

Aus dem Institut für Neurowissenschaftliche Forschung
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Langsame Netzwerkoszillationen in exzitatorisch verknüpften neuronalen Netzwerken

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Hans Karl Bendels
aus Andernach am Rhein

Gutachter:

1. Professor Dr. Dietmar Schmitz
2. Professor Dr. Uwe Heinemann
3. Professor Dr. Christian Leibold

Datum der Promotion: 14. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theorie zur Analyse von ϑ-Oszillationen	9
2.1	Einleitung	9
2.1.1	Die mechanistischen Grundlagen einer synchronen ϑ -Oszillation	10
2.1.2	Phasen-Antwort-Kurven und ihre Bedeutung für die Synchronisation	15
2.1.3	Weiterentwicklung bestehender Theorien	18
2.2	Methoden	21
2.2.1	Synchronisation von neuronalen Oszillatoren	21
2.2.2	Phasen-Antwort-Kurven	24
2.2.3	Deterministische Theorie der Phasen-Antwort	26
2.2.4	Theorie der Synchronisation in Anwesenheit von Rauschen	27
2.2.5	Kriterien zur Synchronisation	34
2.3	Ergebnisse	36
2.3.1	Evaluation des Mean-Field Ansatzes	36
2.3.2	Wie der zeitliche Verlauf der synaptischen Kopplung die Synchronisation beeinflusst	45
2.4	Diskussion	52
2.4.1	Excitatorisches Kopplungsregime	53
2.4.2	Inhibitorisches Kopplungsregime	54

3	Photostimulation	59
3.1	Einleitung	59
3.2	Setup	67
3.3	Elektrophysiologische Methoden	70
3.3.1	Photostimulation	71
3.3.2	Detektion synaptischer Ereignisse	72
3.4	Steuersoftware	74
3.4.1	Navigationsschirm	75
3.4.2	Stimulationsschirm	77
3.4.3	Scanning Prozess	77
3.5	Datenakquirierung und Datenanalyse	83
3.5.1	Die effektive Auflösung des Systems: Das photo-induzierte räumliche Antwort-Profil	83
3.5.2	Kartierung der funktionellen Konnektivität von en- torhinalen Schicht-II Sternzellen	86
3.6	Diskussion	95
3.6.1	1-Photonen- versus 2-Photonen-Uncaging	95
3.6.2	Vergleich zu anderen 1-Photonen-Uncaging-Setups	96
3.6.3	Effektive Auflösung des Systems	98
3.6.4	Kartierung der indirekten Antworten	100
3.6.5	Ausblick	101
4	Diskussion und Ausblick	103
A	Parameter der numerischen Simulation	115
A.1	Sternzell-Modell	115
A.2	Synapsen-Modell	118
B	Phasen-Antwort-Kurve der Sternzelle	119
	Zusammenfassung	121

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	vii
Literaturverzeichnis	122
Danksagung	135
Erklärung	137
Lebenslauf	139

Kapitel 1

Einleitung

Die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit biologischen neuronalen Systemen führt zwangsläufig zu der Fragestellung, wie es einem hochvernetzten, zeitkontinuierlich-operierenden System wie dem Nervensystem gelingt, Information geordnet zu verarbeiten. Bei der Beantwortung stehen zwei Grundprobleme im Vordergrund:

Einmal der hohe Grad an synaptischer Vernetzung zwischen den Nervenzellen. Im Großhirn von Säugetieren schätzt man den durchschnittlichen Grad der Konvergenz, d.h. die Anzahl der präsynaptischen Neurone, die auf eine Nervenzelle projizieren, auf rund 14000 Neurone (Benninghoff *et al.*, 1994). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine Zelle oftmals nur eine einzige Synapse am postsynaptischen Neuron ausbildet und die Wirkung einer einzelnen Synapse meist nur einen geringen Einfluß auf die Dynamik der postsynaptischen Zelle besitzt, stellt sich die Frage, wie eine reliable Informationsverarbeitung zwischen Neuronen, d.h. die Übermittlung von Information, überhaupt möglich sein kann?

Der zweite Schwerpunkt liegt in der Verarbeitung: Auf welche Art und Weise kann Information in einem kontinuierlich operierenden System zeitlich geordnet verarbeitet werden? Konkret richtet sich die Frage nach der Existenz eines 'Taktgeber', der die zeitliche Abfolge neuronaler Ereignisse durch die Bereitstellung eines zeitlichen Rahmens erfassbar

macht. Letztgenannter Mechanismus stellt eine wichtige Verbindung zu den zeitdiskret-operierenden künstlichen neuronalen Netze und ihren Rechenoperation her (Haykin, 1998).

Synchrone neuronale Oszillationen Eine mechanistische Lösungsmöglichkeit für beide genannten Fragen ist die temporäre Assoziation von Neuronen zu synchron feuernenden Zellgruppen.

So erhöht die rhythmische Synchronizität präsynaptischer Neurone im Vergleich zu einem zeitlich dispergierten Feuern den Effekt auf die Dynamik gemeinsamer postsynaptischer Neurone und assoziierter subzellulärer Prozesse, wie der synaptischen Plastizität (Axmacher *et al.*, 2006).

Desweiteren generieren Oszillationen einen zeitlichen Rahmen für die Verarbeitung zeitkritischer Prozesse: Zum einen definiert die synchrone, oszillatorische Ensembleaktivität von Nervenzellen eine Phase ϕ , die den aktuellen Zeitpunkt innerhalb der Oszillationsperiode T angibt und als zeitlicher Referenzwert für eine phasenbasierte Informationscodierung genutzt werden kann. So zeigen bspw. Ortszellen im Hippocampus eine zum hippocampalen ϑ -Rhythmus phasenabhängige Feueraktivität (O’Keefe, 1993). Zum anderen können als Folge einer präsynaptischen oszillierenden Population von Nervenzellen in einem postsynaptischen Neuron Oszillationen des Membranpotentials auftreten. Infolge der nun zeitlich variierenden Annäherung an die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials kann das Feuerverhalten des Neurons ein kurzes Zeitintervall jeweils am Scheitel der Oszillationen begrenzt werden, so dass das zeitkontinuierlich System quasi diskretisiert wird. Einen derartigen Mechanismus findet man bspw. im olfaktorischen System bei der Verarbeitung von Geruchsreizen (Laurent, 1996).

Vorkommen synchroner Oszillationen Neuronale Oszillationen sind in den Nervensystemen verschiedenster Spezies ein ubiquitär zu beobachtendes Phänomen, z.B. im Gehirn von Insekten (Wehr & Laurent, 1996), im

visuellen System von Reptilien (Prechtl, 1994) und Vögeln (Neuenschwander & Varela, 1993), in Fischen (Benda *et al.*, 2006) und sind auch in den meisten Regionen des Säugetierhirns zu finden (Kramis *et al.*, 1975; Buzsáki & Draguhn, 2004).

Funktionen neuronaler Oszillationen Die funktionellen Hypothesen bezüglich neuronaler Oszillationen sind so vielfältig wie ihr Auftreten und spiegeln das gesamte Spektrum neuronaler Funktionsprozesse wider. Als Auswahl sei hier ihre grundlegende Rolle bei der Koordination von Motorfunktionen, bei der Gedächtnisbildung, sensorischen Integration und in Aufmerksamkeitsprozessen genannt (Gray & Singer, 1989; Donoghue *et al.*, 1998; Fetz, 1997; O’Keefe & Recce, 1993). Außerdem vermutet man, dass die transiente Synchronizität räumlich-verteilter Neuronenpopulationen den vom Individuum als subjektiven Gesamteindruck erlebten Zusammenschluss unterschiedlicher Sinnesmodalitäten darstellt und damit als das physiologische Korrelat für die Lösung des sog. Bindungs-Problems fungieren könnte (Eckhorn *et al.*, 1988; Gray & Singer, 1989; Singer, 1999).

Die funktionelle Diversität der neuronalen Oszillationen spiegelt sich unmittelbar in ihrem breiten Frequenzspektrum wider, das sich im Säugetierhirn über mehr als drei Größenordnungen erstreckt. Man unterscheidet langsame Oszillationen im δ - (0.5-3 Hz) und θ - (3-8) Bereich, mittelschnelle Oszillationen im α - (7-13 Hz) und β -Bereich (13-30 Hz) und schließlich die schnellen Oszillationen im γ -Bereich (30-90 Hz), denen im hohen Frequenzbereich noch ultra-schnelle Oszillationen (90-200 Hz) folgen (Buzsáki & Draguhn, 2004). Hochfrequente Oszillationen bleiben meist auf lokale Abschnitte begrenzt, während niederfrequente Oszillationen sich eher über mehrere Hirnareale erstrecken können, wie bspw. der hippocampale θ -Rhythmus. Die verschiedenen Rhythmen können zeitgleich in einer Struktur bzw. innerhalb eines Systems auftreten (Bragin *et al.*, 1995; Steriade, 2001; Csicsvari *et al.*, 2003).

Entsprechend der funktionellen Bedeutung von Oszillationen lässt sich bei vielen pathologischen Zuständen des Nervensystems eine Assoziation mit anormalen Synchronisationsrhythmen nachweisen, etwa im Rahmen einer Schizophrenie, Epilepsie, bei Autismus, Morbus Parkinson und einer Alzheimer Symptomatik (Uhlhaas & Singer, 2006).

Die Entstehung von synchronen Oszillationen Das klassische Vorgehen bei dem Versuch, die Entstehung neuronaler Oszillationen zu verstehen, d.h. die verantwortlichen Zelltypen zu identifizieren, besteht darin, beteiligte Regionen, Schichten oder ganze Subsysteme selektiv im Tierexperiment *in vivo* zu zerstören und die Veränderung der Oszillationen zu dokumentieren. Da prinzipiell eine synchrone Oszillation durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen aus verschiedenen Subsystemen aufgebaut werden kann, ist dieser Ansatz *per se* in seiner Aussagekraft limitiert.

Aus diesem Grund wird in dieser Dissertation ein komplementärer Ansatz vorgestellt, der, ausgehend von den mechanistischen, zellulären Grundlagen einer Synchronisation, die Frage nach der Herkunft von Oszillationen zu beantworten versucht. Dabei bleibt die Analyse auf langsame Oszillationen (<20 Hz) beschränkt. Im Gegensatz zu hochfrequenten Oszillationen, bei denen keine speziellen intrinsischen Eigenschaften von den beteiligten Neuronen erforderlich sind, und das Zusammenspiel zwischen der zeitlich variierenden Feuerschwelle und der schnellen Dynamik postsynaptischer Potentiale die Synchronisation der Neurone induziert (Gerstner *et al.*, 1996), müssen bei langsamen synchronen Oszillationen die Neurone besondere zelluläre Merkmale aufweisen; vgl. Abschnitt 2.1.

Gelingt es, jene charakterisierenden Eigenschaften an einer Einzelzelle zu identifizieren, dann ist dies ein wichtiger Hinweis auf die Herkunft der zu messenden Oszillationen.

Aufbauend auf diesen besonderen zellulären Eigenschaften, wird im ers-

ten Teil dieser Arbeit eine Synchronisationstheorie entwickelt. Die Theorie erlaubt es, ausgehend von einem zellulären Kennwert (der Phasen-Antwort-Kurve), vorausszusagen, ob das Neuron in einem ausgewählten Frequenzbereich synchronisieren kann, welches Konnektivitätsregime hierzu notwendig ist und mit welcher quantitativen Genauigkeit die Synchronisation aufrechterhalten werden kann. Letzteres gelingt durch die Einbeziehung der zufälligen, unter physiologischen Bedingungen auftretenden Membranpotentialfluktuationen, die einer Synchronisation entgegenwirken. Ziel ist es also, nur durch die Untersuchung einer Einzelzelle zu entscheiden, ob ein Zelltyp, eingebettet in einem ausgewählten Konnektivitätsregime, die Fähigkeit besitzt, aus einem zeitlich-unstrukturierten synaptischen Eingang, langsame synchrone Oszillation zu generieren.

Nach ihrer Evaluierung mithilfe von *in silico* Netzwerksimulationen Leitfähigkeits-basierter Neurone (Kapitel 2.3.1) findet die Theorie ihre konkrete Anwendung in der Beantwortung der Frage, ob die Schicht-II-Sternzelle des medialen entorhinalen Cortex (MEC) als ein Generator des hippocampalen ϑ -Rhythmus fungieren kann (Abschnitt 2.3.2).

Der hippocampale ϑ -Rhythmus Der hippocampale ϑ -Rhythmus ist ein Feldpotential, das in der hippocampalen Formation und seinen assoziierten Strukturen, wie dem Subicularkomplex, der Amygdala, dem perirhinalen und entorhinalen Cortex während lokomotorischer Aktivitäten und in der REM-Traumphase zu messen ist. In extrazellulären Ableitungen ist er gekennzeichnet durch eine großamplitudige (1-2 mV) Oszillation mit einer Frequenz von 4-12 Hz. Aufgrund der geordneten, pallisadenartigen Zellorientierung - im Sinne eines offenen Dipols - ist der Rhythmus am besten im Stratum lacunosum-moleculare der hippocampalen CA1 Region zu detektieren. Vielfältige Funktionen werden ihm zugeschrieben; vgl. Buzsáki (2002). Im Wesentlichen vermutet man, dass der hippocampale ϑ -Rhythmus als zeitlicher Rahmen zur Gedächtnisbildung dient (Jensen & Lisman, 1996; Melamed *et al.*, 2004).

Eine bis heute ungeklärte Frage ist die Genese des hippocampalen ϑ -Rhythmus. Nach der klassischen Auffassung von Petsche *et al.* (1962) wird der Komplex um das mediale Septum und das Diagonalband von Broca (MS-DBB) als primärer Theta-Generator angesehen. Der MS-DBB ist recurrent mit dem Hippocampus verbunden, er enthält rhythmische, im ϑ -Rhythmus feuernde Zellen, deren Aktivität eng mit dem hippocampalen ϑ -Rhythmus assoziiert ist. Dies stützt sich auf die Erkenntnisse, dass die niederfrequente Stimulation des MS-DBB einen ϑ -Rhythmus im Hippocampus induziert, und ein Funktionsausfall des MS-DBB den septohippocampalen Rhythmus verschwinden lässt. Deshalb wird der MS-DBB von einigen Autoren als *der* Generator für den hippocampalen ϑ -Rhythmus angesehen.

Andererseits gehen einige Autoren davon aus, dass Anteile des hippocampalen ϑ -Rhythmus durch einen Feedback-Mechanismus zwischen Hippocampus und entorhinalen Cortex aufgebaut werden. Im Mittelpunkt dieser Überlegungen steht der mediale entorhinale Cortex (MEC) mit der dort befindlichen Sternzelle, die als zusätzlicher ϑ -Generator angesehen wird (Alonso & Llinás, 1989; Stewart *et al.*, 1992; Alonso & Klink, 1993; White *et al.*, 1998; Hasselmo *et al.*, 2000; Buzsáki, 2002; Acker *et al.*, 2003; Netoff *et al.*, 2005). Ein wichtiger Grund hierfür sind die besonderen Resonanzeigenschaften der Sternzelle (Schreiber *et al.*, 2004), die sich u.a. in Form langsamer unterschwelliger Oszillationen ihres Membranpotentials im ϑ -Bereich (≈ 10 Hz) äußern. Darüberhinaus emittiert eine Sternzell-Population infolge einer erhöhten Muscarin-Rezeptoraktivierung, Cluster von Aktionspotentialen im ϑ -Frequenzbereich, mit jeweils einem Spike pro Zyklus und Zelle (Klink & Alonso, 1997). Ungeachtet dessen ist bis heute unklar, ob die entorhinalen Sternzellen wirkliche Schrittmacher des Theta-Rhythmus sind, oder ob die zu messenden Oszillationen nur durch die resonanzbedingte Verstärkung des zeitlich-strukturierten Eingangs aus dem MS-DBB entstehen.

Robuste Synchronisation als Funktion des Konnektivitätsregimes Zur Beantwortung dieser Fragestellung wird die Synchronisationstheorie auf die Sternzelle des MEC angewandt. Dabei lassen sich ausgewählten Verknüpfungsregime identifizieren, innerhalb derer die Sternzelle die Fähigkeit besitzt, synchrone ϑ -Oszillationen robust zu erzeugen.

Experimentelle Bestimmung der funktionellen Konnektivität

Zur Überprüfung der theoretisch postulierten Konnektivitätshypothesen wird in Kapitel 3 die tatsächliche funktionelle Konnektivität der Sternzelle experimentell bestimmt. Zu diesem Zweck wird ein Photostimulationssystem entwickelt, das auf Basis der focalen photolytischen Aktivierung eines Transmitters die Analyse der funktionellen Konnektivität einer gepatchten Nervenzelle ermöglicht (Abschnitt 3.1). Die Dokumentation der Eigenschaften des Setups (Abschnitt 3.2), die Entwicklung einer geeigneten Methodik zur Analyse der gewonnenen Daten (Abschnitt 3.5) und schließlich die Offenlegung der intralaminären Konnektivität der Schicht-II-Sternzelle (Abschnitt 3.5.2) sind Gegenstand des zweiten Kapitels.

Die jedes Kapitel beschliessende Diskussion versucht, die gewonnenen Erkenntnisse in den bisherigen Wissensstand einzuordnen. Eine abschließende Diskussion zur Konnektivität und Funktion der Sternzelle findet sich in Kapitel 4.

Kapitel 2

Theorie zur Analyse von ϑ -Oszillationen

2.1 Einleitung

Im ersten Teil der Arbeit wird ein theoretischer Ansatz zur quantitativen Analyse der Synchronisationseigenschaften einer langsam (<10 Hz) oszillierenden Nervenzelle vorgestellt.

Neben zellulären und synaptischen Parametern integriert die Theorie die in vivo stets vorhandene synaptische Hintergrundaktivität, die in einem Neuron in Form zufälliger Membranpotentialfluktuationen auftritt und eine stabile Synchronisation stört. Durch die Miteinbeziehung dieser wichtigen physiologischen Nebenbedingung gelingt es der Theorie, bisherige deterministische Ansätze zur quantitativen Beschreibung neuronaler Synchronisationen (Abschnitt 2.2.3) auf biologisch realistische Regime auszuweiten.

Durch dieses Vorgehen bleibt die theoretische Vorhersage nicht auf die Beantwortung der Frage beschränkt, ob eine Nervenzelle innerhalb eines ausgesuchten Kopplungsregimes synchronisieren kann, sondern benennt auch die Robustheit der Synchronisation in Anwesenheit perturbierender Rauschens unterschiedlicher Stärke. In Kombination mit experimentellen

Ansätzen lassen sich hieraus wichtige Rückschlüsse und Hypothesen bezüglich der Konnektivität und Funktion eines ausgesuchten Nervenzelltyps treffen. Konkret kann die Frage beantwortet werden, ob ein ausgesuchter Zelltyp als Reaktion auf einen zeitlich-unstrukturierten, überschwelligem synaptischen Eingang mit der Generierung von synchronen Oszillationen reagieren kann.

Als Einstiegspunkt zur theoretischen Herleitung werden einleitend die mechanistischen Grundlagen einer langsamen Synchronisation vorgestellt, und aus diesen die Bedeutung von Phasen-Antwort-Kurven (PRC) als zelluläre Kenngröße zur quantitativen Analyse von Synchronisationen herausgearbeitet.

2.1.1 Die mechanistischen Grundlagen einer synchronen ϑ -Oszillation

Ähnlich vielfältig wie die Funktionen neuronaler Oszillationen sind ihre mechanistischen Grundlagen (Ritz & Sejnowski, 1997): So gilt für die Synchronisation einer in einem sehr hohen Frequenzbereich ($\gtrsim 100$ Hz) feuernden Neuronenpopulation, dass diese hauptsächlich durch die ansteigende Flanke der eintreffenden exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) vermittelt wird (Gerstner *et al.*, 1996); sie ist damit weitestgehend unabhängig von den intrinsischen Eigenschaften der beteiligten Neuronen. In ähnlicher Weise kann die Genese von γ -Oszillationen (30–50 Hz) durch die Kinetik inhibitorischer synaptischer Potentiale erfolgreich erklärt werden (Traub *et al.*, 1996).

Aufgrund der Tatsache, dass postsynaptische Potentiale für gewöhnlich schneller als in 100 ms abfallen, kann die synaptische Kinetik im Falle von Oszillationen, die langsamer als 10 Hz sind, wie z.B. dem ϑ -Rhythmus, nicht zur Erklärung herangezogen werden. Bei derart niedrigen Frequenzen müssen die Einzelneurone einer synchron-feuernden Zellpopulation eine bestimmte intrinsische Eigenschaft aufweisen: Jedes Neuron, das früher (später) als der Durchschnitt der Neurone feuert, muss die

Fähigkeit besitzen, als Reaktion auf die eintreffenden postsynaptischen Potentiale (PSPs), die Generierung seines nächsten Aktionspotentials zu verzögern (beschleunigen). Dabei übermitteln die eintreffenden PSPs dem Einzelneuron die Information, in welcher zeitlicher Beziehung sein eigener Feuerzeitpunkt zum durchschnittlichen Feuerzeitpunkt aller Neurone, der *Netzwerkphase*, steht. Die zeitliche Adjustierung des Feuerzeitpunktes als Funktion der Abweichung von der Netzwerkphase - auf ein zu frühes Feuern folgt eine Verzögerung des nächsten Spikes et vice versa - lässt das Einzelneuron im nächsten Feuerzyklus näher an die Netzwerkphase heranrücken, was, bezogen auf alle Neurone, zu ihrer schrittweisen Synchronisation führt. Demnach basiert die Fähigkeit zur neuronalen Synchronisation im niedrigen Frequenzbereich auf einer zellulären Eigenschaft und ist primär unabhängig von Art und Verlauf der synaptischen Kopplung.

Membrankanäle als zellulärer Mechanismus zur synchronisationsfördernden Phasenkorrektur des Feuerzeitpunktes

Als biophysikalisches Äquivalent eines Phasenkorrektors, der das zeitliche 'Heranziehen' des Einzelneurons an die Netzwerkphase realisiert, kann eine spezielle Gruppe von Membrankanälen identifiziert werden. Die Kanäle zeichnen sich dadurch aus zum einen Änderungen des Ruhemembranpotentials aktiv entgegenwirken und zum anderen eine wesentlich langsamere Dynamik als schnelle Kanäle besitzen, so dass ihre Wirkung erst verzögert einsetzt (Hutcheon & Yarom, 2000; Schreiber *et al.*, 2004). Erstgenannte Eigenschaft umfasst u.a. jene Kanäle, deren Umkehrpotential am Fußpunkt ihrer Aktivierungsfunktion zu liegen kommt. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind langsame, muscarinerge Kalium-Kanäle (M-Kanäle) und der H-Strom, an dem der Prozess des Entstehens einer langsamen Synchronisation exemplarisch erklärt wird.

Der H-Strom Ein Kanal, der die oben geforderte Eigenschaften besitzt, ist der H-Strom, I_H , ein Kationen-getragener Einwärtsstrom, der seinem Namen der Besonderheit verdankt, dass er durch die zunehmende Hyperpolarisation der Zelle aktiviert wird (Pape, 1996). Der H-Strom I_h ist hochselektiv für Na^+ - und K^+ -Ionen mit einem Leitfähigkeitsverhältnis von $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}=0.2-0.4$ (Edman *et al.*, 1987). Demnach besitzt er ein Umkehrpotential, das oberhalb des Ruhemembranpotentials zwischen -50 und -20 mV und, wie in Abbildung 2.1a gezeigt, am Fußpunkt seiner Aktivierungsfunktion liegt. Seine maximale Leitfähigkeit entwickelt der Kanal bei rund -110 mV (Pape, 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften wirkt der Kanal einer de- bzw. hyperpolarisierenden Auslenkung des Ruhemembranpotentials mit einer ab- bzw. zunehmenden Leitfähigkeit entgegen.

Biophysik des H-Stroms Die Bedeutung des I_h -Stroms für die Synchronisationseigenschaften eines Neurons wird offensichtlich, wenn man das Feuerverhalten eines tonisch-feuernden Neurons, das mit den Standardkanälen Na -, K_{dr} -, L- und Na_P -Kanälen ausgestattet ist, mit dem eines Neurons vergleicht, das zusätzlich über einen I_h -Strom verfügt:

Im Zuge der Repolarisationsphase des Aktionspotentials kommt es im I_h -tragenden Neuron zu einer verzögert einsetzenden Reaktivierung des I_h -Stroms, dessen depolarisierende Wirkung (Umkehrpotential -50 mV und -20 mV) die Membrantrajektorie näher an die Feuerschwelle anhebt (Depolarisations-Sag) und damit im tonisch-feuernden Neuron die Auslösung des nachfolgenden AP begünstigt. Hieran lässt sich das I_h -tragende Neuron von dem I_h -freien Neuron unterscheiden, dem ein solcher Effekt fehlt.

Appliziert man nun in einem kritischen Zeitintervall nach AP-Generierung einen depolarisierenden Stimulus (grün-gestrichelte Linie in Figur 2.1b), dann führt dies sowohl im I_h -freien als auch im I_h -tragenden Neuron zu einem kurzzeitigen Eingriff in das dynamische Gleichgewicht des Membranpotentials zugunsten der Depolarisation. Im I_h -freien Neuron resultiert dies, wie in Abbildung 2.1c gezeigt, in einer beschleunigten Depolarisation

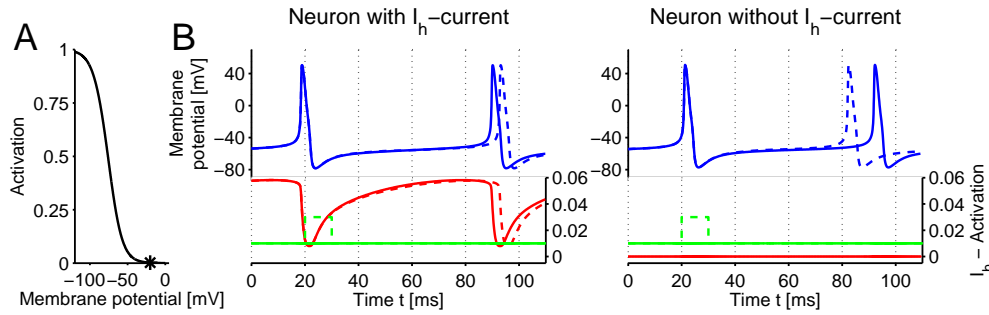


Abbildung 2.1: Die Biophysik des H-Stroms. (A) Aktivierung des H-Stroms als Funktion des Membranpotentials. Der Kanal wird mit zunehmender Hyperpolarisation aktiviert und entwickelt seine maximale Leitfähigkeit bei rund -110 mV (Pape, 1996). Das Umkehrpotential wird von Na^+ - und K^+ -Ionen getragen und liegt oberhalb des Ruhemembranpotentials, am Fußpunkt der Aktivierungsfunktion, bei -20 mV (Stern). Der H-Strom wirkt einer de- bzw. hyperpolarisierenden Auslenkung des Ruhemembranpotentials mit einer ab- bzw. zunehmenden Leitfähigkeit entgegen. (B) Effekt eines perturbierenden Stimulus auf die Dynamik eines tonisch-feuernden Neurons mit I_h -Strom (links) und ohne I_h -Strom (rechts). Dargestellt sind das Membranpotential (blaue Linie) und die Aktivierung des H-Stroms (rote Linie); der unperturbierte Ablauf ist mit soliden Linien, der perturbierte mit gestrichelten Linien dargestellt. Beide Neurone werden durch einen konstanten DC (grüne Linie) angetrieben und feuern mit einer Rate von 14 Hz. Appliziert man in einem kritischen Zeitintervall nach AP-Generierung einen depolarisierenden Stimulus (grün-gestrichelte Linie), dann führt dieser in beiden Neuronen zu einem kurzzeitigen Eingriff in das dynamische Gleichgewicht des Membranpotentials zugunsten der Depolarisation. Im I_h -freien Neuron resultiert dies in einer beschleunigten Depolarisation und der vorgezogenen Generierung des nachfolgenden APs (rechts, blau-gestrichelte Linie). Im I_h -tragenden Neuron kommt es infolge des geringfügig in Richtung Depolarisation verschobenen Membranpotentials zu einer verzögerten und abgemilderten Aktivierung des I_h -Stroms, in dessen Folge die I_h -getragene Depolarisationsphase schwächer ausgebildet ist. Unmittelbar ersichtlich wird dieser Effekt anhand des nun - trotz eines applizierten Einwärtsstroms - zeitlich verzögert auftretenden APs (links, blau-gestrichelte Linie).

und der vorgezogenen Generierung des nachfolgenden APs. Eine hierzu gegensätzliche Wirkung findet sich im I_h -tragenden Neuron. Infolge des geringfügig in Richtung Depolarisation verschobenen Membranpotentials kommt es zu einer verzögerten und abgemilderten Aktivierung des I_h -Stroms, in dessen Folge die I_h -getragene Depolarisationsphase schwächer ausgebildet ist. Unmittelbar ersichtlich wird dieser Effekt anhand des nun - trotz eines applizierten Einwärtsstroms - zeitlich verzögert auftretenden APs; vgl. Abbildung 2.1b.

Appliziert man jedoch den depolarisierenden Stimulus nach Abschluß eines kritischen Zeitintervalls nach AP-Generierung, so führt dies auch im I_h -tragenden Neuron zu einer vorgezogenen Auslösung des nachfolgenden APs.

Zusammenfassend gilt, dass ein depolarisierender Stimulus in der I_h -freien Zelle stets zur vorgezogenen Emittierung des APs führt, im I_h -tragenden Neuron jedoch sowohl eine Beschleunigung als auch eine Verzögerung des nachfolgenden APs bewirken kann. Entscheidend hierfür ist der Zeitpunkt der Stimulusapplikation relativ zum Interspike-Intervall, zur Phase des tonisch-feuernden Neurons.

Typ-I- und Typ-II-Neurone Man klassifiziert Neurone mit den Eigenschaften der hier beschriebenen I_h -freien Zelle als Typ-I-Neurone (Integratoren), Zellen, die das Verhalten des I_h -tragenden Neuron zeigen, als Typ-II-Neurone (Resonatoren). Bei letztgenannten Neuronen hängt die Richtung der Phasenkorrektur nicht nur von der Polarität des Stimulus, sondern auch von dessen Phase ab.

Die Beziehung zur Synchronisationsfähigkeit des Neurons lässt sich nun leicht herstellen, indem man annimmt, dass der depolarisierende Stimulus von der synchronen Aktivität einer Neuronenpopulation in Form eines Summen-PSPs herrührt. Offensichtlich besitzt eine I_h -tragende, tonisch-feuernde Zelle die Fähigkeit, eintreffende Summen-PSPs in Relation zum eigenen Interspike-Intervall (Phase) zu setzen und daran die Generierung des nachfolgenden Spikes zeitlich anzupassen.

Um zu untersuchen, ob diese primär phasendetektierende Eigenschaft der Zelle ausreicht, die Phase der Zelle wie oben gefordert auch korrekt an die Netzwerkphase heranzuziehen, wird der phasenverschiebene Effekt mithilfe von sog. Phasen-Antwort-Kurven systematisiert.

2.1.2 Phasen-Antwort-Kurven und ihre Bedeutung für die Synchronisation

Zur systematischen Erfassung des phasenverschiebenden Effekts, den ein Störstimulus auf die Phase eines tonisch-feuernden Neurons besitzt, appliziert man den Störstimulus zu unterschiedlichen Phasen der Zelle und misst die zeitliche Deviation von der unperturbierten Periode. Die resultierende Kurve heißt *Phasen-Antwort-Kurve* (*PRC* von Phase-Response-Curve) und definiert die Phasenverschiebung Φ (in Prozent der unperturbierten Periode) eines Oszillators als Funktion der Phase φ eines applizierten Stimulus.

Per Definition beschreiben positive Werte von Φ eine Reduktion der Periodendauer (Phasenvorschub), während negative Werte eine Verlängerung der Periodendauer (Phasenverzögerung) kennzeichnen. Abhängig von der Polarität des Stimulus sind Typ-I Neurone, wie das I_h -freie Neuron, durch eine strikt positive oder negative PRCs gekennzeichnet, wohingegen die PRCs von Typ-II Neuronen, wie dem I_h -tragenden Neuron, partiell positive und negative Anteile tragen; vgl. Abbildung 2.2a und b. Entsprechend klassifiziert man die zugehörigen Phasen-Antwort-Kurven mit Typ-I- resp. Typ-II-PRC (Ermentrout, 1996; Rinzel & Ermentrout, 1998). Prinzipiell sind Phasen-Antwort-Kurven für jede Feuerrate eines tonisch-feuernden Neurons messbar. Da mit zunehmender Feuerrate die Depolarisation schneller voranschreitet, in dessen Folge das o.g. kritische Zeitintervall zunehmend schmaler wird, um schließlich gänzlich zu verschwinden, tritt i.d.R. für hohe Feuerrate eine Konversion des Typ-II-Verhaltens in ein Typ-I-Verhalten auf.

Die Relevanz der PRC eines Neurons für dessen Synchronisationsfähigkeit wird unmittelbar ersichtlich, wenn man die zeitliche Entwicklung der Phasen-Abweichung τ eines einzelnen Neurons verfolgt, das außerhalb der Phase eines perfekt synchronisierten oszillatorischen Netzwerkes feuert.

Hierzu nimmt man an, dass alle beteiligten Neurone die gleiche PRC Φ

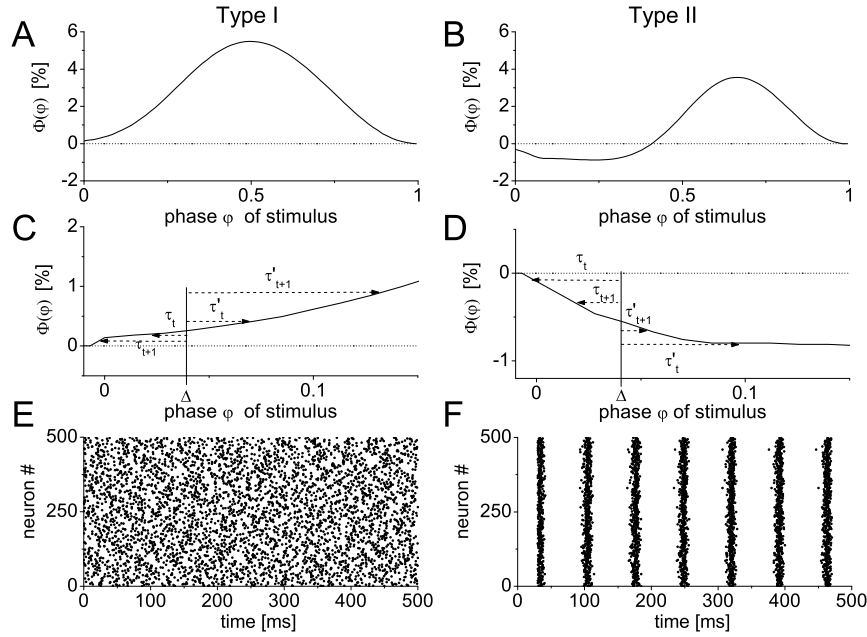


Abbildung 2.2: Phasen-Antwort-Kurven (PRCs) und ihre Bedeutung für die Synchronisation. (A, B) Phasen-Antwort-Kurven definieren die Phasenverschiebung Φ (in Prozent der unperturbierten Periode) eines Oszillators als Funktion der Phase φ eines applizierten Stimulus. Per Definition beschreiben positive Werte von Φ eine Reduktion der Periodendauer (Phasenvorschub), während negative Werte eine Verlängerung der Periodendauer (Phasenverzögerung) kennzeichnen. Typ-I Oszillatoren (Neurone) sind durch ihre strikt positive oder negative PRCs gekennzeichnet, wohingegen die PRCs von Typ-II Oszillatoren (Neuronen) partiell positiv und negativ sind. (C) Zeitliche Entwicklung der Phasen-Abweichung τ eines einzelnen Typ-I-Neurons, das außerhalb der Phase eines perfekt synchronisierten oszillatorischen Netzwerkes feuert. Alle Neurone besitzen die gleiche PRC Φ und sind über einen konstanten, biophysikalisch plausiblen interneuronalen Transmissionsdelay Δ miteinander verbunden. Die Netzwerkaktivität agiert in jedem Zeitschritt t als perturbierender Stimulus und verschiebt die um τ_t abweichende Phase des Einzelneurons um $\phi(\Delta - \tau_t)$ und die Phase der synchronisierten Neurone konstant um $\phi(\Delta)$. Die perturbierende Wirkung des Einzelneurons wird vernachlässigt. Feuert das Einzelneuron im Zeitschritt t später als die Netzwerkphase ($\tau_t > 0$), wird diese Verspätung, da $\phi(\Delta - \tau_t) < \phi(\Delta)$, im nächsten Zeitschritt $t + 1$ anwachsen. Feuert das Einzelneuron im Zeitschritt t früher als die Netzwerkphase ($\tau_t < 0$), dann wird es im Zeitschritt $t + 1$, da $\phi(\Delta - \tau_t) > \phi(\Delta)$, noch früher feuern. In beiden Fällen wird das Einzelneuron von der Netzwerkphase 'weggedrückt', eine Synchronisation ist ausgeschlossen, was anhand des korrespondierenden Spike-Rasterplots einer Population von 500 Typ-I-Neuronen (E) verdeutlicht wird. (D) Die gleichen geometrischen Überlegungen führen bei einem Typ-II-Neuron zu einem gegensätzlichen Ergebnis: Hier wird das abweichende Neuron konsekutiv in die Netzwerkphase hineingezogen, eine synchrone Aktivität wird möglich (F). Die resultierende Netzwerkperiode ist dabei gegenüber der Periode T des ungekoppelten Einzelneurons um $-\phi(\Delta) \cdot T$ verlängert.

besitzen und über einen konstanten, biophysikalisch plausiblen interneuronalen Transmissionsdelay Δ miteinander verbunden sind. Der Transmissionsdelay repräsentiert jene zeitliche Verzögerung, die von der präsynaptischen Generierung des AP bis zur Auslösung des postsynaptischen Signals vergeht (rund 2-5 ms).

Weiter nimmt man an, dass die Netzwerkaktivität in jedem diskreten Zeitschritt t , einmal die um τ_t abweichende Phase des Einzelneurons um $\phi(\Delta - \tau_t)$, und zum anderen die Phase der synchronisierten Neurone konstant um $\phi(\Delta)$ verschiebt. Vereinfachend wird die perturbierende Wirkung des Einzelneurons auf die Netzwerkphase vernachlässigt.

Der erste Fall behandelt ein Neuron mit einer Typ-I-PRC und ist in Abbildung 2.2c dargestellt: Feuert das Einzelneuron im Zeitschritt t später als die Netzwerkphase ($\tau_t > 0$), wird diese Verspätung, da $\phi(\Delta - \tau_t) < \phi(\Delta)$, im nächsten Zeitschritt $t + 1$ weiter anwachsen ($\tau_{t+1} > \tau_t$). Feuert das Einzelneuron im Zeitschritt t früher als die Netzwerkphase ($\tau'_t < 0$), so wird das Neuron im Zeitschritt $t + 1$, da $\phi(\Delta - \tau'_t) > \phi(\Delta)$, noch früher feuern ($\tau'_{t+1} < \tau'_t$). In beiden Fällen wird demnach das Neuron von der Netzwerkphase 'weggedrückt', eine Synchronisation ist ausgeschlossen, was anhand des korrespondierenden Spike-Rasterplots der Typ-I-Neurone in Abbildung 2.2e verdeutlicht wird. Ähnliche geometrische Überlegungen führen bei einem Typ-II-Neuron zu einem gegensätzlichen Ergebnis (Abbildung 2.2d):

Hier wird das zeitlich abweichende Neuron konsekutiv in die Netzwerkphase hineingezogen, so dass ein synchrones Feuern aller Typ-II-Neurone, wie in Abbildung 2.2f dargestellt, möglich wird. Das durch einen zeitlich-unstrukturierten Stimulus angetriebene Typ-II-Neuron besitzt die Fähigkeit, im Kollektiv eine synchrone Oszillationen aufzubauen. Die resultierende Netzwerkperiode ist dabei gegenüber der Periode T des ungekoppelten Einzelneurons um $-\phi(\Delta) \cdot T$ verlängert. Demnach reduzieren die oszillierenden Neurone im synchronen Zustand ihre Feuerrate.

In diesem Abschnitt wurde aufgezeigt, dass Neurone spezielle zelluläre Eigenschaften besitzen müssen, um eine stabile neuronale Synchronisation im niedrigen Frequenzbereich generieren zu können. Insbesondere müssen Neurone die Fähigkeit besitzen, ihre Feuerzeitpunkte als Funktion der synaptischen PSPs an die Netzwerkphase heranzuführen. Realisiert wird eine derartige zelluläre Phasenkorrektur über besondere Membrankanäle, deren phasenverschiebender Effekt auf den Feuerzeitpunkt des Neurons mithilfe der Phasen-Antwort-Kurve quantitativ beschreibbar ist.

2.1.3 Weiterentwicklung bestehender Theorien

Bisherige quantitative Ansätze zur Generierung von ϑ -Oszillationen

Theoretische Analysen zur langsamen Synchronisation von Neuronen basieren auf der aus der Mathematik bekannten Phasen-Antwort-Theorie (vgl. Kopell & Ermentrout, 2002; Goel & Ermentrout, 2002), die auf der Phasen-Antwort-Kurve des jeweiligen rhythmisch feuernden Neurons, des neuronalen Oszillators, basiert; vgl. Kapitel 2.2.3.

Obwohl Phasen-Antwort-Kurven einen rein zellulären Parameter darstellen, sind sie ausreichend, um das kollektive Verhalten einer Population von gekoppelten Oszillatoren - ohne genaue Kenntnis um die physikalische Basis der Oszillation - zu beschreiben. Die Phasen-Antwort-Theorie in ihrer klassischen Form ist jedoch auf rauschfreie Regime beschränkt, in denen die neuronalen Oszillatoren durch einen konstanten Gleichstrom (DC) angetrieben werden. Dies schränkt die Aussagekraft der Methode insofern erheblich ein, als dass Neurone *in vivo* von einer irregulären synaptischen Aktivität angetrieben werden. Man nimmt an, dass diese synaptischen Potentiale die Hauptquelle der zufälligen Membranpotentialfluktuationen in Nervenzellen sind (White *et al.*, 2000). Folglich bewirkt die synaptische Kopplung zwischen den Zellen sowohl ihre Synchronisation via postsynaptischer Potentiale als auch die Störung selbiger durch die Gene-

rierung irregulärer Membranpotentialfluktuationen. Ein mathematischer Ansatz, der diese physiologische Besonderheit mitberücksichtigt und das Membranrauschen inkorporiert, erscheint demnach zum Abschätzen der tatsächlichen Robustheit einer neuronalen in vivo Synchronisation geeigneter.

Ein möglicher Ansatz perturbierendes Rauschen in die Theorie gekoppelter Oszillatoren zu integrieren, stammt von Sakaguchi (1998); Strogatz & Mirollo (1991); Bonilla *et al.* (1992). In diesem linearisieren die Autoren die Fokker-Planck-Gleichung zur Phasenverteilung der Feuerzeitpunkte um den Zustand des asynchronen Feuerns. Dies ermöglicht sowohl die Herleitung von Stabilitätskriterien für die kollektiven Oszillationen als auch eine Schätzung des zu erwartenden Spike-Jitters im Grenzfall einer nur schwachen Synchronisation.

Im Falle von stark-synchronen Oszillationen kann die nichtlineare Fokker-Planck-Gleichung explizit für einige spezielle Phasen-Oszillatoren gelöst werden (z.B. Acebrón & Spigler, 1998). Jedoch gelingt die Darstellung der steady-state Lösungen der Fokker-Planck-Gleichung für beliebige Oszillatoren nur in Form impliziter Integralgleichungen (Acebrón & Bonilla, 1998; Bonilla *et al.*, 2000).

Die Generierung von ϑ -Oszillationen unter dem Einfluß von Rauschen

In der hier vorliegenden Arbeit wird eine einfachere Strategie als Lösung vorgeschlagen. Konkret wird die klassische Phasen-Antwort-Theorie um rauschbehaftete Regime derart erweitert, dass die zeitliche Entwicklung des Spike-Jitters - unter der Annahme einer Gauss-verteilter Phasen-Verteilung der Feuerzeitpunkten - berechnet wird (Abschnitt 2.2.4). Der entwickelte Ansatz ermöglicht eine Schätzung der Größe des resultierenden Spike-Jitters als Funktion des Rauschlevels und liefert damit eine quantitative Schätzung der Robustheit einer Synchronisation in Abhängigkeit des jeweiligen Rauschlevels. Diese Methode bleibt jedoch auf die Analyse

von schwach-gekoppelten Regimen mit einem stationären Membranrauschen beschränkt (s. Diskussion in Abschnitt 2.4). Es ist jedoch bekannt, dass für Neurone, die im ϑ -Frequenzspektrum oszillieren, schwache synaptische Verbindungen zur Induktion einer Synchronisation ausreichend sind (Buzsáki, 2002). Diese inherente Eigenschaft oszillierender Neurone ist die Grundlage der Synchronisation von räumlich weit entfernt liegenden und schwach miteinander gekoppelten neuronalen Populationen.

Übersicht Initial wird die Grundidee der Theorie anhand einer Computersimulation eines exzitatorisch-verknüpften neuronalen Netzwerkes veranschaulicht (Abschnitt 2.2.1). Nach der mathematischen Herleitung der Theorie in Abschnitt 2.2.4 werden die theoretischen Vorhersagen für unterschiedliche Oszillatortypen und verschiedene Konnektivitätsregime unter Zuhilfenahme numerischer Simulationen in Abschnitt 2.3.1 evaluiert. Zwei Kriterien werden zur Validierung der Vorhersage eingeführt; vgl. Abschnitt 2.2.5. Ihre Anwendung findet die Theorie schließlich in Abschnitt 2.3.2, wo sie dazu genutzt wird, Aussagen über die Synchronisationsfähigkeit der Sternzelle des medialen entorhinalen Cortex innerhalb verschiedener Konnektivitätsregime zu treffen.

Konkret soll die Hypothese überprüft werden, ob Sternzellen als einer der Generatoren des hippocampalen ϑ -Rhythmus fungieren können (Alonso & Llinás, 1989; Stewart *et al.*, 1992; Alonso & Klink, 1993; White *et al.*, 1998; Hasselmo *et al.*, 2000; Buzsáki, 2002; Acker *et al.*, 2003; Netoff *et al.*, 2005). Diese These basiert im wesentlichen auf der Beobachtung, dass Sternzellen unterschwellige, langsame Membranoszillationen im ϑ -Frequenzbereich zeigen und bei erhöhten Muscarin-Konzentrationen in der Lage sind, Spike-Cluster im ϑ -Frequenzbereich, mit einem Spike pro Zyklus, zu erzeugen (Klink & Alonso, 1997).

Aufgrund der Tatsache, dass die intrinsischen Oszillationsperioden relativ lang (70-140 ms) im Vergleich zur Kinetik eines möglichen synaptischen Kopplungsregime (5-20 ms) sind, ist anzunehmen, dass das pertur-

bierende Rauschen eine besonders große Wirkung auf die neuronale Dynamik entfaltet. Basierend auf in vitro gemessenen Phasen-Antwort-Kurve der Sternzelle, ermittelt die Theorie sowohl die Stabilität als auch die Robustheit der oszillatorischen Zustände in einem Sternzell-Netzwerk. Beide Größen werden in Abhängigkeit von der Polarität und des Zeitverlaufs der synaptischen Kopplung untersucht.

2.2 Methoden

2.2.1 Synchronisation von neuronalen Oszillatoren

An dieser Stelle wird die Grundidee der Theorie am Beispiel einer Computer-Simulation eines exzitatorisch-gekoppelten Netzwerks aus entorhinalen Sternzellen aufgezeigt. Das verwendete Neuronen-Modell wurde von Acker *et al.* (2003) vorgeschlagen und ist im Appendix A detailliert spezifiziert. Die dokumentierten Ergebnisse entstammen einer Population aus 500 gleichartigen neuronalen Oszillatoren, die untereinander vollständig, synaptisch-schwach gekoppelt sind und die von einem identischen, konstanten Strom angetrieben werden. Jedes Neuron ist zusätzlich einem konstanten Rauschen ausgesetzt, dessen Pegel für alle Neurone gleich groß ist. Unter Rauschen versteht man i.A. einen Störstimulus mit einem breiten und unspezifischen Frequenzspektrum. Es soll all jene stochastischen Fluktuationen des Membranpotentials imitieren, die durch den randomisierten synaptischen Feed-Forward Eingang (Köhler, 1986) und das inherente Kanalrauschen (White *et al.*, 2000) der Zelle hervorgerufen werden.

Aufgrund der schwachen synaptischen Kopplung werden die Oszillationsperioden im Vergleich zur unperturbierten Oszillation nur geringfügig variiert, was dazu führt, dass alle Neurone jeweils einmal pro Zyklus einen Spike emittieren. In einem solchen Regime ist es möglich, die Dynamik der Synchronisation durch die Konstruktion der Verteilung der Feuerzeiten in jedem Zyklus diskret zu quantisieren; vgl. Abbildung 2.3A. Die

zeitliche Entwicklung dieser Verteilung definiert eine Abfolge von Spike-Jittern $\sigma_\tau^{(n)}$ in Form der Standardabweichung der jeweiligen Verteilung, indiziert durch einen diskreten Zeitindex n . Der Spike-Jitter fungiert als Maß für den Grad der Asynchronie in dem betreffenden Zeitschritt (Gutkin *et al.*, 2003). Vereinbarungsgemäß wird der Spike-Jitter relativ zur unperturbierten Periode angegeben.

In Abbildung 2.3B sind verschiedene Beispiele der zeitlichen Entwicklung des Spike-Jitters $\sigma_\tau^{(n)}$ für unterschiedliche Rauschpegel dargestellt. Der Graph offenbart zwei charakteristische Eigenschaften, die stellvertretend für viele untersuchte Regime stehen: Erstens, für ausreichend kleine Rauschpegel konvergiert die initial vollständig desynchronisierte Population asymptotisch auf einen bestimmten Synchronitätsgrad (z.B. die horizontale gestrichelte Linie in Abbildung 2.3B). Überschreitet jedoch der Rauschpegel einen bestimmten Wert, dann bleibt die Population vollständig desynchronisiert und die Trajektorie fluktuiert um den Startwert herum. Zweitens, der Spike-Jitter am Punkt der Konvergenz $\sigma_\tau^{(\infty)} = \lim_{n \rightarrow \infty} \sigma_\tau^{(n)}$ ist eine ansteigende Funktion des Rauschpegels. Der Punkt der Konvergenz $\sigma_\tau^{(\infty)}$ repräsentiert den maximalen Grad der Synchronität, den eine Population von Neuronen unter dem Einfluß des gewählten Rauschpegels bestensfalls aufbauen kann.

Abbildung 2.3C illustriert exemplarisch, wie der Punkt der Konvergenz $\sigma_\tau^{(\infty)}$ von dem gewählten Rauschlevel abhängt. Besitzt der Oszillator die Fähigkeit zu synchronisieren, dann ist der resultierende Graph typischerweise dreigeteilt: In Abwesenheit von Rauschen synchronisiert die Population perfekt. Bei geringen Rauschleveln ist die Relation zwischen Rauschpegel und Spike-Jitter annähernd linear. Je flacher der Graph innerhalb dieser Region ist, um so besser kann das Neuron synchronisieren. Mit ansteigenden Rauschpegeln erreicht der Spike-Jitter $\sigma_\tau^{(\infty)}$ eine Übergangsregion (zwischen den vertikalen gestrichelten Linien in Abbildung 2.3C), in der die Population sehr schnell die Fähigkeit zur Synchronisation ver-

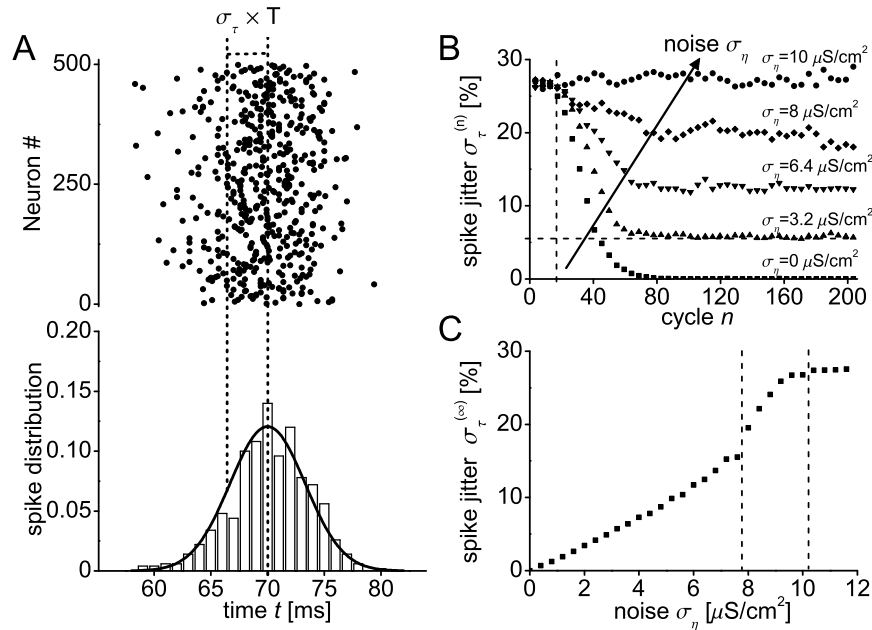


Abbildung 2.3: Dynamische Synchronisation unter dem Einfluß von Rauschen. (A) Im oberen Bildausschnitt sind die Feuerzeitpunkte einer Population von 500 Sternzellen aus einem beliebigen Zeitschritt dargestellt. In einem schwachen Kopplungsregime setzt man voraus, dass jeder neuronale Oszillator pro Zeitschritt genau einmal feuert. Die quantitative Erfassung der Asynchronie der Feuerzeitpunkte in einem Zeitschritt geschieht über die Standardabweichung (Spike-Jitter) $\sigma_\tau^{(n)}$ der Spike-Count-Verteilung (s. unteres Bild). Der Spike-Jitter wird in Einheiten der unperturbierten Periode gemessen. (B) Die zeitliche Entwicklung des Spike-Jitters ist für unterschiedliche Rauschlevel gezeigt (Symbole). Nach einer initialen Randomisierung wird das Rauschlevel auf einen konstanten Wert gesetzt (vertikale gestrichelte Linie), in dessen Folge der Spike-Jitter asymptotisch auf einen Grad der Desynchronisation $\sigma_\tau^{(\infty)}$ konvergiert. (C) Der Punkt der Konvergenz $\sigma_\tau^{(\infty)}$ ist eine ansteigende Funktion des Rauschlevels σ_η . Typischerweise zeigt sich der Graph von $\sigma_\tau^{(\infty)}(\sigma_\eta)$ dreigeteilt: Bei niedrigen Rauschleveln präsentiert sich der steady-state Jitter als nahezu lineare Funktion des Rauschlevels. Bei höheren Rauschleveln verliert die Population zunehmend die Fähigkeit zur Synchronisation (Übergangsregion; zwischen beiden gestrichelten Linien), um für sehr hohe Rauschlevel vollständig zu desynchronisieren.

liert. Schließlich, für sehr hohe Rauschpegel, bleibt $\sigma_\tau^{(\infty)}$ unverändert zum Startwert: die Population ist voll desynchronisiert.

Das Ziel der folgenden Abschnitte ist es, einen theoretischen Ansatz herzuleiten, der die zeitliche Entwicklung der Synchronisation, wie in Abbildung 2.3B dargestellt, mathematisch beschreibt. Da die Synchronisation als diskreter dynamischer Prozess behandelt werden kann, besteht die erste Idee darin, die Theorie der iterierten Abbildungen (siehe z.B. Collet & Eckmann (1980)) auf die Abfolge der Varianzen $v_n = (\sigma_\tau^{(n)})^2$ anzuwenden. Die Konvergenzpunkte entsprechen dann den stabilen Fixpunkten v^* der iterierten Abbildung $v_{n+1} = F(v_n)$. Einige Eigenschaften dieser Fixpunkte können bereits aus der Abbildung 2.3B abgelesen werden. Da die Konvergenz nicht-oszillatorisch ist, wird die Steigung der Abbildung F an einem stabilen Fixpunkt Werte zwischen null und eins annehmen. Darüberhinaus ist zu erwarten, dass die Steigung an einem stabilen Fixpunkt eine ansteigende Funktion der Varianz v^* am Fixpunkt ist. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Konvergenzpunkte mit geringen Werten v^* schneller erreicht werden als jene mit höheren Varianzen v^* .

Mit dem Ziel, die Abbildung F zu spezifizieren, wird im Folgenden die Phasen-Antwort-Theorie auf den Fall des schwachen Rauschens generalisiert.

2.2.2 Phasen-Antwort-Kurven

Störungen der Phase von Oszillatoren kann man mithilfe von Phasen-Antwort-Kurven (PRC) beschreiben (vgl. Goel & Ermentrout, 2002). Dabei besteht die Hauptidee darin, die Abweichung einer oszillatorischen Periode von einer unperturbierten als Funktion der Phase einer standardisierten Perturbation zu messen.

In diesem Abschnitt wird das Konzept der Phasen-Antwort-Kurve formal eingeführt. Konkret betrachtet man eine oszillatorische Einheit, die periodisch Pulse emittiert. Diese Pulse werden in der Folge als Aktionspo-

tentiale interpretiert. Die unperturbierte Periode $T(I)$ zwischen zwei Pulsen ist determiniert durch einen konstanten Eingangsstrom I . Setzt man nun die Einheit einem zusätzlichen Störstimulus j von geringer Stärke aus, der nach einem bestimmten Zeitintervall t^* nach Emission des letzten Spikes auf das Neuron einwirkt, dann erwartet man, dass die nachfolgende Spike-Emission nach einem veränderten Interfall $\tilde{T}(I, j)$ auftritt. Formal beschreibt man die Perturbation zum Zeitpunkt $t^* \in [0, T(I))$ nach Auftreten des letzten Spikes mit

$$j(t) = \varepsilon \kappa(t - t^*) , \quad (2.1)$$

wobei κ der kausale Kern ist, der den Zeitverlauf der Perturbation beschreibt und ε die Amplitude definiert.

Dann definiert

$$\tilde{T}(I, j) = T(I) [1 - \psi(\varepsilon, t^*)] \quad (2.2)$$

die Phasenabweichung $\psi(\varepsilon, t^*)$, die abhängig von zwei reellen Zahlen ist, der Amplitude ε und der Zeit t^* des Auftretens der Perturbation. Für gewöhnlich werden die Phasendeformationen ψ in Kreiseinheiten angegeben.

Die Linearisierung von ψ , d.h. ihre Ableitung nach der Amplitude ε am Punkt $\varepsilon = 0$, ist definiert als *Phasen-Antwort-Kurve* (PRC)

$$\Phi(t^*/T(I)) = \frac{d}{d\varepsilon} \psi(\varepsilon, t^*)|_{\varepsilon=0} . \quad (2.3)$$

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, beschreiben positive Werte von Φ eine Reduktion der Periodendauer (Phasen-Vorschub), wohingegen eine Verlängerung der Periodendauer (Phasen-Verzögerung) mit einer negativen Φ einhergeht.

Es bleibt zu vermerken, dass PRCs oftmals ohne die Grenzwertbildung $\varepsilon \rightarrow 0$ definiert werden, da in den meisten biologischen Systemen die Messung des Grenzwertes $\varepsilon \rightarrow 0$ aus praktischen Gesichtspunkten undurchführbar ist. Der hier vorgestellte Ansatz basiert jedoch auf einer das lineare Regime repräsentierenden PRC. Aus diesem Grund hat man, nach

Wahl eines potentiell geeigneten Wertes für ε die Linearität der PRC etwa durch Überprüfung des Superpositionsprinzips sicherzustellen. Dieses sieht vor, dass die Antwort auf zwei Perturbationspulse zum Zeitpunkt t_1^* and t_2^* genau jener zellulären Antwort entspricht, die die lineare Superposition $\psi(\varepsilon, t_1^*) + \psi(\varepsilon, t_2^*)$ hervorruft; siehe Abschnitt 2.3.1.

2.2.3 Deterministische Theorie der Phasen-Antwort

Die klassische Theorie der Phasen-Antwort ist für ein System von zwei rekurrent-gekoppelten Neuronen formuliert (Kopell & Ermentrout, 2002). Nimmt man an, dass Zelle 1 zum Zeitpunkt t_1 feuert und, im selben Zeitschritt, Zelle 2 zum Zeitpunkt $t_2 > t_1$ feuert, dann wird der nächste Puls von Zelle 1 zum Zeitpunkt

$$t_1^{\text{next}} = t_1 + T(I) \left[1 - \varepsilon \Phi \left(\frac{t_2 - t_1}{T(I)} \right) \right] .$$

aufzutreten.

In analoger Weise wird der nächste Spike von Zelle 2 zum Zeitpunkt

$$t_2^{\text{next}} = t_2 + T(I) \left[1 - \varepsilon \Phi \left(\frac{t_1^{\text{next}} - t_2}{T(I)} \right) \right] .$$

emittiert. Aus diesem Ansatz kann man die zu erwartende Phasen-Differenz $\delta^{\text{next}} = (t_2^{\text{next}} - t_1^{\text{next}})/T(I)$ für den nächsten Zeitschritt als eine Funktion der aktuellen Phasen-Differenz $\delta = (t_2 - t_1)/T(I)$ ermitteln

$$\delta^{\text{next}} := \delta + \hat{G}(\delta) , \tag{2.4}$$

wobei

$$\hat{G}(\delta) = \varepsilon [\Phi(\delta) - \Phi(1 - \delta - \varepsilon \Phi(\delta))] .$$

Bei Gleichung 2.4 handelt es sich um eine iterierte Abbildung mit einem Fixpunkt δ^* , der durch die Gleichung $0 = \hat{G}(\delta^*)$ definiert ist. Wenn dieser Fixpunkt stabil ist, dann repräsentiert der Fixpunkt jene konstante Phasenverzögerung, die sich zwischen beiden Zellen im Zeitverlauf einstellen wird. Stabilität erfordert, dass der Absolutwert der Ableitung auf der

rechten Seite von Gleichung (2.4) kleiner als 1 eins. Entsprechend ist die Stabilitätsbedingung für \hat{G}

$$-2 < \left. \frac{d}{d\delta} \hat{G} \right|_{\delta=\delta^*} < 0. \quad (2.5)$$

In einem zwei Neuronen-System bedeutet Synchronisation $\delta = 0$, was bspw. durch $\Phi(0) = \Phi(1) = 0$ erreicht werden kann. Zur Überprüfung der Stabilität leitet man aus Gleichung (2.5) das folgende Stabilitätskriterium ab

$$\left. \frac{d}{d\delta} \hat{G} \right|_{\delta=0} = \varepsilon 2 \Phi'(0) + [\varepsilon \Phi'(0)]^2 < 0.$$

Folglich synchronisieren Neurone nur, wenn die PRC eine negative Steigung bei $\delta = 0$ besitzt.

Zusammenfassend gilt, dass das Problem der stabilen Synchronizität auf eine einfache diskrete Dynamik der Phasendifferenz der Feuerzeitpunkte abgebildet wird. Im nächsten Abschnitt wird ein ähnlicher Weg zur Erfassung der Synchronisation einer Gruppe von Oszillatoren in Anwesenheit von Rauschen besprochen. Dort treten zwei zusätzliche Annahmen auf:

1. Ein schwaches Kopplungsregime muss bestehen, d.h. die Linearität der Phasen-Antworten ist im Gegensatz zum klassischen deterministischen Fall mit zwei Oszillatoren erforderlich.
2. Abhängigkeiten zwischen den Phasen-Verschiebungen nachfolgender Perturbationen finden keine Berücksichtigung.

Letztgenannte Annahme verletzt die Standardtheorie der Phasen-Antwort, und es ist ein Hauptziel des ersten Teils der Arbeit aufzuzeigen, inwieweit diese Vereinfachung ungeachtet dessen zu validen Approximationen des Synchronizitätsgrades führt.

2.2.4 Theorie der Synchronisation in Anwesenheit von Rauschen

An dieser Stelle wird eine Methode vorgestellt, die das Synchronisationsverhalten einer Population von N puls-gekoppelten Oszillatoren, die un-

ter dem Einfluß unkorrelierter Rauschquellen η_n , mit $1 \leq n \leq N$ stehen, quantitativ anhand ihrer gemeinsamen PRC beschreibt.

Population von gekoppelten Oszillatoren

Hierbei werden N neuronale Oszillatoren durch synaptische Leitfähigkeiten homogen gekoppelt. Die Kopplung soll derart beschrieben werden, dass ein Spike zum Zeitpunkt t^* eine Perturbation $\frac{g}{N-1} \kappa(t - t^*)$ an jedem anderen Oszillator n hervorruft, der seinen letzten Puls zur Zeit $t_n^* < t^*$ emittiert hat. Der Kopplungskern κ kann als Zeitverlauf der synaptischen Leitfähigkeit interpretiert werden. Wichtig hierbei ist, dass die einzelne synaptische Kopplungsstärke $g/(N - 1)$ klein genug ist, damit die totale Kopplungsleitfähigkeit g an einem Oszillator nicht die Linearitätsbedingung der PRC verletzt.

Jeder einzelne Oszillator ist dem Einfluss einer perturbierenden Rauschquelle η_n ausgesetzt. Es wird angenommen, dass die Rauschquellen für die unterschiedlichen Oszillatoren unkorreliert sind (eine striktere Voraussetzung ist in Abschnitt 2.2.4 angegeben) und in ihrer perturbierenden Wirkung die Linearitätsannahme nicht verletzen. Aus Gründen der Anschaulichkeit wird der Definitionsbereich von η_n von der Einheit Zeit auf Kreiseinheiten übertragen, das Argument s von $\eta_n(s)$ wird ein Element aus dem Intervall $[0, 1)$. Anschaulich bedeutet dies, dass sich die Phase des Oszillators zyklisch über einen Kreisbogen der Länge 1 bewegt. Da das Rauschen im Allgemeinen auch über andere Mechanismen als die synaptische Kopplung auf die Zelle einwirken kann, wird zusätzlich eine PRC Φ_η eingeführt, die die rauschinduzierte Phasen-Antwort beschreibt.

Nimmt man an, dass N Oszillatoren jeweils einmal in einem bestimmten Zeitschritt feuern und t_n^* den Feuerzeitpunkt des n -ten Oszillator angibt, dann gilt für den mittleren Feuerzeitpunkt, $\bar{t} = N^{-1} \sum_{n=1}^N t_n^*$. In der Folge setzt man die absolute Zeit $\bar{t} = 0$, so dass die Feuerphasen $\tau_n = t_n^*/T(I)$ die Abweichungen von diesem ausgewiesenen Schwerpunkt

$\bar{t} = 0$ angeben.

Unter diesen Annahmen kann man die Abweichung τ_m^{next} des m -ten Oszillators im nächsten Zeitschritt bestimmen, indem man alle synaptischen (Φ) und rauschbedingten Perturbationen (Φ_η), die auf den Oszillator einwirken, einsammelt

$$\tau_m^{\text{next}} = \tau_m - \frac{g}{N-1} \sum_{n=1; n \neq m}^N \Phi(\tau_n - \tau_m) - \int_0^1 ds \Phi_\eta(s) \eta_m(s). \quad (2.6)$$

Offensichtlich lässt sich die Deviation τ_m^{next} des nachfolgenden Zeitschritts aus der vorangegangenen durch die lineare Superposition aller Perturbationen modifizierten Deviation τ_m ermitteln. Den ersten Beitrag zu diesen Störungen liefert die Summe, die sich aus dem verteilten Feuern der übrigen Oszillatoren ergibt. Der zweite Anteil an Gleichung (2.6), das Integral, addiert jene Rauscheingänge, die zu allen möglichen Phasen auf dem Oszillator eintreffen. Da die Verteilung der Deviationen τ_m und τ_m^{next} grundsätzlich voneinander verschieden sind, was nur dann der Fall sein kann, wenn die Periode länger oder kürzer als $T(I)$ ist, stellt der Rauschterm strenggenommen nur eine Approximation der tatsächlichen Periodendauer dar. In der gegenwärtigen Form nimmt die Gleichung implizit an, dass das Integral über die PRC invariant unter Variationen der Periodendauer $T(I)$ ist.

Ein zusätzlicher kritischer Punkt von Gleichung (2.6) ist, dass alle Wechselbeziehungen zwischen nachfolgenden Perturbationen keine Berücksichtigung finden. Dies ist gleichbedeutend damit, dass die Oszillatoren ihren letzten Feuerzeitpunkt, unabhängig von zwischenzeitlichen Perturbationen und induzierten Phasenverschiebungen, als zeitlichen Referenzwert für nachfolgende Stimuli im Gedächtnis behalten. Dies entspricht nicht den grundlegenden Forderung der Standard-Phasen-Theorie. Jedoch wird in Abschnitt 2.3.1 aufgezeigt, dass ungeachtet dieser Vereinfachung mit ausreichender Präzision das kollektive Verhalten von Hodgkin-Huxley-Modellneuronen in einem schwach-gekoppelten Regime beschrieben wer-

den kann.

In Anlehnung an die physiologische Situation nimmt man weiter an, dass die Anzahl N der Oszillatoren groß, die synaptische Kopplung jedoch schwach ist, so dass die Verteilung der Deviationen τ_m durch eine von-Mises-Verteilung approximierbar ist (kreisförmige Gauss-Funktion).

$$P_v(\tau) \propto \exp \left[\frac{\cos(2\pi \tau) - 1}{(2\pi)^2 v} \right], \quad (2.7)$$

in welcher v die Varianz der Deviationen beschreibt. Die Validität dieser Annahme wird a posteriori überprüft. Da die Abweichungen τ nach Konstruktion in Kreiseinheiten gemessen werden, kann die Summe in Gleichung (2.6) durch das Integral mit den Grenzen 0 und 1 ersetzt werden.

$$\begin{aligned} \sum_{n=1; n \neq m}^N \Phi(\tau_n - \tau_m) &\rightarrow (N-1) \int_{\tau_m}^{1+\tau_m} ds P_v(s) \Phi(s - \tau_m) \\ &= (N-1) \int_0^1 ds P_v(s + \tau_m) \Phi(s) \end{aligned} \quad (2.8)$$

Für geringe Standardabweichungen $\sqrt{v} \ll 1$ stellt Gleichung (2.7) eine gute Approximation einer Gauss-Funktion dar, die in der Folge den Berechnungen zugrunde gelegt wird. Für große \sqrt{v} ist die Verteilung eine $T(I)$ -periodisch modulierte uniforme Verteilung.

Zur Vereinfachung der Notationen ist es zweckmäßig, den Durchschnitt $\langle \dots \rangle_v$ bezüglich P_v einzuführen, d.h. für jede Funktion $f : [0, 1) \rightarrow \mathbb{R}$, definiert man

$$\langle f \rangle_v := \int_0^1 ds P_v(s) f(s). \quad (2.9)$$

Desweiteren wird die Abkürzung

$$\Psi_v(\tau) = \int_0^1 ds P_v(s + \tau) \Phi(s) \quad (2.10)$$

für die durch die Gesamtheit der Oszillatoren hervorgerufene Phasen-Antwort am Einzeloszillator eingeführt.

Kopplung moduliert die Oszillationsperiode

Nach dieser Vorarbeit wird es möglich, mithilfe der aktuellen, P_v -verteilten Deviationen, die mittlere Abweichung $\langle \tau^{\text{next}} \rangle_v$ der nächsten Spike-Generati-on zu ermitteln. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird das Rauschen dabei so gewählt, dass der Ensemble-Mittelwert verschwindet $\langle \eta \rangle_v = 0$ (vgl. Gleichung 2.8). Die Mittelwertbildung von Gleichung (2.6) ergibt

$$\langle \tau^{\text{next}} \rangle_v = -g \int_0^1 ds' P_v(s') \Psi_v(s') = -g \langle \Psi_v \rangle_v \quad (2.11)$$

da aufgrund des Ansatzes $\langle \tau \rangle_v = 0$ gilt. Die mittlere nachfolgende Devia-tion $\langle \tau^{\text{next}} \rangle_v$ ist im Allgemeinen ungleich null, so dass die mittlere Periode $T(I) [1 + \langle \tau^{\text{next}} \rangle_v]$ der Population ungleich der unperturbierten Periode $T(I)$ des einzelnen Oszillators ist. Wie aufgrund der linearen Theorie er-wartet, hängt die Modulation $\langle \tau^{\text{next}} \rangle_v = -g \langle \Psi_v \rangle_v$ der Periode linear von der Kopplungsstärke g ab.

Der restliche Teil dieses Abschnittes befasst sich mit der Fragestellung, wann ein stabiles oszillatorisches Regime im Sinne einer stabilen mittleren Populationsperiode *und* einer stabilen Varianz der Verteilung P_v existiert.

Vorbereitungen zur Einführung einer Mean-Field Dynamik

Wie oben schon erwähnt, moduliert die Pulskopplung nicht nur die mitt-lere Periodendauer sondern auch die Verteilung der Deviationen. Folglich unterliegt auch die Verteilung der Deviation einem dynamischen Prozess. Insbesondere gilt für die Varianz $\text{var}_v(\tau^{\text{next}}) = \langle (\tau^{\text{next}})^2 \rangle_v - \langle \tau^{\text{next}} \rangle_v^2$ der nachfolgenden Spike-Epoche, dass sie sich im Allgemeinen von der ak-tuellen Varianz $v = \langle \tau^2 \rangle_v$ unterscheidet. Die Berechnung von $\text{var}_v(\tau^{\text{next}})$ gestaltet sich wie folgt:

In einem ersten Schritt wird Gleichung (2.6) quadriert und der Durch-schnitt unter der Annahme, dass das Rauschen unkorreliert mit der De-

vation ist ($\langle \eta \tau \rangle_v = 0$), berechnet.

$$\begin{aligned} \langle (\tau^{\text{next}})^2 \rangle_v &= \langle [\tau - g \Psi_v(\tau)]^2 \rangle_v \\ &+ \int_0^1 ds' \Phi_\eta(s') \int_0^1 ds \Phi_\eta(s) \langle \eta(s) \eta(s') \rangle_v \end{aligned} \quad (2.12)$$

Anschließend erweitert man den ersten Term auf der rechten Seite von Gleichung (2.12)

$$\langle [\tau - g \Psi_v(\tau)]^2 \rangle_v = v - 2g \langle \tau \Psi_v(\tau) \rangle_v + g^2 \langle \Psi_v^2(\tau) \rangle_v. \quad (2.13)$$

Der $2g$ Term in der Mitte der rechten Seite von Gleichung (2.12) ist der wichtigste Teil der Mean-Field Dynamik, da er die Interaktion zwischen den Deviationen τ und der Phasen-Antwort-Kurve Φ vermittelt. Eine stabile Lösung kann nur dann auftreten, wenn die Phasen-Deviation τ und die Netzwerk-induzierte Verschiebung $\Psi_v(\tau)$ auf diese Deviationen korreliert sind, d.h. eine negative Deviation $\tau < 0$ - das Neuron feuert früher als der Populationsdurchschnitt - muss durchschnittlich zu einer Verlängerung der Periodendauer $\Psi_v(\tau) < 0$ führen et vice versa. Bis hierin stellt $\langle \tau \Psi_v \rangle_v > 0$ nur eine notwendige dar.

Einfluß des Rauschens

Im nächsten Schritt wird die Wirkung der identisch verteilten, unkorrelierten und stationären Rauschquellen η_n genauer untersucht. Ohne Einschränkung der Allgemeingültigkeit kann angenommen werden, dass die Rauschquellen η_n einen verschwindenden Ensemblemittelwert $\langle \eta \rangle_v = 0$ besitzt. Der Ensemblemittelwert ist vom Erwartungswert der Rauschverteilung, der mit $\langle \dots \rangle_\eta$ gekennzeichnet ist, zu unterscheiden. Offensichtlich gilt $\langle \eta_m \rangle_\eta = 0$, eine Tatsache die unmittelbar aus $\langle \eta \rangle_v = 0$ und der Annahme einer identischen Verteilung folgt. Entsprechend gilt für $\langle \eta_m(s) \eta_{m'}(s') \rangle_\eta = \delta_{mm'} C(s - s')$, wobei C die Autokorrelationsfunktion der Rauschquellen beschreibt. Verwendet man bspw. Gauss'sches weißes

Rauschen, so nimmt die Korrelationsfunktion C die Form einer Dirac'sche Deltafunktion an.

Zusammenfassend gilt für den Erwartungswert des zweiten Terms auf der rechten Seite von Gleichung (2.12)

$$\int_0^1 ds \int_0^1 ds' \Phi_\eta(s) \langle \eta(s) \eta(s') \rangle_{\eta,v} \Phi_\eta(s') = \int_0^1 ds \int_0^1 ds' \Phi_\eta(s) C(s-s') \Phi_\eta(s'). \quad (2.14)$$

Offensichtlich wirkt das Rauschen auf die Varianz der Deviationen über die Struktur der Autokorrelation C . In der hier gewählten Approximation hängt Gleichung (2.14) nicht von der Verteilung der Deviationen P_v ab. Folglich handelt es sich bei der Rausch-induzierten Varianz von Gleichung (2.14) um eine einfache Konstante, v^η .

Die Mean-Field Gleichung

Im folgenden werden die Gleichungen (2.11) bis (2.14) kombiniert und ein Ausdruck für die über das Rauschen gemittelte Varianz der Deviationen $\langle v^{\text{next}} \rangle_\eta := \langle \langle (\tau^{\text{next}} - \langle \tau^{\text{next}} \rangle_v)^2 \rangle_v \rangle_\eta$ hergeleitet:

$$\langle v^{\text{next}} \rangle_\eta = \langle v \rangle_\eta - 2g \langle \tau \Psi_v \rangle_v + g^2 \langle (\Psi_v - \langle \Psi_v \rangle_v)^2 \rangle_v + v^\eta \quad (2.15)$$

Gleichung (2.15) offenbart, dass im Durchschnitt die Varianz der Deviationen sowohl aufgrund des "externen" (v^η) als auch des "internen" ($\text{var}_{v_n}(\Psi) := \langle (\Psi_v - \langle \Psi_v \rangle_v)^2 \rangle_v$) Rauschens zunimmt und nur dann reduziert werden kann, wenn τ und $\Psi_v(\tau)$ positiv korreliert sind. Es ist zu erwarten, dass je stärker diese Korrelation ist, desto robuster die Synchronisation gegen externe Rauschquellen η ist.

Iterierte Abbildungen

Aus den Gleichungen (2.11) und (2.15) kann man eine zweidimensionale iterierte Abbildung für die Entwicklung von Periodenlänge und Varianz

der Deviationen konstruieren. Hierzu kennzeichnet man die mittlere Varianz der n -ten Spike-Epoche mit v_n und die mittlere Periodendauer mit T_n und gelangt damit zu folgender Gleichung:

$$T_{n+1} = T(I) [1 - \langle \Psi_{v_n} \rangle_{v_n}] \quad (2.16)$$

$$v_{n+1} = v_n - 2g \langle \tau \Psi_{v_n} \rangle_{v_n} + g^2 \text{var}_{v_n}(\Psi_{v_n}) + v^n \quad (2.17)$$

In der hier dargestellten Approximation hängen die Variablen (T_{n+1}, v_{n+1}) des nächsten Iterationsschrittes nicht von der Periode T_n des gegenwärtigen Iterationsschrittes ab. Die Frage nach der Synchronisation reduziert sich deshalb auf die Stabilitätsanalyse der eindimensionalen iterierten Abbildung (2.17) der Varianzen der Deviationen.

2.2.5 Kriterien zur Synchronisation

Wie im letzten Abschnitt gesehen, reduziert sich die Frage, ob die Oszillatoren synchronisieren können, auf die Stabilität eines Fixpunkts der eindimensionalen iterierten Abbildung (2.17). Bevor hierzu eine numerische Analyse durchgeführt wird, tritt an diese Stelle zuerst eine allgemeine Analyse dieser Abbildung. Hierzu wird Gleichung (2.17) mit $v_{n+1} = F(v_n)$ abgekürzt und F wie folgt umformuliert:

$$F(v) = v + G(v) + v^n, \quad (2.18)$$

mit

$$G(v) = -2g \langle \tau \Psi_v \rangle_v + g^2 \text{var}_v(\Psi_v).$$

Für die Fixpunkte $v^* = F(v^*)$ gilt

$$G(v^*) = -v^{*n} \quad (2.19)$$

Nun wird unmittelbar ersichtlich, dass genau dann ein Fixpunkt existiert, wenn G einen negativen Wert annimmt. Darüberhinaus muss das Minimum von G mindestens so klein sein wie das Negative der Rausch-induzierten Varianz v^n ; vgl. Abbildung 2.4A and B.

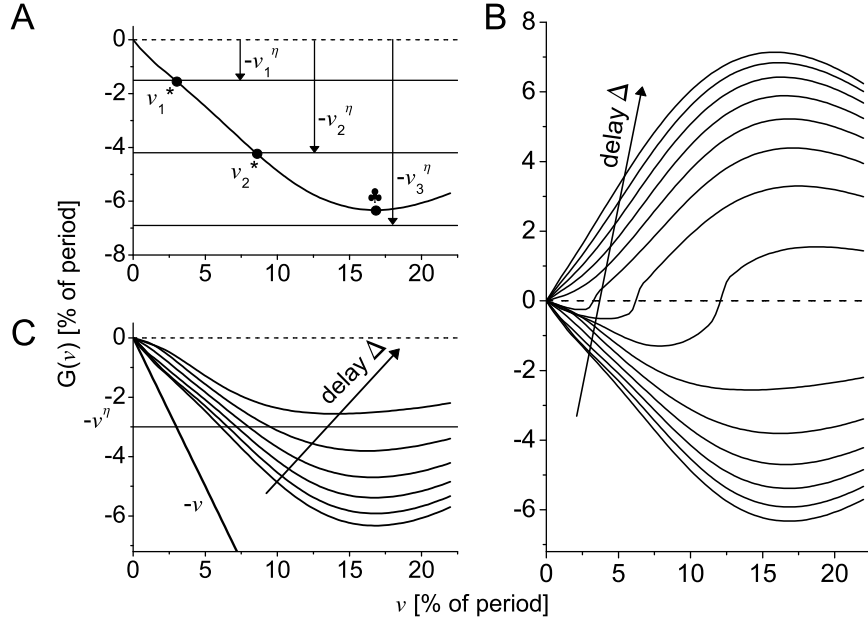


Abbildung 2.4: Stabile Fixpunkte v^* der Varianz der Spikezeit-Deviationen. (A) Die Fixpunkt-Bedingung von Gleichung (2.19) kann durch den Schnittpunkt von $G(v)$ (Graph) mit einer horizontalen Linie auf der Höhe der negativen, durch das externe Rauschen induzierten Varianz $-v^\eta$ illustriert werden. Damit ein Fixpunkt stabil ist, muss G im Schnittpunkt eine negative Steigung besitzen. Je größer das externe Rauschen dabei ist, umso größer ist die Fixpunkt-Varianz (vgl. $v_{1/2}^\eta$). Für Rauschpegel (z.B. v_3^η) größer als das Maximum von $-G$ (Kreuz) existiert kein Schnittpunkt, und die Population ist desynchronisiert. In dieser Abbildung wurde die Funktion G für die PRC eines exzitatorisch-gekoppelten Typ-II-Oszillators ermittelt. Die Spezifikation des Oszillators stammt von Acker *et al.* (2003) und ist in Appendix A detailliert wiedergegeben. (B) In Abhängigkeit der Zell- und Netzwerk-Parameter kann das Minimum von G sich zu positiven Werten verlagern und sogar verschwinden. Als Beispiel wurde die interneuronale Transmissionsverzögerung Δ von 0 auf 0.26 in 0.02 Schritten variiert; siehe Appendix A.2. (C) Die Ableitung von G am stabilen Fixpunkt ist eine ansteigende Funktion von v und nimmt Werte zwischen -1 (solide gerade Linie) und 0 an (Kurven aus (B) entnommen).

Eine Stabilitätsanalyse erfordert die Bestimmung der Ableitung von F am Fixpunkt, welche einen Absolutwert kleiner als eins aufweisen muss. Für die Ableitung von G bedeutet dies nach Konstruktion

$$-2 < \left. \frac{d}{dv} G \right|_{v=v^*} < 0. \quad (2.20)$$

Die untere Grenze von -2 für die Ableitung von G ist weniger restriktiv in dem Sinne, als dass G und damit auch seine Ableitung auf einen beliebig kleinen Wert durch Verminderung der Kopplungsstärke g reduziert werden können. Darüberhinaus gilt, dass durch die Bedingung $G(0) = 0$ und damit für verschwindenes Rauschen $v^n = 0$ der Oszillator immer synchronisieren kann, wenn $\left. \frac{d}{dv} G \right|_{v=0} < 0$. Im bei Abbildung 2.4C gezeigten Beispiel ist die Ableitung von G am stabilen Fixpunkt eine ansteigende Funktion von v^* und nimmt Werte zwischen -1 und 0 an. Aus der Theorie der iterierten Abbildung weiß man, dass ein solcher stabiler Fixpunkt nicht-oszillatorisch ist (s.o.).

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Evaluation des Mean-Field Ansatzes

In diesem Abschnitt wird die Vorhersagekraft der Theorie anhand einer numerischen Simulation eines aus Hodgkin-Huxley-Neuronen aufgebauten Netzwerks untersucht. Dabei werden sowohl ihre Anwendbarkeit als auch bestehende Einschränkungen in der Vorhersage der Synchronizität für verschiedene Rauschlevel diskutiert. Das Netzwerk besteht aus 500 vollvernetzten Modellneuronen einer Schicht-II Sternzelle des entorhinalen Cortex und wurde ursprünglich von Acker *et al.* (2003) (siehe Appendix A) entwickelt. Die synaptische Kopplung ist über eine exponentiell abfallende Leitfähigkeit modelliert, d.h. ein Spike zum Zeitpunkt $t = 0$ ruft eine Leitfähigkeitsänderung $g_{\text{syn}} \exp[-(t - \Delta)/\tau_{\text{syn}}] \mathcal{H}(t - \Delta)$ hervor, mit der Heavisidefunktion $\mathcal{H}(x) = 1$ für $x \geq 0$ und $\mathcal{H}(x) = 0$ sonst (siehe Appendix. A.2 für weitere Details). Die synaptische Leitfähigkeit ist

um eine interneuronale Zeitverzögerung Δ verschoben, welche die axonale und synaptisch-induzierte zeitliche Verzögerung in der Signalübertragung modelliert.

Das Nervenzellmodell zeigt als Funktion der Leitfähigkeit des h-Stroms ein Typ-I (h-Strom inaktiviert) oder ein Typ-II (h-Strom aktiviert) Oszillatorverhalten.

In Figur 2.5 werden die Fixpunkte der theoretischen Vorhersage $\sqrt{v^*}$ mit denen der numerischen Simulation $\sigma_\tau^{(\infty)}$ als Funktion des Rauschlevels für unterschiedliche interneuronale Verzögerungen Δ verglichen. Der genaue Wert der interneuronalen Verzögerung wurde dabei so gewählt, dass eine Synchronisation möglich ist. In Übereinstimmung mit der deterministischen Theorie der Phasen-Antwort, liegen diese Werte in Regionen der synaptischen Phasen-Antwort-Kurve, die eine negative Steigung besitzen (vgl. Goel & Ermentrout, 2002).

Die theoretischen Vorhersagen reproduzieren sehr gut die Simulationsergebnisse, vor allem in der mit einem geringen Rauschpegel einhergehenden linearen Region. Bei höheren Rauschleveln und für Spike-Jittern in der Übergangsregion kann die Genauigkeit der Prädiktion abnehmen. Dieses Problem wird in Abschnitt 2.3.1 näher untersucht.

Wenn das Rauschniveau einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, liefert die Theorie keinen stabilen Fixpunkt mehr. An dieser Stelle sagt die Theorie einen maximalen Spike-Jitter $\sqrt{v^*}$ von rund 16% der unperturbierten Periodenlänge voraus, ein Wert, unabhängig von Oszillator-Typ und Kopplung. Simulationen liefern konsistente Ergebnisse für einen Spike-Jitter unterhalb von $\sigma_\tau^{(\infty)} = 16\%$, jedoch finden sich hier stabile Oszillationen auch bei höherer Werten, die nicht von der Theorie erfasst werden können. Diese schwach-synchronen Oszillationen treten in einem sehr begrenzten Rauschbereich auf, der in Figur 2.3C als Übergangsregion klassifiziert wurde.

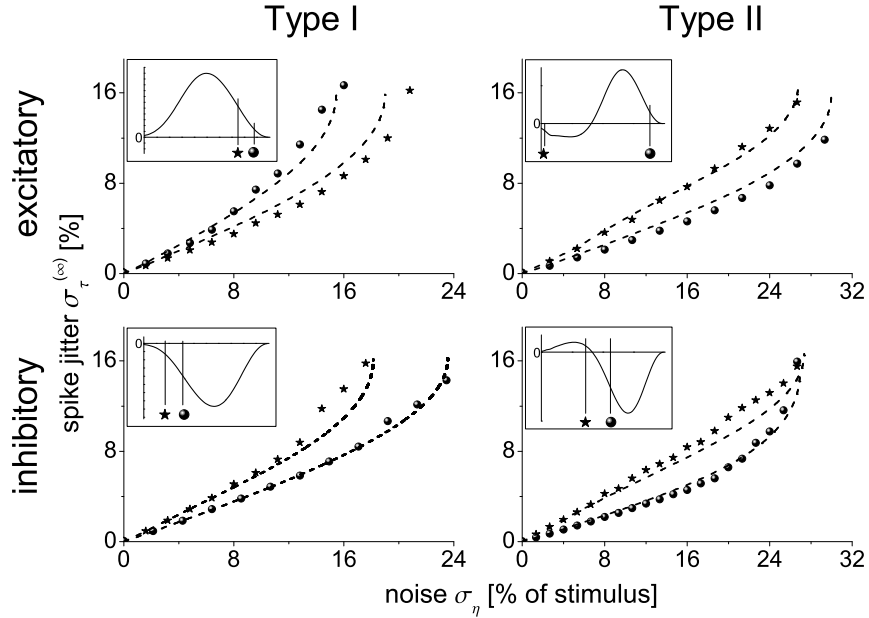


Abbildung 2.5: Simulation versus Theorie. Die Fixpunkte der theoretischen Vorhersage $\sqrt{v^*}$ (gestrichelte Linie) werden mit den Spike-Jittern $\sigma_\tau^{(\infty)}$ der numerischen Simulation (Symbole) von 500 neuronalen Typ-I und Typ-II Oszillatoren verglichen. Die theoretischen Vorhersagen reproduzieren die Simulationsergebnisse sehr in der linearen Region. Für den Spike-Jitter innerhalb der Übergangsregion kann die Prädiktion für einige interneuronale Transmissionsverzögerungen weniger akkurat sein. Die Simulationen starten mit einem vollständig desynchronisierten Netzwerk. Exzitatorische und inhibitorische Kopplungsregime sind mit einem exponentiellen Kopplungskern modelliert, der eine Abklingkonstante von 5 ms und ein Umkehrpotential von $E_E = 0$ mV bzw. $E_I = -80$ mV besitzt. In jedem Diagramm sind die Spike-Jitter für jeweils zwei Delays (Symbole und vertikale Linien in den Einfügebildern) gezeigt. Die Einfügebilder zeigen die PRC für den jeweiligen Oszillator und das dazugehörige Kopplungsregime. Die PRCs wurden mithilfe eines Teststimulus generiert, der die Leitfähigkeitsänderung an einer Zelle durch ein perfekt synchronisiertes Netzwerk initiiert. Die jeweiligen Leitfähigkeitsamplituden betragen $2.5 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$ (I-exc), $3.75 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$ (I-inh, II-exc) und $7.5 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$ (II-inh). Die Rausch-PRCs (nicht gezeigt) wurden durch einen rechteckigen Leitfähigkeitspuls der Dauer 1 ms erzeugt. Rauschamplituden σ_η messen das relative Verhältnis zwischen dem Integral über den Rauschleitfähigkeits-Puls und dem zur Generierung der synaptischen PRC herangezogenen Teststimulus.

Validität der Annahme der Spike-Count-Erhaltung

Die theoretische Vorhersage kann die reale Qualität der Synchronität überschätzen, wie z.B. durch die Sterne im linken unteren Graphen von Figur 2.5 gezeigt ist. Um den Grund hierfür aufzudecken, betrachtet man den korrespondierenden Spike-Rasterplot für einen Rauschlevel von $\sigma_\eta = 9\%$ (Fig. 2.6). Hier kann man einzelne Neurone beobachten, die das Gros der Feuerphasen in Richtung späterer Phasen verlassen, um nach einigen Zeitschritten dieses aus Richtung der früheren Phasen wieder zu erreichen.

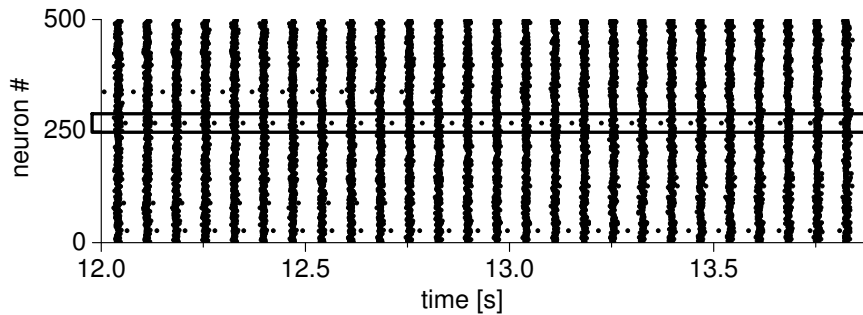


Abbildung 2.6: Einschränkung der Spike-Count-Erhaltung. Der Rasterplot zeigt die Aktionspotentiale von 500 inhibitorisch vernetzten Typ-I-Neuronen mit einem interneuronalen Delay Δ von 14% und einem Rauschpegel von $\sigma_\eta = 9\%$. Einige Neurone (siehe z.B. jenes im mittleren markierten Bereich) verlassen das Gros der übrigen Neurone in Richtung später auftretender Feuerphasen, um, nach einigen Zeitschritten, dieses wieder aus der entgegengesetzten Richtung zu erreichen. Phänomene der Phasenpräzession bzw. -rezession treten sehr leicht bei niedriger Synchronisation auf.

Als Konsequenz daraus feuern die abschweifende Neurone in diesem Zeitraum ein Aktionspotential weniger als die übrigen Neurone, was zur Einschränkung der Annahme führt, dass jedes Neuron exakt einmal pro Zyklus feuert. Da die entwickelte Theorie auf dieser Annahme basiert, wird der Effekt der abweichenden Neurone nicht erfasst und eine höhere Synchronisation als tatsächlich existent vorhergesagt. In Ergänzung zu jenem Fall, der in Figur 2.6 dokumentiert ist, können Neurone auch das Gros der Feuerphase in Richtung früherer Phasen verlassen. In diesem Fall feuern die abweichenden Neurone ein Aktionspotential mehr als die

übrigen Neurone.

An dieser Stelle wird ein Kriterium zur Überprüfung der Spike-Count-Erhaltung eingeführt. Hierzu wird zu Beginn die im folgenden Zeitschritt zu erwartende Phasen-Abweichung $\tau^{\text{next}}(\tau)$ eines einzelnen, um τ abweichenden Neurons bei einer *festen* Verteilung P_{v^*} der Feuerphasen des Gros der Neurone berechnet. Die zugehörige iterierte Abbildung liest sich wie folgt:

$$\tau^{\text{next}}(\tau) = \tau + \Delta\tau(\tau) \quad (2.21)$$

mit

$$\Delta\tau(\tau) = \int_0^1 dx \Phi(x - \tau + \Delta) P_{v^*}(x) - \langle \tau^{\text{next}} \rangle_{v^*}. \quad (2.22)$$

Der Fixpunkt τ^* von Gleichung (2.21) wird über $0 = \Delta\tau(\tau^*)$ bestimmt und im Hinblick auf ein Anwachsen der individuellen Neurondeviation auf *Instabilität* überprüft, d.h.,

$$\left. \frac{d}{d\tau} \Delta\tau \right|_{\tau=\tau^*} < -2 \quad \text{or} \quad \left. \frac{d}{d\tau} \Delta\tau \right|_{\tau=\tau^*} > 0. \quad (2.23)$$

Aufgrund des schwachen Kopplungsregimes ist die Änderung $\Delta\tau$ im Vergleich zur Deviation τ so gering, dass nur die letztgenannte Bedingung von Relevanz ist. In Figure 2.7A sind zwei typische Fälle gezeigt, bei denen die iterierte Abbildung genau einen instabilen Fixpunkt $\tau^* = \tau^{\text{out}}$ aufweist.

Der instabile Fixpunkt τ^{out} fungiert als Grenze des zur Hauptphase $\tau = 0$ gehörenden Attraktorbeckens.

Zwei Fälle können hierbei unterschieden werden:

Erstens, wenn $\tau^{\text{out}} < 0$, erstreckt sich das Attraktorbecken von τ^{out} nach 0.5. Zweitens, wenn $\tau^{\text{out}} > 0$, ist das Attraktorbecken das Intervall zwischen -0.5 und τ^{out} . Wenn ein Neuron eine Phasen-Abweichung besitzt, die außerhalb des Attraktorbeckens zu liegen kommt, dann vergrößert sich dessen Deviation konsekutiv, um nach einigen Zeitschritten wieder die Hauptphase von der anderen Seite her zu erreichen. Für den Fall $\tau^{\text{out}} < 0$, verlagert das Neuron seine Spikezeit konsekutiv nach vorne

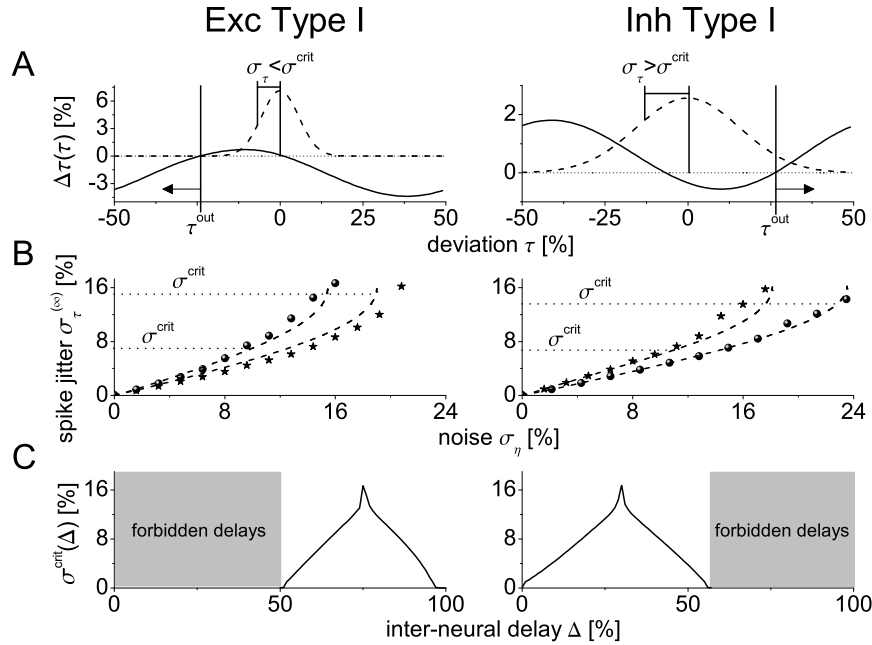


Abbildung 2.7: Test zur Spike-Count-Erhaltung. (A) Die Phasenänderung $\Delta\tau$ [durchgezogene Linie; siehe Gleichung (2.22)] eines Typ-I Neurons ist als Funktion der neuronalen Deviation τ im vorausgegangenen Zeitschritt bei einer gegebenen steady-state Verteilung P_{v^*} (gestrichelte Linie) gezeichnet. Auf der linken Seite ist $\Delta\tau$ für exzitatorische, auf der rechten Seite für inhibitorische Kopplungsregime dargestellt. Der Graph von $\Delta\tau$ teilt die Abszisse auf Höhe des instabilen Fixpunktes τ^{out} in ein Attraktorbecken und eine Region der Instabilität. Liegt die Standard-Abweichung des steady-state Spike-Jitters σ_τ unterhalb eines kritischen Wertes σ^{crit} , ist der Anteil r^{unstable} der Neurone mit einer instabilen Phasen-Deviation vernachlässigbar klein, und die Erhaltungsannahme kann aufrechterhalten werden (links). Ist jedoch σ_τ größer als σ^{crit} , dann bleibt die Anzahl der Spikes während eines Zeitschrittes nicht erhalten (rechts). (B) Darstellung der Graphen der linken Spalte von Figur 2.5. Die gestrichelten horizontalen Linien zeigen das Maximum des Spike-Jitters an, für das die Theorie noch zulässige Ergebnisse liefert. Hieraus wird eine Schwelle $r^{\text{unstable}} = 10^{-4}$ ermittelt (siehe Text). (C) Für einen gegebenen Wert von $r^{\text{unstable}} = 10^{-4}$ erreicht die kritische Standardabweichung σ^{crit} ihr Maximum für Delays, an denen die PRC eine negative Steigung besitzt.

(siehe Abbildungen 2.6 und 2.7 links), umgekehrt, für $\tau^{\text{out}} > 0$ verzögert das Neuron sein Feuern (siehe 2.7 rechts).

Im nun folgenden Schritt wird eine kritische Standardabweichung σ^{crit} eingeführt, so dass für den Fall $\sqrt{v^*} > \sigma^{\text{crit}}$ die steady-state Verteilung P_{v^*} einen signifikanten Anteil

$$r^{\text{unstable}} = 1 - \int_{\text{stable}} d\tau P_{v^*}(\tau)$$

besitzt, der außerhalb des Attraktorbeckens liegt (Abbildung 2.7A rechts). Wenn der steady-state Spike-Jitter σ_τ unterhalb eines kritischen Wertes σ^{crit} liegt, dann ist die Fraktion jener Neurone mit einer instabilen Phasen-Deviation vernachlässigbar klein, und die Spike-Count-Erhaltungsannahme kann als wahr angenommen werden (Abbildung 2.7A links).

Das Schwellenkriterium r^{unstable} wird numerisch durch Schätzung des maximalen Spike-Jitters σ^{crit} bestimmt, bei dem die theoretische Vorhersage in Abbildung 2.7b noch Gültigkeit besitzt. Im hier vorliegenden Fall ist dies der Wert $r^{\text{unstable}} = 10^{-4}$. Für dieses Kriterium $r^{\text{unstable}} = 10^{-4}$ gibt Abbildung 2.7C den kritischen Spike-Jitter σ^{crit} als Funktion des interneuronalen Delays Δ an. Für Delays, an denen die Phasen-Antwort-Kurve eine positive Steigung besitzt, verschwindet der kritische Jitter σ^{crit} . Im Gegensatz dazu ist der kritische Jitter σ^{crit} groß für Delays, an denen die PRC eine stark negative Ableitung besitzt.

Verlassen des linearen Regimes

In diesem Abschnitt werden die Konsequenzen bei Verlassen des schwachen Kopplungsregime durch Erhöhung der synaptischen Leitfähigkeit untersucht. Hierzu wird die Kopplungsstärke derart adjustiert, dass die PRC Φ_1 die Linearitätsbedingung partiell verletzt. Diese abschnittsweise Nicht-linearität ist in Abbildung 2.8A durch den Vergleich der Original-PRC Φ_1 mit einer reskalierten PRC $\Phi_{1/2}$ dargestellt. Letztgenannte PRC wurde mithilfe einer halbierten Stimulusamplitude gewonnen. Unterschiede

zwischen beiden Kurven repräsentieren jene Phasen-Delays, bei denen die Linearitätsbedingung verletzt wird. Wie in Abbildung 2.8A dargestellt, ist das Regime am Anfang der Periode, im negativen Bereich der PRC, linear, um in der zweiten Hälfte in das nichtlineare Regime der PRC überzugehen. Um die Auswirkung dieser Nichtlinearität auf die Vorhersagegüte der Theorie zu überprüfen, werden die Vorhersagen für interneuronale Delays in der linearen (Stern) und nichtlinearen (Ball) Phasenregion mit Simulationsergebnissen verglichen; vgl. Abbildung 2.8B.

Die Vorhersage (gestrichelte Linie) des Spike-Jitters $\sigma_\tau^{(\infty)}$ ist nahezu exakt für den linearen Fall, wohingegen die Theorie im nichtlinearen Fall die Qualität der Synchronisation systematisch unterschätzt (Abbildung 2.8B). Ursächlich hierfür ist die stärkere Steigung im Bereich der nichtlinearen Phasen von $2\Phi_{1/2}$ im Vergleich zur PRC Φ_1 , die zur theoretischen Vorhersage verwendet wird. Allgemein gilt, dass ein Neuron umso besser dem perturbierenden Rauschen entgegenspielen kann und damit eine bessere Synchronität erreichen kann, je steiler die Steigung um den interneuronalen Delay ist (vgl. Gleichung 2.15: Je stärker die positive Korrelation zwischen τ und $\Psi_v(\tau)$ ist, desto robuster ist die Synchronisation gegen externes Rauschen). Trotz dieser quantitativen Ungenauigkeit in der Vorhersage sind die Ergebnisse von Simulation und Theorie in Abbildung 2.8B qualitativ gleich. Für geringfügige Nichtlinearitäten erwartet man daher nur quantitative Abweichungen vom realen Wert.

In Abbildung 2.8A ist zusätzlich die Größe des Fehlers aufgezeigt, der durch die Differenz beider PRCs hervorgerufen wird. Zu diesem Zweck wird die Differenz $2\Phi_{1/2} - \Phi_1$ mit einer festen Phasenverteilung P_{v^*} multipliziert; letztere um den gewählten interneuronalen Delay zentriert. Im Gegensatz zum in der linearen Phase positionierten Delay generiert jener in der nichtlinearen Phase einen signifikanten Fehler, illustriert durch die schattierte Region in Abbildung 2.8A.

Zusammenfassend gilt, dass die Erweiterung der Phasen-Antwort-Theorie

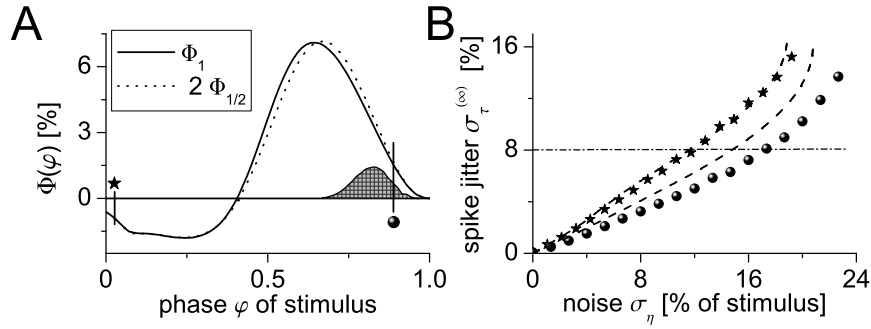


Abbildung 2.8: Lineares versus nichtlineares Regime. (A) Zwei PRCs eines Typ-II-Oszillators (Abb. 2.5), die für Stimuli mit einer Amplitude von $7.5 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$ für Φ_1 und $3.75 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$ für $\Phi_{1/2}$ (gestrichelte Linie) ermittelt wurden. Die Kopplungsstärke ist dabei so adjustiert, dass die PRC Φ_1 partiell die Linearitätsbedingung verletzt, wie anhand des Vergleichs mit $2\Phi_{1/2}$ zu erkennen ist. Symbole und vertikale Linien repräsentieren zwei interneuronale Delays, die in der linearen (Stern) und nichtlinearen (Ball) Region zu liegen kommen. Das schattierte Areal illustriert den Unterschied zwischen beiden PRCs, multipliziert mit der Spike-Phasen-Verteilung P_{v^*} für einen festen Jitter $\sigma_\tau^{(\infty)}$ von 8% [horizontale Linie in (B)]. Nur jener Delay, der im nichtlinearen Bereich lokalisiert ist, generiert einen signifikanten Fehler. (B) Die Vorhersage (gestrichelte Linie) des Spike-Jitters $\sigma_\tau^{(\infty)}$ ist nahezu perfekt für den linearen Fall, wohingegen die Theorie im nichtlinearen Fall die Qualität der Synchronisation systematisch unterschätzt.

präzise Vorhersagen bezüglich der Stabilität und Robustheit der Synchronisation einer Population von neuronalen Oszillatoren vom Hodgkin-Huxley-Typ zulässt. Die Theorie basiert auf der Messung einer PRC eines einzelnen Neurons und funktioniert für Typ-I & II Oszillatoren, genauso wie für inhibitorische und exzitatorische Kopplungsregime. Darüberhinaus wurden zwei Kriterien zur Überprüfung der Validität der Vorhersage hergeleitet. Es wichtig zu erwähnen, dass beide Kriterien keine zusätzlichen Informationsquellen benötigen, sondern vollständig aus der vorliegenden PRC abzuleiten sind.

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Theorie auf die Sternzelle des entorhinalen Cortex angewandt. Von diesem Zelltyp liegen experimentell gemessene PRCs vor. Die Theorie liefert Aussagen über die Synchronisation in Abhängigkeit von Dynamik und Polarität des jeweiligen Kopplungs-

regimes und des Rauschlevels.

2.3.2 Wie der zeitliche Verlauf der synaptischen Kopplung die Synchronisation beeinflusst

An dieser Stelle wird die Mean-Field Theorie von Gleichung (2.17) auf biologische Neurone angewandt. Das Ziel ist es, die Robustheit der Synchronisation von entorhinalen Schicht-II Sternzellen, die im ϑ -Frequenzbereich Spikes emittieren, zu bestimmen. Die Oszillationen werden dabei für unterschiedliche Kopplungsregime und Rauschlevel analysiert.

Die theoretische Vorhersage basiert auf den von Netoff *et al.* (2005) experimentell gemessenen Phasen-Antwort-Kurve (siehe Appendix B). Um die synaptische Phasen-Antwort Kurve Φ_{syn} einer Sternzelle, die mit einer Frequenz von 10 Hz oszilliert, zu ermitteln, wandten die Autoren die Dynamic-Clamp-Messtechnik an. Dabei wird der Zeitverlauf der virtuellen exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Leitfähigkeit durch die Funktion $w(x) = g[\exp(-x/\tau_d) - \exp(-x/\tau_r)] \mathcal{H}(x)$ modelliert, wobei g die synaptische Leitfähigkeitsamplitude, τ_d und τ_r die Abkling- bzw. Anstiegskonstante des synaptischen Kerns sind. Die Zeitkonstanten wurden dabei so gewählt, dass sie möglichst exakt die durch eine somanahe Synapse induzierten Leitfähigkeitsänderung imitieren. Entsprechend dem Sternzellmodell mit aktiviertem h-Strom von Abschnitt 2.3.1 und wie in Abbildung 2.9A gezeigt, sind die gemessenen exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Phasen-Antwort-Kurven beide vom Typ-II.

Zusätzlich zur synaptischen PRC Φ_{syn} wird noch eine Rausch-PRC Φ_{η} eingeführt, welche die rauschinduzierte Perturbation der Oszillationsperiode quantisiert. Folglich werden alle Perturbationen, die aus der Synapsen vermittelten Aktivität des Netzwerks herrühren, durch Φ_{syn} erfasst, wohingegen der phasenverschiebende Effekt von Rauschen durch Φ_{η} charakterisiert ist. Beide Kurven sind identisch unter der Annahme, daß das Rauschen ebenfalls synaptisch erzeugt wird.

Nimmt man an, dass das Rauschen von Gauss'cher Art ist und von

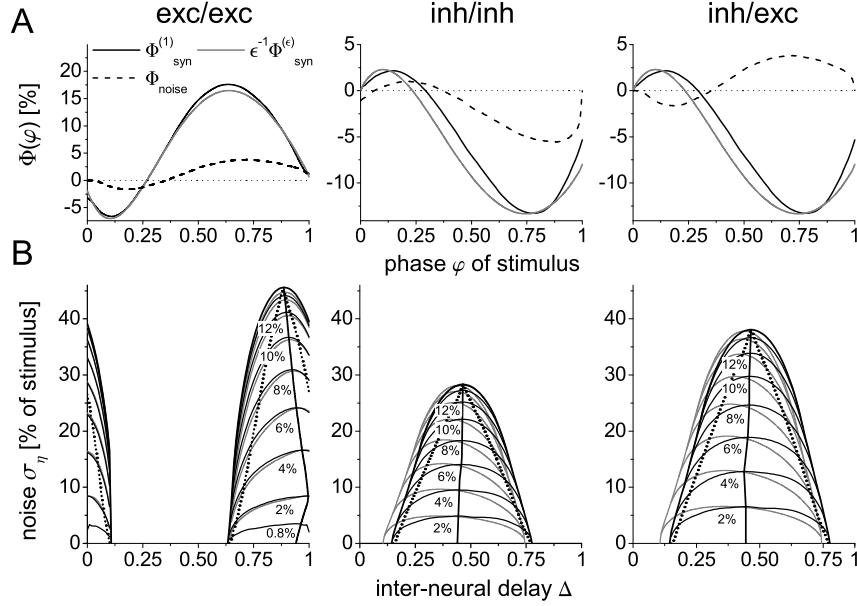


Abbildung 2.9: Regionen der Synchronisation. (A) Die synaptischen PRCs Φ_{syn} (durchgezogene Linien) der MEC-Sternzelle wurden von Netoff *et al.* (2005) mithilfe von Dynamic-Clamp Messungen erfasst. Die Periodenlänge beträgt 100 ms. Die exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Leitfähigkeiten (EPSPs und IPSPs) besitzen eine Amplitude von $g = 1$ nS. Die EPSP Anstiegs- und Abklingkonstanten betragen $\tau_r = 1.68$ ms und $\tau_d = 6.5$ ms. Für die IPSP wählten Netoff *et al.* (2005) $\tau_r = 2.5$ ms und $\tau_d = 5$ ms. Die Rausch-PRCs Φ_{η} (gestrichelte Linien) sind von Φ_{syn} durch die Dekonvolution mit dem inversen Kern u von Gleichung (2.24) abgeleitet. Die grauen Linien zeigen eine andere Zusammenstellung von PRCs, die von Netoff *et al.* durch einen Teststimulus mit um den Faktor $1/\epsilon = 1/0.562$ reduzierten Amplitudenwerten erzeugt wurden. An dieser Stelle werden drei unterschiedliche Regime (Säulen), die mit “Kopplung/Rauschen” charakterisiert sind, untersucht. (B) Für gegebene Steady-state Spike-Jitter $\sigma_{\tau}^{(\infty)}$ sind die Iso-Jitter Linien in der (Δ, σ_{η}) -Ebene eingezeichnet. Für ein exzitatorisches Kopplungsregime (linke Spalte) finden sich Regionen der Synchronisation für sehr kurze und sehr lange Delays. Für inhibitorische Kopplungsregime (mittlere & rechte Spalte) bedeckt das Delay-Intervall der Synchronisation mittellange Delays. Synchronisation ist robuster gegenüber Rauschen, welches über exzitatorische Kanäle (rechts) vermittelt wird im Vergleich zu inhibitorischem Rauschen (Mitte). Die dicken Linien zeigen den jeweils optimalen Delay an, an dem für ein gegebenes externes Rauschlevel der geringste Spike-Jitter sich ausbildet. Die grauen Kurven sind die Isokonturlinien für $\Phi_{\text{syn}}^{(\epsilon)}$. Jene Regionen, für die die Spike-Count-Erhaltungsannahme (Abschnitt 2.3.1) zutrifft, sind mit gepunkteten Linien dargestellt.

Kanälen herrührt, die das gleiche Umkehrpotential wie eine exzitatorische resp. inhibitorische Synapse besitzen, dann kann die Rausch-PRC Φ_η von der korrespondierenden synaptischen, Φ_{syn} , durch Dekonvolution mit dem inversen synaptischen Kern ermittelt werden:

$$u = [\delta - (\tau_r + \tau_d)\delta' + \tau_r\tau_d\delta''] , \quad (2.24)$$

wobei δ für die Dirac- δ -Verteilung und δ' , δ'' für ihre erste und zweite Ableitung stehen. Die resultierende PRC ist in Abbildung 2.9A als gestrichelte Linie dargestellt.

In Übereinstimmung mit Abschnitt 2.3.1 wurde die Funktion u dabei so gewählt, dass die Amplitudenwerte σ_η das Rauschen relativ zum Integral des Leitfähigkeitsstimulus w messen, welcher ursprünglich zur Bestimmung der synaptischen PRC Φ_{syn} verwendet wurde.

Regionen der Synchronisation

Die Phasen-Antwort-Kurven ermöglichen die Analyse der Robustheit der Synchronisation in einem exzitatorischen und inhibitorischen Kopplungsregime. Für ein gegebenes Rauschlevel σ_η illustriert Abbildung 2.9B den Effekt des interneuronalen Transmissionsdelay Δ auf den resultierenden steady-state Spike-Jitter $\sigma_\tau^{(\infty)} = \sqrt{v_\infty}$. Mithilfe der Mean-Field Gleichung (2.17) werden jene Regionen in der (Δ, σ_η) -Ebene bestimmt, in denen $\sigma_\tau^{(\infty)}$ unterhalb eines festgelegten Wertes liegt. Die Grenzen dieser Regionen gleichen in ihrem Verlauf auf den Kopf gestellten Parabeln. Für jeden gegebenen Wert von Δ ist der Spike-Jitter $\sigma_\tau^{(\infty)}$ eine monoton ansteigende Funktion des Rauschlevels σ_η . Der optimale Delay, unter dem die Synchronisation bei gegebenen Spike-Jitter am robustesten gegenüber Rauschen ist, wird durch das Maximum der Iso- $\sigma_\tau^{(\infty)}$ Kurve angegeben. Folglich hängt die Robustheit der Synchronisation sowohl vom interneuronalen Delay als auch vom erwünschten maximalen Spike-Jitter ab.

Entsprechend der deterministischen Theorie der Phasen-Antwort sind die Delays, bei denen die Neurone synchronisieren können, in jenen Ab-

schnitten der synaptischen Phasen-Antwort-Kurve zu finden, die eine negative Steigung aufweisen (vgl. Goel & Ermentrout, 2002). Dementsprechend synchronisiert die exzitatorisch-verknüpfte Sternzelle bei interneuronalen Delays zu Beginn ($\Delta < 0.1$) und innerhalb des letzten Drittels der Periode ($\Delta > 0.63$), wohingegen im inhibitorischen Fall der Delay im Bereich von 0.13 bis 0.78 zu liegen hat (Fig. 2.9B). Folglich kann nur eine exzitatorisch-verknüpfte Sternzelle bei einem biophysikalisch plausiblen interneuronalen Delay (< 6 ms) im ϑ -Rhythmus ($T(I) \approx 110$ ms) synchronisieren. Für die experimentell gemessenen PRCs erstrecken sich die Synchronisationsregionen im Falle einer exzitatorischen Verknüpfung über 47% der Periode, im Falle einer inhibitorischen über 65% der Periode. Zusammenfassend gilt also, dass die inhibitorisch-verknüpfte Sternzelle eine größere Region von interneuronalen Delays besitzt, in denen eine stabile Synchronisation prinzipiell möglich ist.

Der maximale Rauschlevel, der noch eine stabile Synchronisation ermöglicht, beträgt im Falle der exzitatorischen Kopplung unter exzitatorischem Rauschen 45.8% der maximalen synaptischen Leitfähigkeit (bei $\Delta = 0.87$), 28.3% (bei $\Delta = 0.46$) im rein inhibitorischen Szenario, und 38.8% im Falle einer inhibitorischen Kopplung unter exzitatorischem Rauschen (bei $\Delta = 0.46$). Demnach synchronisiert die Sternzelle robuster in Anwesenheit von exzitatorischem Rauschen. An dieser Stelle definiert die Robustheit einer Synchronisation den höchste Rauschlevel σ_η , der einen vorgegebenen Spike-Jitter $\sigma_\tau^{(\infty)}$ generiert.

Für den Fall eines kleinen Spike-Jitters $\sigma_\tau^{(\infty)}$ korreliert die Robustheit der Synchronisation (der höchste Rauschlevel σ_η) hauptsächlich mit der Steigung der synaptischen PRC. Je steiler die Steigung in der synaptischen PRC ist, um so effizienter kann das Neuron Rauschperturbationen entgegenwirken. Bei höheren Spike-Jittern $\sigma_\tau^{(\infty)}$ korreliert jedoch die Robustheit mit dem Zentrum der jeweiligen Delay-Synchronisationsregion. Dies ist insofern verständlich, da ein anwachsender Spike-Jitter mit einer

größeren Fraktion von Neuronen einhergeht, die außerhalb der negativen Delay-Synchronisationsregion auf die Zelle eintrifft und damit einer Synchronisation entgegenwirkt. Der optimale Delay kann daher nur aus einem Trade-off zwischen der steilsten Steigung und dem Zentrum der Delay-Synchronisationsregion gewonnen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abhängigkeit des optimalen Delays vom Rauschlevel σ_η nicht sehr stark ist. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Gutkin *et al.* (2005), die besagen, dass Membranrauschen zu keiner qualitativen Änderung der PRC eines Neurons führt.

Die Ergebnisse dieses Abschnitts sind durch die zwei in Abschnitt 2.3.1 hergeleiteten Kriterien der Spike-Count-Erhaltung und Linearität verifiziert. Beide Kriterien sind mit den experimentell gemessenen PRCs evaluiert. Der Test auf Spike-Count-Erhaltung liefert eine Region im (Δ, σ_η) -Raum, in der die theoretischen Vorhersagen valide sind (gepunktete Linien in Abbildung 2.9B). Außerhalb dieser Region wird die Synchronisation überschätzt. Diese Regionen hoher Validität überlappen in weiten Teilen mit den parabel-förmigen Regionen, innerhalb derer eine Synchronisation möglich ist. Überschätzungen treten an den Ränder dieser Regionen auf, und hier vor allem für hohe Rauschpegel. Der Test auf Linearität überprüft die Unsicherheit der Synchronisationsregionen (graue Linien in Abbildung 2.9B). Offensichtlich ist vor allem für das exzitatorische Kopplungsregime diese Unsicherheit sehr klein. Für inhibitorische Verknüpfungsregime sind die Regionen geringfügig in Richtung kürzere Delays verschoben, wenn die PRC mit einer Test-Stimulusamplitude ermittelt wurde, die um den Faktor $1/\varepsilon = 1.78$ größer als der Kontrollfall ist.

Synchronisation via oszillatorischer Inhibition

Da Sternzellen vermutlich exzitatorisch sind (Jones, 1993), kann eine inhibitorische Kopplung nur disynaptisch über inhibitorische Interneurone vermittelt sein. Die im Hippocampus anzutreffenden Interneurone zei-

gen jedoch eine intrinsische Dynamik, die weit über eine einfache ein-zu-eins Übersetzung von Excitation zu Inhibition hinausgeht. Aus Slice-Studien (Whittington *et al.*, 1995; Fisahn *et al.*, 1998; Hájos *et al.*, 2000; Hormuzdi *et al.*, 2001) und aufgrund theoretischer Überlegungen (Traub *et al.*, 1996) weiß man, dass inhibitorische Populationen in sich oszillatorisch sind, wobei die GABAerge Zeitkonstante von 20 bis 30 ms zu Oszillationen im Gamma-Frequenz-Bereich (30-80 Hz) führt. Zusätzlich gelang es Chrobak & Buzsáki (1998), im Hippocampus von aktiven Ratten eine Gleichzeitigkeit von Gamma- und ϑ -Oszillationen zu beobachten.

Die oben genannten Erkenntnisse führen zu der Frage, ob Sternzellen robust im ϑ -Frequenzbereich synchronisieren können, wenn sie reziprok mit einem Netzwerk von GABAergen fast-spiking Interneuronen verbunden sind. Zur Beantwortung dieser Frage nimmt man an, dass als Reaktion auf das Feuern einer Sternzelle das Interneuron-Netzwerk eine koherente oszillatorische Aktivität an die Sternzell-Population repropagiert. Aus diesem Grund modelliert man die inhibitorische Netzwerkaktivität a_{osc} , die durch ein Sternzell-Aktionspotential hervorgerufen wird mit

$$a_{\text{osc}}(\varphi) \propto \frac{\varphi}{\lambda^2} e^{-\varphi/\lambda} [\cos(\omega\varphi) + 1] \mathcal{H}(\varphi). \quad (2.25)$$

Der Kern a_{osc} ist so normalisiert, dass das Integral $\int_0^\infty a_{\text{osc}}(\varphi) d\varphi$ gleich 1 ist. Die Oszillationsfrequenz ω liegt im Gamma-Bereich, und der Parameter λ beschreibt die zeitliche Dauer des oszillatorischen inhibitorischen Feedbacks; siehe Einfügebilder in Abbildung 2.10. Auf der Basis des angenommenen schwachen Kopplungsregimes gelingt unter Ausnutzung des Superpositions-Prinzips [vgl. Gleichung (2.10)] die Konstruktion der Perturbation $\Phi_{\text{osc}}(\varphi) = \int_0^1 ds a_{\text{osc}}(s - \Delta - \varphi) \Phi_{\text{syn}}(s)$ der Sternzellperiode, die von einem zur Phase φ emittierten Sternzell-AP indirekt über die Interneuron-Population evoziert wird. Wie im obigen Fall nimmt man an, dass das Rauschen von einem Kanal herrührt, der das gleiche Umkehrpotential wie eine exzitatorische Synapse besitzt.

Die so gewonnene PRC Φ_{osc} erlaubt die Analyse der Robustheit der

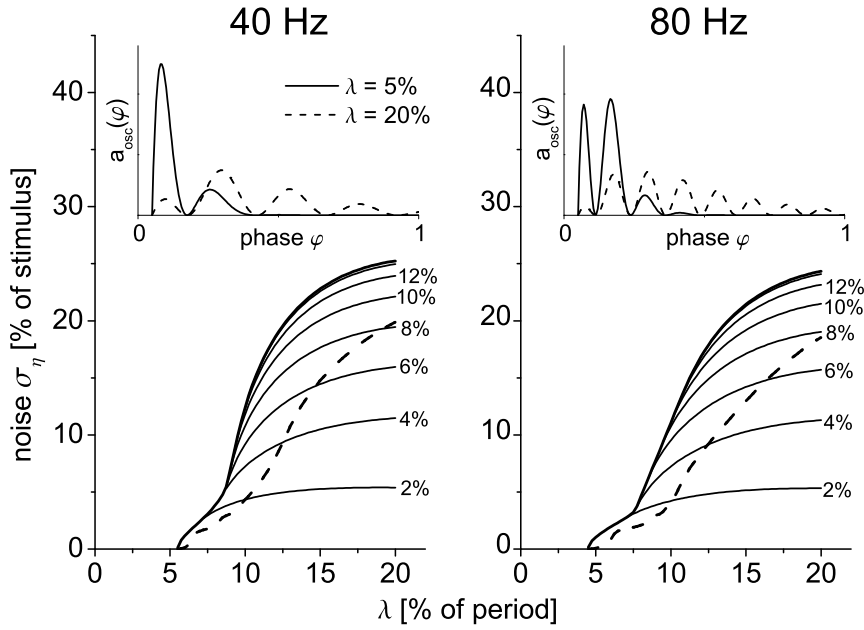


Abbildung 2.10: Synchronisation durch ein oszillatorisch-inhibitorisches Feedback. Zur Imitation von rückgeführten γ -Oszillationen werden oszillatorische Aktivitätskerne (Einsatz) eingeführt, die durch eine Oszillationsfrequenz ω und einem Persistenzparameter λ parametrisiert sind. Die Kerne sind auf einen Delay von 5% der Periode verschoben (≈ 5 ms). Die Iso-Jitter-Linien sind monotone nichtlineare Funktionen von λ . Die Iso-Jitter-Linie für den steady-state Jitter von $\sigma_\tau^{(\infty)} = 16\%$ ist als begrenzende Linie hervorgehoben, und jene Regionen, in denen die Annahme der Spike-Count-Erhaltung (section 2.3.1) zutrifft, mit gestrichelten Linien dargestellt.

Synchronisation in Abhängigkeit der Frequenz ω und dem Persistenzparameter λ des inhibitorisch-oszillatorischen Eingangs. Da die Synchronisation über einen disynaptischen Weg vermittelt wird, ist der interneuronale Delay Δ auf 5% der Oszillationsperiodenlänge gesetzt.

Die Mean-Field Gleichung (2.17) liefert erneut einen Schätzwert für den steady-state Spike-Jitter $\sigma_\tau^{(\infty)}$ in einem oszillatorischen Zyklus. In Abbildung 2.10 ist $\sigma_\tau^{(\infty)}$ in Abhängigkeit des Persistenzparameters λ und dem Rauschlevel σ_η für die zwei Oszillationsfrequenzen $\omega/[2\pi T(I)] = 40$ Hz und $\omega/[2\pi T(I)] = 80$ Hz dargestellt. Im Gegensatz zur direkten inhibitorischen Kopplung kann die Sternzellpopulation bei dem angenommenen kleinen interneuronalen Delay von $\Delta = 5\%$ synchronisieren. Die Robust-

heit der Synchronisation ist eine monoton ansteigende Funktion von λ und beinahe unabhängig von der Frequenz ω . Um eine robuste Synchronisation zu erhalten, muss der Persistenzparameter λ des inhibitorischen Feedbacks rund 10 bis 15% der ϑ -Periode überdecken. Der minimale Wert von λ , der zur Synchronisation notwendig ist (dicke Linie), stellt sich als eine stark nichtlineare Funktion des Rauschlevels heraus. Als Konsequenz dessen würde die Vorhersage einer rauschfreien Phasen-Antwort-Theorie jene Kopplungspersistenz λ stark unterschätzen, die zur Erzeugung einer Synchronisation bei geringen Rauschleveln von etwa 5% nötig ist.

Der hier vorgestellte Mechanismus benötigt jedoch ein starkes inhibitorisches Signal, da die Synchronisation nur für Rauschlevel unter 25% des Synchronisationsstimulus auftritt. Dieser Wert kann sich durch die Spike-Count-Erhaltung (gestrichelte Linie) noch weiter auf rund 20% reduzieren.

2.4 Diskussion

In diesem Kapitel wurde die klassische Phasen-Antwort-Theorie auf rauschbehaftete, synaptisch schwach-gekoppelte Regime erweitert. Der Ansatz liefert plausible Ergebnisse, wenn das Rauschen an den verschiedenen Oszillatoren unkorreliert, identisch verteilt und stationär ist. Rauschen kann dabei sowohl intern als auch extern durch synaptische Kopplung vermittelt sein.

Der Ansatz basiert - ähnlich der rauschfreien Theorie - auf einer Stabilitätsanalyse der oszillatorischen Lösung. Die Robustheit der Synchronisation wird durch die Schätzung des Spike-Jitters als Funktion des Rauschpegels quantisiert. Methodisch basiert die Theorie auf der Anwendung iterierter Abbildungen; statt jedoch die zeitliche Entwicklung der Spikezeiten zu untersuchen, wie im Falle der rauschfreien Theorie, wird hier eine Abbildung der Varianz der Spiketime-Verteilung definiert und in ihrer Dynamik analysiert. In der vorgestellten Approximation wirkt das externe Rauschen auf diese Varianzen rein additiv. Als Konsequenz daraus kann

die Abbildung der Varianzen durch eine einfache Verschiebung entlang der Ordinate vom rauschfreien Anteil gewonnen werden.

Zur Vorhersage ihrer Synchronitätseigenschaften wurde die Methode auf die entorhinale Schicht-II Sternzelle angewandt. Man vermutet, dass diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Erzeugung des hippocampalen ϑ -Rhythmus spielen (Alonso & Llinás, 1989; Stewart *et al.*, 1992; Alonso & Klink, 1993; White *et al.*, 1998; Hasselmo *et al.*, 2000; Buzsáki, 2002; Acker *et al.*, 2003; Netoff *et al.*, 2005).

2.4.1 Excitatorisches Kopplungsregime

Die Theorie untermauert die Vermutung, dass die Sternzellen durchaus als ϑ -Rhythmusgenerator fungieren können, wenn sie rekurrent über schwache exzitatorische Synapsen über biophysikalisch plausible interneuronale Delays miteinander verbunden sind.

Jedoch existieren experimentelle Hinweise darauf, dass die Annahme einer schwachen Kopplung nicht adäquat für ein exzitatorisch-gekoppeltes Sternzell-Netzwerk ist. In-vivo-Daten von Chrobak & Buzsáki (1998) legen eine stark kohärente Aktivität im entorhinalen Cortex nahe, die unter der Annahme einer hochgradigen Vernetzung zwischen den Sternzellen zu einer synchronen Ankunft vieler synaptischer Eingänge und damit zu einer starken Leitfähigkeitsänderung führen würde. Darüberhinaus bricht die Linearitätsannahme in dem Modell von Acker *et al.* (2003) bei exzitatorischen Leitfähigkeiten von 1 bis 2 nS zusammen, was, bezugnehmend auf Ergebnisse von Berretta & Jones (1996), nur 5 bis 10 synchron ankommenden synaptischen Ereignissen entspräche. Acker *et al.* (2003) argumentiert, dass die Sternzelle trotz einer starken Kopplung synchronisieren kann, da nichtlineare Effekte des h-Stroms im Fall einer Asynchronität das Auslösen eines Zeitschritts induzieren können. Da reziproke exzitatorische Verbindungen von Sternzellen sehr gering ausgeprägt sind (Dhillon & Jones, 2000), kann die Annahme der schwachen direkten Kopplung zwischen den Sternzellen beibehalten werden. Da jedoch für nur wenige aktive Synapsen

das neuronale Rauschlevel vergleichsweise groß ist, bleibt unklar, ob eine Robustheit von 30 zu 40%, wie in Abbildung 2.9B gezeigt, ausreichend zur Generierung synchroner Oszillationen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Grenze der Linearität von 5 bis 10 synchron auftretenden EPSPs, wie von den Daten von Berretta & Jones (1996) abzuleiten ist, vermutlich zu gering ist, um eine Synchronisation durch eine schwache Kopplung zu ermöglichen. Dessen ungeachtet, setzt sie eine obere Grenze für die im linearen Regime beschreibbare Wirkung des exzitatorischen Rauschens.

2.4.2 Inhibitorisches Kopplungsregime

Eine Alternative, die das Problem der exzitatorischen Kopplung umgeht, ist die Annahme, dass die Sternzellen indirekt über inhibitorische Interneurone miteinander verbunden sind. In einem solchen Regime wäre es für eine robuste Synchronisation notwendig, dass der Delay etwa in der Mitte der ϑ -Periode zu liegen kommt, d.h. 40-60 ms lang wäre. Da derartige Transmissionsverzögerungen nicht über einen einfachen disynaptischen Weg erklärt werden können, muss die direkte inhibitorische Kopplungshypothese verworfen werden. Darüberhinaus zeigen Arbeiten von Netoff *et al.* (2005), dass für ein Zwei-Zell-Netzwerk mit kurzen Delays eine inhibitorische Verknüpfung zu einer anti-phasischen Lösung und damit zu großen Spike-Jittern führt.

Nimmt man jedoch an, dass die Interneurone eine selbst-verlängernde, Sternzell-getriggerte inhibitorische Aktivität entwickeln können, dann kann ein Sternzell-Netzwerk robust synchronisieren, auch unter realistischen interneuronalen Delays von ungefähr 5% (≈ 5 ms) einer Periode. Eine Grundvoraussetzung für ein derartiges Regime ist die Sensitivität der inhibitorischen Oszillation auf die Sternzell-Aktivität und einer inhibitorischen Aktivität, die rund zwei Drittel des Theta-Zyklus überdauert.

Eine mechanistische Erklärung für die selbst-verlängernde inhibitorische Aktivität könnte im Vorhandensein von γ -Oszillationen liegen, die als

Reaktion auf die Aktivierung von metabotropen Glutamat-Rezeptoren in einem hippocampalen Rattenhirn-Schnitt auftreten (Whittington *et al.*, 1995). γ -Oszillationen finden sich sowohl im entorhinalen Cortex von Menschen während der Wachphasen (Chrobak & Buzsáki, 1998) als auch in isolierten Whole-Brain Präparationen (Dickson *et al.*, 2000). Hippocampale γ -Oszillationen werden für gewöhnlich von Theta-Oszillationen begleitet (Chrobak & Buzsáki, 1998; Buzsáki, 2002) und spiegeln sich im hochamplitudigen phasischen Ausgang von Fast-Spiking Interneuronen wider. Intrazelluläre Aufnahmen von Sternzellen und Fast-Spiking Interneuronen zeigen, dass diese Interneurone einen GABAergen oszillatorischen Eingang zu den Sternzellen mit einer Amplitude von mehreren mV (Cunningham *et al.*, 2003) propagieren. Unklar ist, ob die Fast-Spiking-Interneurone ihrerseits von den Sternzellen einen überschweligen Eingang empfangen (Cunningham *et al.*, 2003). Darüberhinaus bleibt ungeklärt, in welchem Umfang die γ -periodischen Membranpotential-Fluktuationen der Sternzellen während eines ϑ -Zustandes die Annahme einer schwachen synaptischen Kopplung rechtfertigen. Es wird eine zukünftige Aufgabe sein herauszufinden, ob und wie Nichtlinearitäten innerhalb dieses Gamma-Kopplungsregimes auf die Synchronisation unterstützend wirken könnten.

Ungeachtet dessen zeigt dieser theoretische Ansatz, dass der hippocampale Theta-Rhythmus durch Schicht-II Sternzellen generiert werden kann. Voraussetzung hierfür ist, dass die Sternzellen durch einen zeitlich unstrukturierten exzitatorischen Eingangsstrom angetrieben werden und indirekt über eine inhibitorische, im gamma-Bereich oszillierende Population von Interneuronen gekoppelt sind. Verstärkung kann der so generierte entorhinale Theta-Rhythmus zusätzlich durch die Interaktion mit dem medialen Septum und Diagonalband von Broca (Buzsáki, 2002) und die schwache exzitatorische Kopplung der Sternzellen untereinander erfahren.

Die gamma-Kopplungshypothese kann durch anatomische Studien zur Konnektivität der Schicht-II Sternzelle des entorhinalen Cortex überprüft werden. Damit die Hypothese sich als wahr herausstellt, sollte die Anzahl der gefundenen exzitatorischen reziproken Verbindungen vernachlässigbar klein sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wird im zweiten Kapitel der Arbeit ein Photostimulationssystem zur Messung der funktionell-relevanten Verbindungen auf ein postsynaptisches Neuron entwickelt.

Desweiteren sollten Multielektroden-Ableitungen in Schicht II zeigen, dass eine deutliche Korrelation zwischen Sternzellen und Fast-Spiking Interneuronen in einer Form vorliegen, in der die Sternzellen-AP vor jenen der Interneurone erscheinen.

Kapitel 3

Photostimulation

3.1 Einleitung

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wird ein experimentelles System zur Analyse der funktionellen Konnektivität von Nervenzellen entwickelt und auf die Sternzelle des MEC angewandt. Das System ergänzt existierende Standard-Physiologie-Setups um die Möglichkeit, an ausgewählten Positionen innerhalb eines akuten Hirnschnittpräparats einen biologischen Wirkstoff durch die Einwirkung von Lichtenergie photolytisch zu aktivieren. Die elektrophysiologische Nutzbarmachung dieser Photostimulation erfordert neben der Integration ausgewählter Hard- und Software-Komponenten auch die Entwicklung und Validierung einer geeigneten Methodik zur Analyse der gewonnenen Daten. Konkret sind die räumliche Auflösung der Stimulation zu ermitteln, photo-induzierte Signale zu detektieren, zu klassifizieren, zu quantifizieren und schließlich Unterschiede und Muster in den Verbindungseigenschaften einzelner Nervenzelltypen quantitativ herauszuarbeiten. Exemplarisch wird dies am Beispiel der Schicht-II-Sternzelle des MEC vorgestellt, deren intralaminäre Konnektivität bestimmt wird.

Bisherige Ansätze zur Kartierung neuronaler Konnektivitätsmuster

Zur Analyse des hochkomplexen synaptischen Organisationsprinzips neuronaler Systeme existieren vielfältige anatomische und elektrophysiologische Methoden, wie die Golgi-Technik (Somogyi, 1990), anterograde und retrograde Tracing-Methoden (Lanciego *et al.*, 2000), die Elektronenmikroskopie (Alonso-Nanclares *et al.*, 2005), die Ultramikroskopie (Dodt *et al.*, 2007), hochauflösende MRT-Geräte (Goense & Logothetis, 2006), die Paarableitungstechnik (Montgomery *et al.*, 2001), die Kombination von elektrophysiologischen Meßmethoden mit anatomischen Färbetechniken (Martin, 2002; McDonald, 1992) und schließlich statistische Verfahren wie die Berechnung der zeitlichen Kreuzkorrelation zwischen den Aktivitäten unterschiedlicher Neuronen- oder Neuronengruppen (Hata *et al.*, 1993). Trotz dieses kanonischen Methodenspektrums, dessen Vielfalt die Wichtigkeit der Fragestellung unmittelbar erahnen lässt, sind die meisten neuronalen Schaltkreise bis heute funktionell wenig verstanden, was im wesentlichen auf die Eigenart der genannten Methoden zurückzuführen ist: Anatomische Techniken können zwar die Existenz und das allgemeine Muster synaptischer Verbindungen aufzeigen, spezifische Aussagen über deren realen funktionellen Zustand, über ihre Polarität, Stärke, Plastizität, ihre zeitliche Transmissionsverzögerung und schließlich über ihre genau Herkunft lassen sie in aller Regel nicht zu. Physiologische Methoden wiederum können diese Fragen zwar teilweise beantworten, jedoch in der Regel nur für ausgewählte Teilbereiche, wie zwei recurrent miteinander verknüpfte Nervenzellen. Eine Technik, die diese offenkundigen Methodenlücke ansatzweise zu schließen vermag, ist die Photostimulation (Callaway & Yuste, 2002), deren Grundprinzip kurz dargestellt wird. Eine ausführlichere Diskussion zur Photostimulation findet sich in Bendels (2007).

Das Grundprinzip der Photostimulation

In der Neurophysiologie beschreibt der Begriff der Photostimulation den Vorgang, in einem akuten Hirnschnittpräparat einen inaktiven Wirkstoff, meist einen Transmitter, der in gelöster Form der Nährlösung beigemischt ist, mithilfe eines focalen und kurzzeitigen Lichtimpulses photolytisch zu aktivieren (Abbildung 3.1).

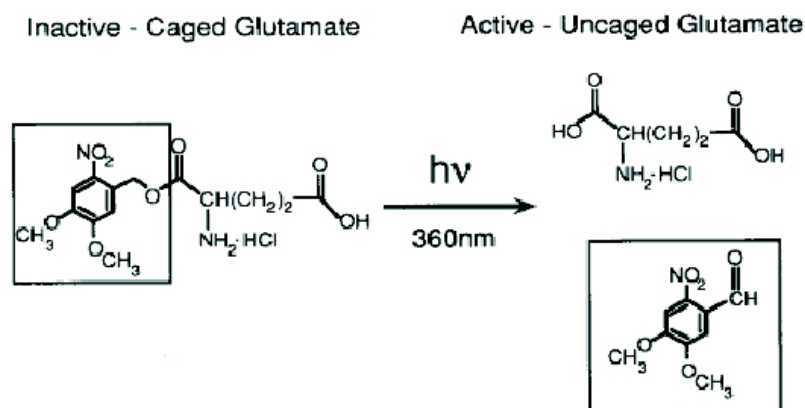


Abbildung 3.1: Photolytische Aktivierung von Glutamat. Der Transfer von Lichtenergie im ultravioletten Frequenzbereich führt zum Aufbrechen der kovalenten Bindung zwischen einer inaktivierenden Caging-Gruppe (Rechteck) und dem Neurotransmitter Glutamat. Das Glutamat wird freigesetzt, entfaltet seine originäre Wirkung an den spezifischen Rezeptoren und durchläuft die substanzspezifischen Degradationsprozesse. Diffusionsprozesse an der Freisetzungsstelle führen dazu, dass die Photostimulation wiederholt und praktisch ohne Erschöpfung an gleicher Stelle ablaufen kann (Abbildung aus Katz & Dalva (1994) entnommen).

In Folge seiner Aktivierung beginnt der Transmitter seinerseits die in unmittelbarer Nähe liegenden transmittersensitiven neuronalen Strukturen zu erregen. Durch die simultane elektrophysiologische Ableitung von einem gepatchten Neuron wird es möglich, die neuronalen Antworten auf diese photochemische Aktivierung an dieser zu erfassen. So kann der transient aktivierte Transmitter einerseits die Zielzelle *direkt* stimulieren. Andererseits können andere nicht zur Zielzelle gehörende neuronale Strukturen in Erregung versetzt werden, deren Aktivität nur dann an der Zielzelle *indirekt* detektierbar ist, wenn eine Verbindung zwischen beiden Zellen in Form einer chemischen oder elektrischen Synapse (Lam *et al.*, 2006) exis-

tiert.

Die Menge der Transmitterfreisetzungen kann durch individuelle Anpassung der Energie des Lichtstimulus, d.h. durch Änderung der Lichtintensität und Einwirkzeit, reguliert werden. Durch Verwendung eines geeigneten Fokussiermechanismus wird die Größe des Lichtkegels und damit die Größe des Freisetzungsbereichs weitestgehend beliebig einstellbar. In Kombination mit einer variablen Positionierung des Lichtkegels ist es weiterhin möglich, den Transmitter an ausgewählten Raumpunkten innerhalb des Präparats zu aktivieren. Das Besondere des Verfahrens liegt also in der Möglichkeit, einen Transmitter in einem räumlich-zeitlichen Muster an ausgewählten Punkten auf dem Präparat, ohne den gewebserstörenden Einsatz eines mechanischen Instrumentariums - ähnlich einem Schalter - zu aktivieren. Aus diesem Grund besitzt man meist viele Stimulationsorte, jedoch für gewöhnlich nur eine Ableitungsstelle in Form des gepatchten Neurons.

Entfaltet der photolytisch aktivierte Transmitter seine Wirkung unmittelbar an dem gepatchten Neuron, dann spricht man von einer **direkten Stimulation**, wirkt er transneuronal durch die überschwellige Aktivierung einer präsynaptischen Zelle, dann handelt es sich um eine **indirekte Stimulation** wie in Abbildung 3.2 illustriert. In beiden, zeitlich auch simultan auftretenden Aktivierungsmodi, misst man, je nach Messmodus, postsynaptische Ströme oder Potentiale. Während jedoch die direkte Stimulation die synaptische Aktivierung unter Umgehung der präsynaptischen Strukturen imitiert, wird bei der indirekten Stimulation der gesamte axonale Apparat mitsamt Synapse zur Signalgenerierung genutzt. Der letztgenannte Fall eröffnet die Möglichkeit, die zur gepatchten Zelle präsynaptischen Neurone innerhalb einer umschriebenen Region durch die sukzessive photolytische Aktivierung aller potentiell präsynaptischen Zellen zu ermitteln. Ein derartiges Experiment erfordert das systematische Abtasten eines ausgesuchten Hirnareals und die punktspezifische Analyse

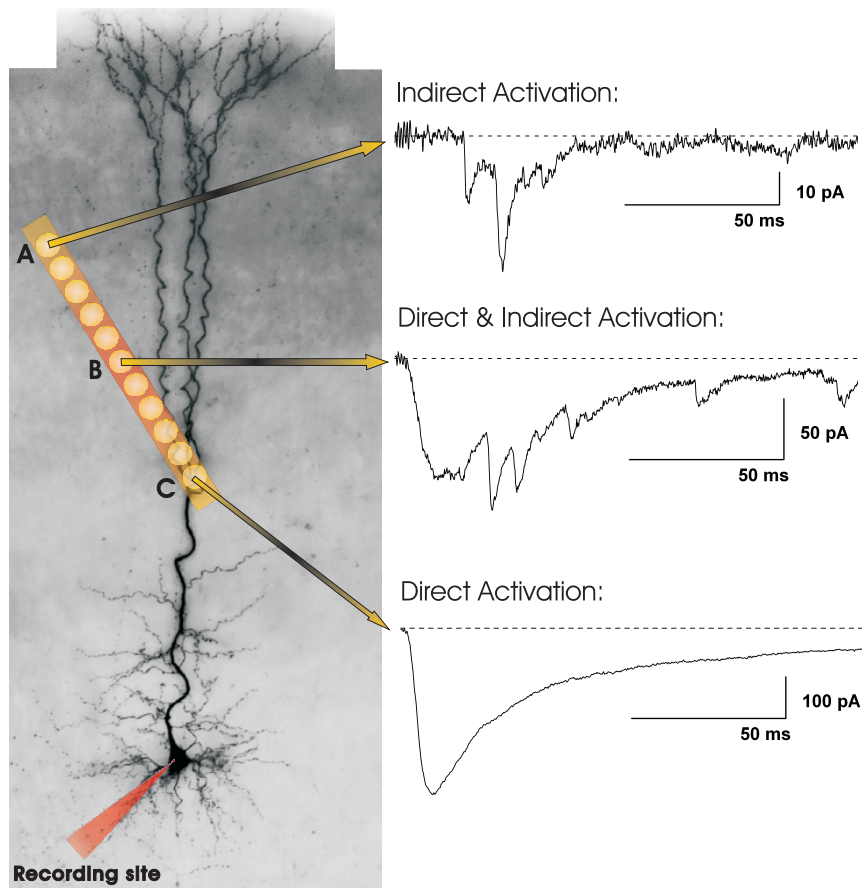


Abbildung 3.2: Formen der Photostimulation. (A) Die überschwellige Aktivierung einer präsynaptischen Zelle, die außerhalb des dendritischen Einzugsgebietes der biocytinfarbenen Zielzelle liegt, induziert an dem gepatchten Neuron ein rein indirektes, transneurales Signal. (B) Überdeckt das Aktivierungsareal zusätzlich dendritische Ausläufer der gepatchten Zelle, dann führt dies zum Auftreten eines Mischsignals, bestehend aus direkten und superponierten indirekten Anteilen. (C) Focussiert man schließlich den Lichtkegel exakt auf einen dendritischen Abschnitt der gepatchten Zelle, so ist ein rein direktes Signal zu messen. Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivierung einer flächenhaften Region mit einer zur Einzelsynapse vergleichsweise größeren Transmitterfreisetzung einhergeht, besitzen direkte Signale i.d.R. eine größere Amplitude, größere Zeitkonstanten und führen insgesamt zu einem größeren Stromfluß über die Zellmembran. Obgleich mehrere dendritischen 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 zu messen, wohingegen indirekte Signale - oftmals Resultat einer Aktionspotential-Serie - zeitversetzt und meist in Gruppen auftreten (Abbildung aus Bendels (2007) entnommen).

der postsynaptischen Signale, weshalb diese Form der Photostimulation den Namenszusatz 'Scanning' trägt. Durch die wiederholte Anwendung der Scanning-Photostimulation gelingt die Offenlegung grundlegender Innervationsprinzipien zwischen und innerhalb von Neuronengruppen bzw. -schichten. Hierbei gilt grundsätzlich, dass aufgrund der niedrigen Innervationsdichte corticaler Neurone die Wahrscheinlichkeit des Auffindens einer synaptischen Verbindung relativ gering ist, so dass viele potentiell präsynaptische Zellen stimuliert werden müssen. Andererseits sollte die Messgenauigkeit sensitiv genug sein, um die Aktivität einer einzelnen synaptischen Aktivierung zu detektieren. Aus diesem Grund etabliert man standardmäßig eine Whole-patch-clamp Ableitung an der gepatchten Zelle, die - in Abhängigkeit von Zelltyp und Hirnregion - über rund eine Stunde stabil aufrechterhalten werden kann und die geforderten Sensitivitätskriterien erfüllt.

Die Bedeutung der Scanning-Photostimulation

Die Scanning-Laser Photostimulation wurde ursprünglich von Katz & Davva (1994) im Jahr 1994 vorgestellt und hat sich innerhalb weniger Jahre zu einer etablierten Methode in der Neurophysiologie entwickelt (Callaway & Yuste, 2002). Ihr Anwendungsspektrum erstreckt sich von der Analyse der neuronalen Konnektivität in akuten Hirnabschnitten (Schubert *et al.*, 2001; 2003; 2006; Shepherd *et al.*, 2003; Brivanlou *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006) und der funktionellen Charakterisierung von Synapsen (Godwin *et al.*, 1997; Kandler *et al.*, 1998), über die Messung der Verteilung von spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Neuronen (Dodt *et al.*, 1998; Frick *et al.*, 2001) bis hin zur Analyse der zeitlichen dendritischen Integration im Einzelneuron (Shoham *et al.*, 2005; Boucsein *et al.*, 2005). Ungeachtet dieses breitgefächerten Einsatzgebietes basieren alle Photostimulationsexperimente stets auf der koordinierten räumlich-zeitlichen Konversion eines inaktiven 'caged' Transmitters

in einen aktiven 'uncaged' Transmitter, induziert durch einen transienten und hoch-energetischen, meist ultravioletten Lichtstrahl, bei gleichzeitiger elektrophysiologischer Ableitung von einem oder mehreren Neuronen. Da die photolytische Aktivierung die schnellste Möglichkeit darstellt, Perturbationen in chemischen Systemen ohne den Einsatz eines invasiven mechanischen Instrumentariums vorzunehmen (Lester & Nerbonne, 1982), ist sie perfekt geeignet, lebende Systeme wie neuronale Elemente und ihre komplexen Interaktionen zu analysieren.

Anforderungen an das Setup

Für Fragestellungen, die sich mit der zeitlichen dendritischen Integration multipler synaptischer Eingänge zur Initiierung der neuronalen Hintergrundaktivität (Boucsein *et al.*, 2005) oder mit der qualitativen Schätzung des Konnektivitätsmusters zwischen unterschiedlichen Hirnregionen (Dantzer & Callaway, 2000) befassen, ist eine hohe räumliche Präzision der Photostimulation nicht zwingend erforderlich. Im Gegensatz dazu erfordern Kartierungsexperimente, deren Ziel eine quantitative Schätzung der synaptischen Leitfähigkeiten als Funktion des Stimulationsortes ist, einen kleineren Lichtkegeldurchmesser, der eine räumlich präzisere Stimulation der ortsständigen Neurone erlaubt. Die Stimulation von dendritischen Abschnitten eines Neurons, bei der das fokale Uncaging-Volumen derart klein sein muss, dass die Glutamatfreisetzung innerhalb eines synaptischen Spaltes initiiert werden soll, ist nur über ein 2-Photonen-Laser basierendes Uncaging-System realisierbar (Losonczy & Magee, 2006; Matsuzaki *et al.*, 2004).

Ungeachtet dieser letztgenannten Einschränkung sind auf 1-Photonen-Laser basierende Photostimulationssysteme zur Bearbeitung ausgewählter subzellulärer Fragestellungen, wie die topographische Analyse der zellulären Rezeptorbestückung (Frick *et al.*, 2001), ausreichend präzise. Hierfür ist eine räumliche Lichtkegelgröße von wenigen μm ausreichend.

Eine im μm -Bereich liegende hohe räumliche Auflösung der optischen Stimulation ist realisierbar, wenn man als Lichtquelle einen Laser wählt, dessen focussierbarer Lichtstrahl über ein sehr dünnes, im Durchmesser 40-200 μm starkes Fiberglaskabel in das Mikroskop geleitet und anschließend mithilfe der Mikroskopoptik im Präparat focussiert wird (Koetter *et al.*, 1998; Shepherd *et al.*, 2003; Brivanlou *et al.*, 2004). Aus diesem Grund setzt eine hohe räumliche Stimulation einen hohen Vergrößerungsfaktor (60x oder 40x Objektive) und eine hohe numerische Apertur des Mikroskops voraus. Dies steht im unmittelbaren Konflikt mit der Tatsache, dass niedrig-vergrößernde Objektive (2.5-4x) einen hervorragenden Überblick über das Präparat und die Stimulationsregion vermitteln, was insbesondere im Rahmen von sich über mehrere Quadratmillimeter erstreckenden Kartierungsexperimenten von größter Bedeutung ist.

Das hier entwickelte Photostimulationssystem wurde so konzipiert, dass es sowohl eine hohe räumliche Präzision als auch einen niedrigvergrößernden Überblick über ein großes Hirnareal zur Planung der Stimulation zulässt. Das zugrundeliegende Konzept hierbei ist die graphische Planung der Stimulation auf der Basis eines niedrig-vergrößernden Übersichtsbildes, während die eigentliche Stimulation mithilfe eines stark-vergrößernden Objektivs durchgeführt wird. Dieses Vorgehen ermöglicht Planung und Durchführung von Kartierungsexperimenten an mehreren Quadratmillimetern großen Hirnarealen mit einer im Mikrometerbereich liegenden räumlichen Stimulationspräzision.

Unter Zuhilfenahme einer hier vorgestellten Windows-basierten Steuerungssoftware ist es prinzipiell möglich, jedes elektrophysiologische Standard-Setup nachträglich und kostengünstig unter Verwendung einiger kommerziell erhältlicher Komponenten zu einem Photostimulations-Setup aufzurüsten.

Übersicht Im ersten Abschnitt werden das konzeptionelle Design und die Einzelkomponenten des Photostimulations-Setups kurz vorgestellt. Im Anschluß daran sind die wichtigsten Funktionen der Steuersoftware Lucifer aufgeführt. Die Steuersoftware ermöglicht Planung und Realisation räumlicher Laser-Stimulations-Muster und offeriert darüberhinaus spezielle optische Zusatzfunktionen, wie einen Image-Stitching-Algorithmus zur Vereinigung sich überlappender Einzelbilder, oder optische Referenzpunkte, zur Maximierung der räumlichen Präzision. Nachfolgend wird das Photostimulations-System dazu genutzt, die photo-induzierten räumlichen Antwortprofile der beiden Hauptzellen des medialen entorhinalen Cortex (MEC), der Stern- und Pyramiden-Zelle (Alonso & Klink, 1993), zu vergleichen. Schließlich wird die intralaminäre, funktionelle Konnektivität der MEC-II-Sternzelle experimentiell bestimmt.

3.2 Setup

In diesem Abschnitt werden die Grundkomponenten des in Abbildung 3.3 schematisch dargestellten Setups beschrieben.

Wie von Katz & Dalva (1994) vorgeschlagen, besteht die grundlegende Idee des Ansatzes darin, zur Fokussierung und Positionierung des Laserlichts im Präparat die Optik eines Standard-Upright-Mikroskops zu nutzen.

Das Laserlicht wird über ein flexibles, 200 μm dickes Fiberglaskabel, das über ein OSI-BX Adapter (Rapp Optoelectronics, Wedel, Deutschland) an den Epifluoreszenz-Port des Mikroskops gekoppelt ist, in ein Olympus BX-51 WI Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) geleitet. Im Inneren des Mikroskops wird der Lichtstrahl über einen Kaltlichtspiegel in die Lichtbahn des Mikroskops reflektiert und mithilfe der Objektivlinse fokussiert.

Dementsprechend ist die resultierende Lichtkegelgröße eine Funktion des Fiberglasdurchmessers, des Vergrößerungsfaktors und der numerischen

Aperatur der Objektivlinse. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein 0.9NA 60x-Objektiv verwendet, das in Kombination mit einem $200\ \mu\text{m}$ starken Fiberglaskabel eine optische Lichtkegelgröße von rund $15\ \mu\text{m}$ liefert. Durch die Verwendung eines Fiberglaskabels mit einem Durchmesser von $20\ \mu\text{m}$ ist es möglich, Lichtkegelgrößen in der Größenordnung von $2\text{-}5\ \mu\text{m}$ zu generieren.

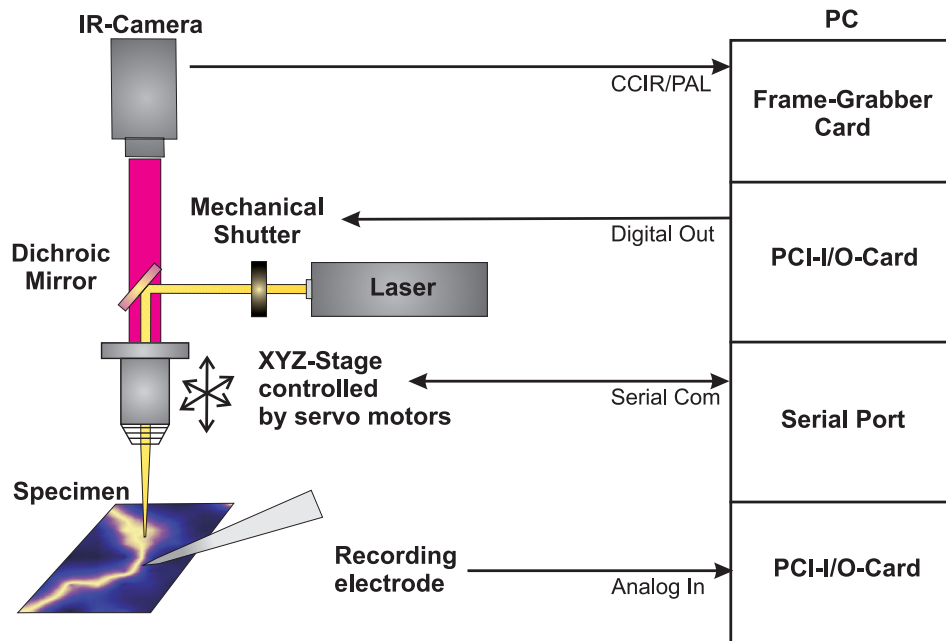


Abbildung 3.3: Setup and Kommunikationsdesign. Das Setup (links) wird über einen Personal-Computer (rechts) gesteuert. Der von einem Laser generierte Lichtstrahl wird über ein flexibles Fiberglaskabel in die Mikroskopoptik geleitet, dort über einen Kaltlichtspiegel in den Lichtweg des Mikroskops reflektiert 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, dessen Achsen jeweils mit einem hochpräzisen Schrittmotor ausgestattet sind. Die stöempfindliche Meßapparatur kann somit unbeweglich verharren. Die wechselseitige Kommunikation zwischen XYZ-Tisch und Computer ist über die seriellen Kommunikationsports realisiert. Das analoge Signal der Aufnahmelektrode wird über eine PCI-I/O-Karte digitalisiert. Zur optischen Kontrolle des Experiments ist eine IR-Kamera am Kopf des Mikroskops angebracht. Das von der Kamera generierte analoge Videosignal im CCIR/PAL-Format wird über eine rechnerinterne Framegrabber-Karte eingelesen.

Als Lichtquelle wird ein modifiziertes DPSS Laser System (Rapp Optoelectronics, Wedel, Deutschland) genutzt. Die Energie dieses pulsgekoppelten UV-Lasers (355 nm Wellenlänge, frequency-tripled Nd:YVO 4, 100 kHz Pulswiederholungsrate; DPSS Lasers, Santa Clara, CA, USA) wird durch die Modulation der Laserimpulszahl adjustiert. Die Lichtdurchlässigkeit auf das Präparat wird über ein schnelles galvanometrisch-gesteuertes Shutter-System kontrolliert (Rapp-OptoElectronic, Wedel, Deutschland), welches über eine garantierte Zeitauflösung von 1 kHz verfügt und über einen digitalen TTL-Impuls getriggert wird. Der TTL-Impuls wird über eine rechnerinterne PCI-I/O-Karte generiert (Multifunction-Data-Aquisition NI-PCI-6221, Shielded Connector Block NI-BNC-2110, National Instruments, Austin, TX, USA). Die Belichtungszeit pro Stimulationspunkt beträgt 2 ms.

Die Mikroskopoptik und damit auch der Laserspot werden über einen motorisierten XYZ-Verschiebetisch (Shifting Table 380, Luigs & Neumann, Deutschland) positioniert, so dass das Präparat mit der stöempfindlichen Meßapparatur in einer fixierten Position verbleiben kann. Jede Achse des Verschiebetisches ist mit einem hochpräzisen Schrittmotor ausgestattet, der eine Schrittweite von $0.1 \mu\text{m}$ besitzt. Die wechselseitige Kommunikation zwischen XYZ-Verschiebetisch und Computer geschieht über die serielle Schnittstelle und einem externen Interface (Shifting Table Control Unit, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland), das die Steuerbefehle an die jeweiligen Motoren weiterleitet.

Zur optischen Kontrolle des Experiments wird eine modifizierte VX55 IR-Kamera (Till Photonics, München, Deutschland) verwendet, welche am standardisierten C-Mount-Port des Mikroskops angekoppelt ist. Die Kamera generiert ein analoges Videosignal des Mikroskopbildes im CCIR/PAL-Format, das über eine rechnerinterne Framegrabber-Karte (DT-3120, Data Translation, Bietigheim Bissingen, Deutschland) digitalisiert wird und in Echtzeit unter Ausnutzung des Direct-Draw-Modus der Videokarte,

und damit weitestgehend CPU-Last-neutral, mit 25 Bildern pro Sekunde dargestellt wird. Die Kommunikationssoftware läuft auf einem Windows-basierten Pentium-Mikroprozessor-System, das eine Taktfrequenz von 1.2 GHz und eine Speicherkapazität von 1 GByte RAM besitzt.

3.3 Elektrophysiologische Methoden

Sowohl die Präparation als auch die Whole-Cell-Aufnahmen wurden von Prateep Beed (PhD-Student, Schmitzlab, NWFZ Berlin) durchgeführt.

Präparation: Akute corticale Hirnschnitte werden von Wistar Ratten (Alter: 15-25 Tage postnatal) präpariert. Nachdem die Tiere mit Diethylether anästhesiert sind, wird die Dekapitation vollzogen. Anschließend werden die Gehirne zügig entfernt und in eisgekühlte ACSF überführt. Die Bestandteile der ACSF sind wie folgt (in mM): 87 NaCl, NaHCO₃, 26 NaHCO₃, 25 Glucose, 2.4 KCl, 7 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 0.5 CaCl₂, 75 Sucrose. Die Lösung besitzt einen pH Wert von 7.4. In der Folge werden unter Zuhilfnahme eines Vibratoms (Leica VT 1200, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) Hirnschnittpräparate in einer Dicke von 300 μm zugeschnitten und über einen Zeitraum von 30 Minuten und bei einer Temperatur von 35°C inkubiert. Die Lagerung der Schnittpräparate geschieht bei Raumtemperatur in einer ACSF mit folgenden Konzentrationen (in mM): 119 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2.5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄. Innerhalb von 1-5 Stunden werden die Schnitte zur Messung herangezogen.

Whole-Cell Ableitung: Whole-cell Voltage- und Current-Clamp Ableitungen werden mit einem Axopatch 700B Verstärker (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Daten werden initial mit 2 kHz tiefpaßgefiltert und durch die selbstverfasste Software Lucifer mit 5 kHz digitalisiert (Multifunction-Data-Aquisition NI-PCI-6221, NI-BNC-2090, Austin, TX, USA) und Stimulationspunkt-spezifisch abgespeichert. Für Kalibrationsexperimente werden die Patch-Elektroden, die

einen Elektroden-Widerstand von 3 bis 6 M Ω besitzen, mit folgender Lösung gefüllt (in mM): 135 K-Gluconate, 20 KCl, 2 MgATP, 10 Hepes, 0.2 EGTA, 5 Phosphocreatine. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7.3. Für Kartierungsexperimente kommt folgende intrazelluläre Lösung zur Anwendung (in mM): 150 K-Gluconat, 0.5 MgCl₂, 1.1 EGTA, 10 Phosphocreatine. Die Lösung besitzt einen pH-Wert von 7.2. Nur jene Messungen werden zur Analyse zugelassen, deren initiale Serienwiderstände nach Etablierung einer Meßverbindung zur Zielzelle kleiner als 25 M Ω sind und während des Experimentes im Voltage-Clamp-Modus weniger als 30% variieren. Eine Kompensation des Serienwiderstands wurde nicht durchgeführt.

Morphologische Rekonstruktion: Während des Kalibrationsexperiments wurden routinemäßig die gepatchten Zellen zur Sichtbarmachung ihrer Morphologie mit Biocytin gefüllt. Nach einem Mindestzeitintervall von 1 h Farbstoff-Äquilibration wurden die Präparate mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für mindestens 24 h fixiert, anschließend in einer Phosphat-gepufferten Saline (PBS) gewaschen und über Nacht mit Avidin-gekoppeltem Alexa 488 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden die Schnittpräparate mit PBS gewaschen und mit DePeX (Serva electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) auf mikroskopische Deckgläser transferiert.

3.3.1 Photostimulation

Glutamat Uncaging: 20 ml von 200 μ M MNI-caged-L-glutamate (Tocris, Bristol, UK) wurden mit einem Volumen von 3-5 ml/min über ein maximales Zeitintervall von 3 Stunden reperfundiert. Das Zeitintervall eines Lichtstimulus betrug 2 ms. Die gleichbleibende effektive Lichtenergie wurde am Ausgang des Objektivs unter Verwendung eines auf Photodioden-basierenden Lichtdetektors dokumentiert (PDA-K-60, Rapp Optoelectronics, Wedel, Deutschland).

Die Optik des Systems wurde so angepasst, dass der effektive Lichtke-

geldurchmesser, in der Focusebene, die auf $50\ \mu\text{m}$ in die Tiefe des Präparates verlagert wurde, $25\ \mu\text{m}$ betrug. Der effektive Lichtkegeldurchmesser wurde anhand der direkten Aktivierung dendritischer Abschnitte eines Neurons geschätzt.

Grundsätzlich wurden die Stimulationspunkte in Form eines hexagonalen Punktrasters mit einer Rastergröße von $60\ \mu\text{m}$ definiert. Der Vorteil in der Verwendung eines hexagonalen Gitters anstelle des sonst üblichen Rechteckgitters besteht darin, dass ein nicht randständiger Stimulationspunkt von sechs äquidistanten Nachbarn umgeben ist, was insgesamt zu der maximalen Stimulationspunkt-Dichte bei gegebenen Punktabstand führt (Marsal, 1976). Zur Verhinderung einer Akkumulation von freigesetztem Glutamat wurde die Stimulationsreihenfolge automatisch so redefiniert, dass zwischen nachfolgenden Stimulationspunkten ein minimaler Abstand von $150\ \mu\text{m}$ bestand. Zur Vermeidung einer Wellenbewegung im Präparat, die relativ leicht zum Abriss der Messpipette führen kann, wurde das optische System mit einer verlangsamten Geschwindigkeit bewegt. Die hierdurch entstehende Zeitverzögerung - die Interstimulus-Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Punkten betrug ungefähr $2\ \text{s}$ - war insofern erwünscht, als dass sie zur Vermeidung einer Übererregung durch die Freisetzung großer Mengen von Glutamat in angrenzenden Arealen beitrug und damit der Entstehung eines zellulären Depolarisationsblocks vorbeugte.

3.3.2 Detektion synaptischer Ereignisse

Die exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs und IPSCs) werden mithilfe eines *iterativen* Algorithmus detektiert: Der Detektionsmechanismus basiert auf vier Kriterien, wie der absoluten Peak-Amplitude (größer als $10\ \text{pA}$), der maximalen absoluten Steigung der Flanke des PSCs (schneller als $2.8\ \text{pA/ms}$), dem Zeitintervall zwischen Initiierung des PSCs und dessen Peak (kürzer als $13\ \text{ms}$) und der Gesamt-

ladungsmenge, die aus der Zelle transportiert wird (negativ für EPSCs und positiv für IPSCs).

Zur Anwendung des letzten Kriteriums muss das Integral zwischen der Grundlinie und dem Signal ermittelt werden. Zu diesem Zweck wird die Grundlinie des Messsignals durch das Ausschneiden detektierter PSCs und der Mittelung des verbleibenden Signals geschätzt. Der Mittelwert des verbleibenden Signals definiert dabei die Grundlinie für den nächsten Iterationsschritt. Der Algorithmus stoppt, wenn im nachfolgenden Iterationsschritt keine Änderungen bezüglich der detektierten PSCs auftritt.

Zur Verbesserung der algorithmischen Detektionsleistung wird das aufgenommene Signal initial mit einem Butterworth-Tiefpaßfilter der Ordnung V mit einer Abbruchfrequenz von 500 Hz digital nullphasen-gefiltert. Zusätzlich werden geringfügige Fluktuationen der Trajektorie (Amplituden kleiner als $1/3$ der Detektionsschwelle für die Peak-Amplitude) durch interpolierende kubische Hermit'sche Splines zwischen ihren Start- und Endpunkten ersetzt, was zu einer Glättung des Originalsignals und damit zu einer weiteren Verbesserung der algorithmischen Detektionsleistung führt (für eine ungefilterte algorithmische Detektion siehe z.B. Kudoh & Taguchi (2002)). Die Steigung im Start- und Endpunkt wurde dabei so gewählt, dass die Interpolation die Form des Originalsignals bewahrt und damit auch die lokalen Extrema konserviert (grau und schwarz gefärbte Funktionen in Abbildung 3.9c und d). Aufgrund seiner Arbeitsweise detektiert der Algorithmus - im Gegensatz zu Template-basierenden Algorithmen (z.B. Clements & Bekkers (1997)) - auch jene indirekten Signale, die sich auf einem direkten Signal superponiert wiederfinden; vgl. Abbildung 3.9d.

3.4 Steuersoftware

Die selbstverfasste Steuersoftware Lucifer überwacht und kontrolliert die angeschlossenen Gerätschaften, ermöglicht die Planung des Experiments, koordiniert den Stimulationsprozess und verwaltet die gewonnenen Daten in einem Archivierungssystem. Der Hauptaufgabe der Software entsprechend, Licht (lat.: lux) koordiniert auf das Präparat zu tragen (lat.: ferre), führte zur Namensgebung: Lucifer.

Die Trennlinie zwischen Datenakquirierung und Datenanalyse fungierte als Designprinzip der Software. Lucifer offeriert die Funktionalität, die zur Durchführung eines Experiments, d.h. zur Datenakquirierung notwendig ist. Die sich anschließende Datenanalyse ist unter Zuhilfenahme anderer Programme durchzuführen. Aus diesem Grund werden alle hierzu wichtigen Programm- und Experimentparameter mit den Daten exportiert. Ein anderes wichtiges Designziel der Software war es, eine möglichst einfache Handhabung während des Experiments zu gewährleisten, da sowohl die strukturelle Integrität des Präparats als auch die Stabilität der Patch-Clamp-Messung mit zunehmender Zeitdauer abnehmen. Zu diesem Zweck besitzt die Software eine das intuitive und schnelle Arbeiten unterstützende graphische Oberfläche. In diesem Abschnitt wird die Grundfunktionalität der, mithilfe des Microsoft Visual Studio .NET erstellten, Software kurz dargestellt. Für eine detailliertere Dokumentation der Programmfunktionalität und der technischen Realisation siehe Bendels (2007).

Die tragende Kernidee des Softwaredesigns war es, die Stimulation auf Basis eines *Planungsbildes* durchzuführen, welches ein Abbild eines beliebig großen Areal im Schnittpräparat darstellen sollte, so dass eine a posteriori Identifikation der Stimulationsorte, etwa durch ein Laser-induziertes Einbrennung von Markierungen (Brivanlou *et al.*, 2004; Dantzker & Callaway, 2000), überflüssig wird. Darüberhinaus sollten die Stimulationspunkte im Planungsbild frei definierbar sein, so dass flexible Stimulationsmuster

erzeugt werden können. Zur Erfüllung dieser Kernanforderungen verfügt Lucifer über zwei Hauptfunktionen: Erstens, die präzise dreidimensionale Echtzeitsteuerung des Verschiebetisches, zweitens, die Planung der Stimulation, ihre Durchführung und Dokumentation. Diese konzeptionelle Dichotomie wird durch zwei Hauptschirme repräsentiert, dem Navigations- und Stimulationsschirm.

3.4.1 Navigationsschirm

Der Navigationsschirm besitzt zwei Hauptaufgaben: 1. Er überwacht und manipuliert die geometrischen Beziehungen zwischen Laserstrahl und Präparat. 2. Er ermöglicht die Konstruktion eines Planungsbildes.

Zur Online-Darstellung des genauen Ortes der Stimulation befindet sich im Zentrum des Navigationsschirms ein Fenster, welches das digitalisierte Videobild der Kamera darstellt; vgl. Abbildung 3.4. Durch Anklicken einer visuell identifizierten Zielstruktur wird diese an eine definierbare, den Focus des Stimulationsspots repräsentierende Bildschirmposition zentriert. Zur linken Hand des Fensters befindet sich ein Steuerfeld zur dreidimensionalen Echtzeitpositionierung des Verschiebetisches und zur Anwahl unterschiedlicher Motorengeschwindigkeiten.

Die Bewegung der Z-Achse ermöglicht die Kontrolle des Stimulationspunkts auch in der dritten räumlichen Dimension. Zusätzlich besitzt Lucifer einen automatischen Focussiermechanismus auf jene optische Ebene innerhalb des Schnittpräparates mit dem maximalen optischen Kontrast.

Geometrische Beziehungen im Präparat werden über die Definition von dreidimensionalen Koordinaten des XYZ-Tisches, sog. Navigationspunkten repräsentiert. Durch die Verwendung von Navigationspunkten errechnet Lucifer Distanzen, Flächen und Umfänge von optischen Strukturen.

Einen graphischen Überblick über die räumlichen Beziehungen zwischen den Navigationspunkten in der XY-Ebene wird durch das Radar-Panel vermittelt.

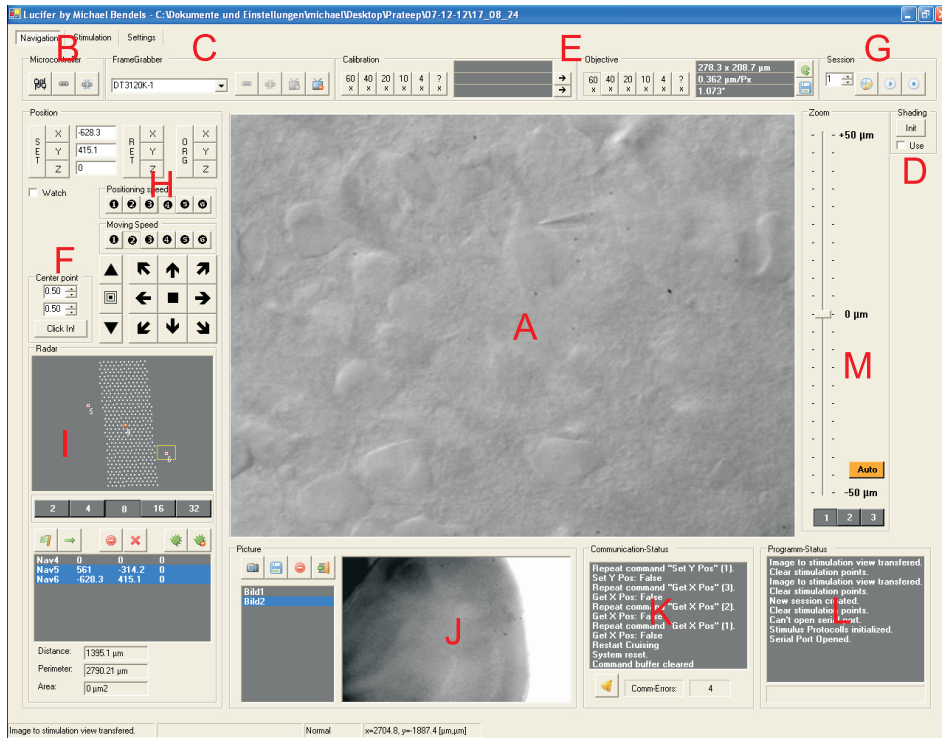


Abbildung 3.4: Der Navigationsschirm. Das Zentrum des Videoschirms (A) stellt das Videobild der Infrarotkamera dar. Die Buttons oberhalb des Videobildes aktivieren die Verbindung zum Verschiebetisch (B), kontrollieren die Framegrabber-Karte (C), die Shading-Korrektur (D), passen die Software an die gewählte Mikroskopvergrößerung an (E), redefinieren das Zentrum des Stimulationspunktes (F) und verwalten den Ablauf des Experimentes (G). Die Steuerung des Verschiebetisches geschieht über die Panels H und I. Innerhalb des Radarpanels (J) werden Navigations- und Stimulationspunkte zur Orientierung in der XY-Ebene dargestellt. Zusätzlich existieren Panels zur Verwaltung der Bilder (K), zur Darstellung des Kommunikationsstatus mit dem Verschiebetisch (L) und zur Dokumentation des Programmstatus (M). Ein vertikaler Slider (N) kontrolliert die Z-Achse des Tisches, d.h. die Fokusebene des Laserstrahls.

Zusätzlich unterstützen die Navigationspunkte im Radarpanel die Generierung eines Planungsbildes. Konkret besteht das Problem darin, dass der Videoschirm in Abhängigkeit des Vergrößerungsfaktors des Mikroskops nur einen kleinen Ausschnitt der zu untersuchenden Region darstellt. Zur Erzeugung eines räumlich ausgedehnten Planungsbildes müssen deshalb mehrere sich überlappende Bilder dieser Region zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden. Navigationspunkte geben, durch Festlegung der räumlichen Grenzen, hierzu die notwendige Orientierung. Ein erstelltes

Übersichtsbild kann nachfolgend in den Stimulationsschirm transferriert werden, wo es als Planungsbild fungiert.

3.4.2 Stimulationsschirm

Der Stimulationsschirm dient der Planung der Stimulation; vgl. Abbildung 3.5. Im Unterschied zum Navigationsschirm - hier wird das aktuelle Mikroskopbild in Form eines Videobildes kontinuierlich aktualisiert - handelt es sich beim Planungsbild um ein statisches Bild.

Stimulationspunkte werden direkt in das Planungsbild eingezeichnet. Jeder Punkt ist mit einer Nummer assoziiert, die seinen Rang während des Stimulationsprozesses definiert. Die sequentielle Abfolge kann manuell beliebig modifiziert werden. Zu beachten gilt hierbei, dass die Pfadlänge und damit die Dauer des Scanningprozesses mit der Anzahl der Stimulationspunkte wie auch durch die Randomisierung der Punktsequenz zunimmt. Um die Generierung vieler Punkte zu erleichtern, existieren unterschiedliche Assistenten, wie bspw. der Polygonkonstruktor, ein Hilfsagent, der die zügige Generierung von komplex-geformten Punktrastern ermöglicht. Jeder Stimulationspunkt wird abschließend mit einem ausgewählten Stimulationsprotokoll assoziiert. Dieses definiert das genau zeitliche Stimulationsmuster an jedem Punkt.

Die gegenwärtige Zielposition des Lasers innerhalb des Planungsbildes wird über einen roten Zielkreis dargestellt und in Echtzeit aktualisiert; vgl. Abbildung 3.4. Zur manuellen Stimulation kann der Laserspot direkt im Planungsbild verändert werden.

3.4.3 Scanning Prozess

Während der Stimulation werden die rechnerinternen Koordinaten der Stimulationspunkte in die korrespondierenden Motorkoordinaten des Verschiebetisches überführt. Zusätzlich zur Ausführung der definierten Stimulationsprotokolle an den jeweiligen Stimulationspunkten nimmt die Kon-

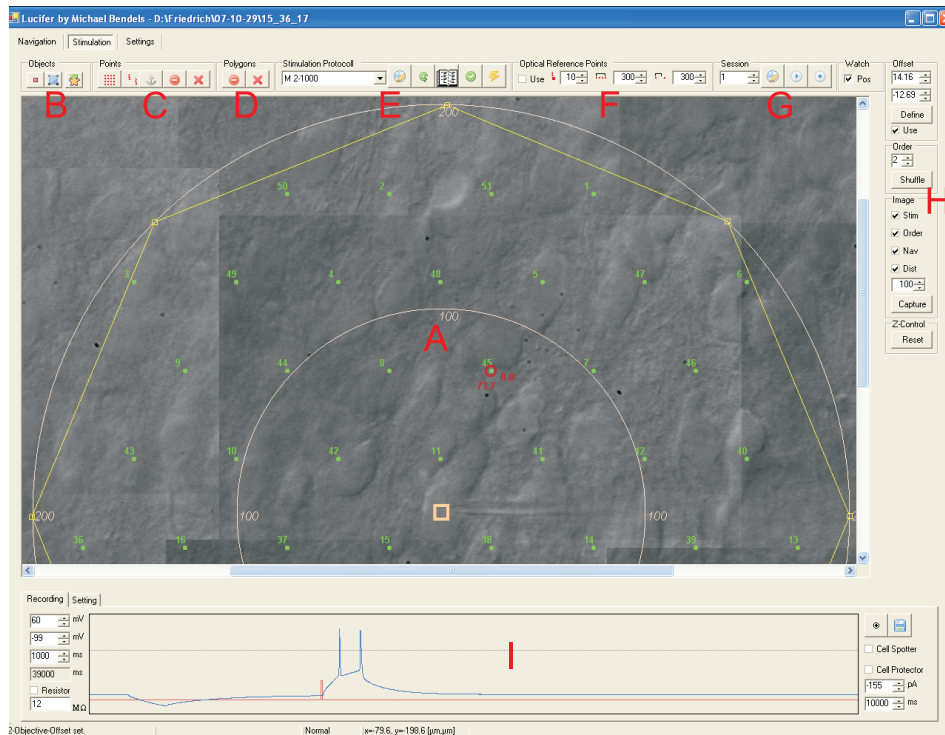


Abbildung 3.5: Der Stimulationsschirm. Der Stimmulationsprozess wird im Planungsbild graphisch ausgearbeitet (A). Vielfältige Funktionen stehen hierzu zur Verfügung, die die Erzeugung und Verwaltung von graphischen Objekten (Punkte, Polygone, Stimmulationsprotokolle) (B-E), die Definition von optischen Referenzpunkten (F, siehe unten) und die Initiierung des Stimmulationsprozesses (G) ermöglichen. Das Aufnahmepanel (I) stellt das zuletzt aufgenommene Messsignal (blau) und das zugehörige Stimmulationsprotokoll (rot) graphisch dar.

trollsoftware gleichzeitig das punktspezifische Signal an der Zielzelle auf, stellt es graphisch dar und speichert es ab. Das Aufnahmesignal wird zur Online-Analyse der zeitlichen Entwicklung des Eingangswiderstandes und des Haltestroms herangezogen.

Optische Referenzpunkte

Aufgrund der inherenten Ungenauigkeit des mechanischen Positioniersystems und der geringfügigen Nicht-Stationaritäten des Schnittpräparates, kann die ursprüngliche Übereinstimmung zwischen anvisiertem optischem Punkt und assoziierter Tischkoordinaten, wie in Abbildung 3.6 illustriert, zunehmend verloren gehen. Diese Ungenauigkeit - im Rahmen der Feh-

lerfortpflanzung kann die Abweichung pro Stimulationpunkt signifikant ansteigen - wird durch sogenannte optische Referenzpunkte kompensiert. Ihre Einführung basiert auf der Idee, die nähere Bildumgebung eines Stimulationpunktes im *Planungsbild* innerhalb des *Videobildes* wiederzuerkennen: Regulär wird ein einfacher Stimulationpunkt über seine korrespondierende Tischkoordinate angefahren. Handelt es sich jedoch um einen optischen Referenzpunkt, so erfolgt nach dem Erreichen der entsprechenden Koordinate ein zusätzlicher Korrekturschritt. In diesem wird das einen optischen Punkt umgebende Bild aus dem *Planungsbild* im *Echtzeitbild* aufgesucht, die Abweichung vom Zentrierpunkt ermittelt und schließlich durch einen Korrekturschritt der Mikroskopoptik behoben. Durch die relative Positionierung der Stimulationpunkte profitieren alle nachfolgend anzufahrenden Punkte von dieser optischen Korrektur.

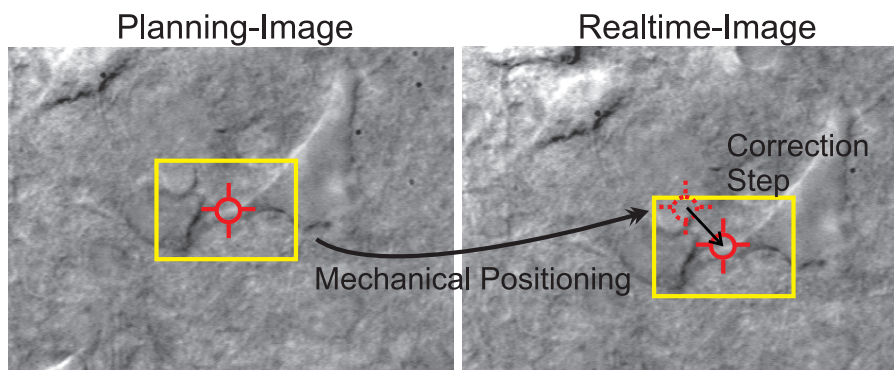


Abbildung 3.6: Die optische Korrektur der Mikroskop-Position. Im Planungsbild (links) wird ein optischer Punkt durch seine assoziierten Mikroskopkoordinaten als Stimulationpunkt definiert (linkes Bild, Fadenkreuz). Aufgrund der Ungenauigkeit des mechanischen Positioniersystems und einer geringen Driftbewegung des Präparates geht die ursprüngliche Übereinstimmung zwischen anvisiertem optischen Punkt und assoziierter Tischkoordinate zunehmend verloren. Evident wird diese Positionierungsungenauigkeit beim Anfahren der ursprünglichen Koordinaten des Stimulationpunktes nach mehreren Stimulationsdurchläufen (rechtes Bild, solides Fadenkreuz). Der optisch identifizierte Stimulationpunkt besitzt nun eine hiervon abweichende Position (gestricheltes Fadenkreuz). Zur Kompensation dieser Ungenauigkeit können ausgewiesene Stimulationspunkte zu optischen Referenzpunkten ernannt werden, nach deren Anfahrt ein zusätzlicher Korrekturschritt erfolgt. In diesem wird der den Stimulationpunkt umgebende Bildausschnitt aus dem *Planungsbild* (links, Rechteck) im *Echtzeitbild* (rechts, Rechteck) aufgesucht, die Abweichung vom Zentrierpunkt ermittelt (Pfeil) und schließlich durch einen Korrekturschritt der Mikroskopoptik behoben. Durch die relative Positionierung der Stimulationspunkte profitieren alle nachfolgend anzufahrenden Punkte von dieser optischer Korrektur.

Zwei-Objektiv-Methode

Zur Kartierung der synaptischen Konnektivität großer Hirnregionen gestaltet sich die Generierung eines Planungsbildes viel einfacher, wenn man ein niedrig-vergrößerndes Objektiv verwendet, da hierdurch der enorme Aufwand entfällt, der durch das rechenintensive Zusammenfügen vieler stark-vergrößernder Einzelbilder entsteht. Besonders die niedrig-kontrastierten optischen Strukturen der tiefen, überwiegend intakten Hirnschnittregionen verkomplizieren die korrekte Bildanordnung. Außerdem stellt das Zusammenfügen vieler Einzelbilder ein rechen- und zeitaufwendiges Unterfangen dar. Auf der anderen Seite ist die Größe des Laserspots im Präparat eine Funktion der verwendeten Objektivstärke, und nur stark-vergrößernde Objektive ermöglichen die Stimulation mit einer kleinen Spotsize. Um diesen Konflikt aufzulösen und eine hohe räumliche Präzision in Kombination mit einem großflächigen Planungsbild zu ermöglichen, werden beide Optionen in der sogenannten Zwei-Objektiv-Methode vereint.

Hierzu werden Planungsbilder mit einem niedrig-vergrößernden Objektiv (z.B. einem 4x-Objektiv und einer Bildausschnittsgröße von 4x3 mm) erzeugt, während die Stimulation unter Verwendung eines stark-vergrößernden Objektivs, wie etwa einem 60x-Objektiv, und einem minimalen Spottedurchmesser von 3 – 5 μm durchgeführt werden. Die Initialisierung der Zwei-Objektiv-Methode gestaltet sich wie folgt; vgl. Abbildung 3.7.

1. Initial wählt man das 60x-Objektiv aus und adjustiert die Spitze einer Patchpipette derart, dass sie in der optischen Ebene und exakt im Zentrum des Echtzeitbildes zu liegen kommt. Anschließend setzt man den Mikroskopursprung neu, so dass die Pipettenspitze die optische Position des Mikroskopursprungs unter der 60x-Vergrößerung markiert.

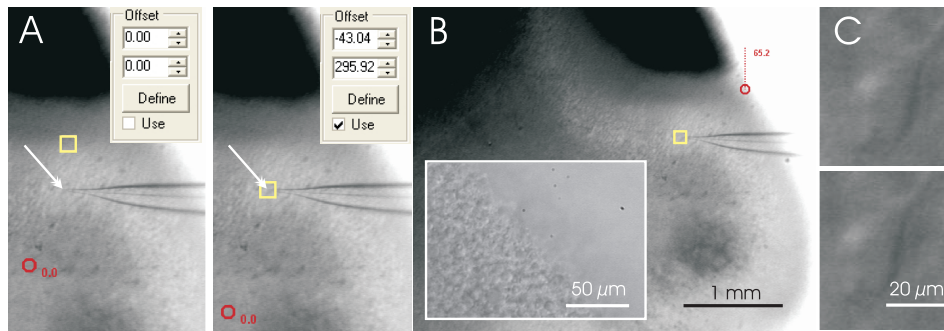


Abbildung 3.7: Die 2-Objektiv-Methode. (A) Zur Initialisierung der 2-Objektiv-Methode adjustiert man unter Verwendung des 60x-Objektivs die Spitze (Pfeil) einer Patchpipette derart, dass sie in der optischen Ebene und exakt im Zentrum des Echtzeitbildes zu liegen kommt. Nach dem Wechsel zum 4x-Objektiv und Aufnahme eines Übersichtsbildes, sind Ursprung (Rechteck) und Pipettenspitze (Pfeil) aufgrund der fehlenden Parafozialität beider Objektive nicht mehr deckungsgleich (links). Durch Markieren der Pipettenspitze ermittelt das System den zu korrigierenden Objektivoffset (rechts), der in der Folge zur Überführung zwischen Bild- und Tischkoordinaten verwendet wird. (B) Nach Reselektion des 60x-Objektivs steht ein stark vergrößerndes Bild (Inset) wieder zur Verfügung. In der Folge repräsentiert die laufend aktualisierte Position der Mikroskopoptik im 4x-Übersichtsbild (roter Kreis am rechten Rand des Präparates) exakt die Position der 60x-Mikroskopoptik und liefert so eine hervorragende Übersicht über das Gesamtpräparat. (C) Die Präzision des Systems ist durch den Vergleich zweier Bilder dokumentiert, die an ein und demselben Stimulationspunkt aufgenommen wurden. Zwischen beiden Aufnahmen liegen 13 Minuten und die zwischenzeitliche Stimulation von 395 Punkten. Die hohe räumliche Präzision des Systems zeigt sich an der nahezu vollständigen Gleichheit beider Bilder.

2. Nun wechselt man auf das 4x-Objektiv und erstellt ein ausreichend großes Übersichtsbild mitsamt der Pipettenspitze. Aufgrund der geringen Vergrößerung reichen hierzu die Aufnahmen einiger weniger Bilder, oft genügt nur ein Bild. Da beide Linse im allgemeinen nicht parafozial zueinander sind, stimmen Mikroskopursprung und optische Position der Patchpipette nun nicht mehr exakt überein. Zur numerischen Erfassung dieses Objektiv-Offsets klickt man mit der Maus auf die Pipettenspitze im Übersichtsbild. Die Entfernung von Ursprung und Pipettenspitze wird in μm errechnet und in der Folgezeit zusätzlich bei der Überführung der rechnerinternen Koordinaten in die Tischkoordinaten verwendet.
3. Der Experimentator kann nun mithilfe des 60x-Objektivs unter Verwendung eines am Mikroskop angeschlossenen Monitors die zu pat-

chende Zelle aufsuchen, währenddessen die Planung unabhängig davon ablaufen kann. Da die externen Positionsänderungen vom Kontrollsystem laufend abgefragt werden, und im Planungsbild die aktuelle Position angezeigt wird, wird die genaue Position der Mikroskopoptik innerhalb des Präparates im Stimulationsschirm angezeigt.

Diese Methode hat den Vorteil, dass nur ein Wechsel der Objektivlinse notwendig ist. Ein Objektivwechsel nach dem erfolgreichen Patchen der Zelle ist überflüssig. Da beide Bilder unterschiedlicher Vergrößerungen entstammen, entfällt die Möglichkeit, optische Punkte zur exakten Anfahrt der im Planungsbild markierten Punkte zu nutzen. Dies stellt jedoch per se keine Einschränkung in der praktischen Anwendung dar: Diese Form der Stimulation wird nicht dazu genutzt, die dendritischen Ausläufer eines Neurons exakt zu stimulieren, sondern sie dient vielmehr dazu, ausgedehnte Areale mit einer räumlichen Präzision von rund 30-50 μm abzuscannen. Dabei reicht es aus, dass sich der Laserspot innerhalb einer ausgewählten Hirnregion, z.B. einer Hirnschicht, bewegt. Das System kann diese Anforderung vollständig gewähren und besitzt eine frappierende Genauigkeit. Selbst nach einer mehrstündigen Arbeit und nach wiederholten und ausgedehnten Stimulationsvorgängen kehrt das System bei Anwahl einer optischen Struktur im Planungsbild genau auf diese im Echtzeitbild zurück; vgl. Abbildung 3.7c.

Visuelle a posteriori Identifikation der optisch stimulierten Neurone

Bei Anwendung der Zwei-Objektiv-Methode existiert keinerlei hochauflösende graphische Information über den Ort der Stimulation. Zur Lösung dieses Problems ist ein Software-Werkzeug vorhanden, das vor jeder Stimulation ein Abbild des Stimulationspunktes abphotographiert, in Echtzeit neben der Spannungsspur anzeigt und als punktassoziertes Bild abspeichert; vgl. Abbildung 3.6c. Diese zusätzliche Bildinformation kann im Rahmen der Messauswertung dazu genutzt werden, die Schnittqualität zu

bewerten oder die Assoziation eines ausgewählten präsynaptischen Zelltyps mit einem charakteristischen postsynaptischen Signal an der Zielzelle zu dokumentieren. Darüberhinaus können die in einem ersten Experimentdurchlauf gewonnenen Einzelbilder als optische Referenzbilder in einem zweiten Durchlauf zur wiederholten Stimulation an identischen Stimulationspunkten genutzt werden.

3.5 Datenakquirierung und Datenanalyse

In diesem Abschnitt wird das entwickelte System dazu genutzt, die intralaminäre Konnektivität von Schicht-II-Sternzellen des medialen entorhinalen Cortex (MEC) zu ermitteln. Hierzu wird in Abschnitt 3.5.1 initial die räumliche Beziehung zwischen dem Stimulationsort und der Position des Zellsomas durch die Messung des räumlichen Profils des AP-Feuerns der exzitatorischen Neurone bestimmt. In Abschnitt 3.5.2 werden die gewonnenen Daten und ihre Analyse dargestellt.

3.5.1 Die effektive Auflösung des Systems: Das photo-induzierte räumliche Antwort-Profil

Das Hauptziel von Kartierungsexperimenten ist die Identifikation der präsynaptischen Zellen. Mit ihren dendritischen und axonalen Bäumen erstrecken sich Neurone jedoch über ein weit ausgedehntes Areal. So können dendritische Amplifikationsmechanismen zu einem AP-Feuern führen, selbst dann noch, wenn die aktivierte dendritische Region, der sog. Hotspot, weit entfernt vom Zellsoma liegt (Frick *et al.*, 2001). Zur Quantisierung der räumlichen Beziehung zwischen Soma und Hotspot und damit zur Bestimmung der räumlichen Auflösung der Photostimulation innerhalb des untersuchten Gebietes wird initial die photo-induzierte räumliche Antwortaktivität der exzitatorischen Hauptzellen in der Schicht-II des MEC bestimmt. Hierbei handelt es sich also um eine Setup- und Hirnregion-spezifische Kalibration.

Konkret werden current-clamp Aufnahmen der beiden exzitatorischen Hauptneurone in der Schicht-II des MEC (Alonso & Klink, 1993), der Sternzelle und der Pyramidenzelle durchgeführt. Aufgrund der Pleomorphie der inhibitorischen Interneurone wird auf ihre Charakterisierung verzichtet. Der photo-induzierte Zeitverlauf des Membranpotentials wird als Funktion der Laserspot-Position relativ zum Zellsoma gemessen; siehe Abbildung 3.8a und b. Das hierzu verwendete hexagonale Gitter von Stimulationspunkten besitzt einen Punktabstand von $50 \mu\text{m}$ und erstreckt sich kreisförmig mit einem Radius von $300 \mu\text{m}$ über die perisomatische Region des Neurons. Zur Quantifizierung der punktspezifischen Aufnahmen des Membranpotentials wird die kumulative Spike-Count-Verteilung als Funktion der Distanz vom Zellsoma berechnet; vgl. Abbildung 3.8c. Für diese Verteilung wird eine kritische Distanz d^* definiert, innerhalb derer sich 75% aller evozierten Spikes hervorrufen lassen. Je kleiner d^* ist, desto kleiner ist die Aktivierungsregion und umso größer ist der Informationsgehalt der Kartierungsdaten bezüglich der räumlichen Lokalität des Zellsomas.

Zur Analyse des Einflusses der Lichtenergie auf die kritische Distanz d^* ist die Verteilung von d^* als Funktion des Laser-Energielevels in Abbildung 3.8d dargestellt. Der Median von d^* beider Zellpopulationen variiert nur geringfügig für unterschiedliche Energiestufen. So erstreckt sich der Median d^* für Sternzellen von $137.6 \mu\text{m}$ bis $151.7 \mu\text{m}$ and von $198.4 \mu\text{m}$ bis $213 \mu\text{m}$ für Pyramidenzellen. Das Antwortprofil der Sternzelle ist durch eine höhere Auflösung gekennzeichnet, d.h. für die Lichtenergie E_{stim} besitzt die Verteilung der kritischen Werte d^* einen Median von $141.6 \mu\text{m}$ (Interquartilsabstand: $32 \mu\text{m}$) für Sternzellen und einen Median von $198.4 \mu\text{m}$ (Interquartilsabstand: $38.7 \mu\text{m}$) für Pyramidenzellen.

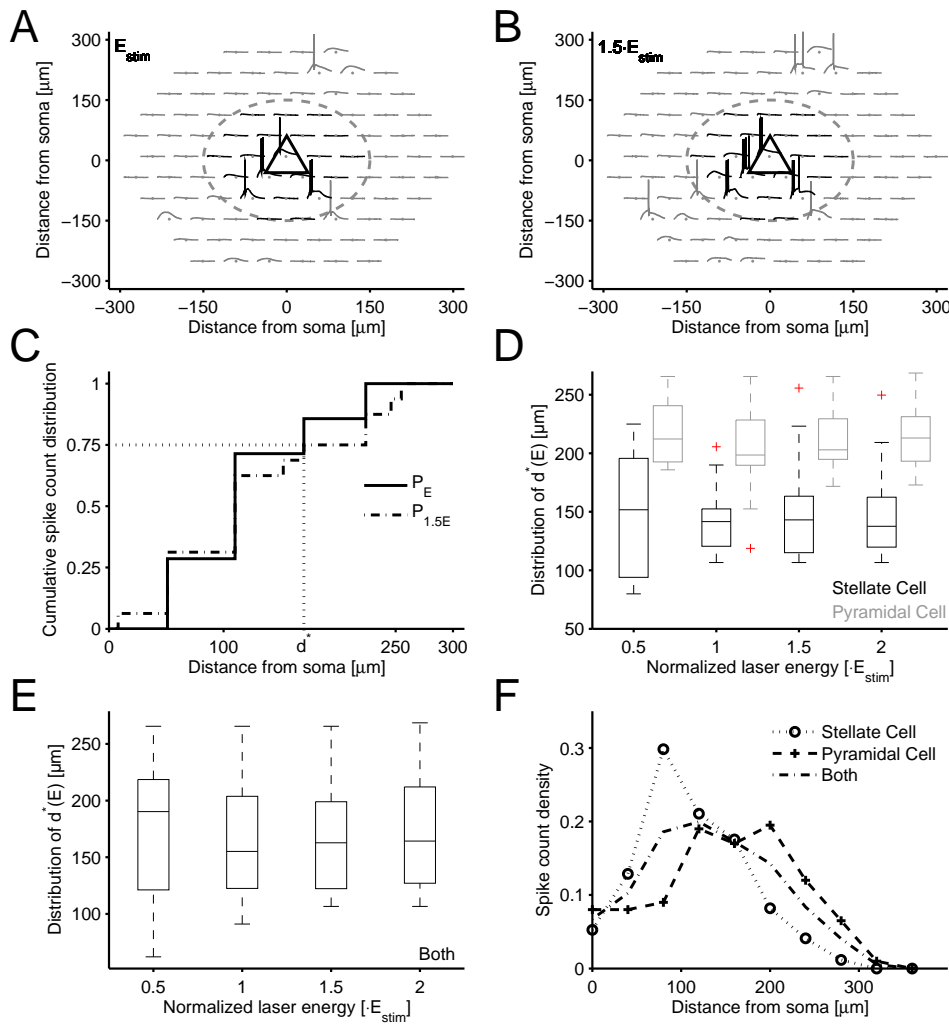


Abbildung 3.8: Photo-induzierte räumliche Antwortaktivität eines Einzelneurons. (A) Zur Charakterisierung der photo-induzierten Aktivität eines current-clamped Neurons als Funktion der Laserspot-Position relativ zum Soma (Dreieck) wird ein hexagonales Punktraster, das eine kreisförmige Region von 300 μm um die Zelle bedeckt und einen Punktabstand von 50 μm besitzt, nacheinander mit unterschiedlichen Lichtenergien photostimuliert. Die punktspezifische zeitliche Entwicklung des Membranpotentials ist in topographischer Ordnung abgebildet, die perisomatische Region wird durch einen 150 μm Kreis (gestrichelter Kreis) um das Soma definiert. Überschwellige Aktivierungen werden hauptsächlich perisomatisch (schwarz gefärbt) hervorgerufen, können aber auch von außerhalb der perisomatischen Region induziert werden (grau eingefärbt). Multiple Spikes sind exklusiv perisomatisch lokalisiert. (B) Wie in (A), nur mit einer 150 % Stimulationsenergie. Alle in (A) identifizierten Hotspots zeigen ein höheres Aktivierungslevel, und vormals auffallende unterschwellige Aktivierungen werden 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) Boxplot der Verteilung von d^* als Funktion der normalisierten Laserenergie in beliebigen Einheiten für Sternzellen (schwarz, $N=27$) and Pyramidenzellen (grau, $N=18$). Die Boxen zeigen den Median und die 25 % und 75 %-Quartile. (E) Verteilung der kritischen Entfernung d^* nach der Vereinigung beider Zelltypen. Die Energie E_{stim} liefert den kleinsten Median d^* . (F) Spike-Count-Verteilung als Funktion der Distanz für beide exzitatorischen Zelltypen separiert und vereint betrachtet, bei einer Laserenergie von E_{stim} .

Zur Identifikation der optimalen Stimulusenergie wird die Verteilung der kritischen Distanzen d^* für beide exzitatorische Zelltypen ermittelt. Wie in Abbildung 3.8e gezeigt, induziert die Stimulationsenergie $E_{\text{stim}}=1$ die kleinste kritische Distanz von $155.1 \mu\text{m}$ (Interquartilsabstand: $81.3 \mu\text{m}$) und wird deshalb zur Durchführung der Kartierungsexperimente verwendet.

Darüberhinaus wurde das durchschnittliche räumliche Antwortprofil beider exzitatorischen Zelltypen bestimmt. Die radiale Spike-Count-Verteilung als Funktion der Distanz zwischen Stimulationsort und Soma ist in Abbildung 3.8f gezeigt: Sternzellen zeigen ein scharfes Maximum bei $80 \mu\text{m}$, wohingegen das Profil der Pyramidenzellen durch ein flaches Maximum zwischen $120 \mu\text{m}$ und $210 \mu\text{m}$ charakterisiert ist. Beide Antwortprofile dokumentieren, dass das Soma nicht die Region mit der höchsten Glutamat-Sensitivität ist. Diese findet sich in einem perisomatischen Kreissegment, das sich von $57 \mu\text{m}$ bis $133 \mu\text{m}$ für Sternzellen und von $112 \mu\text{m}$ bis $214 \mu\text{m}$ für Pyramidenzellen erstreckt.

In Kartierungsexperimenten ohne optische Kontrolle der stimulierten Neurone ist eine Unterscheidung zwischen den aktivierten, potentiell präsynaptischen Zelltypen nicht möglich. Um mit dieser Ungenauigkeit umzugehen, wurde das durchschnittliche Antwortprofil über beide exzitatorische Zelltypen ermittelt; vgl. Abbildung 3.8f. Die Region mit der höchsten photo-induzierten Aktivität erstreckt sich über ein perisomatisches Kreissegment von $75 \mu\text{m}$ bis $160 \mu\text{m}$.

3.5.2 Kartierung der funktionellen Konnektivität von entorhinalen Schicht-II Sternzellen

In diesem Abschnitt wird das Muster der intralaminären funktionellen Konnektivität der medialen entorhinalen Schicht-II-Sternzellen analysiert. Zu diesem Zweck wird die Zelle im Voltage-clamp Modus bei einem Ruhemembranpotential von -60 mV gehalten. Zur simultanen Detektierung

von EPSCs wie auch IPSCs wird eine intrazelluläre Lösung verwendet, die eine niedrige Chloridkonzentration aufweist (Pouille & Scanziani, 2001); siehe Methoden in Abschnitt 3.3. Die Stimulationsregion erstreckt sich über die gesamte Schicht II des medialen entorhinalen Cortex und bedeckt eine Fläche von näherungsweise 2.5 mm x 0.5 mm.

Datenanalyse

An jedem Stimulationspunkt wird ein intrazelluläres Stromsignal von 600 ms Dauer mit einer Digitalisierungsrate von 5 kHz aufgenommen. Für die nachfolgende Analyse wird das aufgenommene Signal, wie in Abbildung 3.9a gezeigt, in vier Zeitintervalle unterteilt (I, IIa, III und IIb). In Zeitintervall I, welches eine Dauer von 150 ms besitzt, wird die Zelle einem 4 mV Teststimulus zur Bestimmung des Zell- und Serienwiderstandes ausgesetzt. Zu Beginn des Zeitintervalls III, zum Zeitpunkt $t=300$ ms, wird der 2 ms andauernde Lichtstimulus appliziert. PSCs, die in dem 86 ms andauernden Zeitintervall III detektiert werden, werden als photo-induzierte PSCs klassifiziert. Konkret werden Signale, die innerhalb der ersten 5 ms nach Stimulusinitiierung auftreten, als direkte Signale, PSCs die später im Zeitintervall III (5 ms bis 86 ms nach Lichtstimulus) auftreten, als indirekte Signale klassifiziert. Zur Schätzung der spontanen Aktivität werden zusätzlich PSCs in Zeitintervall IIa (150 ms Dauer) und IIb (214 ms Dauer), die das Zeitintervall III umranden, detektiert. PSCs in den Zeitintervallen IIa/b werden als spontane Signale gewertet; vgl. Abbildung 3.9c.

Zur Spezifizierung der Dauer von Zeitintervall III, in welchem auftretende PSCs als photo-induziert klassifiziert werden, wird die durchschnittliche PSC-Rate während der Prozessierung des Stimulusprotokolls als Funktion der Zeit berechnet; vgl. Abbildung 3.9d. Nur jene Zellen wurden in die Analyse miteinbezogen, bei denen die PSC-Rate eine signifikante (student's t-test, $p < 0.05$) Zunahme nach Lichtapplikation entwickelte ($N=17/20$). Das der Lichtapplikation vorausgehende Zeitintervall IIa

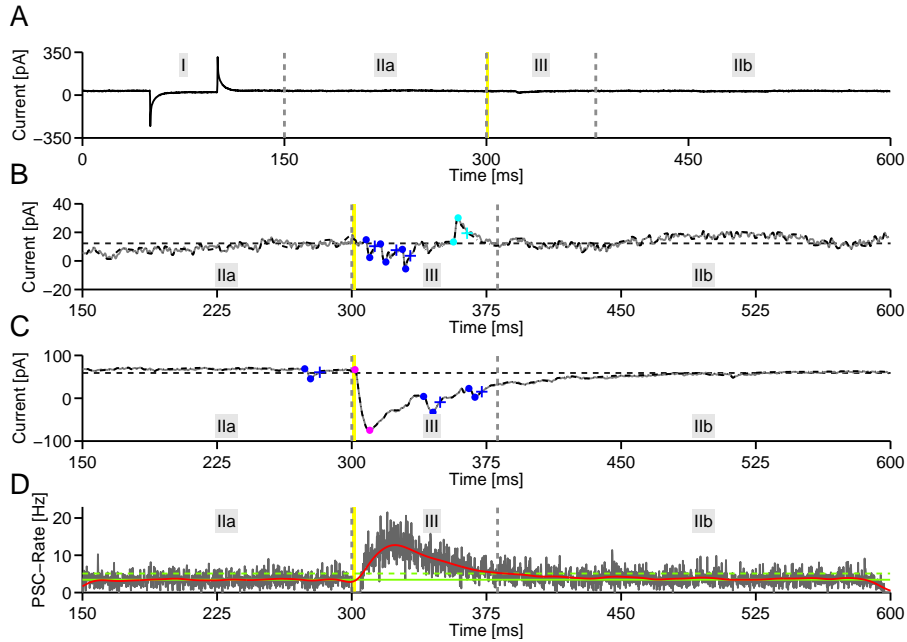


Abbildung 3.9: PSC-Detektion und Klassifikation. (A) An jedem Stimulationspunkt wird ein punktspezifisches Signal von 600 ms Dauer aufgenommen und nachfolgend in vier Zeitintervalle (I, IIa, III und IIb) aufgeteilt. Zeitintervall I wird zur Dokumentation der zeitlichen Entwicklung der Aufnahmeparameter genutzt. Zu Beginn von Zeitintervall III, zum Zeitpunkt $t=300$ ms, wird der Lichtstimulus (gelber Balken) appliziert (Dauer 2 ms). All jene in III detektierten PSCs werden als photo-induzierte Signale gewertet. (B,C) PSCs werden mithilfe eines iterativen Algorithmus, der in Abschnitt 3.3.2 beschrieben ist, detektiert. Zur Verbesserung der Detektion werden geringfügige Fluktuationen in der Originaltrajektorie (graue Funktion) durch interpolierende Splines (schwarze Funktion) substituiert. Der Algorithmus ermittelt die Grundlinie (gepunktete Linie), die Initiierung und den Peak (Punkte) des PSCs und die Abklingkonstante (Kreuz). Darüberhinaus unterscheidet er zwischen direkten PSCs (magenta), indirekten EPSCs (blau) und indirekten IPSCs (cyan). Im Gegensatz zum Beispiel in (B) zeigt das aufgenommene Signal in (C) ein spontanes EPSC. (D) Zur Herleitung eines Kriteriums, das die Dauer von Zeitintervall III definiert, ist die durchschnittliche punktspezifische PSC-Rate als Funktion der Zeit aufgetragen (graue Funktion, bin size=0.2 ms, $N=17/20$) und zusätzlich mit einem Gauss-Filter ($\sigma=5$ ms) geglättet (rote Funktion). Die mittlere Rate von Zeitintervall II definiert die spontane PSC-Rate von 3.6 Hz (grüne durchgezogene Linie). Unmittelbar nach Lichtapplikation steigt die PSC-Rate rasch an, erreicht ihr Maximum nach 23 ms und fällt langsam ab, um nach 167 ms nach Stimulusapplikation das Niveau der Spontanrate wieder einzunehmen. 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 die Dauer von Zeitintervall III ($\Delta t=81.2$ ms).

ist charakterisiert durch eine nahezu kontante PSC-Rate. Der Mittelwert dieses Zeitintervalls definiert die spontane PSC-Rate während des Experimentes ($\nu = 3.6$ Hz; grüne solide Linie in Abbildung 3.9d). Unmittelbar nach Lichtapplikation, zu Beginn von Zeitintervall III, steigt die PSC-Rate rasch an, erreicht ihr Maximum von 13 Hz nach 23 ms und klingt dann langsam auf das Niveau der spontanen PSC-Rate ab, die sie 168 ms nach Stimulusapplikation erreicht und bis zum Ende von Zeitintervall IIb beibehält. Dieser Anstieg der PSC-Rate wird durch die photo-induzierten PSCs hervorgerufen. Die Hälfte der photo-induzierten PSCs erreicht die Zielzelle innerhalb der ersten 32 ms, 75 % der photo-induzierten PSCs innerhalb der ersten 51.4 ms nach Stimulusapplikation. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Abstands der photo-induzierten PSCs wird das Zeitintervall III als jenes Zeitfenster definiert, in welchem die PSC-Rate eine Standardabweichung ($\sigma_r = 1.7$ Hz) oberhalb der durchschnittlichen spontanen PSC-Rate besitzt (gepunktete grüne Linie in Abbildung 3.9d). Nach dieser Regel ergibt sich für die Dauer des Zeitintervalls III ein Wert von $\Delta t = 86$ ms.

Zur Quantifizierung des punktspezifischen synaptischen Eingangs wird ein Summensignal durch die Addition der Peak-Amplituden der photo-induzierten, also in Zeitintervall III detektierten, PSCs gebildet. Da beide Signaltypen, spontane und photo-induzierte PSCs, ähnliche biophysikalische Kenngrößen besitzen (Peak-Amplitude, Rise- und Decay-Konstante), ist eine einfache Separation dieser Einzelereignisse nicht ohne weiteres möglich. Zur numerischen Korrektur der Spontanaktivität wird das durchschnittliche Summensignal von Zeitintervall IIa und IIb von dem photo-induzierten indirekten Summensignal von Zeitintervall III subtrahiert.

Diese punktspezifische Hintergrundkorrektur des indirekten, synaptischen Eingangs wird dadurch gerechtfertigt, dass sich der Zeitverlauf der Spontanrate während eines Experiments signifikant ändern kann; jedoch mit einer wesentlich langsameren Zeitskala als die photo-induzierte Rate.

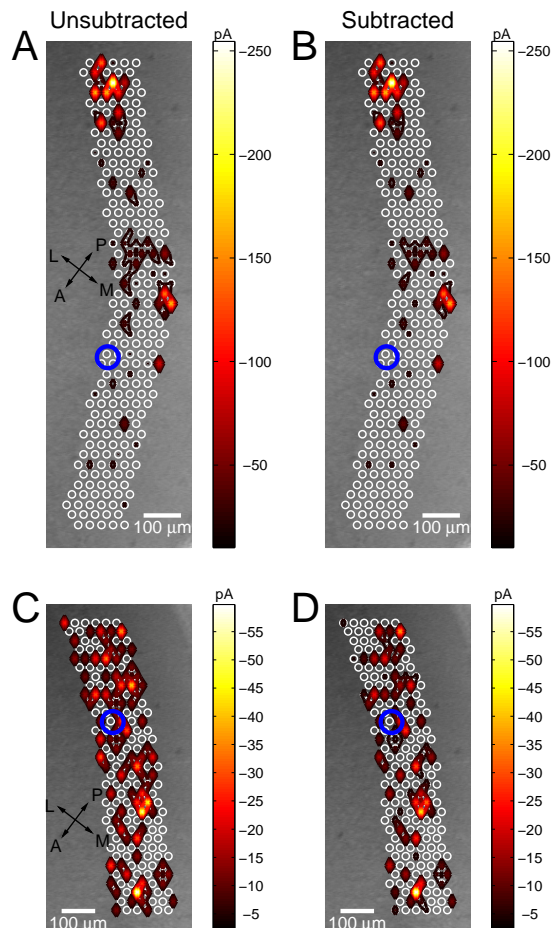


Abbildung 3.10: Subtraktion der Hintergrundaktivität vom Summensignal. (A,C) Das photo-induzierte Summensignal von Zeitintervall III ist in topographischer Ordnung abgebildet; der Ort der Zielzelle ist durch einen blauen Kreis markiert. Im Gegensatz zum Versuch in (A), der durch eine niedrige spontane PSC-Rate charakterisiert ist, zeigt der Versuch in (C) eine relativ hohe spontane PSC-Rate. (B,D) Zur Korrektur der spontanen Aktivität wird vom photo-induzierten Summensignal das durchschnittliche Summensignal der Zeitintervalle IIa und IIb punktspezifisch subtrahiert. Die so korrigierten Summensignale ändern sich nur geringfügig für (A), während für (C) mehrere Signale verschwinden. Die Subtraktion führt hier zu einer Akzentuierung der Hotspots durch eine überdurchschnittliche Verkleinerung der schwachen Summensignale.

Noch nach zwei Sekunden lässt sich eine signifikante Korrelation von 0.11 zwischen den Spontanraten nachfolgender Signale feststellen (student's t-test, $p < 2 \cdot 10^{-4}$). Im Gegensatz dazu kann eine Korrelation zwischen spontaner und photo-induzierter Aktivität während eines Versuchs nicht beobachtet werden. Der Effekt der Korrektur der Hintergrundakti-

vität auf die resultierende Kartierung der indirekten Eingänge ist in Abbildung 3.10 dargestellt. EPSC- und IPSC-Rate sind sowohl für photo-induzierte als auch für spontane PSCs bestimmt.

Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurden die Rate und die biophysikalischen Eigenschaften der detektierten photo-induzierten und spontanen PSCs analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass die photo-induzierte PSC-Rate r^P signifikant höher (student's t-test, $p < 8 \cdot 10^{-4}$) für EPSCs ($r_{\text{exc}}^P = 6.8 \pm 5$ Hz) als für IPSCs ($r_{\text{inh}}^P = 2.2 \pm 1.6$ Hz) ist. Gleichermaßen ist die spontane EPSC-Rate ($r_{\text{exc}}^S = 3.4 \pm 2.5$ Hz) signifikant höher ($p < 3 \cdot 10^{-5}$) als die spontane IPSC-Rate ($r_{\text{inh}}^S = 0.4 \pm 0.4$ Hz).

Die durchschnittlichen Quotienten R zwischen photo-induzierter und spontaner PSC-Rate betragen $R_{\text{exc}} = 2.3 \pm 0.8$ und $R_{\text{inh}} = 7.4 \pm 6.4$. Der inhibitorische Antwortquotient ist signifikant ($p < 0.0024$) höher als der exzitatorische Antwortquotient.

Die folgenden biophysikalischen Kenngrößen wurden für die photo-induzierten PSCs ermittelt (Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts): EPSCs zeigen eine mittlere Peak-Amplitude von -25.5 ± 0.3 pA ($N=4024$), während IPSCs eine mittlere Peak-Amplitude von 22 ± 0.5 pA ($N=1195$) besitzen. Die mittlere Abklingkonstante ist 6.5 ± 0.08 ms für photo-induzierte EPSCs, und 11.6 ± 0.26 ms für photo-induzierte IPSCs.

Spontane PSCs besitzen geringfügige aber signifikante (t-test, $p < 10^{-17}$) unterschiedliche biophysikalische Kenngrößen: Die mittlere Peak-Amplituden verringert sich sowohl für spontane EPSCs (-14.7 ± 0.1 pA, $N=10272$) als auch für spontane IPSCs (13.4 ± 0.1 pA, $N=1084$). Zusätzlich steigt die mittlere Abklingkonstante für spontane EPSCs auf 7.5 ± 0.06 ms und für spontane IPSCs auf 14.3 ± 0.3 ms. Da die Kenngrößen von photo-induzierten und spontanen PSCs sich nur geringfügig voneinander unterscheiden, ist ihre eindeutige Separation nicht möglich.

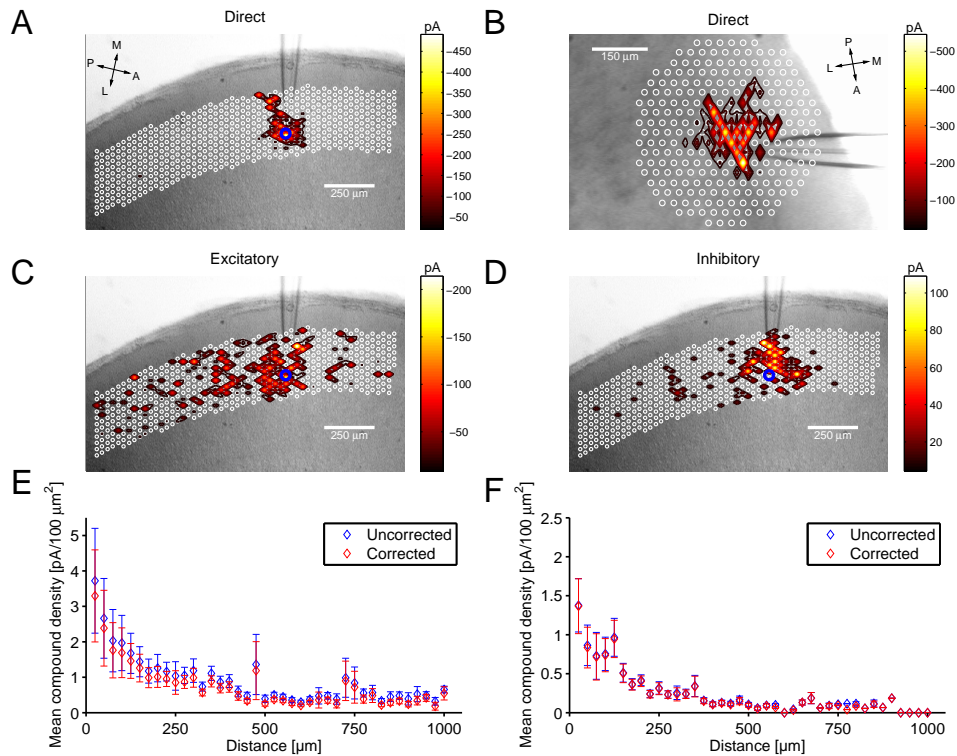


Abbildung 3.11: Direkte Aktivierung und Input-Karte einer MEC-II Sternzelle. (A) Direkte Aktivierung einer Schicht-II-Sternzelle (Soma als blauer Kreis) als Funktion des Stimulationspunktes. Die direkte Aktivierung zeigt sich als ein zusammenhängendes Areal, ihre Amplitude erreicht einen Maximalwert von 450 pA. (B) Direktes Aktivierungsprofil einer zweiten Sternzelle. Obwohl Hotspots meist perisomatisch lokalisiert sind, können sie auch in Regionen, die bis zu 300 μm weit vom Soma entfernt liegen, auftreten. (C,D) Beispiele einer afferenten Karte einer Sternzelle (dieselbe wie in A), aufgeteilt in exzitatorische und inhibitorische Summensignale, dargestellt als Funktion des Stimulationspunktes. Sternzellen empfangen ihren synaptischen Eingang sowohl von exzitatorischen als auch von inhibitorischen Neuronen, wobei die exzitatorischen Eingänge die gesamte Schicht-II des medialen entorhinalen Cortex bedecken. Das exzitatorische Summensignal beträgt bis zu -180 pA, wohingegen das inhibitorische Summensignal einen maximalen Wert von 120 pA annimmt. Zur Quantifizierung der mittleren ($N_{\text{exc}}=18$, $N_{\text{inh}}=18$) räumlichen Verteilung von exzitatorischen (E) und inhibitorischen (F) synaptischen Eingängen, ist die mittlere Summendichte j für unkorrigierte (blaue Funktion) und Hintergrund-korrigierte (rote Funktion) Karten als Funktion der Distanz zwischen dem Stimulationsort und dem Soma der Zielzelle aufgetragen. Exzitatorische Eingänge entspringen von weiter distal gelegenen Lokalisationen als die inhibitorischen, welche akzentuierter um das Zellsoma herum lokalisiert sind.

In einem zweiten Schritt wird die Stärke des synaptischen Eingangs mithilfe des Hintergrund-korrigierten exzitatorischen und inhibitorischen Summensignals quantisiert, die für jeden Stimulationspunkt berechnet wird. Abbildung 3.11 zeigt eine ausgesuchte, repräsentative afferente Karte für exzitatorische (Abbildung 3.11a) und inhibitorische (Abbildung 3.11b) Summensignale. Die Sternzelle besitzt sowohl exzitatorische als auch inhibitorische synaptische Eingänge. Die exzitatorischen Eingänge entstammen von der gesamten Schicht-II des medialen entorhinalen Cortex. Das exzitatorische Summensignal ist größer als das inhibitorische Summensignal. Es kann bis zu 220 pA pro Stimulationspunkt betragen.

Zur Quantisierung der räumlichen Verteilung des synaptischen Eingangs über alle Versuche ($N_{\text{exc}} = 17$, $N_{\text{inh}} = 17$) wird die mittlere Summendichte $j(r)$ (Strom pro Fläche) als Funktion der Entfernung r des Stimulationortes vom Soma der Zielzelle berechnet; vgl. Abbildung 3.11c und d. Sowohl die exzitatorische als auch die inhibitorische mittlere Summendichte verringert sich mit zunehmender Entfernung vom Zellsoma. Berechnet man den Quotienten zwischen der mittleren Summendichte des ersten und zweiten perisomatischen Millimeters, erhält man 3 : 1 für Einwärtsströme und 6 : 1 für Auswärtsströme. Folglich entspringen exzitatorische Eingänge von weiter distal gelegenen Orten als die inhibitorischen Eingänge, die akzentuierter aus der perisomatischen Region herrühren.

Abschließend wird die Reproduzierbarkeit der direkten und synaptischen Aktivierungsprofile durch die wiederholte Prozessierung eines identischen Stimulationsmusters gemessen ($N_{\text{trials}} = 4$); vgl. Abbildung 3.12. Hier zeigt sich, dass das direkte Aktivierungsprofil, d.h. dessen räumliche Ausdehnung und die punkt-spezifischen Peak-Amplituden, nahezu identisch für alle Versuche ist (Abbildung 3.12a). Im Gegensatz dazu zeigt das exzitatorische Summensignal eine höhere Variabilität zwischen den Versuchen (Abbildung 3.12b). Ursache hierfür sind die unreliable AP-Erzeugung und -Transmission und die hohe spontane Hintergrundaktivi-

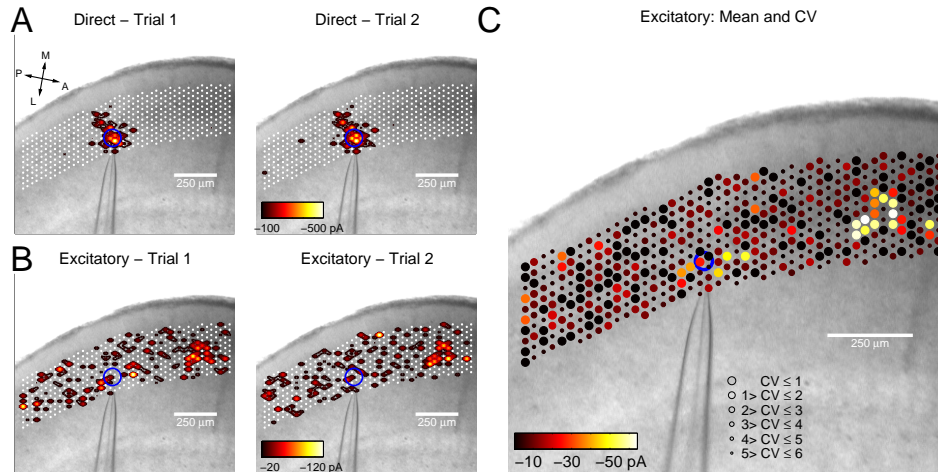


Abbildung 3.12: Reproduzierbarkeit der Aktivierung. (A) Darstellung einer direkten Aktivierung einer Schicht-II-Sternzelle (Soma als blauer Kreis) als Funktion des Stimulationspunktes für zwei von vier Versuchen, bei denen mit einem identischen Muster stimuliert wird. Das Aktivierungsprofil ist nahezu identisch für beide Versuche. (B) Wie in (A) für das exzitatorische Summensignal, das eine höhere Variation zwischen den Versuchen zeigt. Ursächlich hierfür sind die unreliable AP-Erzeugung und -Transmission und die hohe Hintergrundaktivität. (C) Topographische Darstellung von Mittelwert und Variationskoeffizient (CV) des punkt-spezifischen Summensignals über alle Versuche ($N_{\text{trials}} = 4$). Die Größe des Mittelwerts und des CV sind durch die Farbe bzw. den Radius des zugehörigen Stimulationspunktes repräsentiert. Signale, die durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet sind (=kleiner Radius), besitzen meist geringe Amplituden. Große Summensignale sind vorzugsweise von geringerer Variabilität. Demnach werden starke synaptische Verbindungen, ungeachtet eines großen Rauschlevels, zuverlässig detektiert.

tät während des Stimulationsprozesses. Der über alle Versuche gemittelte Quotient R zwischen der photo-induzierten und spontanen EPSC-Rate beträgt $R_{\text{exc}} = 1.4 \pm 0.18$. Mit dem Ziel, den Grad der Ähnlichkeit zwischen den afferenten Karten zu quantifizieren, werden Mittelwert und Variationskoeffizient (CV) des punkt-spezifischen Summensignals über alle Versuche berechnet. Beide Parameter sind in Abbildung 3.12c topographisch dargestellt, wobei die Größen von Mittelwert und CV durch die Farbe bzw. den Radius des korrespondierenden Stimulationspunktes repräsentiert sind. Signale mit einer hohen Variabilität besitzen meist geringe Amplituden, während große Summensignale vorzugsweise von geringerer Variabilität sind. Folglich werden starke synaptische Verbindungen, ungeachtet eines großen Rauschlevels, zuverlässig detektiert.

3.6 Diskussion

In diesem Kapitel wurde eine Software-Lösung zur einfachen Planung und Durchführung von Photostimulationsexperimenten vorgestellt und zur Kartierung der intralaminären Konnektivität der MEC-Schicht-II-Sternzelle genutzt. Die Ausarbeitung des Stimulationsvorgangs, d.h. die Definition der Stimulationsorte und die Festlegung der Reihenfolge ihrer Prozessierung, geschieht auf Basis eines großflächigen Übersichtsbildes, das vor Beginn des Experiments mit einem niedrig-vergrößernden Objektiv erstellt worden ist. Die eigentliche Photostimulation wird anschließend mit einem stärker-vergrößernden Objektiv zur Reduktion der Lichtspotgröße und damit zur Erhöhung der räumlichen Auflösung durchgeführt. Ermöglicht wird diese 2-Objektiv-Methode durch die Herstellung einer Beziehung zwischen der Position des Laserspots im mechanischen Raum und seiner Position innerhalb eines Mikroskopbildes. Durch dieses Vorgehen umgeht man u.a. die methodisch schwierige, postexperimentelle Bestimmung der Stimulationspunkte. Die räumliche Auflösung im zweidimensionalen Raum wurde für Sternzellen und Pyramidenzellen in der Schicht-II des medialen entorhinalen Cortex bestimmt. Die funktionelle Konnektivität der MEC-Schicht-II-Sternzelle wurde kartiert. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit jenen Resultaten, die von anderen Arbeiten bekannt sind (Kumar *et al.*, 2007). Die Analyseroutine detektiert automatisch synaptische Ereignisse, deren Quantifizierung unter Miteinbeziehung der synaptischen Hintergrundaktivität durchgeführt wurde.

3.6.1 1-Photonen- versus 2-Photonen-Uncaging

Verglichen mit den kürzlich entwickelten 2-Photonen-basierten Ansätzen, die eine echte Einzelzell-Auflösung auf Basis einer kombinierten Anwendung von Glutamat-Uncaging und der Einfärbung von neuronalen Zellkörpern erzielen (Nikolenko *et al.*, 2007), erscheint der 1-Photonen-Ansatz primär begrenzt. So kann eine spezifische indirekte postsynaptische Antwort

aufgrund der Lichtstreuung innerhalb des neuronalen Gewebes die Aktivierung mehrerer präsynaptischer Zellen widerspiegeln. Diese inherente Eigenschaft von 1-Photonen-Systemen resultiert aus dem relativ größeren Freisetzungsvolumen von Glutamat. Unter Berücksichtigung des ausgedehnten räumlichen Profils der Einzelzellaktivierung, welche durch die Aktivierung dendritischer Abschnitte hervorgerufen wird, ist es schwierig, das Soma der Zielzelle präzise im Raum zu lokalisieren. Aus diesem Grund gestaltet sich die Entscheidung, ob Antworten benachbarter Stimulationspunkte gleichen oder unterschiedlichen Zellen zuzuordnen sind, mitunter als schwierig. Ungeachtet dessen besteht die Möglichkeit - eine für 60-90 Minuten stabile Whole-Patch-Clamp-Ableitung vorausgesetzt - großflächige, mehrere Quadratmillimeter große corticale Areale systematisch abzutasten. Auf dieser räumlichen Skala kann eine quantitative Aussage über die Konnektivitätsmuster einer Einzelzelle in Bezug auf corticale Unterregionen, Schichten und benachbarte Regionen auch ohne eine echte Einzelzellauflösung getroffen werden und zur Ausarbeitung zelltypspezifischer Innervationsmuster genutzt werden. Im Vergleich zu den technisch anspruchsvolleren 2-Photonen-basierenden Systemen ist ein Lucifer-basierendes System sehr kostengünstig, da nur wenige zusätzliche Standardgerätschaften zur Aufrüstung eines Infrarot-Videomikroskopie-DIC-Patch-Clamp-Setups zu einem Photostimulations-Setup notwendig sind. Aus dieser Perspektive offeriert die Lucifer-Software einige einzigartige Eigenschaften, die im direkten Vergleich mit anderen 1-Photonen-Ansätzen hervorstechen.

3.6.2 Vergleich zu anderen 1-Photonen-Uncaging-Setups

Im allgemeinen existieren für 1-Photonen-Uncaging-Setups zwei unterschiedliche Grundkonzepte zur Positionierung des Laserstrahls in mikroskopischen Schnittpräparaten. Die erste Möglichkeit besteht darin, den Laserstrahl an die unterschiedlichen Positionen im Blickfeld des statio-

nären Mikroskops auszulenken und nachfolgend die stimulierten Positionen dem Mikroskopbild zuzuordnen (Shepherd *et al.*, 2003). Die Größe des Blickfeldes hängt dabei von der Vergrößerung des verwendeten Objektivs ab. Dieser Nachteil kann zwar durch die Repositionierung des Mikroskops in angrenzende Areale kompensiert werden (Jin *et al.*, 2006), erfordert jedoch das nachträgliche Zusammenfügen einer - von der Auflösung abhängigen - großen Anzahl von DIC-Bildern. Desweiteren erschwert dieses Procedere die genaue, an Schichten oder Subregionen orientierte Planung der Stimulation. Aus diesem Grund hat der Experimentator stets einen Kompromiss zwischen der Größe des zu untersuchenden Areals und der Größe des Laserspots zu finden.

Die zweite Option besteht darin, Objektiv und Schnittpräparat relativ zueinander zu bewegen. Der Laserspot wird nun vom Focuspunkt des Objektivs definiert. Für gewöhnlich wird die XY-Ebene in fest definierten Schritten um die gepatchte Zelle herum abgetastet. Die Möglichkeit einer variablen und individuellen, an den corticalen Subregionen orientierten Anpassung des Stimulationsgebietes ist nicht gegeben. In dem nachfolgenden Arbeitsschritt wird das stimulierte Raster post-experimentell über ein niedrig-vergrößerndes (2.5x oder 4x) Bild (Schubert *et al.*, 2001) oder über ein fixiertes Schnittpräparat superpositioniert (Katz & Dalva, 1994). Eine andere Möglichkeit, die zuverlässige Identifikation der exakten Stimulationspositionen vorzunehmen, besteht darin, nach Abschluß des Stimulationsvorganges mithilfe des Lasers Orientierungspunkte in den Schnitt einzubrennen (Brivanlou *et al.*, 2004; Dantzker & Callaway, 2000). Aufgrund der zeitlich akkumulierenden inherenten Ungenauigkeit des Positioniermechanismus geht die Korrespondenz zwischen Bildkoordinate und Stimulationspunkt jedoch zunehmend verloren.

Zusammenfassend gilt, dass alle Ansätze, die Objektiv und Schnittpräparat relativ zueinander mechanisch bewegen, stets mit der schwierigen post-hoc Bestimmung der exakten Lokalisation der Stimulationspunk-

te konfrontiert sind. Desweiteren führt das Prozessieren standardisierter Punktraster zu einem unflexiblen Stimulationsablauf, zu großflächigeren Abtastregionen und damit zwingend zu länger andauerenden Experimenten.

Die hier vorgestellte Steuersoftware umgeht die Problematik einer nachträglichen Zuordnung der Stimulationspunkte, indem sie initial die Position des Laserspots im mechanischen Raum mit seiner Position in einem mikroskopischen Planungsbild assoziiert. Diese Lösung schafft ein Höchstmaß an Flexibilität. So wird es hierdurch möglich, ein niedrig-vergrößerndes DIC-Bild, das eine mehrere Quadratmillimeter große Hirnregion abbildet und als Planungsbild für die Stimulation fungiert, mit einem stark-vergrößernden Objektiv zur räumlich-präzisen Stimulation zu kombinieren. Der Vergrößerungsfaktor des Objektivs und damit die räumliche Präzision der Stimulation können damit *unabhängig* von der Größe der zu analysierenden Hirnregion gewählt werden. Navigation und Planung können während des Patchens der Zelle mit großer zeitlicher Effizienz vollzogen werden, so dass die Definition von individuellen, an den morphologischen Gegebenheiten des Hirnschnitts orientierten Punktrastern online durchgeführt werden kann. Die Fähigkeit des Systems, hochauflösende DIC-Bilder des Stimulationsortes während des Stimulationsvorgangs zu erstellen und sie später bei Bedarf zu einem Gesamtbild zusammenzufügen, kann u.a. dazu genutzt werden, die Schnittqualität der untersuchten Hirnregion nachträglich zu bewerten.

3.6.3 Effektive Auflösung des Systems

Das System wurde zur Bestimmung der intralaminären Konnektivität der Schicht-II-Sternzellen des medialen entorhinalen Cortex genutzt, deren funktionelle Konnektivität schon vorher mithilfe eines niedrig-vergrößernden Objektivs (5x) und von Spiegel-Galvanometern zur Positionierung des Laserspots im Hirnschnitt ermittelt wurde (Kumar *et al.*, 2007). Zur Messung

der räumlichen Auflösung des Uncaging-Systems in der zu untersuchenden Hirnregion wird diese durch die Messung jenes perisomatischen Radius bestimmt, in welchem die gepatchte Zelle die Mehrzahl ihrer Aktionspotentiale in Folge eines Lichtimpulses emittiert (Dantzker & Callaway, 2000; Schubert *et al.*, 2001; Shepherd *et al.*, 2003). Leider haben es Kumar *et al.* (2007) versäumt, quantitative Angaben bezüglich der effektiven räumlichen Auflösung ihres Uncaging-Setups zu machen, sie beschränken sich auf die Aussage, dass 'photostimulation sites that evoked action potentials ('hotspots') tended to be near recorded somata', so dass ein genauer Vergleich der räumlichen Auflösung beider Systeme nicht möglich ist. Interessanterweise besitzt das direkte Aktivierungsprofil in den hier durchgeführten Experimenten sein Maximum in der perisomatischen Region mit einer maximalen Aktivierung an den proximalen Dendriten und einer zum Soma hin abnehmenden Sensitivität auf freigesetztes Glutamat. Abweichend hiervon stellt sich das von Kumar *et al.* (2007) gezeigte Aktivierungsprofil dar, dessen Maximum unmittelbar über dem Soma der Zelle zu liegen kommt. Dieses abweichende Ergebnis ist möglicherweise auf die größere Spotsize des niedrig-vergrößernden (5x) Objektivs im Gegensatz zu dem hier verwendeten 60x-Objektivs zurückzuführen.

Bei der direkten Stimulation von Sternzellen im entorhinalen Cortex fällt auf, dass die effektive (Hirnregion-spezifische) Auflösung größer ist als für Neurone im Barrel Cortex (Schubert *et al.*, 2001; Shepherd *et al.*, 2003) und für Pyramidenzellen im visuellen Cortex, deren apicaler Dendrit entfernt wurde (Dantzker & Callaway, 2000). Unterschiedliche Zelltyp-spezifische kritische Distanzen d^* wurden ermittelt (Pyramidenzelle mit $198 \mu\text{m}$ vs. Sternzellen mit $148 \mu\text{m}$). Diese Zelltyp-spezifische Differenzen sind höchstwahrscheinlich auf die unterschiedliche dendritische Ausdehnungen und Orientierung zur corticalen Oberfläche und einer unterschiedlichen Glutamat-Rezeptor-Sensitivität zurückzuführen. Der Durchmesser der überschwelligeren Antworten um einen Zellkörper besitzt ein Minimum

bei ungefähr $150\ \mu\text{m}$, so dass eine Abtastung mit einem $30\ \mu\text{m}$ im Durchmesser großen funktionellen Lichtkegeldurchmesser, welcher über ein hexagonales Gitter von $60\ \mu\text{m}$ bewegt wird, eine ausreichende Auflösung darstellt.

3.6.4 Kartierung der indirekten Antworten

Die Unterscheidung von direkten und indirekten EPSCs gelingt unmittelbar anhand jener Verzögerung, die bis zum Einsetzen der EPSCs nach Stimulusinitiierung auftritt (Onset-Verzögerung) (Dantzker & Callaway, 2000). Die Dauer des Zeitfensters zur Detektion von indirekten Antworten basiert auf dem zu beobachtbaren Anstieg der photo-induzierten PSC-Rate, die eine Standardabweichung oberhalb der durchschnittlichen Spontanaktivität aufweist. Durch die Verwendung einer intrazellulären Lösung, die eine geringe Chlorid-Ionen-Konzentration besitzt und bei gleichzeitigem Voltage-Clamping der Zelle bei $-60\ \text{mV}$, gelingt es, sowohl EPSCs als auch IPSCs in einem Stimulationsdurchgang zu erfassen (Pouille & Scanziani, 2001). Die Analysesoftware detektiert die PSCs und bestimmt automatisch ihre Onset-Verzögerung, Peak-Amplitude, das Flächenintegral unter der Kurve und Anstiegs- und Abklingkonstante der detektierten Signale.

Die durchgeführten Mapping-Experimente dokumentieren exemplarisch das Konzept der selektiven Stimulation einer flächenhaften, jedoch spezifischen corticalen Subregion (Schicht-II des medialen entorhinalen Cortex). Sie zeigen auf, dass die Region-spezifische Stimulation mit einer Reduktion der Stimulationspunkte einhergeht, was in einer Zeitersparnis und letztendlich in einer statistischen Zunahme der gewonnenen Daten pro Experimentiertag mündet. Im Zuge der Sliceanfertigung kann es zu einer Beschädigung der Integrität des Hirngewebes kommen. Die hiermit einhergehende Zerstörung der axonalen Zellverbindungen kann als Ursache

für die Abnahme präsynaptischer Kontakte bei zunehmender Distanz von der Zelle angenommen werden. Aus diesem Grund liegt das Haupteinsatzgebiet der funktionellen Kartierung präsynaptischer Verbindungen im quantitativen Vergleich unterschiedlicher Zelltypen. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist die Modifikation des Innervationsmusters eines Zelltyps als Reaktion auf eine bestimmte Reizexposition, etwa im Rahmen eines Epilepsie-Modells (Kumar *et al.*, 2007).

Trägt man die Summensignale der EPSCs und IPSCs als Funktion der Entfernung vom Sternzell-Soma auf, wird offensichtlich, dass sowohl dieses als auch jenes von Kumar *et al.* (2007) entwickelte System ähnliche Resultate liefert. Die kleineren Summen-EPSC- und -IPSC-Amplituden sind auf unterschiedliche Haltepotentiale zurückzuführen (-60 mV vs. -70 mV für EPSCs und -60 mV vs. 0 mV für IPSCs). Eine zusätzliche Erklärung hierfür könnte in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Stimulation einer präsynaptischen Zelle liegen, die bei Verwendung eines 5x-Objektivs anstelle eines 60x mit dem vergrößerten Spotdurchmesser einhergeht.

3.6.5 Ausblick

Zusätzlich zu der hier dokumentierten funktionellen, großflächigen und hochauflösenden Kartierung der synaptischen Eingänge unter Verwendung von Caged-Glutamat, kann das entwickelte System leicht für andere Anwendungszwecke adaptiert werden. Aufgrund der mechanischen Einschränkung der Laserpositionierung stellt die Geschwindigkeit der Laserspot-Repositionierung jedoch den wichtigsten Einschränkungsfaktor des Setups dar. In dieser Form ist es nicht zum schnellen Uncaging an unterschiedlichen Lokalisationen einsetzbar (Shoham *et al.*, 2005). Zur Erschließung dieses Anwendungsfeldes ist es jedoch möglich, ein hochfrequentes System zur Lichtauslenkung (z.B. den SpotIlluminator der Firma Rapp-OptoElectronic, Wedel, Deutschland) zwischen Fiberglaskabel und Mikroskop zu interponieren. Naturgemäß wird hierdurch die Untersuchungsre-

gion auf das Blickfeld des Mikroskops beschränkt. Jedoch kann ein solches System mit einer Lucifer-basierten mechanischen Mikroskoppoitionierung kombiniert werden, was die hochfrequente Stimulation einer großflächigen Untersuchungsregion ermöglichen würde. Durch die Änderung des Faserdurchmessers können Laserspot-Größen von bis zu $2 \mu\text{m}$ erzielt werden. Unter Verwendung von optischen Referenzpunkten wird es dann möglich, die dendritischen Eingänge eines fluoreszenzgefärbten Neurons quantitativ zu analysieren. Hierzu ist es notwendig, die intrazelluläre Lösung mit einem Fluoreszenz-Farbstoff anzureichern. Desweiteren können unterschiedliche Caged-Neurotransmitter zur Klassifizierung der verschiedensten Rezeptortypen eingesetzt werden. Außerdem ist es leicht möglich, präsynaptische Partner einer postsynaptischen, gepatchten Zelle zur Durchführung von Paarableitungen aufzufinden. Eine weitere potentielle Anwendung liegt in der Verwendung von Licht-aktivierbaren Ionenkanälen anstatt eines Caged-Transmitters. Als Beispiel ist hier das erst kürzlich vorgestellte Channel-Rhodopsin zu nennen (Wang *et al.*, 2007).

Kapitel 4

Diskussion und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine theoretische Methode zur Analyse der Synchronisationseigenschaften einer Nervenzelle entwickelt, im zweiten Abschnitt eine experimentelle Methode zur großflächigen, räumlich-präzisen Photostimulation akuter Hirnschnitte. Ihre kombinierte Anwendung finden beide Methoden in der Analyse des hippocampalen ϑ -Rhythmus und der Fragestellung, ob die Schicht-II-Sternzelle des MEC als Generator dieses langsamen Rhythmus fungieren kann. Ungeachtet dieser strengen Focussierung auf eine Aufgabenstellung besitzen beide methodischen Ansätze aufgrund ihrer leichten Übertragbarkeit auf andere Zelltypen, Systeme und Untersuchungsebenen ein weitreichendes Anwendungsspektrum.

Theorie zur Entstehung synchroner langsamer Oszillationen

Die Motivation zur Entwicklung der Synchronisationstheorie war die Fragestellung, welcher Zelltyp für die Generierung synchroner Oszillationen in einer Hirnregion verantwortlich ist.

Die Theorie erlaubt in Ergänzung zu experimentellen Ansätzen auf der Basis eines zellulären Charakteristikums, der Phasen-Antwort-Kurve (PRC), zu entscheiden, ob der entsprechende Zelltyp eingebettet innerhalb eines bestimmten Konnektivitätsregimes die Fähigkeit besitzt, eine synchrone Oszillation zu generieren. Konzeptionell stimuliert man ein

Neuron derart, dass es tonisch im Frequenzbereich der Oszillation zu feuern beginnt und misst durch Applikation von kurzzeitigen Störimpulsen zu unterschiedlichen Phasen des Interspike-Intervalls die PRC der Zelle. Idealerweise sollte dabei der Störimpuls jene Störung imitieren, die durch die Aktivierung einer Synapse am Soma des Neurons entsteht (Netoff *et al.*, 2005). Unter Berücksichtigung der anatomischen Verknüpfung des Zelltyps (z.B. rekurrent exzitatorisch, indirekt über inhibitorische Interneurone, indirekt über oszillatorische Interneurone) erlaubt dann die Theorie eine Vorhersage, ob die Zelle angetrieben durch einen zeitlich unstrukturierten Eingang eine synchrone Oszillation im Kollektiv generieren kann, und wie robust die entstehende Synchronisation gegenüber perturbierendem Rauschen ist. Die Validität der Theorie ist dabei auf schwache Kopplungsregime beschränkt. Inwieweit diese Einschränkung zur Vorhersage adäquat ist, muss für den entsprechenden Zelltyp und anhand der Amplitudenwerte der synaptischen PSPs im Einzelfall entschieden werden (Berretta & Jones, 1996).

Die Sternzelle des MEC als ϑ -Generator

Die Synchronisationstheorie wurde auf die Schicht-II Sternzelle des MEC angewandt. Die Theorie bestätigt die Vermutung, dass die Sternzellen als ϑ -Rhythmusgeneratoren fungieren können, wenn sie rekurrent über schwache exzitatorische Synapsen und mit einem biophysikalisch plausiblen interneuronalen Delay verbunden sind. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass exzitatorisches Rauschen weit weniger störend auf die Synchronisation wirkt als inhibitorisches.

Weiterhin konnten experimentelle Untersuchungen (Netoff *et al.*, 2005) theoretisch bestätigt werden, dass die Sternzelle über eine indirekte inhibitorische Kopplung, bei der die inhibitorische Zellpopulation als Reaktion auf den exzitatorischen Eingang ein Aktionspotential zurücksendet, keine robuste Synchronisation aufbauen kann. Modifiziert man jedoch die

Annahme über das Zusammenspiel beider Zellgruppen dahingehend, dass die Interneurone eine selbst-verlängernde, Sternzell-getriggerte inhibitorische Aktivität entwickeln können, dann kann ein Sternzell-Netzwerk robust synchronisieren, auch unter realistischen interneuronalen Delays von ungefähr 5% einer Periode (≈ 5 ms). Eine Grundvoraussetzung für ein derartiges Regime ist die Sensitivität der inhibitorischen Oszillation auf die Sternzell-Aktivität und eine inhibitorische Aktivität, die rund zwei Drittel des Theta-Zyklus überdeckt.

Kartierung der funktionellen Konnektivität der MEC-II-Sternzelle

Zur Überprüfung der theoretischen Konnektivitätshypothesen wurde im zweiten Abschnitt ein Photostimulations-Setup und die geeignete Methodik zur Analyse der gewonnenen Daten entwickelt und dazu genutzt, die intralaminäre Konnektivität der MEC-II-Sternzelle experimentell zu erheben. Basierend auf der Möglichkeit, großflächige Hirnareal mit einer hohen räumlichen Auflösung zu stimulieren, gelang der Nachweis, dass die Sternzelle sowohl exzitatorische als auch inhibitorische synaptische Kontakte aus der Schicht-II des MEC bezieht und damit, der theoretischen Vorhersage entsprechend, als ϑ -Generator fungieren kann. Auch konnte gezeigt werden, daß die inhibitorischen Afferenzen insgesamt lokaler um die Zelle angeordnet sind. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den von Dhillon & Jones (2000) durchgeführten Paarableitungs-Studien, in denen zwar für die Schichten III und V, jedoch nicht für Schicht II rekurrente exzitatorische Verbindungen nachgewiesen wurden. Die abweichenden Resultate erklären sich damit, dass das Photostimulations-System ein großes Hirnschnittvolumen nach potentiell präsynaptischen Zellen absucht, während Paarableitungen immer nur ausgewählte Zellpaare untersuchen. Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass eine niedrige Recurrenz durch Paarableitungen fälschlicherweise nicht erkannt wird. Ob die gefundenen exzitatorischen Kontakte recurrent sind, d.h. ob sie von Sternzellen herrüh-

ren, kann aufgrund des fehlenden Wissens über den Typ der stimulierten präsynaptischen Zelle nicht entschieden werden. Es wird eine zukünftige Aufgabe sein, per Photostimulation gefundene Neuronenpaare elektrophysiologisch mit Hilfe von Paarableitungen zu charakterisieren. Zu diesem Zweck ist es leicht möglich, das Photostimulations-System mit einem einfachen adaptiven Suchalgorithmus zum Auffinden präsynaptischer Zellen innerhalb einer definierten Region zu ergänzen.

Synchrone ϑ -Oszillationen durch oszillatorische Inhibition?

Die Validierung der Hypothese, dass die Sternzellpopulation indirekt über ein oszillierendes Netzwerk von Interneuronen synchronisiert wird, kann alleine mit dem Wissen um die funktionellen Verbindungseigenschaften der Zelle und ohne die Miteinbeziehung der Netzwerkdynamik nicht erfolgen. Zur Klärung dieser Fragestellung ist es notwendig, mithilfe von Multi-elektroden-Ableitungen in der Schicht II, eine deutliche zeitliche Korrelation zwischen Sternzell- und Fast-Spiking-Interneuron-Aktivität zu dokumentieren. Im Mittelpunkt dieser Theorie stehen die Parvalbumin-exprimierenden fast-spiking Korbzellen (Basket-Cells), die bspw. im Hippocampus rund 20% aller GABAergen Interneurone ausmachen (Freund & Buzsáki, 1996) und denen aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Genese von γ -Oszillationen zugeordnet wird (Bartos *et al.*, 2007): So findet man während γ -Oszillationen rhythmische Stromsenken und -quellen perisomatisch zu den Hauptzellen (Bragin *et al.*, 1995; Csicsvari *et al.*, 2003), was ein indirekter Hinweis auf die Beteiligung von Korbzellen mit ihrer hauptsächlich perisomatischen, GABA-vermittelten Inhibition ist. Desweiteren besitzen Korbzellen die Fähigkeit zur schnellen AP-Generation (Jonas *et al.*, 2004) und weisen intrinsische Resonanzeigenschaften im γ -Band auf. Studien zeigen, dass Korbzellen einen Spike pro Gamma-Cyclus emittieren, der hochpräzise an die γ -Phase gekoppelt ist (Penttonen *et al.*, 1998). Hinzukommt, dass Korbzellen untereinander

hochgradig vernetzt sind (Sik *et al.*, 1995; Kisvárdy *et al.*, 1993) und recht unspezifisch eine große Anzahl ortsständiger Hauptneurone innervieren. Denkbar wäre also, dass synchrone ϑ -Oszillationen durch die Propagation von Aktivität zwischen den Hauptzellen und Korbzellen im Sinne eines Erregungskreises entstehen: Die Aktivität der Hauptzellen wird an die Korbzellen weitergegeben, durch deren Zusammenspiel inhibitorische γ -Oszillationen generiert werden. Die Rückpropagation der γ -Oszillationen an die Hauptneurone induziert in den resonanten Sternzellen das Entstehen synchroner ϑ -Oszillationen, zusätzlich unterstützt durch die schwache synaptische exzitatorische Kopplung zwischen den Sternzellen.

Hypothesen zur Funktion des MEC

Wie sind diese Ergebnisse in den bisherigen Wissensstand über die Funktion und Bedeutung des medialen entorhinalen Cortex (MEC) einzuordnen?

Dem MEC wird eine zentrale Rolle bei der örtlichen Navigation zugeschrieben (McNaughton *et al.*, 2006). Grundsätzlich besitzt ein Individuum zwei unterschiedliche Strategien, seine aktuelle Raumposition intern zu repräsentieren (O'Keefe, 1976). Im ersten Fall, der geometrischen Strategie, aktualisiert das Individuum seine Position anhand externer Landmarken. Im zweiten Fall wird die gegenwärtige Position, ausgehend von der alten Position, unter Berücksichtigung interner Schlüsselreize, wie Bewegung und Orientierung berechnet ('path integration'). Der Vorteil des letztgenannten Systems liegt darin, dass es die Navigation im Raum auch in Abwesenheit externer Reize ermöglicht. Die Vereinigung beider Strategien zu einem 'Navigationssystem', d.h. die Berechnung des zurückgelegten Weges anhand interner Schlüsselreize und die intermittierende Anpassung der errechneten Position mit der realen Raumposition, stellt die effektivste Strategie zur räumlichen Navigation dar (O'Keefe, 1976; Schlegel, 2008).

Neuronale Regionen, die ein derartiges System beherbergen, werden im

Hippocampus und in angrenzenden Strukturen vermutet. Dies stützt sich auf die Beobachtung, dass im Hippocampus Ortszellen und im Praesubiculum Kopfrichtungszellen zu finden sind. Beide Zelltypen zeichnen sich durch ihr selektives Feuern bei Einnahme einer bestimmten Raumposition bzw. Kopfrichtung aus, repräsentieren also die gegenwärtige Position und Orientierung.

Es bleibt die Frage bestehen, in welcher Hirnregion die Aktualisierung der Raumposition aus internen Schlüsselreizen, wie einer Bewegung, errechnet wird?

Es gibt Hypothesen (Hafting *et al.*, 2005; Sargolini *et al.*, 2006), die dem entorhinalen Cortex diese wichtige Rolle zuordnen. Man vermutet, dass er von einer gespeicherten Position und Orientierung ausgehend, eine neue Positionsrepräsentation als Reaktion auf eine Translationsbewegung errechnet und damit die Funktion eines Weg-Integrators ('Path-Integrator') innehat. Einen ersten Hinweis hierauf liefert die Beobachtung, dass Tiere mit einem zerstörten MEC auf der Basis von internen Reizen, etwa bei vollständiger Verdunkelung, nicht mehr den Weg zum Ausgangsort zurückfinden (Parron *et al.*, 2004).

Grid-, Kopfrichtungs- und Conjunctive-Zellen des MEC

Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Rolle des MEC ist das Vorhandensein sog. Gridzellen (Hafting *et al.*, 2005). Hierunter versteht man Zellen, die beim Durchlaufen einer Umgebung innerhalb regelmäßig verteilter, hexagonal-geformter Regionen den sog. Grids feuern. In ihrer Gesamtheit bilden die Grids ein Feld, das durch den Abstand benachbarter Grids, seiner Richtungsorientierung und seiner räumlichen Phase charakterisiert ist. Unter letztgenanntem versteht man einen räumlichen Offset, der den relativen Abstand zu einer festen Position in der Umgebung angibt. Gridzellen entlang der dorsoventralen Achse des MEC zeigen den gleichen Gridabstand und die gleiche Orientierung, jedoch sind die Orte des Feuerns,

d.h. die räumlichen Phasen benachbarter Neurone, verteilt. Dies führt dazu, dass die gesamte Umgebung lokal, d.h. auf Höhe einer dorsoventralen Ebene abgebildet wird.

Der Schicht II des MEC wird der größte Anteil von Gridzellen zugeordnet (Sargolini *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den Ortszellen des Hippocampus sind die Gridzellen jedoch in allen Umgebungen aktiv, und dies unabhängig externer Schlüsselreize. Dies lässt vermuten, dass innerhalb des entorhinalen Cortex eine universelle Karte der räumlichen Umgebung generiert wird (Hafting *et al.*, 2005; McNaughton *et al.*, 2006), was einen wichtigen Unterschied zu den Ortszellen im Hippocampus darstellt, deren relative Aktivierung zueinander in unterschiedlichen Umgebungen keiner Regelmäßigkeit unterliegen.

Neben den Gridzellen stellt das Vorhandensein sog. Kopfrichtungszellen und Zellen, die die Gridzellinformation und Kopfrichtung vereinen (Conjunctive-Cells) (Sargolini *et al.*, 2006) ein weiteres wichtiges Indiz für die Rolle des MEC als Path-Integrator dar; beide Zelltypen finden sich akzentuiert in den Schichten III und V. Da diese Schichten die Hauptzielregion der Efferenzen des Praesubiculum darstellen (Wouterlood *et al.*, 2004), wird möglicherweise über diesen Weg die Information bezüglich der Kopfrichtung an den MEC übermittelt (Taube, 1998).

Zusammenfassend gilt, dass verschiedene Indikatoren auf eine zentrale Rolle des MECs als Path-Integrator hinweisen: Erstens, das Gridzellmuster, zweitens, die Existenz von Orientierungs- und Conjunctive-Zellen, drittens, parasubiculäre translationscodierende Afferenzen und schließlich eine ausgeprägte recurrente interne Verschaltung, die auf eine besonders große Rechenkapazität schließen lässt (Haykin, 1998; Leibold & Kempner, 2006). So weiß man, dass zahlreiche Axone von Schicht V in den Schichten III, V und VI (Gloveli *et al.*, 2001), Axone aus Schicht-III-Zellen in den Schichten I,II und III (Lingenhöhl & Finch, 1991) kollateralisieren.

Die Entstehung von Gridfeldern

Einige theoretische Studien favorisieren als Berechnungsgrundlage für die Entstehung von Gridfeldern eine Attraktordynamik im entorhinalen Cortex (McNaughton *et al.*, 2006). Überträgt man das Wissen über neuronale Attraktornetze (Tsodyks, 1999; Samsonovich & McNaughton, 1997) auf den MEC, dann sollten Zellen mit ähnlichen Gridfeldern recurrent exzitatorisch verbunden sein und sich bei Aktivität, unter dem Einfluss einer übergeordneten Hemmung, gegenseitig verstärken, so dass in Abhängigkeit der Position eine spezifische Aktivitätsregion emergiert. Durch Änderung des afferenten Eingangs, also von Translation und Kopfrichtung, sollte sich die gegenwärtige Aktivitätsregion durch die Verlagerung auf andere Zellen entsprechend anpassen (Fuhs & Touretzky, 2006; McNaughton *et al.*, 2006). Einige Theorien fordern zur Generierung eines Attraktornetzwerkes eine Inhibition, die in ihrer räumlichen Ausdehnung die Exzitation übertrifft. Diese Arbeit zeigt, dass zumindest für die Sternzelle innerhalb von Schicht-II eine focale inhibitorische Wirkung vorliegt, so dass die Idee eines Attraktornetzes als eher unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Die Aktualisierung der internen Positionsrepräsentation

Der mediale entorhinale Cortex vereint wie oben gezeigt Ort und Orientierung und errechnet aus dem afferenten parasubicalen Zustrom, der über die Translationsbewegung informiert, kontinuierlich die metrische Repräsentation des Ortes. Das räumliche Aktivierungsprofil über den MEC in Form des Gridfelds ändert sich somit im Zuge einer veränderten Raumposition. Das Feuern der beteiligten Gridzellen ist dabei an die hippocampale Theta-Phase gekoppelt, die wahrscheinlich durch die oszillatorische Sternzell-Aktivität erzeugt wird. Im Zuge der kurzzeitigen Synchronisation kann es dann aufgrund einer initial schwachen Synchronisation - im Sinne einer 'Einschwingphase' - regelmäßig zu Phänomen der Phasenpräzession kommen, welche auch im Rahmen der hier durchgeführten theoretischen

Analyse zu beobachten waren und in Abbildung 2.6 dargestellt sind.

Die rhythmische Aktivierung kann dann an die unteren Schichten des MECs weitergegeben werden. Dies würde eine columnäre Struktur voraussetzen, deren wichtigster Anhaltspunkt die dendritischen Bündel sind, die von den unteren Schichten nach oben geleitet werden (Ikeda *et al.*, 1989).

Vom MEC wird dann die spezifische Gridzellaktivierung direkt von Schicht III und indirekt von Schicht II über den Gyrus dentatus und die CA3-Region an die CA1-Region weitergeleitet (Witter & Amaral, 1991). Das hier entstehende Aktivierungsprofil der Ortszellen gelangt zurück in die unteren Schichten des MEC und könnte dort in die Aktualisierung der Raumposition miteinbezogen sein.

Von Gridzellen zu Ortszellen

Wie kann ein entorhinales Gridfeld zu Ortszellen im Hippocampus führen? Theoretische Untersuchungen zeigen, dass die lineare Summation der synaptischen Gridzelleingänge im Hippocampus zur Ausbildung von Ortszellen führen kann (Solstad *et al.*, 2006). Basis dieses Modells ist die Untersuchung von Cash & Yuste (1998) zur dendritischen Integration synaptischer Eingänge, in der experimentell gezeigt wurde, dass sich zwei exzitatorische Eingänge, unabhängig ihrer Lage und elektrotonischen Distanz zum Soma, weitestgehend linear im Soma des Neurons aufsummieren.

Ausblick

Zur Analyse der zellspezifischen intra- und interlaminären Verschaltung des MECs erscheinen weitere Photostimulationsexperimente lohnenswert. Von großem Interesse ist dabei die Frage, wie die genaue Verschaltung zwischen tiefen und oberflächlichen Schichten ist, inwieweit columnäre oder andere ordnende Strukturen auszumachen sind, und ob Konnektivitätsunterschiede entlang der dorsoventralen Achse des MEC zu messen sind.

Letztgenannte Fragestellung orientiert sich an der Beobachtung, dass der Abstand zwischen den einzelnen Gridfeldern vom dorsalen zum ventralen Ende des MEC kontinuierlich ansteigt (Fyhn *et al.*, 2004; Sargolini *et al.*, 2006). In diesem Kontext zeigen neuere Untersuchungen, daß Sternzellen entlang der dorsoventralen Achse ein unterschiedliches Frequenz-tuning aufweisen (Giocomo *et al.*, 2007). So besitzen dorsal lokalisierte Neurone eine höhere Resonanzfrequenz als ventrale Neurone, was einen Hinweis auf die neurophysiologische Basis der ansteigenden Gridsize entlang der dorsoventralen Achse sein könnte. Doch ob dieses Phänomen alleine auf spezifisch-zellulären Eigenschaften basiert, ist höchst fraglich. Hier könnte es vielmehr helfen, eventuelle Unterschiede in der funktionellen Konnektivität der ortsständigen Zellen als Funktion ihrer genauen Lage zusätzlich herauszuarbeiten. Dies könnte ein wichtiger Beitrag dazu sein, den der Gridzelle zugrundeliegenden Zelltyp zu identifizieren.

Abschlussbemerkung

Die vorliegende Arbeit spiegelt den Versuch wider, eine neurophysiologische Fragestellung durch die kombinierte Anwendungen zweier methodisch unterschiedlicher Ansätze zu beantworten.

Dabei bleiben sowohl die Synchronisationstheorie als auch das Photostimulations-Setup in ihrer Anwendung nicht auf die hier durchgeführte Analyse zur Entstehung langsamer neuronaler Oszillationen beschränkt, sondern können durch entsprechende Anpassungen einem breiterem Anwendungsspektrum zugeführt werden.

So erlaubt bspw. die Synchronisationstheorie ganz allgemein das kollektive Verhalten gekoppelter Oszillatoren, deren Auftreten vielfältig in Natur und Technik ist, quantitativ zu beschreiben. Gleichermaßen kann das Photostimulations-Setup zum Auffinden von Neuronenpaaren oder zur Klassifizierung dendritischer Rezeptortypen eingesetzt werden. Letzteres wird durch die hochauflösende Focussierung des Laserlichts unter Ver-

wendung optischer Referenzpunkte und dem Einsatz spezifischer Caged-Komponenten möglich. Die Flexibilität des Lucifer-basierendes Photostimulations-Setups gründet sich dabei auf der wichtigen Eigenschaft, für Planung und Durchführung der Stimulation unterschiedliche Objektivtypen zu verwenden. Dies resultiert in einem Lichtkegel, dessen Spotsizes aus einem Bereich von $1\ \mu\text{m}$ bis $200\ \mu\text{m}$ wählbar ist.

Bei Anwendungsfeldern, die ein hochfrequentes Uncaging an unterschiedlichen Lokalisationen im Slice notwendigen machen, wie z.B. bei Fragestellungen zur dendritischen Integration oder im Rahmen neuartiger hochfrequenter Mapping-Experimente, kann zusätzlich der Spot-Illuminator der Firma Rapp-OptoElectronics zwischen Fiberglaskabel und Mikroskop interponiert werden. Die Synthese beider Systeme erschafft ein vollständig computergesteuertes System zur flächenhaften, räumlich wie zeitlich hochauflösenden Hirnschnitt-Photostimulation.

Anhang A

Parameter der numerischen Simulation

Ein vollverknüpftes Netzwerk aus 500 synaptisch-gekoppelten Neuronen wurde auf einem Linux-Cluster unter C++ und LAM-MPI simuliert. Als Differentialgleichungslöser diente ein adaptiver Runge-Kutta-Algorithmus vierter Ordnung (Press *et al.*, 1992). Die Parallelisierung geschieht auf der Basis eines minimalen interneuronalen Delays Δ_{\min} (meist 2 ms), der jenes Zeitintervall definiert, das von der Generierung eines APs bis zu dessen Ankunft an der postsynaptischen Zelle und der Auslösung eines postsynaptischen Signals vergeht. Die einzelnen Rechner simulieren autonom die Dynamik der ihnen zugeteilten Modellneurone, tauschen sich alle Δ_{\min} -Zeiteinheiten die Spikezeiten der neu generierten APs aus und integrieren diese unter Berücksichtigung der individuellen interneuronalen Laufzeiten in die Modelldynamik.

A.1 Sternzell-Modell

Das verwendete Hodgkin-Huxley-Modell wurde ursprünglich von Acker *et al.* (2003) für eine Schicht-II Sternzelle des medialen entorhinalen Cortex vorgestellt. Mit der Membrankapazität C und dem Membranpotential V_m

(in mV), enthält die Stromerhaltungs-Gleichung

$$C \frac{dV_m}{dt} = I_{DC} - I_\eta - I_{Na} - I_{Nap} - I_K - I_H - I_L - I_{syn} \quad (\text{A.1})$$

aktive Leitfähigkeiten in Form eines rektifizierenden Kaliumkanals I_K , eines unspezifischen Kationenstroms I_H und eines schnellen und persistierenden Natriumkanals I_{Na} bzw. I_{Nap} . Zusätzlich enthält das Modell einen passiven Leckstrom I_L , einen konstanten Strom I_{DC} , einen synaptischen Strom I_{syn} und einen Rausch-Strom I_η . Mit g_x als der spannungsabhängigen Leitfähigkeit des x -ten Ionenstroms und des kanalspezifischen Umkehrpotentials V_x werden die oben genannten Ströme wie folgt modelliert

$$I_{Na} = g_{Na} m_{Na}^3 h_{Na} (V_m - V_{Na}) \quad (\text{A.2})$$

$$I_{Nap} = g_{Nap} m_{Nap} (V_m - V_{Na}) \quad (\text{A.3})$$

$$I_K = g_K n_K^4 (V_m - V_K) \quad (\text{A.4})$$

$$I_H = g_H (0.65 m_f + 0.35 m_s) (V_m - V_H) \quad (\text{A.5})$$

$$I_L = g_L (V_m - V_L). \quad (\text{A.6})$$

Der Rauschstrom $I_\eta = g_\eta (V_m - V_\eta)$ wird durch eine stochastische Leitfähigkeit g_η generiert, die über einen mittelwertfreien Gaussprozess η mit der Standardabweichung σ_η modelliert wird und unabhängig und identisch über die Neuronenpopulation verteilt ist. Die Spezifikation des synaptischen Stroms ist unten aufgezeigt (A.2).

Die Dynamik der Aktivierung und die Inaktivierungsvariablen, m_x , h_x und n_x , gehorchen einer Kinetik I.Ordnung

$$\frac{dx}{dt} = \alpha_x(V_m)(1 - x) - \beta_x(V_m)x \quad (\text{A.7})$$

wobei α_x und β_x die Vorwärts- und Rückwärtsraten sind, die den Übergang der Kanäle von offenen zu geschlossenen Zuständen beschreiben. Für den Fall von I_h wird folgende alternative Darstellungsform genutzt

$$\frac{dx}{dt} = \frac{x_\infty(V_m) - x}{\tau_x(V_m)} \quad (\text{A.8})$$

wobei x_∞ der Steady-state Wert von x , und τ_x seine Zeitkonstante sind; beide als Funktion des Membranpotentials.

Im folgenden werden alle Ströme in Einheiten von $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ und alle Spannungen in mV gemessen. Die Einheit der Zeit ist ms. Dann gilt für die Vorwärts- und Rückwärtsraten

$$\alpha_{\text{m,Na}} = \begin{cases} \frac{-0.1 (V_m + 23)}{\exp(-0.1 (V_m + 23)) - 1} & \text{for } V_m \neq -23 \\ 1 & \text{for } V_m = -23 \end{cases} \quad (\text{A.9})$$

$$\beta_{\text{m,Na}} = 4 \exp\left(\frac{-(V_m + 48)}{18}\right) \quad (\text{A.10})$$

$$\alpha_{\text{h,Na}} = 0.07 \exp\left(\frac{-(V_m + 37)}{20}\right) \quad (\text{A.11})$$

$$\beta_{\text{h,Na}} = \frac{1}{\exp(-0.1 (V_m + 7)) + 1} \quad (\text{A.12})$$

$$\alpha_{\text{m,Nap}} = \frac{1}{0.15 (1 + \exp(-(V_m + 38)/6.5))} \quad (\text{A.13})$$

$$\beta_{\text{m,Nap}} = \frac{\exp(-(V_m + 38)/6.5)}{0.15 (1 + \exp(-(V_m + 38)/6.5))} \quad (\text{A.14})$$

$$\alpha_{\text{n,K}} = \begin{cases} \frac{-0.01(V_m + 27)}{\exp(-0.1(V_m + 27)) - 1} & \text{for } V_m \neq -27 \\ 1 & \text{for } V_m = -27 \end{cases} \quad (\text{A.15})$$

$$\beta_{\text{n,K}} = 0.125 \exp\left(\frac{-(V_m + 37)}{80}\right). \quad (\text{A.16})$$

Für die steady-state Werte (x_∞) und Zeitkonstanten (τ_x) gilt

$$m_{\text{f}\infty,\text{H}} = \frac{1}{(1 + \exp((V_m + 79.2)/9.78))} \quad (\text{A.17})$$

$$\tau_{\text{m}\text{f},\text{H}} = \frac{0.51}{\exp((V_m - 1.7)/10) + \exp(-(V_m + 340)/52)} + 1 \quad (\text{A.18})$$

$$m_{\text{s}\infty,\text{H}} = \frac{1}{(1 + \exp((V_m + 71.3)/7.9))} \quad (\text{A.19})$$

$$\tau_{\text{m}\text{s},\text{H}} = \frac{5.6}{\exp((V_m - 1.7)/14) + \exp(-(V_m + 260)/43)} + 1 \quad (\text{A.20})$$

Das Modell kann sowohl ein Typ-I als auch Typ-II Oszillator-Verhalten zeigen, abhängig, ob die Leitfähigkeit des h-Stroms an- oder ausgeschaltet

ist. Der konstante Strom I_{DC} wurde so adaptiert, dass er das Neuron mit einer Oszillationsfrequenz von 14 Hz antreibt. Für den Typ-I wurde $g_h = 0 \text{ mS/cm}^2$, $I_{DC} = 1.4 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ gewählt, für Typ-II $g_h = 1.5 \text{ mS/cm}^2$, $I_{DC} = -1.467 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$.

Die übrigen Parameter sind folgende: $V_{Na}=55$, $V_K=-90$, $V_h=-20$, $V_L=-65$; $g_{Na}=52 \text{ mS/cm}^2$, $g_{Nap}=0.5 \text{ mS/cm}^2$, $g_K=11 \text{ mS/cm}^2$, $g_L=0.5 \text{ mS/cm}^2$; $C=1.5 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$.

A.2 Synapsen-Modell

Der synaptische Strom

$$I_{\text{syn}} = g_{\text{syn}}(t) (V_m - V_{\text{syn}}) \quad (\text{A.21})$$

ist definiert über das synaptische Umkehrpotential V_{syn} und die Leitfähigkeit

$$g_{\text{syn}}(t) = \sum_{\text{spike}} \kappa(t - t_{\text{spike}}) \quad (\text{A.22})$$

in welcher die Summe über alle Spikes läuft, die von dem präsynaptischen Neuron zur Zeit t_{spike} emittiert wurden. Der Zeitverlauf der synaptischen Leitfähigkeit ist als exponentieller Abfall definiert

$$\kappa(t) = \mathcal{H}(t - \Delta) g_{\text{syn}} \exp[-(t - \Delta)/\tau_{\text{syn}}] \quad (\text{A.23})$$

mit der Zeitkonstante $\tau_{\text{syn}} = 5 \text{ ms}$. $\mathcal{H}(x)$ symbolisiert die Heaviside-Funktion mit 1 für $x \geq 0$ und ansonsten null. Die maximale synaptische Leitfähigkeit g_{syn} nimmt Werte von $5 \cdot 10^{-6}$ bis $15 \cdot 10^{-6} \text{ mS/cm}^2$ an. Die Umkehrpotentiale betragen $V_{\text{syn}}^{\text{exc}}=0 \text{ mV}$ und $V_{\text{syn}}^{\text{inh}}=-80 \text{ mV}$.

Anhang B

Phasen-Antwort-Kurve der Sternzelle

Die exzitatorischen und inhibitorischen PRCs der Sternzelle sind dem ersten und zweiten Bild der Abbildung 4A in Netoff *et al.* (2005) entnommen. Dort wurden mithilfe der Dynamic-Clamp-Technologie die synaptischen PRCs einer entorhinalen Sternzelle gemessen. Hierzu wurde in eine mit einer Frequenz von 10 Hz periodisch feuernde Sternzelle ein artifizier exzitatorischer und inhibitorischer Leitfähigkeits-Stimulus appliziert. In dieser Arbeit wurden jene PRCs verwendet, die durch Perturbations-Leitfähigkeiten von 1 nS und 562 pS (durchgezogene Linien in Abbildung 4A von Netoff *et al.*, 2005) induziert wurden. Diese Leitfähigkeiten entsprechen ungefähr der Größe von zwei bis fünf spontan-exzitatorischen synaptischen Sternzell-Eingängen (Berretta & Jones, 1996).

Zusammenfassung

Neuronale Oszillationen stellen ein ubiquitär zu beobachtendes Phänomen in Nervensystemen dar. Aufbauend auf den besonderen zellulären Eigenschaften, die eine Zellpopulation zu Generierung von langsamen synchronen Oszillationen aufweisen muss, wird im ersten Teil dieser Arbeit eine Synchronisationstheorie entwickelt. Die Theorie erlaubt es, ausgehend von einem zellulären Charakteristikum (der Phasen-Antwort-Kurve), vorauszusagen, ob das Neuron in einem ausgewählten Frequenzbereich synchronisieren kann, welches Konnektivitätsregime hierzu notwendig ist und mit welcher quantitativen Genauigkeit die Synchronisation aufrechterhalten werden kann. Letzteres gelingt durch die Einbeziehung der zufälligen, unter physiologischen Bedingungen auftretenden Membranpotentialfluktuationen, die einer Synchronisation entgegenwirken. Zwei Kriterien werden zur Validierung der Vorhersage eingeführt: Das erste Kriterium überprüft, ob alle Neurone exakt einmal pro Feuercyclus ein Aktionspotential generieren, das zweite Kriterium testet die Linearitätsannahme der synaptischen Kopplung.

Die Theorie findet ihre konkrete Anwendung in der Beantwortung der Frage, ob die Schicht-II-Sternzelle des medialen entorhinalen Cortex (MEC) als ein Generator des hippocampalen ϑ -Rhythmus fungieren kann. Es zeigt sich, dass Sternzellen als ϑ -Generatoren fungieren können, wenn sie recurrent über exzitatorische Synapsen oder über ein schnell-oszillierendes Netzwerk von inhibitorischen Interneuronen miteinander verbunden sind. Desweiteren kann nachgewiesen werden, dass exzitatorisches

Rauschen weniger störend auf die Sternzell-Synchronisation wirkt als inhibitorisches Rauschen.

Zur Überprüfung der theoretisch postulierten Konnektivitätshypothesen wird im zweiten Teil der Arbeit ein Photostimulations-System zur großflächigen, räumlich-präzisen Kartierung der afferenten Eingänge einer gepatchten Nervenzelle entwickelt und zur Bestimmung der intralaminären Konnektivität der MEC-Schicht-II-Sternzelle genutzt. Hierbei zeigt sich, dass die Sternzelle sowohl exzitatorische als auch inhibitorische synaptische Kontakte aus der Schicht-II des MEC bezieht, wobei die inhibitorischen Afferenzen insgesamt lokaler um die Sternzelle angeordnet sind.

Beide Methoden lassen sich leicht im Kontext anderer Fragestellungen nutzen. So kann beispielsweise das Photostimulations-System zum Auffinden von Neuronenpaaren oder zur Kartierung der dendritischen Rezeptorbestückung eines Nervenzelltyps eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- Acebrón, JA., & Bonilla, LL. 1998. Asymptotic description of transients and synchronized states of globally coupled oscillators. *Physica D*, **114**, 296–314.
- Acebrón, JA., & Spigler, R. 1998. Adaptive frequency model for phasefrequency synchronization in large populations of globally coupled nonlinear oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, **81**, 2229–2232.
- Acker, C.D., Kopell, N., & White, J.A. 2003. Synchronization of strongly coupled excitatory neurons: relating network behavior to biophysics. *J Comput Neurosci*, **15**, 71–90.
- Alonso, A., & Klink, R. 1993. Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *J Neurophysiol*, **70**(1), 128–143.
- Alonso, A., & Llinás, R.R. 1989. Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature*, **342**(Nov), 175–177.
- 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. *Brain*, **128**(Jan), 158–173.
- Axmacher, N., Mormann, F., Fernández, G., Elger, C.E., & Fell, J. 2006. Memory formation by neuronal synchronization. *Brain Res Rev*, **52**(Aug), 170–182.
- Bartos, M., Vida, I., & Jonas, P. 2007. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**(Jan), 45–56.
- Benda, J., Longtin, A., & Maler, L. 2006. A synchronization-desynchronization code for natural communication signals. *Neuron*, **52**(Oct), 347–358.

- Bendels, MHK. 2007 (Apr). *Entwicklung und Verifikation eines Laser-Photostimulations-Systems zur Analyse neuronaler Konnektivität in Hirnschnitten*. M.Phil. thesis, Technische Universität Berlin.
- Benninghoff, A., D., Drenckhahn., & Zenker, W. 1994. *Anatomie*. Vol. 2. Urban und Fischer Verlag.
- Berretta, N., & Jones, R.S. 1996. A comparison of spontaneous EPSCs in layer II and layer IV-V neurons of the rat entorhinal cortex in vitro. *J. Neurophysiol.*, **76**(Aug), 1089–1100.
- Bonilla, LL., Neu, JC., & Spiegler, R. 1992. Nonlinear stability of incoherence and collective synchronization in a population of coupled oscillators. *J Stat Phys*, **67**, 313–330.
- Bonilla, LL., Pérez-Vicente, CJ., Ritort, F., & Soler, J. 2000. Exact solutions and dynamics of globally coupled phase oscillators. *arXiv:nlin.AO/0004016*.
- 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.
- 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**(Jan), 47–60.
- 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.
- Buzsáki, G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, **33**(Jan), 325–340.
- Buzsáki, G., & Draguhn, A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, **304**(Jun), 1926–1929.
- Callaway, Edward M, & Yuste, Rafael. 2002. Stimulating neurons with light. *Curr Opin Neurobiol*, **12**(5), 587–92.
- Cash, S., & Yuste, R. 1998. Input summation by cultured pyramidal neurons is linear and position-independent. *J. Neurosci.*, **18**(Jan), 10–15.

- Chrobak, J.J., & Buzsáki, G. 1998. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J. Neurosci.*, **18**(Jan), 388–398.
- Clements, J.D., & Bekkers, J.M. 1997. Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template. *Biophys. J.*, **73**(Jul), 220–229.
- Collet, P., & Eckmann, J.P. 1980. *Iterated Maps on the Interval as Dynamical Systems*. Boston: Birkhäuser.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K.D., & Buzsáki, G. 2003. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, **37**(Jan), 311–322.
- Cunningham, M.O., Davies, C.H., Buhl, E.H., Kopell, N., & Whittington, M.A. 2003. Gamma oscillations induced by kainate receptor activation in the entorhinal cortex in vitro. *J. Neurosci.*, **23**(Oct), 9761–9769.
- Dantzker, J L, & Callaway, E M. 2000. Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, **3**(7), 701–707.
- Dhillon, A., & Jones, R.S. 2000. Laminar differences in recurrent excitatory transmission in the rat entorhinal cortex in vitro. *Neuroscience*, **99**, 413–422.
- Dickson, C.T., Biella, G., & de Curtis, M. 2000. Evidence for spatial modules mediated by temporal synchronization of carbachol-induced gamma rhythm in medial entorhinal cortex. *J. Neurosci.*, **20**(Oct), 7846–7854.
- Dotd, 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.
- Dotd, 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.
- Donoghue, J.P., Sanes, J.N., Hatsopoulos, N.G., & Gaál, G. 1998. Neural discharge and local field potential oscillations in primate motor cortex during voluntary movements. *J. Neurophysiol.*, **79**(Jan), 159–173.
- Eckhorn, R., Bauer, R., Jordan, W., Brosch, M., Kruse, W., Munk, M., & Reitboeck, H.J. 1988. Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biol Cybern*, **60**, 121–130.

- Edman, A., Gestrelus, S., & Grampp, W. 1987. Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J. Physiol. (Lond.)*, **384**(Mar), 671–690.
- Ermentrout, B. 1996. Type I membranes, phase resetting curves, and synchrony. *Neural Comput*, **8**(Jul), 979–1001.
- Fetz, E.E. 1997. Temporal coding in neural populations? *Science*, **278**(Dec), 1901–1902.
- Fisahn, A., Pike, F.G., Buhl, E.H., & Paulsen, O. 1998. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature*, **394**(Jul), 186–189.
- Freund, T.F., & Buzsáki, G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347–470.
- Frick, A, Zieglgansberger, W, & Dodt, H U. 2001. Glutamate receptors form hot spots on apical dendrites of neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, **86**(3), 1412–1421.
- Fuhs, M.C., & Touretzky, D.S. 2006. A spin glass model of path integration in rat medial entorhinal cortex. *J. Neurosci.*, **26**(Apr), 4266–4276.
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M.P., Moser, E.I., & Moser, M.B. 2004. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, **305**(Aug), 1258–1264.
- Gerstner, W., van Hemmen, J.L., & Cowan, J.D. 1996. What matters in neuronal locking? *Neural Comput*, **8**(Nov), 1653–1676.
- Giocomo, L.M., Zilli, E.A., Fransén, E., & Hasselmo, M.E. 2007. Temporal frequency of subthreshold oscillations scales with entorhinal grid cell field spacing. *Science*, **315**(Mar), 1719–1722.
- Gloveli, T., Dugladze, T., Schmitz, D., & Heinemann, U. 2001. Properties of entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, **13**(Jan), 413–420.
- Godwin, D W, Che, D, O'Malley, D M, & Zhou, Q. 1997. Photostimulation with caged neurotransmitters using fiber optic lightguides. *J Neurosci Methods*, **73**(1), 91–106.

- Goel, P., & Ermentrout, B. 2002. Synchrony, stability, and firing patterns in pulse-coupled oscillators. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, **163**(Mar), 191–216.
- Goense, Jozien B M, & Logothetis, Nikos K. 2006. Laminar specificity in monkey V1 using high-resolution SE-fMRI. *Magn Reson Imaging*, **24**(4), 381–92.
- Gray, C.M., & Singer, W. 1989. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**(Mar), 1698–1702.
- Gutkin, B., Ermentrout, G.B., & Rudolph, M. 2003. Spike generating dynamics and the conditions for spike-time precision in cortical neurons. *J Comput Neurosci*, **15**, 91–103.
- Gutkin, B.S., Ermentrout, G.B., & Reyes, A.D. 2005. Phase-response curves give the responses of neurons to transient inputs. *J. Neurophysiol.*, **94**(Aug), 1623–1635.
- 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.
- Hasselmo, M.E., Fransen, E., Dickson, C., & Alonso, A.A. 2000. Computational modeling of entorhinal cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **911**(Jun), 418–446.
- 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.
- Haykin, S. 1998. *Neural Networks. A Comprehensive Foundation*. Prentice Hall International Editions.
- Hájos, N., Katona, I., Naiem, S.S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I., & Freund, T.F. 2000. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur. J. Neurosci.*, **12**(Sep), 3239–3249.
- Hormuzdi, S.G., Pais, I., LeBeau, F.E., Towers, S.K., Rozov, A., Buhl, E.H., Whittington, M.A., & Monyer, H. 2001. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron*, **31**(Aug), 487–495.
- Hutcheon, B., & Yarom, Y. 2000. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci.*, **23**(May), 216–222.

- Ikeda, J., Mori, K., Oka, S., & Watanabe, Y. 1989. A columnar arrangement of dendritic processes of entorhinal cortex neurons revealed by a monoclonal antibody. *Brain Res.*, **505**(Dec), 176–179.
- Jensen, O., & Lisman, J.E. 1996. Hippocampal CA3 region predicts memory sequences: accounting for the phase precession of place cells. *Learn. Mem.*, **3**, 279–287.
- 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.
- Jonas, P., Bischofberger, J., Fricker, D., & Miles, R. 2004. Interneuron Diversity series: Fast in, fast out—temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci.*, **27**(Jan), 30–40.
- Jones, R.S. 1993. Entorhinal-hippocampal connections: a speculative view of their function. *Trends Neurosci.*, **16**(Feb), 58–64.
- Kandler, K, Katz, L C, & Kauer, J A. 1998. Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors. *Nat Neurosci*, **1**(2), 119–123. In Vitro.
- Katz, L C, & Dalva, M B. 1994. Scanning laser photostimulation: a new approach for analyzing brain circuits. *J Neurosci Methods*, **54**(2), 205–218.
- Köhler, C. 1986. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J. Comp. Neurol.*, **246**(Apr), 149–169.
- Kisvárdy, Z.F., Beaulieu, C., & Eysel, U.T. 1993. Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): implication for lateral disinhibition. *J. Comp. Neurol.*, **327**(Jan), 398–415.
- Klink, R., & Alonso, A. 1997. Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiol.*, **77**(Apr), 1813–1828.
- Koetter, R, Staiger, J F, Zilles, K, & Luhmann, H J. 1998. Analysing functional connectivity in brain slices by a combination of infrared video microscopy, flash photolysis of caged compounds and scanning methods. *Neuroscience*, **86**(1), 265–77.

- Kopell, N., & Ermentrout, GB. 2002. *Handbook on Dynamical Systems: Toward applications*. Vol. 1. Elsevier, Amsterdam. Chap. Mechanisms of phase-locking in pairs of coupled neural oscillators., pages 3–54.
- Kramis, R., Vanderwolf, C.H., & Bland, B.H. 1975. Two types of hippocampal rhythmic slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp. Neurol.*, **49**(Oct), 58–85.
- Kudoh, S.N., & Taguchi, T. 2002. A simple exploratory algorithm for the accurate and fast detection of spontaneous synaptic events. *Biosens Bioelectron*, **17**(Sep), 773–782.
- 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.
- Laurent, G. 1996. Dynamical representation of odors by oscillating and evolving neural assemblies. *Trends Neurosci.*, **19**(Nov), 489–496.
- Leibold, C., & Kempter, R. 2006. Memory capacity for sequences in a recurrent network with biological constraints. *Neural Comput*, **18**(Apr), 904–941.
- Lester, H A, & Nerbonne, J M. 1982. Physiological and pharmacological manipulations with light flashes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **11**(NIL), 151–75.
- Lingenhöhl, K., & Finch, D.M. 1991. Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains. *Exp Brain Res*, **84**, 57–74.
- Losonczy, A., & Magee, J.C. 2006. Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, **50**(Apr), 291–307.

- Marsal, D. 1976. *Die numerische Lösung partieller Differentialgleichungen in Wissenschaft und Technik*. Vol. 1. Mannheim: Bibliographisches Institut.
- Martin, Kevan A C. 2002. Microcircuits in visual cortex. *Curr Opin Neurobiol*, **12**(4), 418–25.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., & Kasai, H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, **429**(Jun), 761–766.
- McDonald, A J. 1992. Neuroanatomical labeling with biocytin: a review. *Neuroreport*, **3**(10), 821–7.
- McNaughton, B.L., Battaglia, F.P., Jensen, O., Moser, E.I., & Moser, M.B. 2006. Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**(Aug), 663–678.
- Melamed, O., Gerstner, W., Maass, W., Tsodyks, M., & Markram, H. 2004. Coding and learning of behavioral sequences. *Trends Neurosci.*, **27**(Jan), 11–14.
- Montgomery, J.M., Pavlidis, P., & Madison, D.V. 2001. Pair recordings reveal all-silent synaptic connections and the postsynaptic expression of long-term potentiation. *Neuron*, **29**(Mar), 691–701.
- Netoff, T.I., Banks, M.I., Dorval, A.D., Acker, C.D., Haas, J.S., Kopell, N., & White, J.A. 2005. Synchronization in hybrid neuronal networks of the hippocampal formation. *J. Neurophysiol.*, **93**(Mar), 1197–1208.
- Neuenschwander, S., & Varela, F.J. 1993. Visually triggered neuronal oscillations in the pigeon: an autocorrelation study of tectal activity. *Eur. J. Neurosci.*, **5**(Jul), 870–881.
- Nikolenko, Volodymyr, Poskanzer, Kira E, & Yuste, Rafael. 2007. Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits. *Nat Methods*, **4**(11), 943–950.
- O'Keefe, J. 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.*, **51**(Apr), 78–109.
- O'Keefe, J. 1993. Hippocampus, theta, and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**(Dec), 917–924.
- O'Keefe, J., & Recce, M.L. 1993. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, **3**(Jul), 317–330.

- Pape, H.C. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 299–327.
- Parron, C., Poucet, B., & Save, E. 2004. Entorhinal cortex lesions impair the use of distal but not proximal landmarks during place navigation in the rat. *Behav. Brain Res.*, **154**(Oct), 345–352.
- Penttonen, M., Kamondi, A., Acsády, L., & Buzsáki, G. 1998. Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, **10**(Feb), 718–728.
- 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**(Apr), 202–211.
- Pouille, F., & Scanziani, M. 2001. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*, **293**(5532), 1159–1163. In Vitro.
- Prechtl, J.C. 1994. Visual motion induces synchronous oscillations in turtle visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**(Dec), 12467–12471.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., & Flannery, B.P. 1992. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, MA.
- Rinzel, J., & Ermentrout, B. 1998. *Methods in Neuronal Modeling: From Ions to Networks*. Cambridge, MA: MIT Press. Chap. Analysis of neural excitability and oscillations, pages 251–291.
- Ritz, R., & Sejnowski, T.J. 1997. Synchronous oscillatory activity in sensory systems: new vistas on mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**(Aug), 536–546.
- Sakaguchi, H. 1998. Cooperative Phenomena in Coupled Oscillator Systems. *Prog Theor Phys*, **79**, 39–46.
- Samsonovich, A., & McNaughton, B.L. 1997. Path integration and cognitive mapping in a continuous attractor neural network model. *J. Neurosci.*, **17**(Aug), 5900–5920.
- 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.

- Schlegel, P.A. 2008. Magnetic and other non-visual orientation mechanisms in some cave and surface urodeles. *Journal of Ethology*, **to appear**.
- Schreiber, S., Erchova, I., Heinemann, U., & Herz, A.V. 2004. Subthreshold resonance explains the frequency-dependent integration of periodic as well as random stimuli in the entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.*, **92**(Jul), 408–415.
- 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), 223–36.
- 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.
- Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., & Buzsáki, G. 1995. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J. Neurosci.*, **15**(Oct), 6651–6665.
- Singer, W. 1999. Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron*, **24**(Sep), 49–65.
- Solstad, T., Moser, E.I., & Einevoll, G.T. 2006. From grid cells to place cells: a mathematical model. *Hippocampus*, **16**, 1026–1031.
- Somogyi, P. 1990. Synaptic connections of neurones identified by Golgi impregnation: characterization by immunocytochemical, enzyme histochemical, and degeneration methods. *J Electron Microsc Tech*, **15**(4), 332–51.
- Steriade, M. 2001. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J. Neurophysiol.*, **86**(Jul), 1–39.

- Stewart, M., Quirk, G.J., Barry, M., & Fox, S.E. 1992. Firing relations of medial entorhinal neurons to the hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized and walking rats. *Exp Brain Res*, **90**, 21–28.
- Strogatz, SH., & Mirollo, RF. 1991. Stability of incoherence in a population of coupled oscillators. *J Stat Phys*, **63**, 613–635.
- Taube, J.S. 1998. Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog. Neurobiol.*, **55**(Jun), 225–256.
- Traub, R.D., Whittington, M.A., Colling, S.B., Buzsáki, G., & Jefferys, J.G. 1996. Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo. *J. Physiol. (Lond.)*, **493 (Pt 2)**(Jun), 471–484.
- Tsodyks, M. 1999. Attractor neural network models of spatial maps in hippocampus. *Hippocampus*, **9**, 481–489.
- Uhlhaas, P.J., & Singer, W. 2006. Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron*, **52**(Oct), 155–168.
- 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**(19), 8143–8148.
- Wehr, M., & Laurent, G. 1996. Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature*, **384**(Nov), 162–166.
- White, J A, Rubinstein, J T, & Kay, A R. 2000. Channel noise in neurons. *Trends Neurosci*, **23**(3), 131–137.
- White, J.A., Klink, R., Alonso, A., & Kay, A.R. 1998. Noise from voltage-gated ion channels may influence neuronal dynamics in the entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.*, **80**(Jul), 262–269.
- Whittington, M.A., Traub, R.D., & Jefferys, J.G. 1995. Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*, **373**(Feb), 612–615.

- Witter, M.P., & Amaral, D.G. 1991. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J. Comp. Neurol.*, **307**(May), 437–459.
- Wouterlood, F.G., Van Haeften, T., Eijkhoudt, M., Baks-Te-Bulte, L., Goede, P.H., & Witter, M.P. 2004. Input from the presubiculum to dendrites of layer-V neurons of the medial entorhinal cortex of the rat. *Brain Res.*, **1013**(Jul), 1–12.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dietmar Schmitz und Herrn Professor Christian Leibold für alle gebotenen Möglichkeiten, ihre Betreuung und ihren fachmännischen Rat in allen Lagen.

Darüberhinaus möchte ich Herrn Prateep Beed und Herrn Dr. Friedrich Johenning für ihre kompetente Hilfe bei Planung, Durchführung und Optimierung der Photostimulationsexperimente ganz herzlich danken!

Schließlich möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihren unermüdlichen Einsatz und Zuspruch und nicht zuletzt für ihre große Geduld danken.

Ihnen allen herzlichen Dank!

Erklärung

Ich, Michael Hans Karl Bendels, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift zum Thema '*Langsame Netzwerkoszillationen in exzitatorisch verknüpften neuronalen Netzwerken*' selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

