

Aus dem  
Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité  
Direktor: Prof. Dietmar Schmitz

## **Habilitationsschrift**

### **Optische Methoden zur funktionell-anatomischen Charakterisierung synaptischer Verschaltungen**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Anatomie und Neurobiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Friedrich Jochenning,  
geboren am 8.7.1975 in Münster

Eingereicht: März 2011

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Tobias Böckers, Ulm

2. Gutachter: Prof. Jochen Staiger, Göttingen

## **1. Einleitung**

- 1.1. Funktionelle Anatomie: Optische Methoden zur funktionellen Charakterisierung synaptischer Verschaltungen 4
- 1.2. Intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  als Schnittstelle zwischen synaptischer Aktivierung und biochemischer Veränderung 4
- 1.3. Scanning Photostimulation zur Untersuchung synaptischer Verbindungen in lokalen Schaltkreisen 8

## **2. Kompartimentspezifische neuronale $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase: Charakterisierung differentieller intrazellulärer Mechanismen der synaptisch vermittelten elektrisch-biochemischen Kopplung**

- 2.1. Differentielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion in Soma und Dendrit des Neurons 11
- 2.2. Eingangsspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion in dendritischen spines determiniert synaptische Plastizität 22
- 2.3. Die Rolle der somatisch/nukleären  $\text{Ca}^{2+}$  Signaltransduktion für langanhaltende, transkriptionsabhängige synaptische Plastizität 36

## **3. Charakterisierung synaptischer Mikroschaltkreise durch funktionelle Kartierung zellspezifischer interzellulärer Verschaltungsmuster**

- 3.1. Dynamisierung des Arbeitsablaufs bei der Generierung funktioneller Karten durch Scanning Photostimulation 50
- 3.2. Extraktion spezifischer Aktivierungsmuster in Hirnregionen mit hoher Spontanaktivität 65
- 3.3. Lokale Schaltkreise im entorhinalen Cortex 76

## **4. Diskussion 85**

<b>5. Zusammenfassung</b>	93
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	96
<b>7. Danksagung</b>	103
<b>8. Eidesstattliche Erklärung</b>	104

## **1.1 Funktionelle Anatomie: Optische Methoden zur funktionellen Charakterisierung synaptischer Verschaltungen**

Vor jeder funktionellen Untersuchung des Gehirns wird die Organisationsebene definiert, auf der die Fragestellung untersucht werden kann. Die moderne Hirnforschung unterscheidet den “top down” vom “bottom up” Ansatz: Entlang einer Achse von bottom up nach top down lassen sich nach Shepherd folgende Organisationsebenen in aufsteigender Reihe unterscheiden: Gene » Moleküle » Synapsen » Synaptische Mikroschaltkreise » Dendritenbäume » Neurone » Lokale Schaltkreise » Interregionale Schaltkreise » Verhaltenssysteme (Shepherd, 2004). Ziel dieser Arbeit ist es aufzuzeigen, wie die Kombination optischer und elektrophysiologischer Methoden mit Fokus auf das einzelne Neuron genutzt werden kann, um grundlegende Struktur-Funktionsbeziehungen im Sinne einer funktionellen Anatomie zu erforschen. Im ersten Teil der Arbeit bewegen wir uns auf der oben dargelegten Achse vom Neuron in Richtung “bottom-up” (Synaptische Mikroschaltkreise und Dendritenbäume), im zweiten Teil in Richtung “top down” (lokale Schaltkreise). Regional liegt der Fokus auf für die frühe Pathogenese neuropsychiatrischer Krankheitsbilder wie Alzheimer und Epilepsie wichtigen Hirnstrukturen des Temporallappens, dem primär olfaktorischen oder piriformen Cortex (McIntyre and Gilby, 2008) (Kesslak et al., 1988), dem Hippocampus (Witter and Amaral, 2004) sowie dem entorhinalen Kortex (Canto et al., 2008).

## **1.2. Intrazelluläres $Ca^{2+}$ als Schnittstelle zwischen synaptischer Aktivierung und biochemischer Veränderung**

Bis ca. 1900 war es unklar, ob das Gehirn aus isolierten Zellen besteht. Erst die wegweisenden morphologischen Arbeiten von Ramon y Cajal haben die Neuron-Doktrin als akzeptierte Theorie etabliert (Cajal, 1906). Das Neuron ist eine komplex strukturierte Zelle, deren Hauptaufgabe die Integration von Signalen/Informationen ist: Es nimmt über seine postsynaptischen Eingänge Signale anderer Nervenzellen auf, verändert sie und leitet sie über

seine präsynaptischen Fortsätze an andere Neurone weiter (Sherrington, 1906). Dieser Impulsweiterleitung liegen auf postsynaptischer Seite durch Neurotransmitteraktivierung überwiegend ligandengesteuerter Ionenkanäle ausgelöste synaptische Ströme zugrunde. Diese Ströme werden durch intrinsische neuronale Leitfähigkeiten moduliert. Ein Beispiel ist der A-Typ Kaliumkanal. Durch schnelle Depolarisation erfolgt seine Aktivierung, die zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt (Rudy et al., 1988).

Bei Schwellenüberschreitung feuert die Zelle ein Aktionspotential, das an den präsynaptischen Terminalen die Ausschüttung von Neurotransmittern hervorruft. Neurotransmitter können durch Kanalproteine direkt elektrische Phänomene hervorrufen, oder aber durch metabotrope Rezeptoren über second messenger direkt auf die biochemische Signaltransduktion einwirken (Shepherd, 2004).

In diesem Zusammenhang kommt dem den ersten Teil der hier vorliegenden Habilitationsschrift dominierenden  $\text{Ca}^{2+}$  Molekül eine Schlüsselstellung zu: Es gibt ligandenaktivierte, spannungsabhängige und intrazelluläre Ionenkanäle mit einer hohen Leitfähigkeit für das divalente Kation  $\text{Ca}^{2+}$ . Aufgrund eines ca.  $10^9$ -fachen Gradienten zwischen extrazellulärer (2-3 mM) und intrazellulärer (100 nM)  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ist eine Aktivierung dieser  $\text{Ca}^{2+}$  Leitfähigkeiten regelhaft mit einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verbunden (Ghosh and Greenberg, 1995). Neben einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten über die Plasmamembran können Erhöhungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch durch Freisetzung aus  $\text{Ca}^{2+}$  Speichern des endoplasmatischen Retikulums (ER) hervorgerufen werden. Auf der ER-Membran finden sich verschiedene Typen von  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen. Die Haupttypen sind der Inositol-Trisphosphat (IP3) -Rezeptor, der durch den second messenger IP3 und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird, sowie der Ryanodinrezeptor, der primär durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird (Berridge, 1998). In Originalarbeit 1 werden kompartiment-spezifische Unterschiede der  $\text{Ca}^{2+}$  Signaltransduktion zwischen Dendrit und Soma beschrieben. Diese Unterschiede werden vor dem Hintergrund der Interaktion

unterschiedlicher Subtypen des IP<sub>3</sub>-Rezeptors, Ryanodinrezeptors und dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor-assoziierten Protein Chromogranin B diskutiert (Johanning et al., 2002).

Intrazellulär finden wir eine Vielzahl Ca<sup>2+</sup> sensitiver Proteine, sogenannter Ca<sup>2+</sup> Sensoren, die Ca<sup>2+</sup> Konzentrationserhöhungen in biochemische Signale umsetzen. Diese second-messenger Funktion des Ca<sup>2+</sup> macht es zu einem Schlüsselmolekül der elektrisch-biochemischen Kopplung in Neuronen (Hille, 1992). Beispiele für die durch Ca<sup>2+</sup> vermittelte Umsetzung von elektrischer in biochemische Aktivität sind: Die Induktion synaptischer Plastizität in Dendriten und dendritischen Dornen (spines; (Nevian and Sakmann, 2006; Sjöstrom and Nelson, 2002; Sjöstrom et al., 2008), das Wachstum von axonalen Fortsätzen in der Entwicklung (Gomez and Spitzer, 2000), die Freisetzung von Neurotransmittern in der Präsynapse (Zucker, 1993) oder die Steuerung der nukleären Transkription (Hardingham and Bading, 1998).

Eine Steuerung dieser Prozesse erfolgt durch die räumliche, zeitliche und quantitative Dimension des Ca<sup>2+</sup> Signals in den verschiedenen subzellulären Kompartimenten. Mit der Entwicklung fluoreszierender Ca<sup>2+</sup> Indikatoren (Grynkiewicz et al., 1985) ist es möglich geworden, durch fluoreszenzmikroskopische Verfahren die stimulusinduzierte Änderung der neuronalen Ca<sup>2+</sup> Konzentration auf subzellulärer Ebene zu untersuchen (Yuste et al., 2006). Somit lässt sich durch optische Verfahren biochemisch relevante neuronale Aktivität stimulusabhängig und in Echtzeit untersuchen. Moderne fluoreszenzoptische Verfahren wie die konfokale und die 2-Photonenmikroskopie haben dabei die räumliche Auflösung auch in optische stark streuender Umgebung wie dem akuten Hirnschnitt oder dem Ganzhirn in vivo entscheidend verbessert (Svoboda and Yasuda, 2006).

Synaptische Plastizität ist die langanhaltende, stimulusabhängige Veränderung der Effektivität synaptischer Übertragung. Eine langfristige Verstärkung der synaptischen Übertragung bezeichnet man als Langzeitpotenzierung (long-term-potential: LTP), eine Verringerung als Langzeitdepression (long-term-depression: LTD). Wie oben angedeutet, ist das Ca<sup>2+</sup> Molekül

an der Induktion (Auslösung der die Veränderung bedingenden Kaskade), beteiligt (Malenka and Bear, 2004).

Für das ‚spike-timing-dependent-plasticity (STDP)‘ Paradigma konnte eine Dosisbeziehung zwischen Anstieg des neuronalen  $\text{Ca}^{2+}$  im postsynaptischen spine und der Stärke der Potenzierung einer synaptischen Verbindung gezeigt werden (Nevian and Sakmann, 2006). In erregenden Neuronen findet sich ein Großteil erregender Synapsen auf dendritischen spines (Yuste, 2010). Spines sind wenige  $\mu\text{m}$  große morphologische Spezialisierungen, die in der Lage sind, biochemische Signale zu kompartimentalisieren (Sabatini und Svoboda, 2000). In diesem Zusammenhang ist eine ihrer vielen Funktionen die Vermittlung einer synapsenspezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung bei der LTP-Induktion (Yuste, 2010).

Grundsätzliche mechanistische Prinzipien, die der LTP-Induktion zugrunde liegen, sind die Aktivierung des synaptischen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors durch präsynaptisches Glutamat bei nachfolgender –Aufhebung des  $\text{Mg}^{2+}$ -Blocks des NMDARs (Kampa et al., 2004). Zusammen mit spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen der R- und T-Typ Gruppe ist der NMDAR Hauptquelle für LTP-induzierende  $\text{Ca}^{2+}$  Signale in dendritischen spines (Bloodgood and Sabatini, 2007). Der beim Ruhemembranpotetial bestehende  $\text{Mg}^{2+}$ -Block wird durch postsynaptische Depolarisation aufgehoben, meist durch ein in Dendriten und spines weitergeleitetes Aktionspotential (Nevian and Sakmann, 2004). Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit die Induktion synaptischer Plastizität durch die elektrischen Eigenschaften dendritischer Kompartimente determiniert ist (Sjostrom et al., 2008). Originalarbeit 2 untersucht den Zusammenhang zwischen eingangsspezifischer synaptischer Potenzierung und Unterschieden in den elektrischen Eigenschaften des distalen und proximalen dendritischen Kompartimenten im primär olfaktorischen oder piriformen Cortex (Johanning et al., 2009). Neben der direkten, lokalen Induktion von synaptischer Langzeitplastizität direkt in den aktivierten Synapsen wurden in der Literatur auch Fernwirkungen starker synaptischer Aktivierungen beschrieben, die eine Veränderung des zellulären Transkriptionsmusters im

Nukleus hervorrufen (Impey et al., 1996). Die so induzierten Transkriptionsvorgänge sind für die Induktion langanhaltender synaptischer Plastizität entscheidend (Frey et al., 1996; Frey et al., 1989; Impey et al., 1996). Als Sekundärbotenstoff (second messenger)-Kaskaden für die Kommunikation zwischen Synapse und Nukleus im Sinne einer Erregungs-Transkriptionskopplung (excitation/transcription coupling) sind hier zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP), die Mitogen-activated Protein Kinase (MAP-kinase) sowie das  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin System vorgeschlagen worden (Deisseroth et al., 2003). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors cyclic-AMP-response-element (CRE) durch das CRE-binding protein (CREB) wird durch nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten reguliert (Hardingham, 1998). In diesem Zusammenhang wurde in Originalarbeit 3 untersucht, ob es (ähnlich wie im spine) eine Dosisabhängigkeit zwischen effektiver langanhaltender Langzeitpotenzierung und der Größe des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten während der Induktion gibt (Johenning and Holthoff, 2007).

### **1.3. Scanning Photostimulation zur Untersuchung synaptischer Verbindungen in lokalen Schaltkreisen**

Vorab ist eine Begriffsdefinition notwendig: Nach Shepherd ist ein Mikroschaltkreis (microcircuit) ein lokales synaptisches Verschaltungsmuster, das eine funktionelle Operation durchführen kann. Ein lokaler Schaltkreis (local circuit) ist die Gesamtheit aller Verbindungen eines Neurons innerhalb einer Hirnregion, ein interregionaler Schaltkreis (interregional circuit) beschreibt Verbindungen zwischen Hirnregionen (Shepherd, 2004). Neurone sind nicht nur durch die in dieser Habilitationsschrift bisher untersuchten postsynaptischen und intrinsischen Reaktionsmuster auf synaptische Stimulation in synaptischen Mikroschaltkreisen definiert (s.o.). Sie sind immer Teil eines Netzwerkensembles (lokale und interregionale Schaltkreise). Entscheidend für die Funktion eines Neurons ist somit auch die Herkunft des synaptischen



Stimulus. Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit werden optische und elektrophysiologische Verfahren kombiniert, um die Einbettung eines Neurons in lokale Schaltkreise zu untersuchen. Ein wichtiges Verfahren für die funktionelle Analyse neuronaler Schaltkreise ist die in den frühen 90er Jahren im Labor von Larry Katz entwickelte "scanning photostimulation". Mit Hilfe der punktspezifischen Anregung des durch chemische Modifikation UV-lichtaktivierbaren Moleküls 4-Methoxy-7-nitroindoliny-*caged*-L-glutamate (MNI-Glutamat) lassen sich im akuten Hirnschnitt über eine große Fläche die Verschaltungsmuster einer abgeleiteten Zielzelle kartographieren (Callaway and Katz, 1993).

Hierbei handelt es sich um ein technisch aufwendiges Verfahren. Folgerichtig beschäftigen sich hier vorgelegte Originalarbeiten mit der methodischen Etablierung der "scanning photostimulation". Zunächst wird eine den komplexen Arbeitsablauf vereinfachende integrierte Softwarelösung vorgestellt (Bendels et al., 2008). Für die weitere Analyse des entorhinalen Cortex war es notwendig, ein neuartiges Analyseverfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe spezifische lichtinduzierte synaptische Antworten lokalisiert und von unspezifischer Aktivität getrennt werden konnten (Bendels et al., 2010).

Grundsätzlich ermöglicht das Verfahren, zielzellspezifisch wiederkehrende Organisationsmuster lokaler Schaltkreise zu untersuchen (Callaway, 2002). Beispiele für solche Organisationsmuster sind das Verhältnis inter- und intralaminärer synaptischer Verbindungen (Dantzker and Callaway, 2000), die Gruppierung von Quellzellen synaptischer inputs in Modulen oder Kolumnen (Shepherd and Svoboda, 2005) oder die asymmetrische Verteilung der Eingänge (Oviedo et al., 2010). Bisher wurden dabei primär sensorische Areale wie der auditorische (Oviedo et al., 2010), visuelle (Dantzker and Callaway, 2000) oder sensorische (Shepherd and Svoboda, 2005) Cortex analysiert.

Im Gegensatz dazu ist der entorhinale Cortex den assoziativen Kortexarealen zuzuordnen: Er nimmt vor allem mit seinen oberflächlichen Schichten eine Schlüsselstellung bei der Weiterleitung von neocortikalen Informationen in den Hippokampus ein. Die tiefen Schichten

sind primär Schnittstelle für Projektionen vom Hippocampus in den Neocortex. Gleichzeitig generiert der mediale entorhinale Cortex (MEC) durch ‚Gitterzellen (grid cells)‘ eine metrische Repräsentation des Raums, die unabhängig von den Umweltbedingungen eine Art Navigationshilfe darstellt (Canto et al., 2008). Die letzte vorgestellte Originalarbeit beschäftigt sich mit der Beschreibung des Aufbaus lokaler Schaltkreise im entorhinalen Cortex (Beed et al., 2010).

## 2. **Kompartimentspezifische neuronale $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase: Charakterisierung differentieller intrazellulärer Mechanismen der synaptisch vermittelten elektrisch-biochemischen Kopplung**

### 2.1. **Differentielles $\text{Ca}^{2+}$ signaling in Soma und Dendrit des Neurons**

In der ersten Originalarbeit der hier vorgelegten Habilitationsschrift wird die kompartiment-spezifische Expression der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle IP3-Rezeptor Typ I und III sowie deren unterschiedliche Interaktion mit dem Ryanodinrezeptor in den Kompartimenten Dendrit und Soma beschrieben. Niedrige Konzentrationen des muscarinergen Agonisten Carbachol führen zu früheren und stärkeren  $\text{Ca}^{2+}$  Signalen in Dendriten. Diese erhöhte Ansprechbarkeit dendritischer IP3-Rezeptoren ist nicht durch eine erhöhte dendritische IP3 Konzentration zu erklären. Die Diffusionseigenschaften von IP3 und Experimente mit membrangängigem, langsam freigesetztem IP3 legen nahe, dass es Unterschiede zwischen dendritischen und somatischen IP3-Rezeptoren gibt.

In diesem Zusammenhang wird eine spezifische Expression des IP3-Rezeptors Typ III im neuronalen Soma sowie des den IP3-Rezeptor aktivierenden Proteins Chromogranin B im Dendriten nachgewiesen. Aufgrund seiner niedrigeren Affinität für IP3 sowie der fehlenden Feedbackregulation durch erhöhtes intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  (Hagar et al., 1998) wird ein Modell vorgeschlagen, in dem der Typ III IP3-Rezeptor die Rolle eines hochschwelligem ‘Torwächters (gatekeeper)’ für hochamplitudige, lange  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten in Soma und Nukleus innehat. Ryanodinrezeptoren können ein IP3-Rezeptor Typ I vermitteltes  $\text{Ca}^{2+}$  Signal verstärken und erhöhen so die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Aktivierbarkeit des IP3-Rezeptors Typ III.

**Johanning FW**, M.R. Zochowski, S. Conway, A. Holmes, P. Koulen and B.E. Ehrlich (2002)  
Distinct intracellular calcium transients in neurites and somata integrate neuronal signals.  
Journal of Neuroscience, July 1, 22(13):5344-53

## **2.2 Eingangsspezifisches $\text{Ca}^{2+}$ signaling in dendritischen spines determiniert synaptische Plastizität**

Die Beschreibung von  $\text{Ca}^{2+}$  Signalen in der räumlichen, zeitlichen und quantitativen Dimension in unterschiedlichen neuronalen Kompartimenten wirft immer auch die Frage nach ihrer Funktion auf. Elektrische synaptische Signale werden bei der Induktion synaptischer Plastizität über den  $\text{Ca}^{2+}$  - Einstrom in synaptischen spines in biochemische Prozesse übersetzt. Am apikalen Dendriten der Schicht 2 Pyramidenzelle des piriformen Cortex finden sich 2 unterschiedliche erregende Mikroschaltkreise: Proximale, assoziative Synapsen können von sensorischen, distalen Synapsen unterschieden werden. LTP kann ab postnatalem Tag (p) 19 nur in proximalen assoziativen Synapsen ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang untersucht Originalarbeit 2 Unterschiede im  $\text{Ca}^{2+}$  Signal bei der Induktion von LTP in proximalen assoziativen und distalen sensorischen spines. Eine stärkere Lokalisierung der A-Typ Kaliumkanäle (Kv 4.2 und 4.3) im distalen Dendriten führt zu einer reduzierten Weiterleitung des rückläufigen Aktionspotentials in den distalen Dendriten. Rückläufige Aktionspotentiale depolarisieren den Dendriten und reduzieren so den  $\text{Mg}^{2+}$  vermittelten Block des NMDA Rezeptors. Demzufolge beobachten wir eine reduzierte NMDA-Rezeptoraktivierung durch rückläufige Aktionspotentiale bei der LTP Induktion in distalen sensorischen Synapsen. Der damit verbundene reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom ist nicht ausreichend, um LTP zu induzieren.

**Johanning, F.W.**, Beed, P.S., Trimbuch, T., Bendels, M.H., Winterer, J., and Schmitz, D. (2009). Dendritic compartment and neuronal output mode determine pathway-specific long-term potentiation in the piriform cortex. *J Neurosci* 29, 13649-13661.

### **2.3. Die Rolle des somatisch/nukleären Ca<sup>2+</sup> signaling für langanhaltende, transkriptionsabhängige synaptische Plastizität**

Ca<sup>2+</sup> Signale in dendritischen spines sind wie in der vorhergehenden Arbeit gezeigt an der Induktion von LTP beteiligt. In der Literatur wurden aber auch langanhaltende LTP Formen beschrieben, die von nukleärer Transkription abhängen. Das nukleäre Ca<sup>2+</sup> Signal spielt eine Rolle bei der Informationsübertragung von der Synapse zum Nukleus. Die nächste Originalarbeit untersucht den Zusammenhang zwischen der Größe des nukleären Ca<sup>2+</sup> Signals und der Effektivität der ‘langen’ transkriptionsabhängigen Langzeitpotenzierung (L-LTP). Nukleäre Ca<sup>2+</sup> Transienten während L-LTP Induktion wurden mit Hilfe der Zweiphotonen Mikroskopie mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung gemessen. Das nukleäre Ca<sup>2+</sup> Signal wurde durch den hier erstmals beschriebenen single cell excitability probing (SCEP) Ansatz auch verwendet, um langfristig mit optischen Methoden Veränderungen der Effektivität synaptischer Übertragung zu messen. Mit diesem Verfahren finden wir keine statistisch relevanten Unterschiede des Induktionssignals zwischen Zellen, die langfristig oder kurzfristig potenziert werden.

**Johanning, F.W.**, and Holthoff, K. (2007). Nuclear calcium signals during L-LTP induction do not predict the degree of synaptic potentiation. *Cell Calcium* 41, 271-283.

### **3. Charakterisierung synaptischer Mikroschaltkreise durch funktionelle Kartierung zellspezifischer interzellulärer Verschaltungsmuster**

#### **3.1. Dynamisierung des Arbeitsablaufs bei der Generierung funktioneller Karten**

##### **durch Scanning Photostimulation**

Im bisherigen Verlauf dieser Habilitationsschrift wurden postsynaptische und intrinsische neuronale Reaktionsmuster auf synaptische Stimulation in synaptischen Mikroschaltkreisen untersucht (s.o.). Neurone und Mikroschaltkreise sind aber immer auch Teil eines Netzwerkensembles. Um die Herkunft des synaptischen Stimulus auf eine Zielzelle zu definieren, benötigt man Informationen über die Lokalisierung der Quellzelle. Die punktspezifische Freisetzung von caged ('chemisch gefangenem') Glutamat (MNI-Glutamat, s.o.) durch UV Licht ermöglicht eine zeitlich und räumlich lokalisierbare Aktivierung solcher Quellzellen. Grundlage für dieses Verfahren ist die genaue Lokalisierung des aktivierenden Lichtpunktes auf einem mikroskopischen Bild. Bei einem in der Fokusebene fixierten Anregungspunkt kann dies durch die Verschiebung des Mikroskops im Verhältnis zum Präparat (oder umgekehrt) durch hochpräzise Mikromanipulatoren erfolgen. Im folgenden wird eine technische Lösung beschrieben, die es ermöglicht, auf großen Übersichtsbildern durch punktgenaues Verfahren des Mikroskops großflächige Kartierungen der auf eine Zielzelle projizierenden Quellzellen vorzunehmen. Die durch Mikromanipulatoren und Präparat vorgegebenen räumlichen Koordinaten werden mit den virtuellen Navigationspunkten auf einem Übersichtsbild abgeglichen. So wird es ermöglicht, die hochauflösende, punktspezifische Aktivierung einzelner Zellen durch UV-Licht in großflächigen Schnittpräparaten durchzuführen.

Bendels, M.H., Beed, P., Leibold, C. and Schmitz, D.\*, **Johanning, F.W.\*** (2008). A novel control software that improves the experimental workflow of scanning photostimulation experiments. *J Neurosci Methods* 175, 44-57.

\* **gleichberechtigt**

### **3.2. Extraktion spezifischer Aktivierungsmuster in Hirnregionen mit hoher Spontanaktivität**

Die entwickelte Methode zur Laser Scanning Photostimulation basiert auf der Messung postsynaptischer Ströme in der Zielzelle, die durch überschwellige Aktivierung von Quellzellen ausgelöst werden. Diese Ereignisse sind in ihren Eigenschaften grundsätzlich nicht von spontan auftretenden postsynaptischen Strömen, ausgelöst durch spontanes Feuern von Zellen im Hirnschnitt, zu unterscheiden. Ein erster, in der vorherigen Publikation beschriebener Ansatz für die Trennung von spezifischer photoinduzierter Aktivierung und unspezifischer Hintergrundaktivität ist die Definition eines Auslesezeitfensters direkt nach Applikation des Lichtpulses. Je nach spontaner Aktivitätsrate ist dieses Zeitfenster aber notwendigerweise durch Hintergrundaktivität überlagert. Epileptogene Strukturen des medialen Temporallappens wie z.B. der entorhinale oder piriforme Cortex zeigen in diesem Zusammenhang eine besonders hohe Spontanaktivität. Hier ist es notwendig, das Signal-Rauschverhältnis weiter zu verbessern. Im folgenden wird ein Algorithmus eingeführt, der es auch in Präparationen mit hoher Hintergrundaktivität ermöglicht, aufgrund der räumlichen Korrelation von synaptischen Inputs mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifische photoinduzierte Signale von der Hintergrundaktivität zu trennen und so Quellzellen präziser zu lokalisieren.

Bendels, M.H., Beed, P., Schmitz, D., **Johanning, F.W.**, and Leibold, C. (2010). Detection of input sites in scanning photostimulation data based on spatial correlations. *J Neurosci Methods* 192, 286-295.

### **3.3. Lokale Schaltkreise im medialen entorhinalen Cortex**

Nach der Etablierung von Methodik und Analyseverfahren zur Kartierung von Hirnstrukturen mit hoher spontaner Aktivität erfolgt in der nächsten Publikation die Anwendung dieser Verfahren auf die Analyse lokaler Schaltkreise im medialen entorhinalen Cortex. Der mediale Entorhinale Cortex (MEC) hat eine Schlüsselstellung bei der räumlichen Navigation, da er in Form sogenannter ‘Gitterzellen (grid cells)’ eine periodische metrische räumliche Matrix entwirft. Grid cells finden sich in den hier untersuchten oberflächlichen Schichten. Das durch grid cells generierte Perzept unterscheidet sich grundlegend von primären Sinneseindrücken. Diese werden in neocortikalen Primärarealen codiert, die bisher im Fokus der Analyse lokaler Schaltkreise standen. Zusätzlich dienen oberflächliche Projektionsneurone des entorhinalen Cortex als Schaltzentrale für cortikale Informationen, die in den Hippocampus weitergeleitet werden. Dabei verarbeiten sie diese Signale durch lokale, intracortikale Verbindungen weiter. In der folgenden Arbeit werden zelltypspezifische Organisationsmuster lokaler Schaltkreise oberflächlicher erregender Neuronenpopulationen (Sternzellen, Schicht 2 Pyramidenzellen, Schicht 3 Pyramidenzellen) untersucht. Von besonderer Bedeutung in dieser Arbeit ist die Organisation der synaptischen Eingänge aus den tiefen Schichten fünf und sechs. Untersuchte Parameter sind das zelltypspezifische Verhältnis oberflächlicher und tiefer Eingänge, die räumliche Ausdehnung tiefer Eingänge und die Symmetrie entlang der medialen/lateralen Achse.

Beed, P., Bendels, M.H., Wiegand, H.F., Leibold, C. and **Johanning, F.W.\***, Schmitz, D.\* (2010). Analysis of Excitatory Microcircuitry in the Medial Entorhinal Cortex Reveals Cell-Type- Specific Differences. *Neuron*, 68(6):1059-66  
\* **gleichberechtigt**



#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden optische und elektrophysiologische Ansätze kombiniert, um grundlegende Struktur-Funktionsbeziehungen im Sinne einer funktionellen Anatomie zu erforschen. Während der erste Teil primär kompartimentspezifische subzelluläre neuronale Mechanismen untersucht, geht es im zweiten Teil um die Netzwerkeinbindung einzelner Neurone.

Eine in der Literatur immer wieder diskutierte Besonderheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Moleküls ist die Beteiligung eines einzelnen Moleküls an unterschiedlichen, teilweise funktionell antagonistischen zellulären Vorgängen (Berridge et al., 2000). Besonders in erregbaren Zellen (Muskelzellen und Neurone) ist  $\text{Ca}^{2+}$  das Schlüsselmolekül für die Umsetzung elektrischer Phänomene an der Membran in biochemische intrazelluläre Veränderungen (Hille, 1992). Um einem Molekül die stimulusabhängige Codierung unterschiedlicher Funktionen zu ermöglichen, bedarf es räumlicher, zeitlicher und quantitativer Unterschiede der stimulusspezifischen Antwort (Berridge et al., 2000). Die Kombination fluoreszierender  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren, die Konzentrationsveränderungen anzeigen, mit fluoreszenzmikroskopischen Verfahren erlaubt eine genaue Analyse dieser Antwortmuster. Ein Caveat ist hier die natürliche räumliche Auflösungsgrenze der Zweiphotonenmikroskopie in Verbindung mit der durch die Puffereigenschaften des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators verbundenen Verlangsamung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals: Die so erfolgte Diffusionsmittelung über Zeit und Volumen unterschätzt lokale, extrem kurzlebige Mikro- und Nanodomänen in der unmittelbaren Nachbarschaft der  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen (Kanäle, etc.) direkt nach der Aktivierung (Demuro und Parker, 2006).

Eine zelluläre Strategie zur Diversifizierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Codes ist die differentielle Verteilung an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligter Proteine in unterschiedlichen neuronalen Kompartimenten (Berridge et al., 2003). Originalarbeit 1 untersucht in diesem Zusammenhang die Einflüsse des differentiellen Verteilungsmusters unterschiedlicher intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auf die durch muscaringerge Acetylcholinrezeptoren hervorgerufenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster in Dendrit und

Soma in Abhängigkeit unterschiedlicher Agonistenkonzentrationen. An einem reduzierten System, der neuronal differenzierten PC12 Zelle, konnten durch Immunzytochemie und Proteinbiochemie jeweils zwei verschiedene Ryanodin- und IP3-Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden. Für den IP3-Rezeptor Typ III konnte eine selektive Expression im Soma nachgewiesen werden. Dieser niederaffine IP3-Rezeptor im Soma verfügt über eine deutlich höhere Aktivierungsschwelle als der ubiquitäre IP3-Rezeptor Typ I (Hagar et al., 1998). Die Verteilung der Kinetiken somatischer Antworten unter Blockade der Ryanodinrezeptoren legt nahe, dass der IP3-Rezeptor Typ III zusammen mit den Ryanodinrezeptoren Typ 2 und 3 ein positives Rückkopplungssystem bildet, das an der Entstehung hochamplitudiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster beteiligt ist. Hörschwelligeren, fundamentalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten könnte allgemein eine größere Bedeutung bei der Aktivierung globaler, die ganze Zelle betreffender Vorgänge zugesprochen werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Rolle des IP3-Rezeptor Typ III für die neuronale Apoptose (Blackshaw et al., 2000). In Dendriten ergaben sich andere Interaktionsmuster zwischen dem IP3-Rezeptor Typ I und den Ryanodinrezeptoren Typ 2 und 3.

Bisher war aus sekretorischen Zellen eine differentielle Verteilung unterschiedlicher Ryanodin- und IP3-Rezeptor Subtypen am apikalen und basalen Zellpol mit Auswirkungen auf die regionalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster bekannt (Hirata et al., 1999; Zhang et al., 1999). In neuronalen Zellen war zu diesem Zeitpunkt primär die differentielle Verteilung von Ionenkanälen auf der Plasmamembran und ihre Auswirkungen auf die neuronale Integrationsleistung beschrieben (Christie et al., 1995). Die stimulusabhängigen Unterschiede der ER-  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster in Dendrit und Soma zeigen, dass auch im intrazellulären Membransystem des ER Signale unterschiedlich integriert werden. Somit wird die 1998 von Berridge formulierte Hypothese, das ER sei ein Neuron im Neuron, gestützt (Berridge, 1998).

Reduzierte Systeme wie die neuronal ausdifferenzierte PC12 Zelle eignen sich, um grundlegende morpho-funktionelle Beziehungen wie den Zusammenhang zwischen lokaler

Kanalexpression und  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster zu analysieren. In Originalarbeit 2 wurden lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster in unterschiedlichen Populationen von dendritischen spines untersucht. Um die funktionelle Rolle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmusters für synaptische Plastizität in unterschiedlichen Mikroschaltkreisen untersuchen zu können, war es nötig, ein komplexeres Präparat zu verwenden: Im akuten Hirnschnittpräparat lassen sich Zellen innerhalb ihres unmittelbaren Funktionszusammenhangs untersuchen. Es ist wichtig zu erwähnen, dass dieser Funktionszusammenhang natürlich nicht der ‚in vivo‘ Situation im lebenden Tier entspricht: Das Gewebe wird künstlich in oxygenierter Nährlosung konserviert und die Präparation führt zur Amputation multipler neuronaler Fortsätze (Axone und Dendriten; (Steriade, 2001). Deshalb gibt es verstärkt den Trend, in vivo dieselben elektrophysiologischen und optischen Verfahren auf Einzelzellebene zu verwenden (Helmchen et al., 1999; Margrie et al., 2002; Svoboda et al., 1997; Waters et al., 2003). Dennoch ermöglicht das akute Schnittpräparat einen Kompromiss zwischen der Konservierung von Zellen in ihrer unmittelbaren strukturellen Umgebung und experimenteller Zugänglichkeit und Stabilität. Insbesondere für die optische Messung von dynamischen Größen in kleinen Strukturen wie z.B. schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmustern in dendritischen spines hat das akute Schnittpräparat Vorteile: Kürzere Strahlengänge im stark streuenden Hirngewebe und eine weitaus höhere mechanische Stabilität verbessern Signalqualität und Auflösung optischer Messungen. Gleichzeitig können elektrophysiologische Ganzzelleitungen länger stabil unter kontrollierten Bedingungen gehalten werden. Außerdem führt die Badapplikation von pharmakologischen Substanzen im akuten Hirnschnitt zu vergleichsweise reproduzierbaren Gewebekonzentrationen und Ein- und Auswaschkinetiken.

Ein in der Literatur bereits beschriebenes Problem war die Schwierigkeit, in sensorischen Synapsen des primär olfaktorischen (piriformen) Cortex nach p19 durch extrazelluläre Stimulation langanhaltende plastische Veränderungen auszulösen. In assoziativen Synapsen hingegen lassen sich langanhaltende plastische Veränderungen auslösen (Franks and Isaacson,

2005; Jung et al., 1990; Poo and Isaacson, 2007). Im primären olfaktorischen Cortex findet sich eine klare Schichtung sensorischer und assoziativer Synapsen am apikalen Dendriten der Schicht 2 Pyramidenzellen (Neville and Haberly, 2004). Somit eignete sich dieses Präparat besonders gut, um Unterschiede im  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster in den spines unterschiedlicher Synapsenpopulationen zu untersuchen. Der Kernbefund eines differentiellen Expressionsmusters des A-Typ  $\text{K}^+$ -Kanals führt zu einer selektiven Unterdrückung der aktionspotentialvermittelten Aufhebung des  $\text{Mg}^{2+}$ -Blocks des NMDA-Rezeptors in distalen sensorischen Synapsen. Hier finden wir also ein Beispiel, wie intrinsische Leitfähigkeiten auf der Plasmamembran des Dendriten über das  $\text{Ca}^{2+}$ -Molekül indirekten Einfluß auf das Plastizitätsverhalten eines synaptischen Mikroschaltkreises haben: Der A-Typ Kaliumkanal wird durch neuronale Depolarisation aktiviert. Resultat ist eine Hyperpolarisation vor allem des distalen Dendriten. Diese Hyperpolarisation verhindert die Weiterleitung der aktionspotentialvermittelten Depolarisation in distale spines. Der NMDA-Rezeptorvermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den spine hängt von den beiden Faktoren präsynaptische Glutamatfreisetzung und postsynaptische Depolarisation ab. Die Höhe und der zeitliche Verlauf dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms determinieren die Ausprägung der Plastizitätsinduktion. Interessanterweise lässt sich der A-Typ Kaliumkanal durch Neuromodulatoren wie Acetylcholin modulieren (Hoffman and Johnston, 1999). Somit haben wir ein funktionelles Beispiel für eine kompartimentspezifische Regulation der Umsetzung von Leitfähigkeitsänderungen an der Plasmamembran in letztendlich biochemische Prozesse wie synaptische Plastizität.

Die im olfaktorischen Cortex und vorher bereits an anderen Synapsen beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Plastizitätsinduktion in dendritischen spines (Nevian and Sakmann, 2006) wirft die Frage nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Plastizitätsinduktion in anderen zellulären Kompartimenten auf. Die prinzipielle Möglichkeit, den plastizitätsregulierenden nukleären Transkriptionsfaktor CREB in Abhängigkeit der Depolarisationsdauer und dem damit verbundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kultivierter Zellen zu phosphorylieren wurde nachgewiesen

(Chawla and Bading, 2001). In der Literatur wurde eine Gen-Dosis Beziehung zwischen Aktionspotentialvermitteltem nukleärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und der Aktivierung plastizitätsrelevanter Transkriptionsfaktoren diskutiert (Hardingham et al., 2001). In Originalarbeit 3 geht es in diesem Zusammenhang um die Frage nach einer Dosisbeziehung zwischen dem durch starke synaptische Aktivierung vermittelten nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der transkriptionsabhängigen Form der Langzeitpotenzierung, der ‚L-LTP‘ (Nguyen et al., 1994). Mithilfe der 2-Photonenmikroskopie konnten in Originalarbeit 3 nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale mit hoher Spezifität und zeitlicher Auflösung von zytoplasmatischen Signalen auf Einzelzellebene differenziert werden. Auch wenn der Zellkern über eigene  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster verfügt, konnte kein Zusammenhang zwischen nukleärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und Effektivität der langen Langzeitpotenzierung (L-LTP) nachgewiesen werden. Bereits in Hinblick auf Originalarbeit 1 wurde auf den Zusammenhang zwischen somatonukleärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und der Apoptose hingewiesen. In Verbindung mit den in Originalarbeit 1 und 3 gewonnenen Erkenntnissen könnte man spekulieren, dass quantitative Unterschiede im somatonukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmuster eher fundamentale zelluläre Prozesse steuern. Diese qualitativ unterschiedlichen Prozesse würden nach dem Alles-oder-Nichts Prinzip kontrolliert, so dass Feinabstufungen einen geringeren Informationsgehalt besitzen. Die in der zweiten Arbeit dargelegten Ergebnisse aus den spines lassen vermuten, dass in diesen subkompartimenten die quantitative Ausprägung qualitativ gleichwertiger Prozesse durch subtilere Unterschiede des  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmusters gesteuert wird.

Das einzelne Neuron (Zielzelle) wird in seiner Funktion auch durch die auf die Zielzelle projizierenden Nervenzellen (Quellzellen) definiert. Die in Originalarbeit 2 und 3 beschriebenen subzellulären Steuerungsmechanismen sind immer auch im Zusammenhang mit der Konnektivitätsmatrix des Einzelneurons zu sehen (Yuste, 2010). Entscheidend für die Funktion eines Neurons ist somit auch die Herkunft des synaptischen Stimulus. Im zweiten

Teil der vorgelegten Arbeit werden optische und elektrophysiologische Verfahren kombiniert, um die Einbettung eines Neurons in lokale Schaltkreise zu untersuchen.

Es gibt verschiedene Ansätze, funktionelle Konnektivität von Nervenzellen zu untersuchen. Grundsätzlich unterscheidet man anatomische, also rein morphologische von funktionellen, also physiologischen Verfahren. Ein Großteil der cortikalen Verbindungskarten basiert auf morphologischen Rekonstruktionen der Dendriten und Axone mit neuronalen Tracern gefärbter Neuronenpopulationen. Dieser Ansatz kann den Unterschied zwischen einer Überkreuzung von Axon und Dendrit und der Ausbildung einer funktionellen synaptischen Verbindung nicht auflösen (Petreanu et al., 2009). Für eine funktionelle Kartierung von Hirnregionen benötigt man somit elektrophysiologische Ableitungen von synaptische Eingänge empfangenden Zielzellen und spezifische Aktivierung der Quellzellen synaptischer Eingänge. Unterschiedliche Verfahren unterscheiden sich dabei vor allem in der Abtastung der Quellzellen. Klassische gepaarte Ableitungen in Verbindung mit morphologischen Rekonstruktionen z.B.(Feldmeyer et al., 2005) erlauben die detaillierte Analyse synaptischer Eigenschaften wie quantale Amplitude und Freisetzungswahrscheinlichkeit in Verbindung mit zelltypspezifischer Morphologie und genauer Lokalisation. Limitiert wird diese Methode durch teilweise niedrige Verbindungswahrscheinlichkeit in Verbindung mit den technischen Herausforderungen von Einzelzelleableitungen. In der Summe bedingen diese Faktoren, dass pro Zielzelle immer nur eine kleine Zahl von spezifischen Quellzellen abgetastet werden kann. Hier liegt ein Vorteil der in Originalarbeit 4,5 und 6 implementierten und verwendeten scanning-photostimulation: Gerade durch die in Originalarbeit 4 beschriebene Zwei-Objektivmethode lassen sich große Hirnareale mit hoher räumlicher Auflösung abrastern. Die in Originalarbeit 4 und 6 beschriebenen Kalibrationsverfahren belegen hinreichende Genauigkeit der räumlichen Auflösung. Somit kann also für eine Zielzelle ein großes Areal mit einer Vielzahl von Quellzellen abgerastert werden. Zwar können anhand der postsynaptischen Antwort inhibitorische und exzitatorische Eingänge unterschieden werden. Wenn sich

unterschiedliche inhibitorische oder exzitatorische Neuronentypen jedoch räumlich überlagern, sind Rückschlüsse auf den Quellzelltyp nicht möglich (Callaway, 2002). Da bei der scanning photostimulation nicht von den Quellzellen abgeleitet wird, ist es ferner nicht möglich, Aussagen über quantale Amplitude oder Freisetzungswahrscheinlichkeit der kartierten Synapsen zu treffen.

Die bereits in der Diskussion zu Originalarbeit 2 erwähnte Amputationsproblematik neuronaler Fortsätze im akuten Hirnschnitt gelten natürlich sowohl für Paarableitungen als auch für den ‚scanning photostimulation‘ Ansatz. Beide Methoden lassen somit nur Rückschlüsse auf lokale und von der gewählten Schnittebene nicht betroffene Verbindungen zu (Petreanu et al., 2009).

In der neueren Literatur finden sich 2 Verfahren, die diese Problematik lösen. 1. Mithilfe optogenetischer Verfahren ist es möglich, den lichtaktivierten depolarisierenden Ionenkanal Channelrhodopsin gezielt in definierten Zellpopulationen zu exprimieren. Axone dieser Zellen sind auch ohne Verbindung zum Quellzellsoma erregbar. Somit lassen sich hier quellzellspezifisch synaptische Eingänge im Hirnschnitt umfassend in allen Entfernungen charakterisieren (Petreanu et al., 2009). 2. Kürzlich ist es der Gruppe von Callaway gelungen, Einzelzellen mit einem Rabiesvirus zu infizieren, der die auf eine spezifisch markierte Zielzelle projizierenden Quellzellen ebenfalls eindeutig markiert. Die Rabiesvermittelte Expression fluoreszierender Proteine erlaubt eine detaillierte morphologische Charakterisierung der Quellzellen (Marshall et al., 2010; Miyamichi et al., 2010).

Somit beschränkt sich die in Originalarbeit 4 und 5 entwickelte methodische Variante der scanning photostimulation auf die Charakterisierung lokaler Schaltkreise. In Originalarbeit 6 wurde der Ansatz gewählt, tiefe Eingänge auf 3 verschiedene oberflächliche Zelltypen zu vergleichen. Unter der grundlegenden Annahme, dass alle 3 Zelltypen durch die Amputation lokaler Axone gleich betroffen sind, konnte so die zielzellspezifische Organisation lokaler Schaltkreise im medialen Entorhinalen Cortex beschrieben werden. Im Vergleich zu mit ähnlichen Verfahren intensiv charakterisierten primär sensorischen Hirnarealen wie dem

primär visuellen (Dantzker and Callaway, 2000) oder somatosensorischen Cortex (Schubert et al., 2003; Shepherd et al., 2003) konnten so neue Organisationsprinzipien lokaler Schaltkreise offengelegt werden.

Eine der zukünftigen Herausforderungen in den Neurowissenschaften ist der Erforschung des Konnektoms (connectome). Endziel ist in diesem Zusammenhang die umfassende Erforschung kompletter Konnektome einer Hirnregion, eine aufgrund der anfallenden Datenmengen (verschiedene Neuronentypen, Axonlänge, Neuropildichte) momentan nicht zu realisierende Aufgabe. Realistischer erscheint in diesem Zusammenhang Analyse ‚partieller Konnektome‘ (partial connectomes), wie z.B. einer kortikalen Kolumne (Lichtman et al., 2008). Originalarbeit 6 liefert erste Ansätze für ein partielles Konnektom der oberflächlichen Schichten des MEC. Dies ist besonders pathophysiologisch interessant. Neuronale Entwicklungsstörungen wie z.B. Autismus, die von Sanes und Lichtman als ‚Konnektopathien‘(connectopathies) beschrieben werden (Lichtman et al., 2008), manifestieren sich histopathologisch im entorhinalen Kortex (Baumann und Kemper, 2005). Hier könnten Unterschiede in den lokalen Schaltkreisen betroffener Zelltypen wertvolle Informationen über die Pathogenese liefern.



## 5. Zusammenfassung

Jede funktionelle Untersuchung des Gehirns wird durch die Organisationsebene definiert, auf der sie stattfindet. Ziel dieser Arbeit ist es aufzuzeigen, wie die Kombination optischer und elektrophysiologischer Methoden mit Fokus auf das einzelne Neuron genutzt werden kann, um grundlegende Struktur-Funktionsbeziehungen im Sinne einer funktionellen Anatomie zu erforschen.

Im ersten Teil wurden subzelluläre Mechanismen und funktionelle Implikationen des neuronalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortmusters untersucht. Originalarbeit 1 untersucht die kompartiment-spezifische Expression der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle Inositol-Trisphosphat (IP3) -Rezeptor Typ I und III sowie deren unterschiedliche Interaktion mit dem Ryanodinrezeptor in den Kompartimenten Dendrit und Soma. Die erhöhte Ansprechbarkeit dendritischer IP3-Rezeptoren auf niedrigdosierte muscarinerge Stimulation impliziert Unterschiede zwischen dendritischen und somatischen IP3-Rezeptoren. Die Arbeit beschreibt in diesem Zusammenhang differentielle Verteilungsmuster der IP3-Rezeptortypen I und III sowie des den IP3-Rezeptor aktivierenden Proteins Chromogranin B. Originalarbeit 2 untersucht Unterschiede des  $\text{Ca}^{2+}$  Signals in dendritischen Dornen (spines) bei der Induktion von Langzeitplastizität (long-term-potential LTP) in proximalen assoziativen und distalen sensorischen spines im primär olfaktorischen Cortex. Rückläufige Aktionspotentiale depolarisieren den Dendriten und reduzieren so den  $\text{Mg}^{2+}$ -vermittelten Block des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) -Rezeptors. Eine stärkere Lokalisierung der A-Typ Kaliumkanäle (Kv 4.2 und 4.3) im distalen Dendriten wird nachgewiesen. Demzufolge beobachten wir eine reduzierte NMDA-Rezeptoraktivierung durch rückläufige Aktionspotentiale bei der LTP-Induktion in distalen sensorischen Synapsen. Der damit verbundene reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom ist ursächlich an der erschwerten LTP-Induktion beteiligt. Das in Originalarbeit 3 analysierte nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$  Signal spielt eine Rolle bei der Informationsübertragung von der Synapse zum Nukleus. Untersuchungsgegenstand ist der Zusammenhang zwischen der Größe des nukleären  $\text{Ca}^{2+}$

Signals und der Effektivität der ‘langen’ transkriptionsabhängigen Langzeitpotenzierung (L-LTP). Nukleäre  $Ca^{2+}$  Transienten während der LTP Induktion wurden mit Hilfe der Zweiphotonenmikroskopie mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung gemessen. Es wurden keine statistisch relevanten Unterschiede des Induktionssignals zwischen Zellen, die langfristig oder kurzfristig potenziert wurden, festgestellt.

Im zweiten Teil wurden optische und elektrophysiologische Verfahren kombiniert, um die Einbettung eines Neurons in lokale Schaltkreise zu untersuchen. Um die Herkunft des synaptischen Stimulus auf eine Zielzelle zu definieren, benötigt man Informationen über die Lokalisierung der Quellzelle. Originalarbeit 4 beschreibt die Entwicklung eines zu diesem Zweck entwickelten ‘scanning photostimulation’ Systems. Das System ermöglicht, auf großen Übersichtsbildern durch punktgenaues Verfahren des Mikroskops großflächige Kartierungen der auf eine Zielzelle projizierenden Quellzellen vorzunehmen. Die durch Mikromanipulatoren und Präparat vorgegebenen räumlichen Koordinaten werden mit den virtuellen Navigationspunkten auf einem Übersichtsbild abgeglichen. So ist es möglich, die hochauflösende, punktspezifische Aktivierung einzelner Zellen durch UV-Licht in großflächigen Schnittpräparaten durchzuführen. Grundproblem bei der scanning photostimulation ist die Unterscheidung von spontaner Hintergrundaktivität und spezifischer photoinduzierter synaptischer Aktivität. Gerade für eine epileptogene Struktur wie den in Originalarbeit 6 untersuchten medialen entorhinalen Cortex war es nötig, das Signal-Rauschverhältnis weiter zu verbessern. In Originalarbeit 5 wird ein Algorithmus eingeführt, der es auch in Präparationen mit hoher Hintergrundaktivität ermöglicht, aufgrund der räumlichen Korrelation von synaptischen Inputs mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifische photoinduzierte Signale von der Hintergrundaktivität zu trennen und so Quellzellen präziser zu lokalisieren. In Originalarbeit 6 werden zelltypspezifische Organisationsmuster lokaler Schaltkreise oberflächlicher erregender Neuronenpopulationen (Sternzellen, Schicht 2 Pyramidenzellen, Schicht 3 Pyramidenzellen) im medialen entorhinalen Cortex untersucht.

Von besonderer Bedeutung in dieser Arbeit ist die Organisation der synaptischen Eingänge aus den tiefen Schichten fünf und sechs. Untersuchte Parameter sind das zelltypspezifische Verhältnis oberflächlicher und tiefer Eingänge, die räumliche Ausdehnung tiefer Eingänge und die Symmetrie entlang der medialen/lateralen Achse.

## 6. Literaturverzeichnis

- Bauman, M.L., and Kemper, T.L. (2005). Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 23, 183-187.
- Beed, P., Bendels, M.H., Wiegand, H.F., Leibold, C., Jochenning, F.W., and Schmitz, D. (2010). Analysis of excitatory microcircuitry in the medial entorhinal cortex reveals cell-type-specific differences. *Neuron* 68, 1059-1066.
- Bendels, M.H., Beed, P., Leibold, C., Schmitz, D., and Jochenning, F.W. (2008). A novel control software that improves the experimental workflow of scanning photostimulation experiments. *J Neurosci Methods* 175, 44-57.
- Bendels, M.H., Beed, P., Schmitz, D., Jochenning, F.W., and Leibold, C. (2010). Detection of input sites in scanning photostimulation data based on spatial correlations. *J Neurosci Methods* 192, 286-295.
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13-26.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Blackshaw, S., Sawa, A., Sharp, A.H., Ross, C.A., Snyder, S.H., and Khan, A.A. (2000). Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death. *Faseb J* 14, 1375-1379.
- Bloodgood, B.L., and Sabatini, B.L. (2007). Ca<sup>2+</sup> signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 17, 345-351.
- Cajal, R.Y. (1906). The structure and connexions of neurons. In *Nobel Lectures: Physiology of Medicine (1901-1921)* (Amsterdam: Elsevier), pp. 220-253.
- Callaway, E.M. (2002). Cell type specificity of local cortical connections. *J Neurocytol* 31, 231-237.

Callaway, E.M., and Katz, L.C. (1993). Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7661-7665.

Canto, C.B., Wouterlood, F.G., and Witter, M.P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* 2008, 381243.

Chawla, S., and Bading, H. (2001). CREB/CBP and SRE-interacting transcriptional regulators are fast on-off switches: duration of calcium transients specifies the magnitude of transcriptional responses. *J Neurochem* 79, 849-858.

Christie, B.R., Eliot, L.S., Ito, K., Miyakawa, H., and Johnston, D. (1995). Different Ca<sup>2+</sup> channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca<sup>2+</sup> influx. *J Neurophysiol* 73, 2553-2557.

Dantzker, J.L., and Callaway, E.M. (2000). Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 3, 701-707.

Deisseroth, K., Mermelstein, P.G., Xia, H., and Tsien, R.W. (2003). Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 13, 354-365.

Demuro, A., and Parker, I. (2006). Imaging single-channel calcium microdomains. *Cell Calcium* 40, 413-422.

Feldmeyer, D., Roth, A., and Sakmann, B. (2005). Monosynaptic connections between pairs of spiny stellate cells in layer 4 and pyramidal cells in layer 5A indicate that lemniscal and paralemniscal afferent pathways converge in the infragranular somatosensory cortex. *J Neurosci* 25, 3423-3431.

Franks, K.M., and Isaacson, J.S. (2005). Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron* 47, 101-114.

Frey, U., Frey, S., Schollmeier, F., and Krug, M. (1996). Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. *J Physiol* 490 ( Pt 3), 703-711.

Frey, U., Krug, M., Brodemann, R., Reymann, K., and Matthies, H. (1989). Long-term potentiation induced in dendrites separated from rat's CA1 pyramidal somata does not establish a late phase. *Neurosci Lett* 97, 135-139.

Ghosh, A., and Greenberg, M.E. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268, 239-247.

Gomez, T.M., and Spitzer, N.C. (2000). Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J Neurobiol* 44, 174-183.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.

Hagar, R.E., Burgstahler, A.D., Nathanson, M.H., and Ehrlich, B.E. (1998). Type III InsP<sub>3</sub> receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature* 396, 81-84.

Hardingham, G.E., Arnold, F.J., and Bading, H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4, 261-267.

Hardingham, G.E., and Bading, H. (1998). Nuclear calcium: a key regulator of gene expression. *Biometals* 11, 345-358.

Helmchen, F., Svoboda, K., Denk, W., and Tank, D.W. (1999). In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2, 989-996.

Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*, second edition edn (Sunderland, MA: Sinauer Associates).

Hirata, K., Nathanson, M.H., Burgstahler, A.D., Okazaki, K., Mattei, E., and Sears, M.L. (1999). Relationship between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and subcellular Ca<sup>2+</sup> signaling patterns in nonpigmented ciliary epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2046-2053.

Hoffman, D.A., and Johnston, D. (1999). Neuromodulation of dendritic action potentials. *J Neurophysiol* 81, 408-411.

Impey, S., Mark, M., Villacres, E.C., Poser, S., Chavkin, C., and Storm, D.R. (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16, 973-982.

Johanning, F.W., Beed, P.S., Trimbuch, T., Bendels, M.H., Winterer, J., and Schmitz, D. (2009). Dendritic compartment and neuronal output mode determine pathway-specific long-term potentiation in the piriform cortex. *J Neurosci* 29, 13649-13661.

Johanning, F.W., and Holthoff, K. (2007). Nuclear calcium signals during L-LTP induction do not predict the degree of synaptic potentiation. *Cell Calcium* 41, 271-283.

Johanning, F.W., Zochowski, M., Conway, S.J., Holmes, A.B., Koulen, P., and Ehrlich, B.E. (2002). Distinct intracellular calcium transients in neurites and somata integrate neuronal signals. *J Neurosci* 22, 5344-5353.

Jung, M.W., Larson, J., and Lynch, G. (1990). Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro. *Synapse* 6, 279-283.

Kampa, B.M., Clements, J., Jonas, P., and Stuart, G.J. (2004). Kinetics of Mg<sup>2+</sup> unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *J Physiol* 556, 337-345.

Kesslak, J.P., Cotman, C.W., Chui, H.C., Van den Noort, S., Fang, H., Pfeffer, R., and Lynch, G. (1988). Olfactory tests as possible probes for detecting and monitoring Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 9, 399-403.

Lichtman, J.W., Livet, J., and Sanes, J.R. (2008). A technicolour approach to the connectome. *Nat Rev Neurosci* 9, 417-422.

Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.

Margrie, T.W., Brecht, M., and Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflugers Arch* 444, 491-498.

Marshel, J.H., Mori, T., Nielsen, K.J., and Callaway, E.M. (2010). Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron* 67, 562-574.

McIntyre, D.C., and Gilby, K.L. (2008). Mapping seizure pathways in the temporal lobe. *Epilepsia* 49 Suppl 3, 23-30.

Miyamichi, K., Amat, F., Moussavi, F., Wang, C., Wickersham, I., Wall, N.R., Taniguchi, H., Tasic, B., Huang, Z.J., He, Z., *et al.* (2010). Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature*.

Nevian, T., and Sakmann, B. (2004). Single spine Ca<sup>2+</sup> signals evoked by coincident EPSPs and backpropagating action potentials in spiny stellate cells of layer 4 in the juvenile rat somatosensory barrel cortex. *J Neurosci* 24, 1689-1699.

Nevian, T., and Sakmann, B. (2006). Spine Ca<sup>2+</sup> signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci* 26, 11001-11013.

Neville, K.R., and Haberly, L.B. (2004). Olfactory cortex. In *The synaptic organization of the brain*, G.M. Shepherd, ed. (New York: Oxford UP), pp. 415-454.

Nguyen, P.V., Abel, T., and Kandel, E.R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265, 1104-1107.

Oviedo, H.V., Bureau, I., Svoboda, K., and Zador, A.M. (2010). The functional asymmetry of auditory cortex is reflected in the organization of local cortical circuits. *Nat Neurosci* 13, 1413-1420.

Petreaanu, L., Mao, T., Sternson, S.M., and Svoboda, K. (2009). The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 457, 1142-1145.

Poo, C., and Isaacson, J.S. (2007). An early critical period for long-term plasticity and structural modification of sensory synapses in olfactory cortex. *J Neurosci* 27, 7553-7558.

Rudy, B., Hoyer, J.H., Lester, H.A., and Davidson, N. (1988). At least two mRNA species contribute to the properties of rat brain A-type potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 1, 649-658.



Schubert, D., Kotter, R., Zilles, K., Luhmann, H.J., and Staiger, J.F. (2003). Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. *J Neurosci* 23, 2961-2970.

Shepherd, G.M. (2004). Introduction to synaptic circuits. In *The Synaptic Organization of the Brain*, G.M. Shepherd, ed. (Oxford University Press, Inc.), pp. 6-8.

Shepherd, G.M., Pologruto, T.A., and Svoboda, K. (2003). Circuit analysis of experience-dependent plasticity in the developing rat barrel cortex. *Neuron* 38, 277-289.

Shepherd, G.M., and Svoboda, K. (2005). Laminar and columnar organization of ascending excitatory projections to layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex. *J Neurosci* 25, 5670-5679.

Sherrington, C.S. (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*, 2nd edn (New Haven, CT: Yale University Press).

Sjostrom, P.J., and Nelson, S.B. (2002). Spike timing, calcium signals and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 12, 305-314.

Sjostrom, P.J., Rancz, E.A., Roth, A., and Hausser, M. (2008). Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 88, 769-840.

Steriade, M. (2001). *The Intact and Sliced Brain* (Cambridge, MA, USA: MIT Press).

Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., and Tank, D.W. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385, 161-165.

Svoboda, K., and Yasuda, R. (2006). Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50, 823-839.

Waters, J., Larkum, M., Sakmann, B., and Helmchen, F. (2003). Supralinear Ca<sup>2+</sup> influx into dendritic tufts of layer 2/3 neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23, 8558-8567.

Witter, M.P., and Amaral, D.G. (2004). Hippocampal formation. In *The rat nervous system*, G. Paxinos, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 637-703.

Yuste, R. (2010). *Dendritic Spines*, 1st edition edn (Cambridge, MA: MIT Press).

Yuste, R., Konnerth, A., and Masters, B.R. (2006). Imaging in neuroscience and development, a laboratory manual. *J Biomed Opt* 11, 19902.

Zhang, X., Wen, J., Bidasee, K.R., Besch, H.R., Jr., Wojcikiewicz, R.J., Lee, B., and Rubin, R.P. (1999). Ryanodine and inositol trisphosphate receptors are differentially distributed and expressed in rat parotid gland. *Biochem J* 340, 519-527.

Zucker, R.S. (1993). Calcium and transmitter release. *J Physiol Paris* 87, 25-36.

## **7. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dietmar Schmitz aus dem NWFZ danken. Die von Ihm geschaffenen Arbeitsbedingungen, sein Vertrauen, seine Begeisterungsfähigkeit und seine Kreativität haben meinen wissenschaftlichen Werdegang entscheidend mitgeprägt. Desweiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern seines Labors für die hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit und das großartige Arbeitsklima.

Dr. Andreas Winkelmann und den Kollegen aus der Anatomie möchte ich für die Unterstützung bei der anatomischen Lehre bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Arthur Konnerth vom Institut für Neurowissenschaften der TU München und den und allen Mitarbeitern seines Labors. Insbesondere möchte ich hier Prof. Knut Holthoff erwähnen und ihm noch einmal für Zusammenarbeit und Ausbildung danken.

Auch Prof. Barbara Ehrlich von der Yale University School of Medicine und meinen damaligen Kollegen möchte ich besonders für die großartige Zeit in ihrem Labor in Yale und die Sommer am Mbl in Woods Hole danken.

Mein Dank gilt auch allen Kooperationspartnern, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Der größte Dank gilt meiner Frau und unserer Familie, ohne die alles nichts wäre.

## 8. Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

---

(Datum)

---

(Unterschrift)