov, Dmitry V, & Wang, Samuel S-H. 2005. Rapid neurotransmitter uncaging in spatially defined patterns. *Nat Methods*, **2**(11), 837–843.
- Silberberg, G., Grillner, S., LeBeau, F. E., Maex, R., & Markram, H. 2005. Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci.*, **28**(Oct), 541–551.
- Simonnet, J., Bendels, MHK., Eugene, E., Cohen, I., Miles, R., & D., Fricker. in Vorbereitung. Functional anatomy of rat presubiculum.

- Singer, W. 2011. Dynamic formation of functional networks by synchronization. *Neuron*, **69**(Jan), 191–193.
- Smith, D. M., & Mizumori, S. J. 2006. Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus*, **16**, 716–729.
- Solstad, T., Boccara, C. N., Kropff, E., Moser, M. B., & Moser, E. I. 2008. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science*, **322**(Dec), 1865–1868.
- Somogyi, P. 1990. Synaptic connections of neurones identified by Golgi impregnation: characterization by immunocytochemical, enzyme histochemical, and degeneration methods. *J Electron Microscop Tech*, **15**(4), 332–51.
- Strecker, G J, Wuarin, J P, & Dudek, F E. 1997. GABAA-mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*, **78**(4), 2217–20.
- Taube, Jeffrey. 2009. Head direction cells. *Scholarpedia*, **4**(12):1787.
- Thomson, A. M., & Lamy, C. 2007. Functional maps of neocortical local circuitry. *Front Neurosci*, **1**(Nov), 19–42.
- Tolner, E. A., Kloosterman, F., van Vliet, E. A., Witter, M. P., Silva, F. H., & Gorter, J. A. 2005. Presubiculum stimulation in vivo evokes distinct oscillations in superficial and deep entorhinal cortex layers in chronic epileptic rats. *J. Neurosci.*, **25**(Sep), 8755–8765.
- Treves, A., & Rolls, E. T. 1994. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, **4**(Jun), 374–391.
- van Haeften, T., Jorritsma-Byham, B., & Witter, M. P. 1995. Quantitative morphological analysis of subicular terminals in the rat entorhinal cortex. *Hippocampus*, **5**, 452–459.
- van Haeften, T., Baks-te Bulte, L., Goede, P. H., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. 2003. Morphological and numerical analysis of synaptic interactions between neurons in deep and superficial layers of the entorhinal cortex of the rat. *Hippocampus*, **13**, 943–952.
- van Strien, N. M., Cappaert, N. L., & Witter, M. P. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**(Apr), 272–282.

- Wang, H., Peca, J., Matsuzaki, M., Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., Wang, D., Zhang, F., Boyden, E., Deisseroth, K., Kasai, H., Hall, W. C., Feng, G., & Augustine, G. J. 2007. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**(May), 8143–8148.
- West, M. J., Slomianka, L., & Gundersen, H. J. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.*, **231**(Dec), 482–497.
- Wickersham, I. R., Finke, S., Conzelmann, K. K., & Callaway, E. M. 2007. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat. Methods*, **4**(Jan), 47–49.
- Wiegand, H. F., Beed, P., Bendels, M. H., Leibold, C., Schmitz, D., & Johenning, F. W. 2011. Complementary sensory and associative microcircuitry in primary olfactory cortex. *J. Neurosci.*, **31**(Aug), 12149–12158.
- Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A., & Van Haeften, T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **911**(Jun), 1–24.
- Wood, E. R., Dudchenko, P. A., & Eichenbaum, H. 1999. The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature*, **397**(Feb), 613–616.
- Zhang, F., Wang, L. P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., & Deisseroth, K. 2007. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, **446**(Apr), 633–639.