

Aus dem
Charité Centrum 2 für Grundlagenmedizin
Institut für Neurophysiologie
Direktor: Professor Dr. Jörg Geiger

Habilitationsschrift

**Induktion und Modulation von Sharp Wave – Ripple
Komplexen und synchronisierter Netzwerkaktivität
im Hippocampus der Ratte *In Vitro***

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach **Physiologie**
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Christoph J. Behrens

geboren am 06.09.1971 in Bonn

Eingereicht: Oktober 2012
Dekan: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. Heiko Luhmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Alzheimer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Afferenz, Efferenz, Assoziationsverbindungen und Feinstruktur des Hippocampus Seite 03
- 1.2. Periodische Netzwerkoszillationen und Plastizität im Hippocampus Seite 07

2. Ergebnisse

- 2.1. Erste Publikation: Sharp Wave - Ripple Komplexe, synaptische Plastizität und die Reorganisation neuronaler Netzwerke im hippocampalen Hirnschnittpräparat der adulten Ratte Seite 14
- 2.2. Zweite Publikation: Effekte von GABA_A Rezeptor Antagonisten auf Sharp Wave-Ripple Aktivität in Area CA3 der Ratte *in vitro* Seite 24
- 2.3. Dritte Publikation: Unspezifische Effekte des Gap junction Blockers Mefloquine auf schnelle Netzwerkaktivität im Hippocampus der adulten Ratte *in vitro* Seite 38
- 2.4. Vierte Publikation: Adrenerge Modulation von Sharp Wave – Ripple Komplexen im hippocampalen Hirnschnittpräparat adulter Ratten Seite 49
- 2.5. Fünfte Publikation: Effekte Nikotin-vermittelter, partieller Disinhibition auf Sharp Wave-Ripple Komplexe in Area CA3 *in vitro* Seite 69

3. Diskussion Seite 87

- 3.1 NMDA Rezeptor - abhängige Induktion von Sharp Wave - Ripple Komplexen und LTP *in vitro* Seite 88
- 3.2 Limitierungen des *in vitro* Paradigmas Seite 92
- 3.3 Reiz - induzierte SPW-Rs sind von epileptiformer Aktivität verschieden Seite 93
- 3.4 Das Janusgesicht der noradrenergen SPW-R Modulation Seite 97
- 3.5 Ausblick Seite 100

4. Zusammenfassung Seite 101

5. Literatur Seite 102

6. Eidesstattliche Erklärung Seite 112

Abkürzungen

α - R:	Alpha - Rezeptor
ACh:	Acetylcholin
ACh-E:	Acetylcholin Esterase
AHP:	Afterhyperpolarization, Nachhyperpolarisation
AMPA – R:	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid - Rezeptor
AP:	Aktionspotenzial
β - R:	Beta - Rezeptor
BMI:	Bicucullin Methiodid
CaMKII	Calcium Calmodulin – abhängige Kinase II
CA1:	Cornu ammonis 1
CA3:	Cornu ammonis 3
Cx:	Connexin
Cbx:	Carbenoxolon
DG:	Dentate gyrus, Gyrus dentatus
EC:	Entorhinaler Kortex
EPSP:	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
GJ:	Gap junction
IN	Interneuron
IPSP:	Inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
[K⁺]_o:	extrazelluläre Kaliumkonzentration
Kainat – R:	Kainate - Rezeptor
LTD:	Langzeitdepression
LTP:	Langzeitpotenzierung
MFQ:	Mefloquin
NA:	Noradrenalin
MAPK	Mitogen – aktivierte Protein Kinase
NMDA – R:	N – Methyl – D - Aspartat - Rezeptor
PZ	Pyramidenzelle
PDS:	Paroxysmale Depolarisation
RED:	Recurrent epileptiform discharge, Rekurrente epileptiforme Entladung
REM:	Rapid eye movement (Schlaf)
SP:	Stratum pyramidale
SPW - R:	Sharp Wave – Ripple Komplex
SL - M:	Stratum lacunosum – moleculare
SO:	Stratum oriens
SR:	Stratum radiatum
Sub:	Subikulum
SWS:	Slow - wave Schlaf
TLE	Temporallappen Epilepsie

1. Einleitung

1.1 Afferenz, Efferenz, Assoziationsverbindungen und Feinstruktur des Hippocampus

Mnemosyne, die von Hesiod in der Theogonie als Tochter des Uranos und der Gaia besungen wird und folglich zu den Titanen gezählt wird, gilt als die Göttin der Erinnerung (v. Schirnding, 1991). Nach einer ihrer Töchter, der Muse Mneme, ist die *ars memoriae*, die Gedächtniskunst, benannt. Noch heute wird daher die Fähigkeit, etwas zu erinnern, klinisch als mnestische Funktion beschrieben und meint, dass Inhalte, die einst gelernt wurden, frei aus dem Langzeitgedächtnis dargestellt werden können.

Das Langzeitgedächtnis kann in zwei verschiedene Gedächtnisformen untergliedert werden, ein implizites und ein deklaratives Gedächtnis. Das deklarative Gedächtnis, umfasst episodische und semantische Gedächtnisinhalte. Informationen, die kurzfristig im Arbeitsgedächtnis gespeichert werden, müssen, um vor einem Vergessen bewahrt zu werden, in das Langzeitgedächtnis übertragen werden. Dieser Prozess wird als Gedächtniskonsolidierung bezeichnet. An der Bindung, Reaktivierung und Fortleitung multimodaler deklarativer Gedächtnisinformationen ist der Hippokampus unmittelbar beteiligt (Buzsaki, 1998). Diese dem Archikortex zugeordnete Struktur liegt im mittleren Temporallappen und ist neuroanatomisch mit einer Vielfalt kortikaler Areale verbunden. Gemeinsam bilden diese Verbindungen ein funktionelles Netzwerk, das die Voraussetzung für die Verarbeitung deklarativer Gedächtnisinformationen sowohl im Arbeits- als auch Langzeitgedächtnis darstellt (Buzsaki, 1989).

Der zentralen neuroanatomischen Stellung, die der Hippocampus bei der Bildung deklarativer Gedächtnispuren einnimmt, entspricht ein komplexer funktioneller

Arbeitsmodus, der besonders durch rasche Wechsel zwischen verschiedenen Netzwerkzuständen charakterisiert ist (Buzsaki, 1996; Lisman and Buzsaki, 2008).

Oberwohl der Hippocampus kaum direkte Afferenzen von peripheren primären Sensororganen erhält, koordiniert er verschiedene Sinnesinformationen zu komplexen Informationsschleifen. Dies geschieht in Form von Netzwerkoszillationen, die im Hippocampus generiert und von dort fortgeleitet werden können. Neben den für die intrahippocampale Fortleitung wichtigen primären Relaisnetzwerken, dem Gyrus dentatus (DG) und der CA1 Region, kommt den assoziativen Netzwerkpopulationen der Area CA3 und des Subikulums eine besondere Bedeutung bei der Verarbeitung mnestisch explizierter Informationen zu. Neuroanatomische Grundlage dieser funktionellen Bedeutung bildet hierbei eine besonders hohe rekurrente Innervationsdichte, die sich durch Ausbildung von Kollateralsynapsen zwischen einzelnen Neuronen innerhalb der Population auszeichnet.

Zum besseren Verständnis der in der vorliegenden Habilitation erhobenen Daten sei an dieser Stelle die neuroanatomische Grundlage der funktionellen Einbindung des Hippocampus in die Gedächtnisbildung kurz zusammengefasst.

Verbindungen In neokortikalen Assoziationsfeldern und subkortikalen Strukturen (mediales Septum, Broca Diagonalband, (PETSCHKE et al., 1962; Stewart and Fox, 1990) verarbeitete Sinnesdaten erreichen den Hippocampus über Faserkaskaden zum postrhinalen und perirhinalen Kortex und dem nachgeschalteten paleokortikalen lateralen und medialen entorhinalen Kortexn (EC) (Amaral and Witter, 1995). Die multimodalen Sinnesinformationen werden auf alle Schichten des EC übertragen (Köhler, 1986; Köhler, 1988; Dolorfo and Amaral, 1998). Hauptsächlich aus der Schicht II gelangt diese über den medialen tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG) (Anderson et al., 1971; Boulton et al., 1992; Heinemann et al.,

1992), die wiederum über die Moosfasern auf Pyramidenzellen der CA3 Region des Hippocampus projizieren (Ramón y Cajal, 1911; BLACKSTAD and KJAERHEIM, 1961). Von der Schicht III des EC gelangen Informationen über den temporo - ammonischen Trakt in das Subiculum, das CA1 Feld und möglicherweise auch die CA3 Region (Hjorth-Simonsen and Jeune, 1972; Steward and Scoville, 1976; Witter et al., 1988; Empson and Heinemann, 1995; Remondes and Schuman, 2002). Der Output der CA1 Region erreicht über das Subikulum vorwiegend die Schicht V des EC und auf gleichem Weg wie der neokortikale Input (perirhinaler Kortex, Faserkaskaden) die neokortikalen Zielorte des Hippocampus (Suzuki and Amaral, 1994; Burwell and Amaral, 1998). Daneben wurden direkte Afferenzen aus der Schicht V des EC in den DG beschrieben (Dugladze et al., 2001).

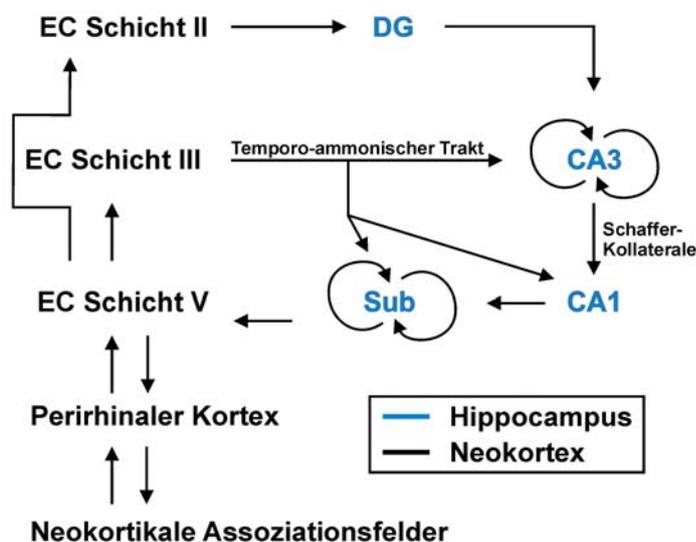


Abbildung 1

Darstellung der neuroanatomischen Verschaltung des Hippocampus mit dem Neokortex (assoziative Netzwerke mit rekurrenten Kollateralen in Area CA3 und dem Subikulum sind durch Pfeile angezeigt; DG: Gyrus dentatus, CA: Cornu ammonis, Sub: Subikulum, EC: entorhinaler Kortex).

Neben den geschilderten Afferenzen erhalten die CA – Neurone Theta - Rhythmus - steuernde Afferenzen aus dem medialen Septumkern und über Kommissurfasern Afferenzen aus homotopen CA - Feldern des kontralateralen Hippocampus.

Die geschilderten Afferenzen innervieren räumlich getrennt die Pyramidenzellen. Die direkten Afferenzen des temporo - ammonischen Trakts (CA1) und des tractus perforans enden im distalen Bereich der Dendriten der CA1 und CA3 Pyramidenzellen und bilden das Stratum lacunosum - moleculare (SL - M). Die Schaffer – Kollateralen enden im Stratum radiatum (SR) der CA1; Die Moosfasern terminieren proximal am apikalen Dendriten der CA3; Projektionsfasern aus dem medialen Septumkern und die der Kommissurfasern enden im Bereich der basalen Dendriten im Stratum oriens (SO).

Für die Speicherung von Informationen in neuronalen Netzwerken des Hippocampus der Ratte stehen etwa 4×10^5 Pyramidenzellen in der CA1 und etwa 3×10^5 Pyramidenzellen in der CA3 zur Verfügung. Letztere sind durch rekurrente Kollateralen ihrer Axone vielfach verbunden. Eine jede CA3 Pyramidenzelle wird von rekurrenten Kollateralen von etwa 12×10^3 anderen CA3 Pyramidenzellen innerviert (Ishizuka et al., 1990; Amaral and Witter, 1995; Henze et al., 1996). Umgekehrt bedeckt das axonale Innervationsfeld einer CA3 Pyramidenzelle ein Drittel des Hippocampus. Eine typische CA1 Pyramidenzelle wird von etwa 16.000 CA3 Pyramidenzelle über die Schaffer – Kollateralen innerviert (Bernard and Wheal, 1994).

Zytoarchitektonisch besitzen die CA – Felder, die zum Archikortex gehören, nur eine Pyramidenzellschicht, das Stratum pyramidale (SP) (Amaral and Witter, 1989). Neben den Pyramidenzellen enthalten die CA – Felder eine Vielfalt verschiedener hemmender Interneurone (Freund and Buzsáki, 1996; Klausberger and Somogyi,

2008), die vorwiegend perisomatisch an den Pyramidenzellen enden und teils rekurrent von den Pyramidenzellen (rekurrierende Hemmung), teils vom EC (Vorwärtshemmung), teils von dem medialen Septumkern (Theta - Rhythmussteuerung) innerviert werden (Bartos et al., 2007). Die Interneurone dienen der Erregungsbegrenzung und der Gestaltung rhythmischer Aktivität der Pyramidenzellen (Theta -, Gamma - Rhythmus, Rippleaktivität). Die Pyramidenzellen der CA3 innervieren direkt über Kommissuralfasern diejenigen der Gegenseite und Neurone des medialen Septumkerns. Sie innervieren indirekt über Schaffer - Kollateralen und CA1 Pyramidenzellen (oder das Subikulum) die tiefen Schichten des EC, um schließlich über den perirhinalen Kortex den Neokortex zu erreichen. Darüber hinaus innerviert die CA1 über das Subikulum und die Fornix den Nucleus accumbens (Groenewegen et al., 1987; Pennartz and Kitai, 1991) sowie die Corpora mammilaria (Alonso and Köhler, 1984).

1.2. Periodische Netzwerkoszillationen und Plastizität im Hippocampus

Sensorische Informationen werden vermutlich in Sequenzen von Aktionspotenzialen verschiedener Neurone eines Ensembles neuronal gebunden, als Übersichtsartikel siehe (O'Neill et al., 2010). Darauf folgend werden in der Konsolidierungsphase solche neuronalen Entladungsserien reaktiviert (Schwindel and McNaughton, 2011; Colgin, 2011). Neurophysiologisch betrachtet muss der Hippocampus hierbei zwischen zwei unterschiedlichen funktionellen Netzwerkzuständen wechseln. Solche periodischen Wechsel zwischen verschiedenen Netzwerkzuständen werden auch im Tiefschlaf beobachtet. Während die Rapid - Eye Movement (REM) – Schlafphase durch das Auftreten von synchronisierten Netzwerkoszillationen (Theta/Gamma – Aktivität) und einer erhöhten extrazellulären Acetylcholin (ACh) – Konzentration

charakterisiert ist, kommt es in der Slow - Wave (SWS) Schlafphase unter einem erniedrigten ACh Spiegel zu einem Wechsel in periodische, kurze, synchronisierte Netzwerkentladungen, die als Sharp Wave - Ripple Komplexe (SPW-Rs) bezeichnet werden (Buzsaki, 1989; Hasselmo, 1999; Gais and Born, 2004; Hasselmo, 1999).

Dieses Funktionsgefüge bildet die Grundlage der ‚Two – Stage‘ Hypothese der Gedächtnisbildung der Ratte (Buzsaki, 1989). Während der Explorationsphase in den Hippocampus gelangende Sinnesdaten werden mit Hilfe von rhythmischer neuronaler Aktivität und Langzeitpotenzierung (LTP) in den Cornu ammonis (CA) - Feldern zu transienten Ensembles aktiver Pyramidenzellen verknüpft, die das neuronale Korrelat der passageren Intermediärspeicherung (Arbeitsgedächtnis) darstellen (Buzsaki, 1989; Buzsaki, 1996; Lisman and Buzsaki, 2008). Im Feldpotenzial werden während solcher Aktivität charakteristischerweise Theta – Oszillationen (Bragin et al., 1995; Chrobak and Buzsáki, 1998; Buzsaki, 1989; Buzsaki, 1996) beobachtet, denen kleinamplitudige Gamma – Wellen aufgelagert sind (Chrobak and Buzsáki, 1998; Csicsvari et al., 2003; Buzsaki, 1989; Colgin et al., 2009).

Zur Langzeitspeicherung muss die in der Ensemblestruktur enthaltene Information während der Gedächtniskonsolidierung in neokortikale Assoziationsfelder übertragen werden (Nadel and Moscovitch, 1998; Squire, 1992). Dies geschieht angeblich dadurch, dass die neuronalen Komponenten der Ensembles, die in wiederholten, kurzen Episoden von 40 - 100 ms Dauer synchron, hochfrequent periodisch aktiv sind, in den Output – Relaisstationen (EC, perirhinaler Kortex) und neokortikalen Assoziationsfeldern Transferbahnungen durch Langzeitpotenzierung (LTP) erzeugen. Solche synchronisierten Netzwerkentladungen, die als SPW-Rs

bezeichnet werden (O'Keefe, 1976; Buzsaki et al., 1992; Buzsaki et al., 1983; Buzsaki, 1986; Chrobak et al., 2000), bestehen aus kurzen synchronisierten Netzwerkentladungen, den sogenannten „Sharp waves“, denen schnellere Netzwerkoszillationen im Bereich von 120 – 200 Hz, sogenannte ‚Ripple Oszillationen‘ (O'Keefe, 1976; Buzsaki et al., 1992) aufgelagert sind (Buzsaki et al., 1983; Buzsaki, 1986; Chrobak et al., 2000). Im lebenden Tier werden SPW-Rs als synchronisierte Netzwerkentladungen vor allem im Hippocampus der Ratte (Buzsaki, 1986; Ylinen et al., 1995; Csicsvari et al., 1999; Dragoi et al., 1999) und der Maus (Buzsaki et al., 2003), aber auch im Hippocampus von Makakken (Skaggs et al., 2007) und Fledermäusen (Ulanovsky and Moss, 2007) beobachtet. SPW-Rs werden überwiegend während des Tiefschlafs in der SWS Phase generiert. Daneben treten sie v. a. im Anschluss an eine Exploration mit Futterbelohnung auch während Wachphasen des Tieres beim Fressen, Trinken und bei Sozialverhalten sowie der Fellpflege auf (Buzsaki, 1986; Buzsaki, 1989; Buzsaki, 1998).

Die wichtige Bedeutung, die SPW-Rs anscheinend während der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten haben, wurde erstmals 1994 in einer Studie von Wilson und McNaughton demonstriert, die zeigte, dass während einzelner SPW-R Ereignisse im SWS diejenigen Zellen in der CA1 Region eine hohe Wahrscheinlichkeit zeigen synchron zu feuern, die während der Exploration des Tieres am Tag synchron aktiv sind (Wilson and McNaughton, 1994), siehe auch (Pavlides and Winson, 1989; Kudrimoti et al., 1999). Somit wurde demonstriert, dass neuronale Ensembles, die sich während der Exploration aktivitätsabhängig zusammensetzen, während des SWS in einem stark verkürzten Zeitfenster reaktiviert werden und Information dann aus dem Hippocampus in den Neokortex transferieren (Wilson and McNaughton, 1994; Siapas and Wilson, 1998). Besonderes Interesse weckt der Befund, dass die

Sequenz, in der die beteiligten CA1 Neurone, sogenannte ‚Place cells‘ (O'Keefe and Dostrovsky, 1971), während der Exploration aktiviert werden, während der 40 - 100 ms dauernden SPW-Rs zeitlich kondensiert und in einer genau entgegengesetzten Art und Weise reaktiviert werden, ein Phänomen, das als ‚reverse replay‘ bezeichnet wird (Wilson and McNaughton, 1994; Nadasdy et al., 1999; Foster and Wilson, 2006). Darüber hinaus kann die Reaktivierung der Erregung innerhalb eines neuronalen Ensembles tagsüber auch in derselben Sequenz geschehen wie bei vorheriger Kodierung während der Exploration. Dieses als ‚forward replay‘ bezeichnete Erregungsmuster tritt auf, wenn ein Tier vor Exekution einer intendierten Handlung aufgrund vorheriger Erfahrungen plant (Diba and Buzsaki, 2007).

Den engen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von hippocampalen SPW-Rs und der Schlaf - assoziierten Konsolidierung von Gedächtnisinhalten demonstrierten in der Nachfolge eine Reihe von Studien, die zeigten, dass nach Lernprozessen (Kudrimoti et al., 1999; Eschenko et al., 2008) sowie nach Schlafentzug (Ponomarenko et al., 2003) eine verstärkte SPW-R Aktivität beobachtet wird. Dass solche Übertragungen auch für das menschliche Gehirn funktionelle Bedeutung hat, wurde erstmals 1953 in einer Fallstudie berichtet, in der der Patient H. M. nach beidseitiger Hippocampusresektion eine anterograde Amnesie zeigte, wobei das Langzeitgedächtnis des Patienten nicht nachhaltig beeinträchtigt war (SCOVILLE and MILNER, 1957).

In Ergänzung zu den *in vivo* Studien wurden sowohl Ripple - Oszillationen in Hirnschnittpräparaten der Ratte (Draguhn et al., 1998) als auch spontane SPW-Rs (Maier et al., 2003; Nimmrich et al., 2005; Both et al., 2008; Norimoto et al., 2012) in der Maus etabliert. Hierdurch wurde eine genauere Untersuchung der zugrunde

liegenden Prozesse innerhalb neuronaler Netzwerke während SPW-R Aktivität möglich.

Die Fähigkeit, periodisch zwischen den verschiedenen Netzwerkzuständen des Arbeitsgedächtnisses und der Gedächtniskonsolidierung zu wechseln, ist eng mit einer aktivitätsabhängigen Feinabstimmung erregender und hemmender Einflüsse innerhalb des neuronalen Netzwerks verbunden. Bei Störungen dieser Balance, beispielsweise durch Verringerung hemmender GABAerger Neurotransmission, die u. a. bei Temporallappenepilepsien beobachtet wird (Friedman et al., 2007), kann es in der Folge zur Entstehung hypersynchroner Netzwerkentladungen innerhalb des CA3 Netzwerks kommen. Diese sind als epileptiforme Entladungen bekannt und können einem generalisierten Temporallappenanfall voran gehen (Staley et al., 2005). In zwei Studien der vorliegenden Habilitation wurde daher der Einfluss reduzierter interneuronaler Hemmung auf Übergänge von SPW-Rs in epileptiforme Entladungen genauer untersucht.

Ein wichtiger Aspekt für Lernvorgänge im Gehirn wurde 1949 von Donald Hebb formuliert, der forderte, dass für Lernprozesse auf neuronaler Ebene eine Koinzidenz von prä- und postsynaptischer Signalverarbeitung gegeben sein müsse (Hebb, 1949). Eine anhaltende Verstärkung der synaptischen Effizienz wurde erstmals 1973 von Bliss und Lomo demonstriert (Bliss and Lømo, 1973). Dieses als LTP bezeichnete Phänomen gilt gemeinhin als neuronales Korrelat von Lernprozessen (Eccles, 1986). Hierbei ist ein spezifischer Glutamatrezeptor, der N-methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDA-R), prominent an der Induktion postsynaptischer LTP beteiligt (Nowak et al., 1984). Neben der Verstärkungen der synaptischen Effizienz spielt wahrscheinlich auch eine als Depotenzierung bekannte Abschwächung der

synaptischen Kopplung eine funktionelle Bedeutung bei Lernvorgängen (Bear and Malenka, 1994; Malenka and Bear, 2004).

Die in der vorliegenden Habilitation vorgestellten Publikationen beschäftigen sich mit folgenden Fragestellungen:

- 1) Ist die Induktion von hippocampalen SPW-Rs kausal mit der Induktion von LTP innerhalb hippocampaler Netzwerke verbunden und welche Konsequenzen haben plastische Veränderungen für das zelluläre Netzwerk in der Area CA3 (erste Publikation)?
- 2) Anhand welcher Charakteristika lassen sich Stimulus-induzierte SPW-Rs von REDs unterscheiden (zweite und fünfte Publikation)?
- 3) Welche unterschiedlichen Einflüsse hat der Gap Junction Blocker Mefloquine auf Stimulus-induzierte SPW-Rs und hypersynchronisierte, rekurrente epileptiforme Entladungen (recurrent epileptiform discharges; REDs), die in Area CA3 durch Blockade des GABA_A-Rezeptors hervorgerufen werden (dritte Publikation)?
- 4) Welchen Einfluss hat der Neuromodulator Norepinephrin auf die Induktion und Expression von hippocampalen SPW-Rs (vierte Publikation)?

Zur Bearbeitung der Fragestellungen wurden hippocampale Akutschnittpräparate adulter Ratten verwendet, in denen elektrophysiologisch extrazelluläre Feldpotenziale registriert wurden. In zusätzlichen Messungen wurden solche Registrierungen durch simultane intrazelluläre Ableitungen von CA3 und CA1 Pyramidenzellen ergänzt und teilweise mit anderen Messtechniken kombiniert. Hierzu zählen Registrierungen der extrazellulären Kalium- und Calciumkonzentration mittels ionenselektiver Mikroelektroden in Area CA3 und CA1, die Registrierung intrazellulärer Calciumsignale und vergleichende Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb des neuronalen Gewebes unter Ruhebedingungen und während verschiedener synchroner Netzwerkaktivitäten (Daten nicht publiziert).

2. Ergebnisse

2.1. Erste Publikation: Die Induktion von Sharp Wave - Ripple Komplexen mittels LTP - induzierender Hochfrequenzreizserien *in vitro*, und die zugrundeliegende Reorganisation neuronaler, hippocampaler Netzwerke

Behrens CJ, van den Boom LP, de Hoz L, Friedman A, Heinemann U. **Induction of sharp wave-ripple complexes in vitro and reorganization of hippocampal networks.** Nat Neurosci. 2005 Nov; 8(11):1560-7.

Wenn SPW-Rs das neuronale Korrelat darstellen, durch das deklarative Gedächtnisspuren während der Gedächtniskonsolidierung innerhalb hippocampaler Netzwerverbände reaktiviert werden und anschließend am Transfer solcher Gedächtnisinhalte in nachgeschaltete neokortikale Felder beteiligt sind, dann muss die Induktion solcher Ereignisse mit plastischen Veränderungen einhergehen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SPW-Rs in hippocampalen Akutschnittpräparaten durch wiederholte Applikation von verschiedenen LTP - induzierenden Reizserien, Hochfrequenz - Stimulation (HFS) oder Thetaburst - Stimulation (TBS), induziert werden können. SPW-Rs propagieren aus der CA3 in die CA1 Region und das Subikulum. Interessanterweise werden solche SPW-Rs durch die Applikation von Langzeitdepression (LTD) - induzierenden Reizen vollständig blockiert, was eine enge Kopplung der SPW-R Induktion an plastische Veränderungen innerhalb synaptisch verbundener Neurone anzeigt. Während die Induktion von SPW-Rs durch NMDA Rezeptoren vermittelt ist, ist die SPW-R Expression an Aktivierung von AMPA-/Kainat-Rezeptoren gebunden. Intrazelluläre Ableitungen von CA3 Pyramidenzellen während wiederholter Reizung zeigen dynamische, plastische Veränderungen innerhalb der beteiligten neuronalen Population während Induktion von SPW-Rs. Einige Zellen verstärken während der SPW-R Induktion die initiale

Antwort, entweder Erregung oder Hemmung; andere Neurone wechseln von einer Erregung in eine Hemmung oder vice versa. Dynamische Wechsel in der Einzelzellantwort von CA3 Pyramidenzellen während der SPW-R Expression können auch durch Input - Wechsel in die CA3 Region vom proximalen in das distale SR in Area CA1 oder durch Stimulation afferenter Eingänge (Moosfasern) ausgelöst werden. Wirkungen dieses Wechsels sind vollständig reversibel. Insgesamt zeigt diese Studie erstmalig, dass die Induktion von hippocampalen SPW-Rs mit der Induktion von LTP assoziiert ist und, dass dieser Prozess mit dynamischen Änderungen der zellularen Antwort in CA3 Pyramidenzellen verbunden ist.

2.2. Zweite Publikation: Effekte von GABA_A Rezeptor Blockern auf Sharp Wave-Ripple Aktivität im Hippocampus adulter Ratten *in vitro*

Behrens CJ, van den Boom LP, Heinemann U. Effects of the GABA(A) receptor antagonists bicuculline and gabazine on stimulus-induced sharp wave-ripple complexes in adult rat hippocampus in vitro. Eur J Neurosci. 2007 Apr; 25(7): 2170-81.

Auf der Annahme, dass wiederholte elektrische Hochfrequenz- oder Thetaburst - Stimulation in neuronalem Gewebe zu einer Aktivierung relativ großer Netzwerke führt, wurde in der Folge kritisiert, dass es sich bei der in der ersten Publikation induzierten Netzwerkaktivität eher um hypersynchronisierte, epileptische denn um Gedächtnis - relevante Erregungsmuster handelt. Ziel der zweiten Publikation war es daher zu untersuchen, ob und wie sich die beschriebenen Signale von epileptiformen Entladungen abgrenzen lassen. SPW-Rs und rekurrente epileptische Entladungen (REDs) stellen beide synchronisierte Netzwerkentladungen dar, die in der CA3 Region generiert werden und von dort entlang der hippocampalen Achse in benachbarte Regionen wie die Area CA1 und das Subikulum propagieren. Beide Formen der Netzwerkaktivität sind durch das Auftreten von Ripple - Oszillationen während der synchronen Netzwerkentladungen charakterisiert. Während SPW-Rs als neuronales Korrelat der Gedächtniskonsolidierung angesehen werden, treten REDs in pathologischem Gewebe auf, in dem die GABAerge Inhibition reduziert oder aufgehoben ist, wie beispielsweise in Gewebe von epileptischen Rattengehirnen oder Patienten, die an Temporallappenepilepsie leiden (Bragin et al., 2002; Engel, Jr. et al., 2009; Gabriel et al., 2004). In dieser Studie wurden die Effekte von zwei verschiedenen GABA_A Rezeptor Antagonisten, Bicucullin (5 µM) und Gabazin (5 µM), auf induzierte SPW-Rs untersucht und charakteristische Unterschiede zwischen

beiden SPW-Rs und REDs herausgearbeitet. Die Ergebnisse zeigen, dass sich REDs neben signifikant vergrößerten Amplituden und einer prolongierten Dauer von bis zu 200 ms durch einen Anstieg der Ripplefrequenz auf bis zu 400 Hz auszeichnen. Interessanterweise sind Anstiege des extrazellulären Kaliums $[K^+]_o$, die als Maß für die Intensität neuronaler Aktivität angesehen werden können (Heinemann, Gutnick, Lux, 1977), etwa 20-fach höher als während SPW-Rs. Intrazelluläre Ableitungen zeigten, dass alle abgeleiteten CA3 Pyramidenzellen während REDs massiv depolarisiert sind und synchron zu den extrazellulären Ripple - Oszillationen bis zu 40 Aktionspotentiale generieren. Zusammen weisen diese Befunde darauf hin, dass das Auftreten von REDs mit signifikant erhöhter Ripplefrequenz auf einer GABAergen Disinhibition beruhen kann.

2.3. Dritte Publikation: Unspezifische Effekte des Gap-junction Blockers Mefloquine auf schnelle synchronisierte Netzwerkentladungen in der adulten Ratten *in vitro*

Behrens CJ, Ul-Haq R, Liotta A, Anderson ML, Heinemann U. **Nonspecific effects of the gap junction blocker mefloquine on fast hippocampal network oscillations in the adult rat *in vitro***. Neuroscience. 2011 Sep 29; 192:11-9. Epub 2011 Jul 14.

Wie bereits in vorhergehenden Studien gezeigt wurde (Taylor and Dudek, Draguhn 1998, Meier 2003), sind an der Generation von schnellen hippocampalen Ripple - Oszillationen, die während SPW-Rs und REDs auftreten, neben chemischen Synapsen elektrische Synapsen, sogenannte Gap junctions beteiligt. Diese setzen sich aus Connexin (Cx) - Proteinen zusammen (Kumar and Gilula 1996, Bennett et al., 1997, Connors and Long 2004), wobei eines dieser Cxs, das Cx36, sowohl auf Interneuronen (Venance 2000) wie auch Pyramidenzellen (Condorelli 2000) in der CA3 Region exprimiert wird. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, welche Effekte der Cx36 Blocker Mefloquin (MFQ), der ebenfalls Cx43 und Cx50 blockiert, auf die Expression von SPW-Rs und rekurrenten epileptischen Entladungen (REDs) und insbesondere auf die diesen aufgelagerten Ripple - Oszillationen in Area CA3 hat. Die Ergebnisse zeigen, dass reizinduzierte SPW-Rs und insbesondere aufgelagerte Ripple - Oszillationen unter MFQ keine Veränderungen zeigen. Im Gegensatz dazu werden SPW-Rs vollständig geblockt, wenn Carbenoxolone (Cbx), ein anderer unspezifischer Gap junction Blocker, appliziert wird. REDs, die durch Einwaschen des GABA_A Rezeptor Blockers Bicuculline (5 µM) induziert wurden und ebenfalls durch Cbx blockiert wurden, zeigen während MFQ Applikation eine Abnahme der Amplitude, Dauer und Inzidenz, während die Frequenz der

aufgelagerten Ripple - Oszillationen während REDs unverändert ist. Interessanterweise ist die Amplitude der ultraschnellen Ripple - Oszillationen (>250 Hz) unter MFQ Einwirkung um ~54% reduziert. Um mögliche Ursachen dieser Amplitudenreduktion näher zu untersuchen, wurden simultan zum Feldpotenzial CA3 Pyramidenzellen abgeleitet. Diese Ableitungen zeigen, dass MFQ die Anzahl der Aktionspotenziale (APs), die während einzelner REDs generiert werden, signifikant reduziert, wobei APs, die durch starke Hyperpolarisation mittels Stromapplikation unter Kontrollbedingungen nicht vollständig verhindert werden können, auch durch MFQ Applikation nicht blockierbar sind. Weiterhin zeigten Versuche, in denen depolarisierende Strompulse (0.1 - 0.5 nA) appliziert wurden, dass MFQ die Anzahl evozierter APs reduziert. Auswertungen der intrinsischen Eigenschaften zeigten, dass weder der Eingangswiderstand noch das Ruhemembranpotenzial der CA3 Pyramidenzellen durch MFQ verändert, aber die Nachhyperpolarisation der APs signifikant verstärkt wird, was möglicherweise die reduzierte Entladungsrate verursacht. Insgesamt zeigt die Studie, dass die Expression und die Eigenschaften von SPW-Rs in der CA3 Region durch MFQ nicht beeinflusst werden, während die Reduktion der Rippleamplitude während REDs auf einer verringerten Entladungsrate der CA3 Pyramidenzellen durch MFQ beruht. Aufgrund der Daten kann zwar eine Beteiligung der Blockade der Cx36 - vermittelten elektrischen Transmission an diesen Effekten nicht ausgeschlossen werden, jedoch weist die Verstärkung der Nachhyperpolarisation eher auf einen unspezifischen Effekt von MFQ hin.

2.4. Vierte Publikation: Modulation von SPW-Rs durch Noradrenalin *in vitro*

Ul Haq R, Liotta A, Kovacs R, Rösler A, Jarosch MS, Heinemann U, Behrens CJ.

Adrenergic modulation of sharp wave-ripple activity in rat hippocampal slices.

Hippocampus. 2011 Jan 20. doi: 10.1002/hipo.20918.

Ein wesentliches Merkmal von Dysstress ist, dass die Langzeitgedächtnisleistung durch Stress negativ beeinflusst wird (Payne J et al., 2002; Kimm JJ and Diamond DM, 2002). Noradrenalin (NA) ist ein Hormon, das wesentlich bei der Bewertung aversiver Zusammenhänge beteiligt ist. Darüber hinaus ist NA als systemisch wirksamer Neurotransmitter und Neuromodulator bekannt. NA wird vor allem bei Exploration von Neuigkeiten wie etwa einer neuen Umgebung oder von unbekanntem Gegenständen reichhaltig aus dem locus coeruleus in den Hippocampus freigesetzt (Sara 1994). Hierbei kommt es innerhalb des CA3 und CA1 Netzwerks während vermehrter NA – Freisetzung innerhalb weniger Sekunden zu einem charakteristischerweise abrupten Wechsel der neuronalen Aktivität aus vorheriger SPW-R Aktivität in instantane Theta-Gamma Oszillationen (Buzsaki 1989). Bisher ist wenig bekannt, auf welchen Mechanismen die durch NA vermittelte Neuromodulation während Aufmerksamkeitswechselln sowie auch Stresseinwirkung beruht. Um direkte Einflüsse von NA auf Netzwerkoszillationen zu untersuchen, die für die Gedächtniskonsolidierung wesentlich sind, wurde in dieser Studie das Modell induzierter SPW-Rs in akuten Hippocampusschnittpräparaten der Ratte genutzt, um Effekte von NA auf die Induzierbarkeit und Expression von SPW-Rs zu untersuchen. Simultane extra- und intrazelluläre Ableitungen in Area CA3 zeigten, dass NA Applikation (50 μ M) zu einer abrupten und reversiblen Unterdrückung von SPW-Rs führt, wobei diese Suppression dosisabhängig ist. Interessanterweise zeigten SPW-Rs, die nach dem Auswaschen von NA registriert wurden, eine verstärkte Inzidenz.

Da NA sowohl an α - als auch an β Rezeptoren bindet, wurden verschiedene pharmakologische Studien angeschlossen, die zeigen, dass die noradrenerge SPW-R Suppression über α_1 Rezeptoren vermittelt wird. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden („paired-pulse“ Fazilitierung, extra- und intrazelluläre Calciumsignalmessungen, Analyse der Varianzkoeffizienten) konnte gezeigt werden, dass Aktivierung von α_1 Rezeptoren durch NA zu einer Abnahme der präsynaptischen Calcium Aufnahme führt, wodurch die Transmitterfreisetzung reduziert wird. Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von β_1 Rezeptoren eine fazilitierte Induktion von LTP und SPW-Rs bewirkt und wahrscheinlich auch für die erhöhte SPW-R Inzidenz nach dem Auswaschen von NA verantwortlich ist. Weitere Experimente zeigten, dass in der Anwesenheit von NA die Induktion von SPW-Rs durch wiederholte Tetanisierung verhindert ist, während SPW-Rs nach Beendigung der elektrischen Reizung während des Auswaschens von NA spontan auftreten. Insgesamt stellt diese Studie erstmals den bi-modalen Charakter der adrenergen Modulation auf hippocampale SPW-R Aktivität dar, zeigt somit mögliche Mechanismen der Beeinflussung von Stress auf die Langzeitgedächtnisleistung auf und erklärt die bei Langzeitgabe von Betablockern auftretenden Gedächtnisfunktionsstörungen.

2.5. Fünfte Publikation: Partielle Disinhibition und die Transformation von SPW-Rs in epileptiforme Entladungen im Hippocampus adulter Ratten *in vitro*

Liotta A, Caliskan G, ulHaq R, Hollnagel JO, Rösler A, Heinemann U, Behrens CJ. Partial disinhibition is required for transition of stimulus-induced sharp wave-ripple complexes into recurrent epileptiform discharges in rat hippocampal slices. J. Neurophysiol. 2011 Jan; 105 (1):172-87.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine vollständige Blockade der GABA_A-vermittelten Inhibition zu einer Transformation von SPW-Rs in rekurrente, epileptiforme Entladungen führt, sollten mögliche Mechanismen dieser Umwandlung in einer Folgestudie genauer untersucht werden. Hierzu wurden drei verschiedene pharmakologische Ansätze gewählt: 1) die Effekte von Nikotin (100 und 500 µM) auf SPW-Rs, 2) Effekte des GABA_A Rezeptorblockers Bicucullin auf SPW-Rs, appliziert in niedrigen Dosierungen (1 - 3 µM) und 3) Effekte einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$, 8.5 mM) auf etablierte SPW-R Aktivität. Die Ergebnisse zeigten, dass Nikotin dosisabhängig zu einer Reduktion der GABAergen Inhibition auf CA3 Pyramidenzellen führt, wobei in Gegenwart von 100 µM Nikotin ausschließlich die Amplitude der SPW-Rs vergrößert ist, während 500 µM Nikotin SPW-Rs in REDs transformiert. Intrazelluläre Ableitungen von CA3 Pyramidenzellen zeigten, dass dies einer Reduktion der GABAergen Inhibition um ~25% bei 100 µM Nikotin und ~75% in der Gegenwart von 500 µM Nikotin entspricht. Vergleichsweise reduziert Bicucullin in einer Konzentration von 1 µM die Hemmung um ~57%, ohne zu einer Transformation von SPW-Rs in REDs zu führen, während 2 µM Bicucullin die Hemmung um ~85% reduziert und eine Transformation auslöst. In Gegenwart von 3 µM Bicucullin ist die GABAerge Hemmung vollständig aufgehoben und löst eine Transformation von SPW-Rs in REDs in allen untersuchten Hirnschnitten aus.

Im Gegensatz dazu ist die Hemmung um ~115.0 % verstärkt, wenn $[K^+]_o$ von 3 mM im ACSF unter Kontrollbedingungen auf 8.5 mM erhöht wird. Unter diesen Bedingungen sind die Amplitude, Dauer und Inzidenz der SPW-Rs vergrößert, jedoch bleibt eine Transformation von SPW-Rs in REDs aus. Interessanterweise zeigen Hirnschnitte, in denen SPW-Rs induziert wurden, eine weitaus niedrigere Wahrscheinlichkeit, spontane epileptische Entladungen (sogenannte ‚seizure-like events‘) in Gegenwart von 8.5 mM $[K^+]_o$ zu entwickeln, was in etwa der Hälfte der unstimulierten Hirnschnitte eintritt. Insgesamt zeigt diese Studie, dass eine Transformation von SPW-Rs in REDs nur unter Bedingungen einer reduzierten GABAergen Hemmung stattfindet.

3. Diskussion

In den der vorliegenden Habilitation zu Grunde liegenden Publikationen wurden folgende Kernbefunde aufgezeigt:

1) Unter *in vitro* Bedingungen führt die wiederholte Applikation von LTP induzierenden Reizserien, HFS oder TBS, zur Induktion von SPW-Rs in Area CA3 in Akutschnittpräparaten der adulten Ratte. Im Gegensatz dazu kann die hervorgerufene SPW-R Aktivität über die Induktion von LTD reversibel gehemmt werden. 2) Die induzierten SPW-Rs propagieren in nachgeschaltete Subregionen des Hippocampus (CA1 und das Subikulum) und sind assoziiert mit einer zellulären Reorganisation innerhalb des CA3 Netzwerks. 3) Die Induktion von SPW-Rs ist NMDA-R abhängig; die SPW-R Expression kann hingegen über AMPA-/Kainat-R Blocker unterbrochen werden, was eine Beteiligung Mitogen - aktivierte Protein – Kinase (MAPK) – abhängiger Kaskaden anzeigt (Asrar et al., 2009). 4) Inputspezifische Stimulation führt reversibel zur Generation distinkter SPW-Rs. 5) Aktivierung von α 1-Rs während Norepinephrin - Applikation führt über Reduktion des präsynaptischen Calcium Uptakes zur abrupten und reversiblen Blockade von SPW-Rs. 6) Stimulation von β 1 – Rs führt zu einer facilitierten Induktion von LTP und SPW-Rs in Area CA3; während etablierter SPW-R Aktivität erhöht β 1 – R Stimulation die SPW-R Inzidenz und reduziert die Amplitude und Dauer der Nachhyperpolarisation (AHP) in CA3 Pyramidenzellen. 7) Stimulus-induzierte SPW-Rs können anhand verschiedenen Populations- wie auch Einzelzellparametern eindeutig von REDs unterscheiden werden. Hierzu zählen u. a. die Dauer und Amplitude der ereigniskorrelierten intrazellulären Depolarisation und Anzahl der generierten APs, die Dauer, Inzidenz und Amplitude der Netzwerkentladungen, die Frequenz überlagerter Ripple - Oszillationen, die Höhe der durch die Netzwerkentladung

hervorgerufenen Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs innerhalb des Extrazellularraums (gemessen 80 - 100 μm unterhalb der Hirnschnittoberfläche).

3.1. NMDA Rezeptor-abhängige Induktion von Sharp Wave-Ripple Komplexen und LTP *in vitro*

SPW-Rs stellen neben intrathalamischen Hochfrequenz - Netzwerkoszillationen (Gobbele et al., 1998) das synchronste Entladungsmuster dar, das das Zentralnervensystem (ZNS) unter physiologischen Bedingungen generiert (Buzsáki and Chrobak, 2005). Während eines SPW-R Ereignisses entladen in einem Zeitfensters von etwa 100 Millisekunden zwischen 50.000 und 100.000 Neurone simultan in der CA3 - CA1 – Subikulum - EC Achse, wobei dies einem Anteil von 10 - 20% der neuronalen Population des Hippocampus der Ratte entspricht (Chrobak and Buzsáki, 1994). Somit präsentieren SPW-Rs Eigenschaften, die sie zu einem idealen Erregungsmuster für die Konsolidierung von synaptischer Plastizität und dem Transfer neuronaler Erregungsmuster machen (Buzsáki et al., 1987) (ul Haq et al., in preparation). Derzeitigem Wissensstand nach können SPW-Rs innerhalb der rekurrenten Kollateralen des kommissural-assoziativen CA3 Netzwerks beider Hirnhemisphären generiert werden. Von dort aus propagieren sie teilweise entlang der hippocampalen Achse in die tiefen Schichten des ipsilateralen EC (Buzsáki, 1989; Buzsáki, 1996) und über Fimbrienfasern in die CA3 Region der jeweilig kontralateralen Hemisphäre (Buzsáki, 1989) sowie über das Subikulum in den Nucleus accumbens (Axmacher et al., in preparation) und über frontale Thalamuskern in den frontalen Neokortex (Swanson and Kohler, 1986). Somit stellen SPW-Rs ein elementares Bindeglied zwischen einem charakteristischerweise

transienten Arbeitsgedächtnis in Form von hippocampalen Theta-/Gamma - Oszillationen einerseits und dem langfristigen Speichern von Gedächtnisspuren innerhalb neokortikaler Felder dar (Buzsáki, 1991; Rolls, 2010; Takano et al., 2012). Die Beobachtung, dass SPW-Rs durch vorherige Eindrücke und Erfahrungen des Tieres in ihrer Gestalt beeinflusst werden (Wilson and McNaughton, 1994), unterstützt hierbei die wesentliche Rolle, die SPW-Rs innerhalb des Prozesses der Gedächtniskonsolidierung im intakten Gehirn übernehmen. Die Annahme, dass die aktivitätsabhängige Modifizierung synaptischer Kontakte zwischen Neuronen das neuronale Korrelat von Lernen und Gedächtnis darstellt (Bliss and Collingridge, 1993; Morris et al., 2003), legt nahe, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Auftreten von SPW-Rs innerhalb der Hippocampus - Formation und der Induktion synaptischer Plastizität innerhalb neuronaler Netzwerke besteht (hierzu sei eine aktuelle Studie aus unserem Labor erwähnt, die den experimentellen Nachweis eines solchen Zusammenhanges experimentell belegt (ul Haq et al., in Vorbereitung).

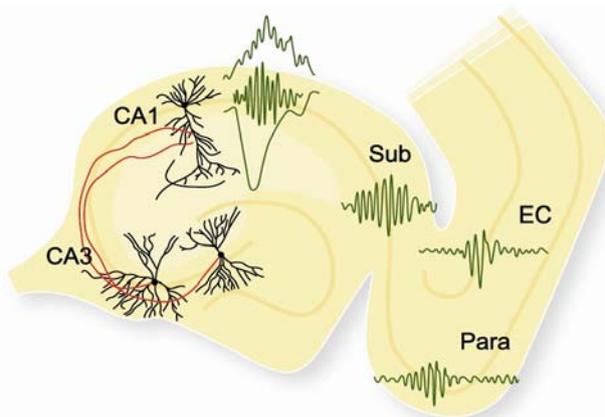


Abbildung 2

Darstellung Sharp wave – assoziierter Ripple - Oszillationen in Area CA3, CA1 und dem Subikulum (Sub), sowie propagierter Ripple – Aktivität im Parasubikulum (Para) und den tiefen Schichten des entorhinalen Kortex (EC), modifiziert nach Buzsáki und Chrobak, 2005.

Bisher wurden unter *in vitro* Bedingungen spontan auftretende SPW-Rs im Hippocampus der Maus (Maier et al., 2002; Maier et al., 2003; Both et al., 2008; Reichinnek et al., 2010; Bahner et al., 2011; Reichinnek et al., 2012; Maier et al., 2011), sowie in ventralen Hippocampusschnittpräparaten von Ratten (Papatheodoropoulos and Kostopoulos, 2002; Papatheodoropoulos, 2010; Norimoto et al., 2012) beobachtet. Wie die vorliegenden Daten zeigen, können darüber hinaus SPW-Rs in Hippocampusschnittpräparaten adulter Ratten durch wiederholte Hochfrequenzstimulation (HFS oder TBS) induziert werden, die gleichzeitig eine robuste LTP auslöst (erste Publikation). Solche SPW-Rs bestehen aus langsamen Feldpotenzialtransienten ‚sharp waves‘, denen 200 Hz schnelle Rippleszillationen aufgelagert sind, und werden wie SPW-Rs im intakten Gehirn innerhalb des rekurrenten Kollateralsystems der CA3 Region generiert (Csicsvari et al., 2000). Die zur Induktion von SPW-Rs verwendete HFS stellt hierbei ein etabliertes Protokoll zur Induktion von LTP (Bliss and Lømo, 1973; Dunwiddie and Lynch, 1978), insbesondere von langanhaltender LTP (L - LTP) in neuronalem Gewebe dar (Frey and Morris, 1997; Matthies et al., 1990). Die hier präsentierte Studie stellt somit den Zusammenhang zwischen der Induktion aktivitätsabhängiger synaptischer Langzeitplastizität und der Induktion hippocampaler SPW-Rs dar. Dieser Zusammenhang wird flankierend bestärkt durch den Befund, dass ausschließlich HFS Serien, die LTP induzieren (50 oder 100 Hz Tetanie), auch SPW-Rs induzieren, während eine SPW-R Induktion versagt, wenn Reizserien appliziert werden (5, 10 oder 20 Hz Tetanie), die keine LTP innerhalb des kommissural - assoziativen CA3 Netzwerks etablieren (Behrens et al., 2005).

Interessanterweise ist die Induktion von SPW-Rs in Area CA3 *in vitro*, wie eine klassische Form der L - LTP, NMDA Rezeptor - abhängig (Behrens et al., 2005). Ein

wesentliches Merkmal dieser Form der LTP ist, dass die Aktivierung von NMDA - Rs sowohl spannungs- als auch transmitterabhängig ist und somit als Koinzidenzdetektor die Assoziation von prä- und postsynaptischer Aktivierung anzeigt (als Übersichtartikel siehe (Malenka and Nicoll, 1999)). Wie vorher beschrieben (Nowak et al., 1984) ist hierbei neben der präsynaptischen Freisetzung von Glutamat eine gleichzeitige Depolarisation der postsynaptischen Membran notwendig, durch die der bei Ruhemembranpotenzial vorherrschende Magnesiumblock aufgehoben wird, um den NMDA Rezeptor für Natrium- und Calciumionen leitfähig zu machen (Nowak et al., 1984), als Übersichtartikel siehe (Nicoll and Malenka, 1999). Diese Form der Koinzidenz von prä- und postsynaptischer Aktivität, die seit Donald Hebb's 'The Organization of Behavior' als das neuronale Korrelat von Lernen und Gedächtnis vorgestellt wird (Hebb, 1949), konnte somit durch die NMDA Rezeptor-abhängige Induktion mit hippocampalen SPW-Rs in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Daten einen weiteren wichtigen Aspekt der Beziehung zwischen synaptischer Plastizität und dem Auftreten hippocampaler SPW-Rs auf. Wie in der ersten Studie gezeigt wurde, kann die durch LTP induzierte SPW-R Aktivität durch Induktion von Langzeitdepression (LTD) mittels Niederfrequenzstimulation der Schaffer-kollateralen in Area CA1 reversibel blockiert werden (Behrens et al., 2005). Somit steht nicht nur die Induktion hippocampaler SPW-Rs, sondern auch deren Expression in enger Beziehung zu Veränderungen aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität innerhalb umschriebener zellulärer Netzwerkverbände.

Auf der Basis der hier präsentierten Daten darf vermutet werden, dass die aktivitätsabhängige Potenzierung spezifischer Synapsen innerhalb des CA3 Netzwerks während wiederholter Applikation LTP – induzierender Hochfrequenz-

oder Thetaburst - Stimulation oder zukünftig durch intrinsische hippocampale Netzwerkaktivität, mit der Induktion und Expression distinkter SPW-Rs kausal verbunden ist. Hierbei ist denkbar, dass aktivitätsabhängig in die Postsynapse einströmende Calciumionen durch Bindung an zytosolisches Calmodulin innerhalb aktivierter Spines zu einer Autophosphorylierung von CaMKII innerhalb distinkter Synapsen führen (Mukherji et al., 1994; Lledo et al., 1995). Autophosphorylierte CaMKII, die ihrerseits an der NR2B Untereinheit von NMDA - Rs bindet, könnte als Bindeglied für weitere intrazellulären Kaskaden an der aktivitätsabhängigen Markierung spezifischer Synapsen, dem sogenannten ‚Tagging‘ (bisher für die CA1 Region demonstriert (Frey and Morris, 1997; Redondo and Morris, 2011)), während der ‚ad hoc‘ Formation distinkter neuronaler Ensembles in der CA3 Region beteiligt sein. Darüber hinaus könnte autophosphorylierte CaMKII in den intrazellulären Transport sowie die Verankerung *de novo* - synthetisierter AMPA – Rs in spezifische Spines während L – LTP involviert sein (Lisman et al., 2012; Pi et al., 2010; Opazo et al., 2012).

3.2 Limitierungen des *in vitro* Paradigmas

Die in den vorliegenden Arbeiten durch kurze 100 Hz Tetanie (jeweils à 40 Pulse) induzierten, LTP-assoziierten *in vitro* SPW-Rs sind den unter *in vivo* Bedingungen beobachteten SPW-Rs ähnlich. Zum rechten Verständnis und der zulässigen Interpretation der hier vorgestellten Daten ist jedoch Folgendes von prominenter Bedeutung: auf Grund methodischer Limitierungen können die hier im Akutschnittpräparat gezeigten SPW-Rs nicht mit solchen Ereignissen, wie sie unter *in vivo* Bedingungen registrierten werden, gleichgesetzt werden. Vielmehr handelt es

sich bei allen in der vorliegenden Habilitation gezeigten Phänomenen notwendigerweise um artifizielle Ereignisse, deren Ursprung im Hirnschnittpräparat liegt, das zwar durch ein hinreichend großes, aber im Vergleich zu der *in vivo* Situation signifikant reduziertes zelluläres Netzwerk mit stark eingeschränkten synaptischen Verbindungen limitiert ist (Boulton et al., 1992). Auf Grundlage dieser methodologischen Beschränkung darf jedoch weiterhin angenommen werden, dass Mechanismen, die aus solchermaßen beschränkten *in vitro* Messungen abgeleitet werden können, grundsätzliche Mechanismen beschreiben, die hochwahrscheinlich auch für die Induktion, Expression und Modulation von Gedächtnis-assoziierten Netzwerk-Oszillationen im intakten Tier relevant sind.

3.3 Reiz - induzierte SPW-Rs sind von epileptiformer Aktivität verschieden

Da die HFS, die zur Induktion von SPW-Rs und LTP angewandt wird, einen relativ starken Stimulus für das zelluläre Gewebe darstellt und unter abgeänderten ionalen Bedingungen (1.0 mM $[Mg^{2+}]_o$, 1.2 mM $[Ca^{2+}]_o$, 5 mM $[K^+]_o$) auch für das so genannte ‚Kindling‘ (eine fortschreitende Zunahme neuronaler Antworten auf eher seltene und schwache Stimulation einer neuronalen Population) angewandt wird (Stelzer et al., 1987), drängt sich insbesondere innerhalb des verwandten *in vitro* Paradigmas die Frage auf, inwiefern die resultierenden SPW-Rs ein physiologisches Erregungsmuster darstellen oder ob eine - wie von anderen Autoren befundene ‚solch massive‘ Stimulation nicht eher zu einer Übererregung des neuronalen Netzwerks und folglich zur Generation epileptiformen Massentladungen führt. Hierzu ergaben ausführliche Analysen (vierte und fünfte Publikation) eine eindeutige Demarkation zwischen Inhibitions-kontrollierten Netzwerkentladungen, wie sie SPW-

Rs darstellen, und hypersynchronisierter, prä-epileptischer Aktivität innerhalb hippocampaler Netzwerke. Im Einzelnen zeigt ein erster Schritt beim Vergleich der Feldpotenzialantworten sowohl in Area CA3 als auch in der CA1 Region vor und nach HFS Applikation, dass die post - tetanischen, extrazellulär registrierten Antworten eine robuste LTP aufweisen, aber keinerlei Anzeichen einer neuronalen Überreizung wie beispielsweise verlängerte Feld - EPSP Antworten oder multiple Populationsentladungen (Popspikes, PSs) zeigen (erste bis fünfte Publikation). An dieser Stelle sei kurz angemerkt, dass bei der gewählten Reizung der Schaffer-kollateralen in SR der CA1 Region die antidrome Feldpotenzialantwort im SP der Area CA3 charakteristischerweise zwei PSs zeigt, die dem Feld EPSP aufgelagert sind. Hierbei ergibt sich der erste antidrome PS aus der direkten Reizung der Axonkollateralen der CA3 Pyramidenzellen, dem ein zweiter PS folgt, der innerhalb der rekurrenten Kollateralen innerhalb des CA3 Netzwerks generiert wird. Die Induktion von LTP in Area CA3 zeigt sich durch die Amplitudenzunahme des zweiten PSs, wobei der erste PS charakteristischerweise in Amplitude und Latenz unverändert ist. Ein zweiter, gewichtiger Befund bezüglich des Grades der zellulären Erregbarkeit des neuronalen Gewebes während der Stimulus-Induktion von SPW-Rs ergibt sich jedoch aus simultanen intrazellulären Ableitungen von CA3 Pyramidenzellen während der SPW-R Induktion und Expression. Während SPW-R Aktivität zeigen etwa 50 % der CA3 Pyramidenzellen ein exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (EPSP), dem 1 – 3 Aktionspotenziale (APs) aufgelagert sind, wohingegen die andere Hälfte der Neurone nicht erregt wird, d.h. ein inhibitorisches postsynaptisches Potenzial (IPSP) oder nur schwache EPSPs generiert (Behrens et al., 2005). Während der SPW-R Induktion finden sich zum einen Zellen, die bei wiederholter HFS Applikation ein vergrößertes EPSP und eine Zunahme der Anzahl der generierten APs zeigen. Dieser Steigerung der Erregbarkeit

stehen jedoch interessanterweise zum anderen Zellen gegenüber, die während SPW-Rs gehemmt werden und bei wiederholter Reizung eine Vergrößerung der jeweiligen IPSP Amplitude zeigen. Darüber hinaus findet sich auch eine kleine Subpopulation von Neuronen, die aus einer ursprünglichen EPSP Antwort, assoziiert mit AP Generation, in eine Hemmung wechseln und vice versa (Behrens et al., 2005). Der Beobachtung, dass nach etwa 5 – 7 HFS Serien eine Sättigung der Amplitude und Inzidenz der SPW-Rs bei unveränderter SPW-R Dauer im Feldpotenzial eintritt, liegt also eine dynamische Netzwerkreorganisation auf zellulärer Ebene zugrunde, die ähnlich der Expression von LTP ein Saturierungslevel zeigt und somit einer potenziell gefährlichen Übererregbarkeit des neuronalen Gewebes effizient entgegenwirkt (Behrens et al., 2005). Zusammenfassend sei auf eine ganze Reihe von wesentlichen Unterschieden verwiesen, die sämtlich Stimulus-induzierten SPW-Rs von hypersynchronisierten ‚recurrent epileptiform discharges‘ (REDs), die unter teilweise reduzierter oder vollständig blockierter GABA_AR - vermittelter synaptischer Transmission (Inhibition) registriert wurden, unterscheiden (vierte und fünfte Publikation): 1 - 3) die Amplitude, Dauer und Inzidenz der jeweiligen Netzwerkentladungen, 4) die jeweilige Ripplefrequenz, 5) der unter GABA_AR - Blockade beobachtete paroxysmale Depolarisationsschiff (PDS), der in CA3 PCs während REDs generiert wird, 6) die Tatsache, dass unter GABA_AR - Blockade alle PCs verlängerte EPSPs zeigen und somit aktiv in die hypersynchronisierten Netzwerkentladungen eingebunden sind, 7) die Anzahl der generierten APs/Ereignis, 8) die entladungsbedingten extrazellulären Anstiege der Kaliumionenkonzentration, 9) der Sauerstoffverbrauch/Ereignis (unpublizierte Daten).

Neben der überwiegend gewählten antidromen Stimulation der CA3 Region aus dem SR der Area CA1 können SPW-Rs ebenso orthodrom aus dem Stratum moleculare,

dem Granularlayer des DG sowie aus dem Hilus und mittels selektiver Moosfaserstimulation induziert werden (Behrens et al., 2005). Bemerkenswerterweise finden sich transiente Wechsel der zellulären Antworten während SPW-Rs auch bei Änderungen des Stimulationsortes. So zeigten Zellen, die ursprünglich ein EPSP und 1 - 2 APs während SPW-Rs generieren, bei Wechsel des Reizortes beispielsweise vom proximalen in das distale SR der CA1 Region eine Veränderung der zellulären Antwort in ein IPSP. Dieser Prozess ist vollständig reversibel und zeigt somit, ähnlich der LTP, eine Inputspezifität (Behrens et al., 2005). Auch die resultierenden SPW-Rs zeigen in den extrazellulären Feldpotenzialantworten hierbei reversible Änderungen ihrer Eigenschaften wie beispielsweise der Dauer und Amplitude der SPW-Rs sowie der Anzahl der generierten Ripples (Behrens et al., 2005). Diese inputspezifischen Veränderungen lassen darauf schließen, dass, abhängig vom jeweiligen Reizort, distinkte SPW-Rs generiert werden, die aus der Aktivierung spezifischer neuronaler Cluster resultieren, welche innerhalb der Gesamtpopulation des Netzwerks transiente, funktionelle Ensembles bilden. Weitere Analysen aktivitätsabhängiger neuronaler Clusterbildung während der LTP - assoziierten Induktion und Generation von SPW-Rs, wie sie für spontan generierte SPW-Rs im Hippocampus der Maus kürzlich beschrieben wurde (Maier et al., 2002; Maier et al., 2003; Both et al., 2008; Reichinnek et al., 2010; Bahner et al., 2011; Maier et al., 2011), ist hierbei Gegenstand aktueller Forschung unserer Arbeitsgruppe.

3.4 Das Janusgesicht der noradrenergen SPW-R Modulation

Wie das ‚two - stage‘ Modell für Lernen und Gedächtnis vorstellt, kommt es beim Wechsel von explorativem Verhalten - verbunden mit der Registrierung neuer Inhalte - einerseits und der Konsolidierung von Gedächtnisspuren aus dem Hippocampus in den Neokortex andererseits zu einem raschen Wechsel zustandsabhängiger synchroner Netzwerkaktivität von Theta - assoziierten Gamma - Oszillationen zu hippocampalen SPW-Rs (Buzsaki, 1989; Buzsaki, 1996). Wie in diesem Zusammenhang bisher bekannt ist, kann die Detektion ‚neuer‘, genauer gesagt un- oder wenig bekannter Informationen mit einer Freisetzung von NA aus dem Locus coeruleus über monoaminerge Fasertrakte an basale Dendritenfortsätze von CA3 Neuronen im Hippocampus einhergehen (Sara et al., 1994). Wie in der zweiten Publikation gezeigt wurde, verursacht ein vorübergehender Anstieg der extrazellulären NA Konzentration eine rasche und reversible Suppression von SPW-Rs innerhalb des CA3 Netzwerks mit konsekutiver Unterbrechung der SPW-R Propagation in die CA1 Region. Wie weiter demonstriert werden konnte, ist diese Blockade über präsynaptische α 1-Adrenorezeptoren vermittelt (siehe: simultane intra- und extrazellulärer Messungen in der CA1 und CA3 Region; Analysen der PP – Fazilitierung (Debanne et al., 1996; Regehr and Tank, 1991), Varianzkoeffizienz - Analysen (Faber and Korn, 1991) sowie Messung der extrazellulären Calciumabfälle mittels ionensensitiver Mikroelektroden (Heinemann et al., 1977) und Fluoreszenzmessungen des intrazellulären Calciumsignals während repetitiver, afferenter elektrischer Stimulation in Abwesenheit schneller glutamaterger Transmission (Igelmund et al., 1996; Egorov et al., 1996)). Somit zeigen diese Ergebnisse gemeinsam einen Mechanismus an, durch den der durch neokortikale Inputs verursachte, rasche Übergang von Gedächtniskonsolidierungs - assoziierten

Netzwerkoszillationen innerhalb hippocampaler Netzwerke hin zu Arbeitsgedächtnis - assoziierter Hirnaktivität während erhöhter Aufmerksamkeit, wie er im intakten Hirn beobachtet wird, erklärt werden kann. Darüber hinaus bestätigen die vorliegenden Daten erneut einen engen Zusammenhang zwischen der Induktion synaptischer Plastizität und dem Auftreten hippocampaler SPW-Rs dadurch, dass NA, zusätzlich zu den Effekten via präsynaptischer α_1 - Adrenorezeptoren, über postsynaptische β_1 - Adrenorezeptoren sowohl die Induktion klassischer lang anhaltender LTP (L - LTP) als auch von SPW-Rs in Area CA3 fasziliert. Von besonderem Interesse ist ferner der Befund, dass nach der NA-vermittelten Unterdrückung der SPW-Rs, deren Wiederauftreten durch eine erhöhte SPW-R Inzidenz charakterisiert ist, wobei dieser Effekt ebenfalls über Aktivierung von β_1 -Adrenorezeptoren vermittelt wird (ul Haq et al., 2011). Zusammen mit dem Befund, dass sowohl die aktivitätsabhängige Induktion von LTP als auch von SPW-Rs über β_1 -Adrenorezeptoren *in vitro* fasziliert ist, könnte dies erklären, warum nach Lernprozessen (Kudrimoti et al., 1999) sowie auch Schlafentzug (Ponomarenko et al., 2003) eine erhöhte Inzidenz von hippocampalen SPW-Rs im intakten Gehirn beobachtet wird.

Die CA3 Einzelzelleableitungen während SPW-R Aktivität in Anwesenheit von NA weisen im Wesentlichen auf zwei Ergebnisse hin: 1) Die plötzliche NA – vermittelte Suppression der SPW-Rs ist nicht alleine durch Hyperpolarisation von CA3 Pyramidenzellen zu erklären, da zum einen die Unterdrückung der SPW-Rs einer Hyperpolarisation der simultan gemessenen Neurone zeitlich vorausgeht und zum anderen, im Gegensatz zu dieser Wirkung, in einem Teil der gemessenen Zellen die SPW-R Suppression von einer leichten Depolarisation des Membranpotentials von CA3 Pyramidenzellen begleitet war. Hierbei sind beide beobachteten Effekte von NA auf CA3 Neurone in Übereinstimmung mit Befunden aus vorherigen Beobachtungen

in CA1 Pyramidenzellen (Madison and Nicoll, 1986). 2) Die verstärkte SPW-R Aktivität während Aktivierung von β_1 - Adrenorezeptoren in Gegenwart von Dobutamin geht mit einer reduzierten Nachhyperpolarisation in CA3 Pyramidenzellen einher, die vermutlich auf β_1 - Rezeptor – vermittelten Effekten auf calciumabhängige Kaliumkanäle vom SK (small conductance) Typ beruht, ähnlich der für CA1 Neurone beschriebenen Effekte (Madison and Nicoll, 1986; Haas and Konnerth, 1983; Pedarzani and Storm, 1993).

Ein weiteres Ergebnis dieser Studie weckt besonderes Interesse: In Gegenwart von NA können SPW-Rs nicht durch wiederholte HFS Reizserien induziert werden. Diese werden jedoch nach Beendigung der elektrischen Reizung spontan in der CA3 generiert, wenn NA ausgewaschen wird. Die spontane Generation von SPW-Rs kann dadurch verursacht sein, dass distinkte synaptische Kontakte zwischen CA3 Neuronen, die durch die wiederholte HFS Applikation aktivitätsabhängig verstärkt wurden, ein neuronales Ensemble konstituieren, das eine koordinierte Ensembleaktivität in Form von SPW-Rs generiert, sobald während des NA Auswaschens die α_1 – R - vermittelte Reduktion der Transmitterausschüttung nachlässt. Es ist denkbar, dass eine aktivitätsabhängige Verstärkung spezifischer synaptischer Kontakte innerhalb des CA3 Netzwerks ein synaptisches ‚Tagging‘ distinkter Synapsen einbezieht. Einer aktuellen Hypothese folgend ist das ‚Tagging‘ ein CaMKII – abhängiger Prozess, der pharmakologisch blockiert werden kann (Frey and Morris, 1997; Redondo and Morris, 2011). Erste Befunde in unserem Labor zeigen, dass in Anwesenheit des CaMKII Blockers KN - 93 (1 μ M) das Auftreten von SPW-Rs während des NA Auswaschens verhindert ist (unpublizierte Daten). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass ein synaptisches ‚Tagging‘ an der

aktivitätsabhängigen Formierung distinkter neuronaler Ensembles und somit an der Induktion von SPW-Rs durch synaptische Plastizität beteiligt ist.

3.5 Ausblick

Mögliche Implikationen des vorgestellten *in vitro* Paradigmas Gedächtnis – assoziierter, synchronisierter hippocampaler Netzwerkaktivität umfassen 1) Untersuchung grundlegender Mechanismen aktivitätsabhängiger Formation spezifischer zellulärer Cluster und der damit verbundenen Topographie synaptischer Plastizität innerhalb verschiedener subzellulärer Kompartimente von CA3 Neuronen. Im Speziellen soll plastizitätsabhängige Ensembleaktivität während mit der Bindung sensorischer Informationen verbundenen Theta-/Gamma Aktivität einerseits und der mit hippocampalen SPW-Rs assoziierten Reaktivierung von vorübergehenden Gedächtnisspuren andererseits analysiert werden, 2) Aufdeckung von Mechanismen, die über aktivitätsabhängige synaptische Defizite zu funktionellen Ausfällen führen, wie sie bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Fronto - temporale Demenz und Demenzen anderer Genese) beobachtet werden, die charakteristischerweise mit Gedächtnisfunktionsstörungen einhergehen, 3) Untersuchung der Bedeutung entwicklungsbedingter Variabilität intrazellulärer Chloridkonzentrationen, die mit unterschiedlichen Expressionsmustern der Chloridtransporter NKCC1 und KCC2 zusammenhängt, für die Induktion und Expression verschiedener synchronisierter hippocampaler Netzwerkaktivitäten und 4) vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen synchronisierter, hippocampaler Netzwerkoszillationen (Theta-, Gamma- und Ripple - Aktivität) in operativ gewonnenen, humanen Hirnschnittpräparaten pharmako - resistenter TLE Patienten.

4. Zusammenfassung

Unter *in vitro* Bedingungen führt die wiederholte Applikation von LTP induzierenden Reizserien in Akutschnittpräparate der adulten Ratte zur Induktion von SPW-Rs in Area CA3, von wo sie in die CA1 Region und das Subikulum propagieren. Die Induktion von SPW-Rs ist mit einer zellulären Reorganisation innerhalb des CA3 Netzwerks assoziiert und ihre Expression kann über Induktion von LTD reversibel gehemmt werden. Zusammen zeigt dies eine enge Beziehung zwischen SPW-Rs und aktivitätsabhängigen, synaptischen Veränderungen innerhalb hippocampaler Netzwerke an. Während die Induktion von SPW-Rs NMDA - R abhängig ist, kann deren Expression über AMPA-/Kainat - R Blocker unterbrochen werden. Darüber hinaus führt inputspezifische Stimulation des CA3 Netzwerks aus der proximalen und distalen Area CA1 sowie des Hilus zur Generation distinkter SPW-Rs, wobei die Wirkung solcher Wechsel reversibel ist. Aktivierung von $\alpha 1$ -Rs während Norardenalin - Applikation führt über Reduktion des präsynaptischen Calcium Uptakes zur abrupten und reversiblen Blockade von SPW-Rs. Andererseits fazilitiert Stimulation von $\beta 1$ - Rs die Induktion von LTP und SPW-Rs in Area CA3. Reiz - induzierte SPW-Rs können anhand verschiedenen Populations- wie auch Einzelzellparametern von hypersynchronen epileptiformen Netzwerkentladungen unterschieden werden. Hierzu zählen die Dauer und Amplitude der ereigniskorrelierten neuronalen Depolarisation und Anzahl der generierten APs, die Dauer, Inidenz und Amplitude der Netzwerkentladungen, die Frequenz überlagerter Ripple - Oszillationen, die Höhe der durch die Netzwerkentladung hervorgerufenen Anstiege der $[K^+]_o$ und des im Extrazellularraum gemessenen Sauerstoffverbrauchs. Zusammen dienen diese Befunde einem besseren Verständnis synchronisierter hippocampaler Netzwerkaktivität, die mit der Konsolidierung deklarativer Gedächtnisspuren verbunden ist und somit Langzeitgedächtnis ermöglicht.

5. Literatur

Alonso A, Köhler C, 1984. A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 225: 327-343.

Amaral DG, Witter MP, 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.

Amaral DG, Witter MP, 1995 The hippocampal formation. In: Paxinos, G. (Ed.), *The rat nervous system*. Academic Press, New York, pp. 443-494.

Anderson P, Bliss TV, Skrede KK, 1971. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp. Brain Res.* 13: 222-238.

Asrar S, Zhou Z, Ren W, Jia Z, 2009. Ca(2+) permeable AMPA receptor induced long-term potentiation requires PI3/MAP kinases but not Ca/CaM-dependent kinase II. *PLoS. One.* 4: e4339.

Bahner F, Weiss EK, Birke G, Maier N, Schmitz D, Rudolph U, Frotscher M, Traub RD, Both M, Draguhn A, 2011. Cellular correlate of assembly formation in oscillating hippocampal networks in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108: E607-E616.

Bartos M, Vida I, Jonas P, 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 45-56.

Bear MF, Malenka RC, 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 389-399.

Behrens CJ, van den Boom LP, de HL, Friedman A, Heinemann U, 2005. Induction of sharp wave-ripple complexes in vitro and reorganization of hippocampal networks. *Nat. Neurosci.* 8: 1560-1567.

Bernard C, Wheal HV, 1994. Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. *Hippocampus* 4: 497-529.

BLACKSTAD TW, KJAERHEIM A, 1961. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J. Comp Neurol.* 117: 133-159.

Bliss TVP, Collingridge GL, 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.

Bliss TVP, Lømo T, 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232: 331-356.

- Both M, Bahner F, von Bohlen und HO, Draguhn A, 2008. Propagation of specific network patterns through the mouse hippocampus. *Hippocampus* 18: 899-908.
- Boulton CL, von Haebler D, Heinemann U, 1992. Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* 2: 99-106.
- Bragin A, Jandó G, Nádasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G, 1995. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci.* 15: 47-60.
- Bragin A, Mody I, Wilson CL, Engel J, Jr., 2002. Local generation of fast ripples in epileptic brain. *J. Neurosci.* 22: 2012-2021.
- Burwell RD, Amaral DG, 1998. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: Interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.* 391: 293-321.
- Buzsaki G, 1986. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res.* 398: 242-252.
- Buzsaki G, 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31: 551-570.
- Buzsaki G, 1991. Network properties of memory trace formation in the hippocampus. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 67: 817-835.
- Buzsaki G, 1996. The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb. Cortex* 6: 81-92.
- Buzsaki G, 1998. Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *J. Sleep Res.* 7 Suppl 1: 17-23.
- Buzsaki G, Buhl DL, Harris KD, Csicsvari J, Czeh B, Morozov A, 2003. Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* 116: 201-211.
- Buzsaki G, Chrobak JJ, 2005. Synaptic plasticity and self-organization in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 8: 1418-1420.
- Buzsaki G, Haas HL, Anderson EG, 1987. Long-term potentiation induced by physiologically relevant stimulus patterns. *Brain Res.* 435: 331-333.
- Buzsaki G, Horvath Z, Urioste R, Hetke J, Wise K, 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256: 1025-1027.
- Buzsaki G, Leung LW, Vanderwolf CH, 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* 287: 139-171.
- Chrobak JJ, Buzsáki G, 1994. Selective activation of deep layer (V-VI) retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J. Neurosci.* 14: 6160-6170.

Chrobak JJ, Buzsáki G, 1998. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. J. Neurosci. 18: 388-398.

Chrobak JJ, Lorincz A, Buzsaki G, 2000. Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. Hippocampus 10: 457-465.

Colgin LL, 2011. Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. Curr. Opin. Neurobiol. 21: 467-474.

Colgin LL, Denninger T, Fyhn M, Hafting T, Bonnevie T, Jensen O, Moser MB, Moser EI, 2009. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. Nature 462: 353-357.

Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A, Buzsáki G, 1999. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. J. Neurosci. 19: 274-287.

Csicsvari J, Hirase H, Mamiya A, Buzsaki G, 2000. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. Neuron 28: 585-594.

Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsaki G, 2003. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. Neuron 37: 311-322.

Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM, 1996. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: Quantal fluctuation affects subsequent release. J. Physiol. (Lond.) 491: 163-176.

Diba K, Buzsaki G, 2007. Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. Nat. Neurosci. 10: 1241-1242.

Dolorfo CL, Amaral DG, 1998. 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: 25-48.

Dragoi G, Carpi D, Recce M, Csicsvari J, Buzsáki G, 1999. Interactions between hippocampus and medial septum during sharp waves and theta oscillation in the behaving rat. J. Neurosci. 19: 6191-6199.

Draguhn A, Traub RD, Schmitz D, Jefferys JGR, 1998. Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus *in vitro*. Nature 394: 189-192.

Dugladze T, Heinemann U, Gloveli T, 2001. Entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation in vitro. Brain Res. 905: 224-231.

Dunwiddie T, Lynch G, 1978. Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: Localization and frequency dependency. J. Physiol. (Lond.) 276: 353-367.

Eccles JC, 1986. Mechanisms of long-term memory. J. Physiol (Paris) 81: 312-317.

Egorov AV, Heinemann U, Müller W, 1996. Muscarinic activation reduces changes in $[Ca^{2+}]_o$ evoked by stimulation of Schaffer collaterals during blocked synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 214: 187-190.

Empson RM, Heinemann U, 1995. The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. *J. Physiol. (Lond.)* 484: 707-729.

Engel J, Jr., Bragin A, Staba R, Mody I, 2009. High-frequency oscillations: what is normal and what is not? *Epilepsia* 50: 598-604.

Eschenko O, Ramadan W, Molle M, Born J, Sara SJ, 2008. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn. Mem.* 15: 222-228.

Faber DS, Korn H, 1991. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys. J.* 60: 1288-1294.

Foster DJ, Wilson MA, 2006. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 440: 680-683.

Freund TF, Buzsáki G, 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.

Frey U, Morris RG, 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385: 533-536.

Friedman A, Behrens CJ, Heinemann U, 2007. Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 5: 126-130.

Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ERG, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Lehmann TN, 2004. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J. Neurosci.* 24: 10416-10430.

Gais S, Born J, 2004. Declarative memory consolidation: mechanisms acting during human sleep. *Learn. Mem.* 11: 679-685.

Gobbele R, Buchner H, Curio G, 1998. High-frequency (600 Hz) SEP activities originating in the subcortical and cortical human somatosensory system. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 108: 182-189.

Groenewegen HJ, Vermeulen-Van der ZE, te KA, Witter MP, 1987. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 23: 103-120.

Haas HL, Konnerth A, 1983. Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 302: 432-434.

Hasselmo ME, 1999. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci.* 3: 351-359.

Hebb DO, 1949. *The Organization of Behavior.* Wiley, New York.

Heinemann U, Beck H, Dreier JP, Ficker E, Stabel J, Zhang CL, 1992 The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. In: Ribak, C. E., Gall, C. M., Mody, I. (Eds.), *The dentate gyrus and its role in seizures.* Elsevier Science Publishers BV., Amsterdam, pp. 273-280.

Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ, 1977. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res.* 27: 237-243.

Henze DA, Cameron WE, Barrionuevo G, 1996. Dendritic morphology and its effects on the amplitude and rise-time of synaptic signals in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J. Comp Neurol.* 369: 331-344.

Hjorth-Simonsen A, Jeune B, 1972. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Comp. Neurol.* 144: 215-232.

Igelmund P, Zhao YQ, Heinemann U, 1996. Effects of T-type, L-type, N-type, P-type and Q-type calcium channel blockers on stimulus-induced pre- and postsynaptic calcium fluxes in rat hippocampal slices. *Exp. Brain Res.* 109: 22-32.

Ishizuka N, Weber J, Amaral DG, 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295: 580-623.

Klausberger T, Somogyi P, 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321: 53-57.

Köhler C, 1986. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J. Comp. Neurol.* 246: 149-169.

Köhler C, 1988. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain: III. The lateral entorhinal area. *J. Comp. Neurol.* 271: 208-228.

Kudrimoti HS, Barnes CA, McNaughton BL, 1999. Reactivation of hippocampal cell assemblies: effects of behavioral state, experience, and EEG dynamics. *J. Neurosci.* 19: 4090-4101.

Lisman J, Buzsaki G, 2008. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr. Bull.* 34: 974-980.

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S, 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 169-182.

Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA, 1995. Calcium calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation

enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 11175-11179.

Madison DV, Nicoll RA, 1986. Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones, in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 372: 221-244.

Maier N, Guldenagel M, Sohl G, Siegmund H, Willecke K, Draguhn A, 2002. Reduction of high-frequency network oscillations (ripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice. *Journal of Physiology-London* 541: 521-528.

Maier N, Nimmrich V, Draguhn A, 2003. Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *J. Physiol* 550: 873-887.

Maier N, Tejero-Cantero A, Dorn AL, Winterer J, Beed PS, Morris G, Kempter R, Poulet JF, Leibold C, Schmitz D, 2011. Coherent phasic excitation during hippocampal ripples. *Neuron* 72: 137-152.

Malenka RC, Bear MF, 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21.

Malenka RC, Nicoll RA, 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874.

Matthies H, Frey U, Reymann K, Krug M, Jork R, Schroeder H, 1990. Different mechanisms and multiple stages of LTP. *Adv. Exp. Med. Biol.* 268: 359-368.

Morris RGM, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, O'Carroll C, 2003. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond [Biol.]* 358: 773-786.

Mukherji S, Brickey DA, Soderling TR, 1994. Mutational analysis of secondary structure in the autoinhibitory and autophosphorylation domains of calmodulin kinase II. *J. Biol. Chem.* 269: 20733-20738.

Nadasdy Z, Hirase H, Czurko A, Csicsvari J, Buzsaki G, 1999. Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *J. Neurosci.* 19: 9497-9507.

Nadel L, Moscovitch M, 1998. Hippocampal contributions to cortical plasticity. *Neuropharmacology* 37: 431-439.

Nicoll RA, Malenka RC, 1999. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 515-525.

Nimmrich V, Maier N, Schmitz D, Draguhn A, 2005. Induced sharp wave-ripple complexes in the absence of synaptic inhibition in mouse hippocampal slices. *J. Physiol* 563: 663-670.

Norimoto H, Mizunuma M, Ishikawa D, Matsuki N, Ikegaya Y, 2012. Muscarinic receptor activation disrupts hippocampal sharp wave-ripples. *Brain Res.* 1461: 1-9.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A, 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 307: 462-465.

O'Keefe J, 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51: 78-109.

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: 171-175.

O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Dupret D, Csicsvari J, 2010. Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends Neurosci.* 33: 220-229.

Opazo P, Sainlos M, Choquet D, 2012. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22: 453-460.

Papathodoropoulos C, 2010. Patterned activation of hippocampal network (approximately 10 Hz) during in vitro sharp wave-ripples. *Neuroscience* 168: 429-442.

Papathodoropoulos C, Kostopoulos G, 2002. Spontaneous, low frequency (approximately 2-3 Hz) field activity generated in rat ventral hippocampal slices perfused with normal medium. *Brain Res. Bull.* 57: 187-193.

Pavlidis C, Winson J, 1989. Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes. *J. Neurosci.* 9: 2907-2918.

Pedarzani P, Storm JF, 1993. PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K⁺ current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron* 11: 1023-1035.

Pennartz CM, Kitai ST, 1991. Hippocampal inputs to identified neurons in an in vitro slice preparation of the rat nucleus accumbens: evidence for feed-forward inhibition. *J. Neurosci.* 11: 2838-2847.

PETSCHE H, STUMPF C, GOGOLAK G, 1962. [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells]. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 14: 202-211.

Pi HJ, Otmakhov N, El GF, Lemelin D, De KP, Lisman J, 2010. CaMKII control of spine size and synaptic strength: role of phosphorylation states and nonenzymatic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107: 14437-14442.

Ponomarenko AA, Lin JS, Selbach O, Haas HL, 2003. Temporal pattern of hippocampal high-frequency oscillations during sleep after stimulant-evoked waking. *Neuroscience* 121: 759-769.

Ramón y Cajal S, 1911. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Vol.II. Maloine, Paris. -1960 *Studies on Vertebrate Neurogenesis*. Translated by L. Guth. Charles C Thomas, Springfield, Illinois. Maloine, Paris.

Redondo RL, Morris RG, 2011. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12: 17-30.

Regehr WG, Tank DW, 1991. The maintenance of LTP at hippocampal mossy fiber synapses is independent of sustained presynaptic calcium. *Neuron* 7: 451-459.

Reichinnek S, Kunsting T, Draguhn A, Both M, 2010. Field potential signature of distinct multicellular activity patterns in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 30: 15441-15449.

Reichinnek S, von KA, Hagenston AM, Freitag E, Roth FC, Bading H, Hasan MT, Draguhn A, Both M, 2012. Reliable optical detection of coherent neuronal activity in fast oscillating networks in vitro. *Neuroimage.* 60: 139-152.

Remondes M, Schuman EM, 2002. Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. *Nature* 416: 736-740.

Rolls ET, 2010. A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 215: 180-196.

Sara SJ, Vankov A, Herve A, 1994. Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: a clue to the role of noradrenaline in memory. *Brain Res. Bull.* 35: 457-465.

Schwindel CD, McNaughton BL, 2011. Hippocampal-cortical interactions and the dynamics of memory trace reactivation. *Prog. Brain Res.* 193: 163-177.

SCOVILLE WB, MILNER B, 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20: 11-21.

Siapas AG, Wilson MA, 1998. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* 21: 1123-1128.

Skaggs WE, McNaughton BL, Permenter M, Archibeque M, Vogt J, Amaral DG, Barnes CA, 2007. EEG sharp waves and sparse ensemble unit activity in the macaque hippocampus. *J. Neurophysiol.* 98: 898-910.

Squire LR, 1992. *Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans.* *Psychol. Rev.* 99: 195-221.

Staley K, Hellier JL, Dudek FE, 2005. Do interictal spikes drive epileptogenesis? *Neuroscientist.* 11: 272-276.

Stelzer A, Slater NT, ten Bruggencate G, 1987. Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. *Nature* 326: 698-701.

Steward O, Scoville SA, 1976. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. J. Comp. Neurol. 169: 347-370.

Stewart M, Fox SE, 1990. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? Trends Neurosci. 13: 163-169.

Suzuki WA, Amaral DG, 1994. Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. J. Neurosci. 14: 1856-1877.

Swanson LW, Kohler C, 1986. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. J. Neurosci. 6: 3010-3023.

Takano H, McCartney M, Ortinski PI, Yue C, Putt ME, Coulter DA, 2012. Deterministic and Stochastic Neuronal Contributions to Distinct Synchronous CA3 Network Bursts. J. Neurosci. 32: 4743-4754.

Ulanovsky N, Moss CF, 2007. Hippocampal cellular and network activity in freely moving echolocating bats. Nat. Neurosci. 10: 224-233.

Wilson MA, McNaughton BL, 1994. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science 265: 676-679.

Witter MP, Griffioen AW, Jorritsma-Byham B, Krijnen JLM, 1988. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. Neurosci. Lett. 85: 193-198.

Ylinen A, Bragin A, Nádasdy Z, Jandó G, Szabó I, Sík A, Buzsáki G, 1995. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. J. Neurosci. 15: 30-46.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei folgenden Personen bedanken, die mit vielfältigem Rat, inhaltlicher Diskussion und praktischer Unterstützung zu den Publikationen für die vorliegende Habilitationsschrift sowie die Weiterentwicklung themenbezogener Fragestellungen und methodischer Ansätze beigetragen haben: M. S. Jarosch, S. Fano, A. R. Rösler, J. – O. Hollnagel, G. Caliskan, C. Reiffurth, B. Schacht, Dr. L. P. van den Boom, Dr. R. ul Haq, Dr. A. Liotta, Dr. N. Maggio, Dr. N. Maier, Dr. S. Gabriel, Dr. A. Kirchner, Dr. B. Pöschel, Dr. K. Buchheim (†), Dr. L. de Hoz, Dr. H. – J. Gabriel, Dr. H. Siegmund, Dr. S. Ivens, Dr. C. Kehrer, Dr. J. Decker, Dr. A. M. Wojtowicz, Dr. R. Kovács, Dr. J. Otahal, Dr. C. Henneberger, Dr. A. Boehlen, Dr. I. Erchova, Dr. D. Rokni, Dr. K. Schulze, PD Dr. V. Schmieden, Prof. Dr. A. Draguhn, Prof. Dr. D. Schmitz, Prof. Dr. G. Buzsáki, Prof. Dr. O. Kann, Prof. Dr. K. - H. Braunewell, Prof. Dr. A. Friedman, Prof. Dr. M. Gutnick, Prof. Dr. Y. Yarom, Prof. Dr. K. Albus, Prof. Dr. M. Straschill und im Besonderen meinem Mentor Prof. Dr. Uwe Heinemann für unzählige, wertvolle Inspirationen.

Für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung einiger Abbildungen bedanke ich mich bei Katharina Mia Wittek, für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts bei Sonja Frosinski.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Helene C. und Jakob J. Behrens sowie meinen Geschwistern Bettina S. Möller und Thomas W. Behrens für ihre Anteilnahme und Unterstützung.

Die vorliegende Habilitationsschrift ist meinem verstorbenen Vater Jakob sowie meinem Sohn Ben Henri Joseph gewidmet.

6. Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 16.08.2012

Christoph Joseph Behrens