

Aus der Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optogenetisch induzierte funktionelle Hyperämie als Modell der
neurovaskulären Kopplung *in vivo*

*Optogenetically induced functional hyperemia as a model of
neurovascular coupling in vivo*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Carl Böhm

Datum der Promotion: 30. November 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	4
2	Abstract (Deutsch)	5
3	Abstract (English)	6
4	Einleitung	7
4.1	Mechanismen und Relevanz der neurovaskulären Kopplung	7
4.2	Aktuell verwendete Modelle zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung..	10
4.3	Ziel dieser Arbeit: Ein neuartiges Modell zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung <i>in vivo</i>	11
5	Methoden	13
5.1	Experimentelle Tiere und chirurgische Vorbereitung	13
5.2	Überwachung der systemischen physiologischen Parameter	14
5.3	Lichtstimulation	15
5.4	Bildgebung des kortikalen Blutflusses	16
5.5	Evozierte Potenziale	18
5.6	Statistische Auswertung	19
6	Ergebnisse	20
6.1	Einfluss von Stimulation mit Licht auf den kortikalen zerebralen Blutfluss in Thy1-ChR2-YFP-Mäusen	20
6.2	Durch Lichtstimulation evozierte Potenziale	23
6.3	Interhemisphärische Inhibition von somatosensibel evozierten Potenzialen durch optogenetisch evozierte Potenziale	25
6.4	Neurovaskuläre Entkopplung durch kortikale Streudepolarisierung	25
6.5	Einfluss von Lichtstimulation auf die Temperatur kortikalen Gewebes	26
6.6	Einfluss von weißem Licht auf den zerebralen Blutfluss in Ruhe	27
7	Diskussion	27
7.1	Mechanistische Überlegungen zur Funktionsweise des Modells	28
7.2	Reproduktion bekannter kortikaler Konnektivität	29
7.3	Neurovaskuläre Entkopplung im optogenetischen Modell	30
7.4	Stärken und Limitationen des Modells	30
7.5	Ausblick auf weitere Forschung und klinische Relevanz	32
8	Literaturverzeichnis	34
	Eidesstattliche Versicherung	39
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	40
	Auszug aus der Journal Summary List	41
	Publikation	42
	Lebenslauf	63
	Publikationsliste	65
	Danksagung	66

1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 (eigene Darstellung): Geräte und Software	13
Abbildung 1 (eigene Darstellung): Aufsicht auf die Schädelkalotte nach chirurgischer Präparation	14
Abbildung 2 (modifiziert nach Böhm et al. ³⁶): Zeitstrahl des experimentellen Protokolls	16
Abbildung 3 (modifiziert nach Böhm et al. ³⁶): Definierte kortikale Regionen	18
Abbildung 4 (modifiziert nach Böhm et al. ³⁶ durch Ergänzung eigener Abbildungen): Repräsentative Laser-Speckle-Bilder	20
Abbildung 5 (modifiziert nach Böhm et al. ³⁶ durch Ergänzung eigener Abbildungen): Zeitliche Verläufe der Veränderung des zerebralen Blutflusses	22
Abbildung 6 (modifiziert nach Böhm et al. ³⁶ durch Ergänzung eigener Abbildungen): Abwesenheit von durch Lichtstimulation induzierten Veränderungen des zerebralen Blutflusses in Wildtypmäusen	23

2 Abstract (Deutsch)

Neurovaskuläre Kopplung beschreibt die enge Verbindung zwischen neuraler Aktivität und zerebralem Blutfluss. Unter physiologischen Bedingungen gewährleistet diese Verbindung eine der Aktivität des jeweiligen Gewebes angepasste Blutversorgung. In zahlreichen neurovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen konnte eine abnorme neurovaskuläre Kopplung nachgewiesen werden, die einen potentiellen Zielmechanismus für eine therapeutische Intervention darstellt. Valide experimentelle *in vivo* Modelle zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung sind somit essentiell. Herkömmliche Modelle haben Nachteile wie die Notwendigkeit einer Kraniotomie oder die Anwendung einer peripheren Stimulation zur Aktivierung des Kortex über subkortikale Bahnen. Dies ist ein Störfaktor, falls die zu untersuchende Pathologie auch subkortikale Zentren beeinflusst. In dieser Studie verwendeten wir optogenetische Stimulation zur direkten Aktivierung des Barrel-Kortex in Thy1-Channelrhodopsin-2-YFP-transgenen Mäusen und quantifizierten die lokalen und räumlich entfernten Veränderungen des kortikalen Blutflusses mittels Laser Speckle Flowmetry. Wir fanden eine von Intensität und Frequenz des Lichtstimulus abhängige Hyperämie im stimulierten Barrel-Kortex und im ipsilateralen Motorkortex. Der kontralaterale Barrel-Kortex zeigte eine oligäme Antwort, die elektrophysiologisch mit interhemisphärischer Inhibition korrelierte. Kortikale Streudepolarisierungen, welche bekannterweise die physiologische neurovaskuläre Kopplung unterbrechen, führten in unserem Modell zu einer anhaltenden Halbierung der optogenetisch induzierten Hyperämie. Zusammenfassend zeigen unsere Daten deutliche Überschneidungen der optogenetisch induzierten funktionellen Hyperämie mit der physiologischen neurovaskulären Kopplung und reflektieren bekannte kortikale Konnektivität. Diese Ergebnisse begründen den Einsatz unseres *in vivo* Modells zur minimal-invasiven Untersuchung von neurovaskulärer Kopplung in neurovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen.

3 Abstract (English)

Neurovascular coupling describes the close connection between neural activity and cerebral blood flow. Under physiological conditions, this connection ensures a match of supply and demand between blood flow and tissue. Abnormal neurovascular coupling has been demonstrated in several neurovascular and neurodegenerative diseases, representing a potential target mechanism for therapeutic intervention. Therefore, valid experimental *in vivo* models to study neurovascular coupling are essential. Conventional models have limitations, such as the need for craniotomy or the use of peripheral stimulation to activate the cortex via subcortical pathways. This is a confounding factor if the pathology studied in the model also affects subcortical centers. In this study, we used optogenetic stimulation to directly activate the barrel cortex in Thy1-channelrhodopsin-2-YFP transgenic mice and imaged local and distant changes in cortical blood flow using laser speckle flowmetry. We found hyperemia in the stimulated barrel cortex and the ipsilateral motor cortex, dependent on intensity and frequency of the light stimulus. The contralateral barrel cortex showed an oligemic response that correlated electrophysiologically with interhemispheric inhibition. Cortical spreading depression, which is known to disrupt physiological neurovascular coupling, resulted in a sustained decrease of optogenetically induced hyperemia in our model. In summary, our data show a clear overlap of optogenetically induced functional hyperemia with physiological neurovascular coupling and reflect known cortical connectivity. These results establish the use of our *in vivo* model for minimally invasive investigation of neurovascular coupling in models of neurovascular and neurodegenerative diseases.

4 Einleitung

4.1 Mechanismen und Relevanz der neurovaskulären Kopplung

Das Gehirn ist trotz seiner für den Körper lebenswichtigen Funktionen, deren Ausführung eines hohen Energiekonsums bedarf, nicht in der Lage, essentielle Metabolite des Energiestoffwechsels zu speichern. Deswegen ist es auf eine konstante Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch den Blutkreislauf angewiesen. Der Bedarf an Substraten des Energiestoffwechsels ist dynamisch und variiert erheblich, abhängig von Gehirnregion und Stoffwechselaktivität des Gewebes. Um zu gewährleisten, dass genau die richtige Menge nährstoffreichen Blutes zur richtigen Zeit und am richtigen Ort ankommt, müssen die energieverbrauchenden Gehirnzellen und die sie versorgenden Blutgefäße miteinander kommunizieren.

Durch den Begriff neurovaskuläre Kopplung wird die enge Verbindung zwischen neuraler Aktivität und zerebralem Blutfluss beschrieben.¹

Unter physiologischen Bedingungen reagiert die neurovaskuläre Kopplung auf eine Erhöhung der neuralen Aktivität mit einem Anstieg des lokalen zerebralen Blutflusses.¹

Bei zahlreichen Pathologien mit Affektion des zentralen Nervensystems, wie zum Beispiel ischämischer Hirninfarkt, Morbus Alzheimer oder arterielle Hypertension, ist diese physiologische Antwort jedoch verringert oder vollkommen unterbrochen. Dies führt zu funktionellen und strukturellen Schäden des unterversorgten Gewebes.^{2, 3}

Anders als bei einer einfachen Abschwächung oder Unterbrechung der neurovaskulären Kopplung, konnte in einem Modell der Subarachnoidalblutung gar eine inverse neurovaskuläre Kopplung nachgewiesen werden, bei der die neurale Aktivierung paradoxerweise zu einer Vasokonstriktion führt.⁴ Aufgrund ihrer Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen stellt die veränderte neurovaskuläre Kopplung einen möglichen Zielmechanismus einer therapeutischen Intervention dar.

Darüber hinaus ist die Verbindung von Gehirnzellen und Blutgefäßen in der Neurowissenschaft von Bedeutung, da sie als ein Werkzeug zur Untersuchung und Kartierung von Hirnaktivität verwendet wird. Dies ist möglich, da die durch die erhöhte neurale Aktivität hervorgerufene Hyperämie normalerweise örtlich und zeitlich auf das aktivierte Areal begrenzt ist.^{5, 6}

In der Erforschung der Frage, durch welche Mechanismen neurale Aktivität den lokalen zerebralen Blutfluss steuert, wird eine Vielzahl von möglichen Mediatoren und

Signalwegen diskutiert. Es ist bekannt, dass sowohl Neurone als auch Astrozyten die neurovaskuläre Kopplung durch vasodilatative Substanzen, die auf die glatten Muskelzellen von Arteriolen wirken, beeinflussen. Dazu zählen unter anderem Glutamat, Stickstoffmonoxid sowie Prostaglandine.^{1, 7, 8, 9}

Funktionell lassen sich die diskutierten oder bereits identifizierten Mechanismen in zwei verschiedene Konzepte einteilen: das „Feedback“- und „Feedforward“-Modell.¹⁰ Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die hyperäme Antwort lediglich durch einen Verbrauch von Substraten des Energiestoffwechsels und die daraus entstehenden Abfallprodukte, wie Kohlenstoffdioxid, Laktat und Adenosin, gesteuert würde. In einem Metabolismus-abhängigen Feedback-Mechanismus initiieren diese Vasodilatoren eine vaskuläre Antwort, um toxische Metabolite zu eliminieren und die Sauerstoffzufuhr zu erhöhen.^{11, 12} Im Einklang mit dieser Theorie steht die Beobachtung, dass es zeitgleich mit einer Zunahme neuraler Aktivität zu einem Abfall von Sauerstoff und einem Anstieg von Laktat kommt, während die lokale Hyperämie zeitverzögert einsetzt.¹¹

Mittlerweile wird angenommen, dass Feedback-Mechanismen nicht die alleinigen Akteure der neurovaskulären Kopplung sind. Neuere Studien legen die Grundlage für die Theorie eines „Feedforward“-Modells, in dem Mediatoren der neurovaskulären Kopplung unabhängig vom metabolischen Zustand des Gewebes eine Hyperämie auslösen.¹⁰ Diese Theorie wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Steigerung des lokalen zerebralen Blutflusses disproportional größer zum lokalen Sauerstoffbedarf des Gewebes ist und somit mehr Sauerstoff als benötigt durch die Blutbahn geliefert wird.¹³ Darüber hinaus können Steigerungen des lokalen zerebralen Blutflusses gemessen werden, selbst wenn ein Überangebot an Sauerstoff und Glucose besteht.¹⁴ Diese Beobachtung steht in direktem Gegensatz zur Feedback-Theorie, nach welcher der Verbrauch dieser Energiesubstrate eine Metabolismus-abhängige hyperäme Antwort steuert. Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde die Hypothese entwickelt, dass Feedforward-Signalwege eine Hyperämie, durch die Freisetzung von auf den Gefäßtonus wirkenden Nebenprodukten synaptischer Aktivität, wie Kalium und Stickstoffmonoxid, bewirken.^{14, 15}

Letztendlich schließen sich die beiden Modelle wohl nicht gegenseitig aus, und es ist wahrscheinlich, dass sowohl Metabolismus-abhängige als auch –unabhängige Mechanismen an der Steuerung der neurovaskulären Kopplung beteiligt sind.¹⁰

Eine stützende Beobachtung für die Vereinbarkeit der beiden scheinbar gegensätzlichen Theorien ist der typische Verlauf einer hyperämen Antwort auf

kontinuierliche neurale Stimulation, bei der der lokale zerebrale Blutfluss kurz nach Beginn der Stimulation sein Maximum erreicht und im Verlauf auf ein niedrigeres Niveau adjustiert.^{11, 16} Denkbar ist also ein Modell, bei dem es zunächst zu einer durch Feedforward-Mechanismen vermittelten überschießenden hyperämen Reaktion kommt, die später durch Feedback-Mechanismen angepasst wird, um sich dem tatsächlichen Sauerstoff- und Nährstoffbedarf des Gewebes anzunähern. Somit könnten die bisher identifizierten Metabolismus-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen nicht im Gegensatz zueinander stehen, sondern beide in unterschiedlichem Maße, abhängig vom Zeitpunkt während der hyperämen Reaktion und vom Gewebetyp, an der neurovaskulären Kopplung beteiligt sein.¹⁰

Neben dem vergleichsweise gut untersuchten Einfluss der neuralen Aktivität auf den zerebralen Blutfluss, gibt es Hinweise darauf, dass auch eine umgekehrte Manipulation stattfinden kann, bei der der zerebrale Blutfluss die neurale Aktivität bestimmt. Kim et al. konnten demonstrieren, dass eine Steigerung des intravaskulären Drucks in parenchymalen Arteriolen zu einer erhöhten Aktivität von kortikalen Neuronen führt, und umgekehrt eine Abnahme des intravaskulären Drucks die neuronale Aktivität verringert. Diese Gefäß-Neuron-Verbindung wird durch mechanosensitive Ionenkanäle vom TRPV4-Typ (*transient receptor potential vanilloid receptor type 4*) vermittelt.¹⁷ Diese Erkenntnisse legen nahe, dass eine umgekehrte Kommunikation von Blutgefäßen zu Nervenzellen stattfindet und die neurovaskuläre Kopplung nicht als unidirektionaler Mechanismus zu verstehen ist.

Zusammenfassend kann die neurovaskuläre Kopplung als bidirektionaler Kommunikationsmechanismus, bestehend aus Feedback- und Feedforward-Signalwegen, zwischen Blutgefäßen und Zellen des zentralen Nervensystems verstanden werden. Ziel dieser Verbindung ist die Aufrechterhaltung einer Homöostase von Energiebedarf und -verfügbarkeit. Einige molekulare Signalwege der neurovaskulären Kopplung sind bereits bekannt; weitere sind Gegenstand aktueller Forschung. Eine veränderte neurovaskuläre Kopplung spielt eine Rolle in der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems und ist deswegen ein potentiell Ziel einer therapeutischen Intervention. Darüber hinaus ist die Verbindung zwischen neuraler Aktivität und Blutfluss zur indirekten Detektion und Quantifizierung von Hirnaktivität in der Neurowissenschaft von großer Bedeutung.

4.2 Aktuell verwendete Modelle zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung

Traditionelle Modelle zur Untersuchung neurovaskulärer Kopplung basieren auf der peripheren, in der Regel somatosensiblen, Stimulation zur Aktivierung von Gehirnzellen und Auslösung einer vaskulären Antwort.^{18, 19, 20} Die durch die neurale Aktivierung ausgelösten Veränderungen des lokalen Blutflusses können durch verschiedene Methoden detektiert und quantifiziert werden.

Sowohl in tierexperimentellen Studien als auch in Studien mit Menschen kommt der BOLD-Kontrast (aus dem Englischen: *blood oxygenation level dependant*), bei dem das Bildsignal vom Sauerstoffgehalt der Erythrozyten abhängig ist, in der funktionellen Magnetresonanztomographie zur Anwendung. Hierbei kann eine räumliche Auflösung von 1-2 mm und eine zeitliche Auflösung von etwa 1 Sekunde erreicht werden.²¹

Eine weitere nicht invasive Technik, die ebenfalls in Studien mit Menschen zum Einsatz kommt, ist die fNIRS (*functional near infrared-spectroscopy*), eine optische Methode, die ebenfalls Veränderungen der Blutoxygenierung misst. Im Gegensatz zur funktionellen Magnetresonanztomographie mittels BOLD-Kontrast, ist mit der fNIRS eine deutlich höhere zeitliche Auflösung von bis zu 1 Millisekunde zu erreichen, allerdings mit dem Nachteil einer schlechteren räumlichen Auflösung. Auch ist es mit dieser Methode nicht möglich, tiefere Gehirnstrukturen zu untersuchen.^{1, 22} Dem großen Vorteil der fehlenden Invasivität steht gegenüber, dass sowohl BOLD als auch fNIRS auf Quantifizierung der Blutoxygenierung basieren und die durch die neurovaskuläre Kopplung ausgelöste hyperämische Antwort somit nur indirekt messen.¹

Eine in tierexperimentellen Studien häufig angewandte Methode ist das IOSI (*intrinsic optical signal imaging*), welches darauf basiert, dass direkt mit Licht von einer Wellenlänge zwischen 500 und 650 nm beleuchtetes aktives Hirngewebe weniger Licht reflektiert als inaktives Hirngewebe. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass depolarisierte Neurone mehr Licht streuen aufgrund von Ionenbewegungen und Schwellung der Neurone, andererseits mit dem höheren Blutvolumen in aktiven Hirnregionen sowie den unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin.²³ Mit IOSI kann sowohl eine hohe räumliche Auflösung von etwa 100 µm, als auch eine hohe zeitliche Auflösung von etwa 100 ms erreicht werden.²⁴ Ein entscheidender Nachteil der Technik ist, dass eine Kraniotomie und Durotomie zu ihrer Anwendung erforderlich sind, was den Einsatz in Studien mit Menschen stark einschränkt und somit nur in einigen Studien mit neurochirurgischen

Patientinnen und Patienten erfolgen konnte.²⁴ Die Invasivität der Methode kann auch in tierexperimentellen Studien kritisiert werden, da unklar ist, inwieweit die operativen Vorbereitungen die Physiologie des Hirngewebes verändern.

Alternativ wird in der tierexperimentellen Forschung häufig die nicht invasive *Laser Doppler Flowmetry* (LDF) verwendet, welche die kontinuierliche Messung von Blutfluss mit hoher zeitlicher Auflösung in einer Gewebetiefe von 100 bis 400 µm bietet.²⁵ Die Verwendung der *Laser Doppler Flowmetry* wird jedoch beschränkt durch die fehlende räumliche Auflösung, sodass einige Studien sich damit behelfen, LDF mit IOSI zu kombinieren, unter der Inkaufnahme einer Kraniotomie.^{20, 26}

Die *Laser Speckle Flowmetry* (LSF, auch genannt *Laser speckle contrast imaging*) hat den Vorteil, ein großes Sichtfeld mit einer hohen räumlichen Auflösung von bis zu 10 µm darstellen zu können, jedoch ohne Tiefenauflösung, sodass die Anwendung auf oberflächliche Gehirnstrukturen beschränkt bleibt. Die zeitliche Auflösung variiert stark je nach Setup und kann bis zu 1 µs erreichen.²⁷ Die Methode basiert auf der Analyse des sogenannten Speckle-Phänomens (auf deutsch Fleck-Phänomen), welches entsteht, wenn Licht (bei der LSF in der Regel rotes oder infrarotes Licht) auf streuende, sich bewegende Partikel, wie Erythrozyten, trifft. Die LSF nutzt diesen Mechanismus, um einen Speckle-Kontrast mit Laserlicht zu erzeugen, der in umgekehrtem Verhältnis zum zerebralen Blutfluss (CBF) steht.^{27, 28} Somit basiert die in dieser Arbeit verwendete LSF im Gegensatz zu anderen Methoden nicht auf indirekten Markern, wie zum Beispiel der Blutoxygenierung, sondern ist ein direktes Maß des zerebralen Blutflusses. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass eine zuverlässige Bildgebung des zerebralen Blutflusses im Mausmodell auch durch die intakte Schädelkalotte möglich ist.²⁹

4.3 Ziel dieser Arbeit: Ein neuartiges Modell zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung *in vivo*

Trotz der zahlreichen Erkenntnisse, die durch die etablierten Modelle zur Untersuchung neurovaskulärer Kopplung gewonnen werden konnten, sind ihre Limitationen zu berücksichtigen. Bei der häufig verwendeten peripheren, in der Regel somatosensiblen, Stimulation zur Aktivierung von Gehirnzellen findet eine polysynaptische Übertragung über periphere Nerven, Myelon und multiple intrazerebrale subkortikale Zentren bis zum Kortex statt. Diese Übertragung kann durch multiple Störfaktoren beeinträchtigt werden,

wie das verwendete Anästhetikum, Verletzungen während der experimentellen Vorbereitung sowie durch Schädigung kortikaler und subkortikaler Strukturen durch eine chirurgische Intervention, wie zum Beispiel in Tiermodellen des ischämischen Hirninfarkts. Darüber hinaus ist in vielen Modellen eine Kraniotomie erforderlich, um die hämodynamische Antwort zu detektieren und ggf. zu quantifizieren.

Um diese Probleme zu umgehen, könnte ein optogenetisches Modell helfen, bei dem zelluläre Aktivität durch die Expression lichtsensitiver Ionenkanäle minimalinvasiv mit Licht kontrolliert werden kann und somit eine direkte Aktivierung der zu untersuchenden Hirnregion möglich ist.³⁰ In der Vergangenheit ist es mehreren Forschungsgruppen gelungen, in optogenetischen Tiermodellen durch Stimulation mit Licht eine hämodynamische Antwort auszulösen.^{31, 32, 33, 34, 35} Diese Beobachtung legt nahe, dass tatsächlich eine Art neurovaskulärer Kopplung bei der optogenetischen Aktivierung von neuronalen bzw. neuralen Zellen stattfindet. Allerdings ist unklar, inwieweit diese der physiologischen neurovaskulären Kopplung, wie z.B. bei somatosensibler Stimulation, entspricht und als experimentelles Modell zur Untersuchung neurovaskulärer Kopplung genutzt werden kann.

In dieser Arbeit wird ein minimal-invasives experimentelles Modell etabliert, welches ein optogenetisches Tiermodell zur gezielten Aktivierung der zu untersuchenden Kortexregion mit Laser Speckle Flowmetry zur Detektion der vaskulären Antwort kombiniert. Die Ergebnisse der Experimente zeigen intensitäts- und frequenzabhängige hyperäme Antworten in der aktivierten Region, sowie hyperäme und teilweise oligäme Antworten in entfernten kortikalen Regionen, die elektrophysiologisch mit interhemisphärischer Inhibition verknüpft sind. Weiterhin zeigen die Daten, dass die hyperäme Antwort durch kortikale Streudepolarisierung (Cortical Spreading Depression) unterbrochen wird. Alles in allem untermauern die Ergebnisse eine deutliche Überschneidung von optogenetisch induzierter funktioneller Hyperämie mit der physiologischen neurovaskulären Kopplung und begründen den Einsatz des neuartigen Modells in weiteren Studien zur Untersuchung von neurovaskulärer Kopplung in Krankheitsmodellen.

Teile dieses Manteltextes wurden in der Originalpublikation vorveröffentlicht.³⁶

5 Methoden

Tabelle 1: Geräte und Software (eigene Darstellung)

Geräte/Software	Hersteller
Heizkissen	FHC, Brunswick, ME, USA
Stereotaktischer Rahmen	David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
LED-Lichtquelle	LED: MF470F3; LED driver: DC2100; Thorlabs, Newton, NJ, USA
Power Meter	PM16-130, Thorlabs
CCD-Kamera	CoolSnap cf , 1392 x 1040 pixels; Photometrics, Tucson, AZ
Verstärker	Axoprobe 1A, Axon Instruments, Molecular Devices, San Jose, CA, USA
Objektiv	Edmund Industrial Optics, Barrington, NJ, USA
BAT-12/IT-23 Mikrothermometer	Physitemp, Clifton, NJ, USA
PowerLab	ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA
LabChart 5	ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA
Scope	ADInstruments, Colorado Springs, MO, USA
Prism 6	GraphPad Software, Inc., CA, USA
Matlab	The MathWorks, Inc., MA, USA

5.1 Experimentelle Tiere und chirurgische Vorbereitung

Um eine kontrollierte neurale Aktivierung zu erreichen, wurden transgene Thy1-ChR2-YFP-Mäuse verwendet. In diesen Tieren wird unter der Kontrolle des Thymuszell-Antigens 1 (Thy1)-Promotors im gesamten zentralen Nervensystem der durch Licht aktivierte Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) in Fusion mit dem *Yellow fluorescent protein* (YFP) exprimiert. ChR2 ist ein nichtselektiver Transmembrankationenkanal aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, der durch einen Lichtreiz mit Wellenlänge im blauen Spektrum geöffnet werden kann.³⁷ Für diese Studie wurden 12 – 32 Wochen alte männliche Mäuse (n = 32) aus der homozygoten Linie 18 verwendet (B6.Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng/J, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Als Wildtyp-Kontrollen dienten C57BL/6 Mäuse (n = 17; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA).

Alle Experimente wurden an anästhesierten Tieren durchgeführt. Die Narkose wurde mit 2,5 % Isofluran eingeleitet, welches zusammen mit einer Mischung aus 70 %

Stickstoff und 30 % Sauerstoff zur Inhalation verabreicht wurde. Zur Erhaltung der Narkose erfolgte eine Dosisreduktion auf 1 % Isofluran während der weiteren chirurgischen Vorbereitung. Zunächst erfolgte die Anlage eines intraarteriellen Katheters in die rechte oder linke Femoralarterie. Nach Anlage des intraarteriellen Katheters wurden die Versuchstiere für eine mittige Inzision und Retraktion der Kopfhaut in einem stereotaktischen Rahmen platziert. Die so freigelegte Schädelkalotte wurde mit einer dünnen Schicht Mineralöl bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach Abschluss der chirurgischen Eingriffe erfolgte ein Wechsel der Narkose von Isofluran auf Chloralhydrat (300 mg/kg intraperitoneal), aufgrund der durch Isofluran verursachten Vasodilatation und Entkopplung des zerebralen Blutflusses vom lokalen Metabolismus.³⁸

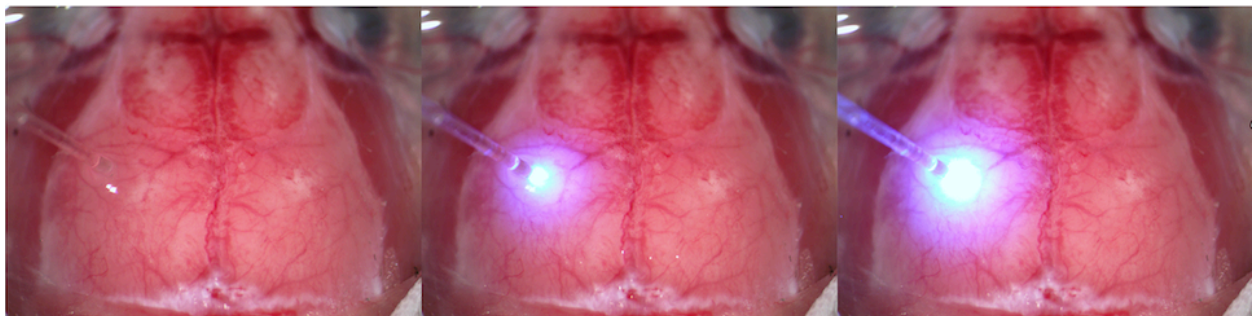


Abbildung 1 (eigene Darstellung): Aufsicht auf die Schädelkalotte nach chirurgischer Präparation.

Links: Die mit Mineralöl bedeckte intakte Schädelkalotte nach Retraktion der Kopfhaut. Über dem ipsilateralen Barrel-Kortex (3 mm lateral und 1 mm posterior zum Bregma) liegt der Lichtwellenleiter auf, über den der Lichtstimulus in verschiedenen Intensitäten (mittig: 1 mW, rechts: 5 mW) appliziert wurde.

5.2 Überwachung der systemischen physiologischen Parameter

Über den intraarteriellen Katheter erfolgte eine kontinuierliche Blutdruckmessung. Aufgrund des Einflusses des systemischen Blutdrucks auf die neurovaskuläre Kopplung, wurden Abschnitte eines Experiments mit mittlerem arteriellen Blutdruck von unter 60 mmHg von der Auswertung ausgeschlossen. Darüber hinaus erfolgte über den Katheter die Entnahme arteriellen Blutes zur Analyse von pH, Sauerstoffpartialdruck und Kohlenstoffdioxidpartialdruck jeweils vor Beginn und nach Abschluss eines Experimentes. Dies ist insbesondere aufgrund des Einflusses des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks und zu einem geringeren Grad auch des Sauerstoffpartialdrucks auf den Vasotonus relevant.³⁸ Da die Blutgasanalysen

innerhalb oder nah am Normbereich lagen, wurden keine Experimente aufgrund des Ergebnisses der Blutgasanalyse von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und durch ein Heizkissen bei 37°C gehalten.

In einer separaten Gruppe von Wildtyp-Mäusen (n = 4; C57BL/6, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) erfolgte eine Messung der Gehirntemperatur unter maximaler Lichtstimulation mit den in dieser Studie verwendeten Parametern (maximale Intensität, Pulsfrequenz sowie Pulsdauer), um eine Erhitzung des Gehirngewebes während der Lichtstimulation auszuschließen. Dazu erfolgte eine kortikale Bohrlochtrepantation der Schädelkalotte und Positionierung einer Thermometerspitze (Physitemp, Clifton, NJ, USA) durch das Bohrloch, direkt unterhalb des auf der Schädelkalotte aufliegenden Lichtwellenleiters.

5.3 Lichtstimulation

Es gibt fünf Variablen, die den Lichtstimulus definieren: Wellenlänge, Dauer der Stimulation, Pulsdauer, Pulsfrequenz und Intensität (Leistung).

Als Lichtquelle diente eine LED-Lampe mit einer Wellenlänge von 470 nm. Ein Lichtwellenleiter von 400 µm Durchmesser (numerische Apertur 0.39) wurde mithilfe eines stereotaktischen Arms 3 mm lateral und 1 mm posterior zum Bregma, über dem medialen Barrel-Kortex auf intakter Schädelkalotte aufgelegt (s. Abbildung 1). Die Parameter Wellenlänge (470 nm) und Dauer der Stimulation (30 Sekunden) blieben unverändert. Es erfolgte die Messung des basalen zerebralen Blutflusses durch Laser Speckle Flowmetry für 30 Sekunden vor Stimulation (Baseline), während der 30-sekündigen Stimulation und für 90 Sekunden nach Ende der Stimulation.

Zur Untersuchung des Einflusses von Pulsdauer, Pulsfrequenz und Intensität des Lichtstimulus auf den zerebralen Blutfluss erfolgte eine schrittweise Veränderung der Pulsdauer von 2 bis 10 ms in Schritten von 2 ms bei unveränderter Intensität (3 mW) und Frequenz (8 Hz), eine Veränderung der Pulsfrequenz von 4 bis 12 Hz in Schritten von 2 Hz bei unveränderter Intensität (3 mW) und Pulsdauer (6 ms) sowie eine Veränderung der Intensität von 1 bis 5 mW in Schritten von 1 mW bei unveränderter Frequenz (8 Hz) und Pulsdauer (6 ms).

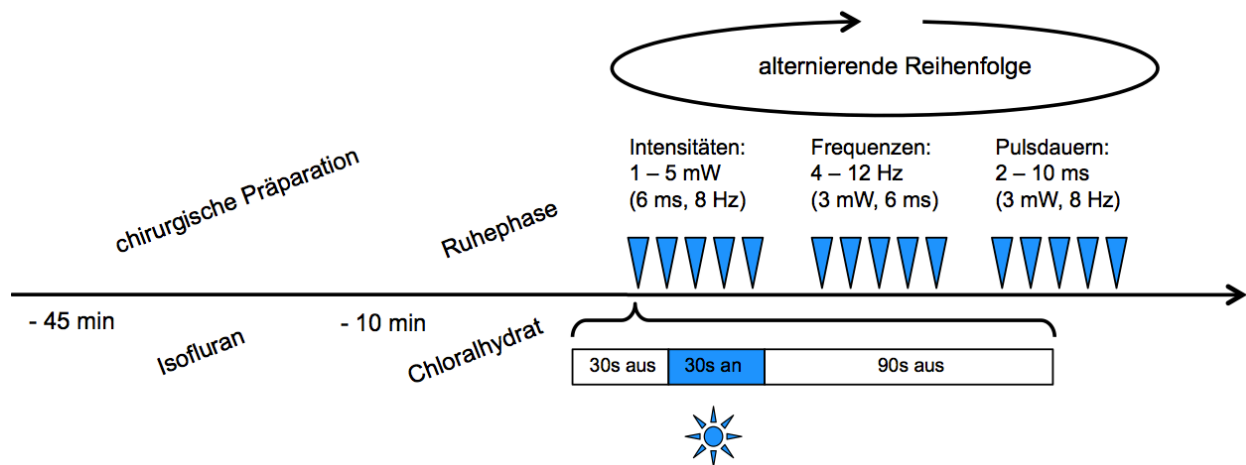


Abbildung 2: Zeitstrahl des experimentellen Protokolls. Die chirurgische Präparation erfolgte unter Isofluran-Anästhesie, welche vor Beginn der Lichtstimulation auf eine Anästhesie mit Chloralhydrat intraperitoneal umgestellt wurde, mit nachfolgend zehnmütiger Ruhephase. Anschließend begann die Lichtstimulation zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Intensitäten, Frequenzen und Pulsdauern des Lichtstimulus auf den kortikalen Blutfluss. Intensitäten, Frequenzen und Pulsdauern wurden in alternierender Reihenfolge getestet, um einen Zeiteffekt auszuschließen. Jeder Stimulus bestand aus 30 Sekunden *Licht aus* (= Baseline), 30 Sekunden *Licht an* (mit den jeweils angegebenen Parametern) und weiteren 90 Sekunden *Licht aus*. Der kortikale Blutfluss wurde währenddessen kontinuierlich mittels Laser Speckle Flowmetry aufgezeichnet. Abbildung modifiziert nach Böhm et al. ³⁶.

Für einen Teil der Experimente wurde die Lichtstimulation dazu verwendet, um nach einem kürzlich etablierten Protokoll ³⁹ durch die intakte Schädelkalotte eine kortikale Streudepolarisierung auszulösen. Hierzu wurde über den Lichtwellenleiter ein 10-sekündiger kontinuierlicher Lichtstimulus von 3 mW über dem ipsilateralen Barrel-Kortex appliziert.

5.4 Bildgebung des kortikalen Blutflusses

Zur Aufzeichnung von Veränderungen des kortikalen Blutflusses vor, während und nach der Lichtstimulation erfolgte die Bildgebung mittels Laser Speckle Flowmetry durch die intakte Schädelkalotte. Dafür wurde eine CCD-Kamera (CoolSnap cf, 1392x1040 pixels; Photometrics, Tucson, AZ) über der von der Kopfhaut freigelegten Schädelkalotte positioniert, und eine Laserdiode (785 nm, 75mW) wurde verwendet, um die kortikale Schädeloberfläche zu beleuchten. Die Eindringtiefe des Lasers beträgt etwa 500 µm ab dem Punkt, an dem das Laserlicht auf die Schädeloberfläche trifft. ²⁹ Das Bildfeld wurde

mit einem Objektiv (Edmund Industrial Optics, Barrington, NJ, U.S.A.) so eingestellt, dass der gesamte dorsale Kortex erfasst wurde.

Speckle-Rohbilder wurden mit einer Frequenz von 17 Hz erfasst und zur Berechnung des Speckle-Kontrasts verwendet. Die Speckle-Kontrast-Aufnahmen wurden gemittelt, um alle 3,5 Sekunden ein Bild des zerebralen Blutflusses zu erhalten. Der Speckle-Kontrast ist ein Maß für die Speckle-Sichtbarkeit in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der streuenden Partikel und ist definiert als das Verhältnis zwischen der Standardabweichung der Pixelintensitäten und der mittleren Pixelintensität in einem kleinen Bereich des Bildes.^{29, 40}

Die Bildgebung mittels Laser Speckle Flowmetry erfolgte während der 30-sekündigen Baseline, der 30-sekündigen Lichtstimulation und für weitere 90 Sekunden nach Ende der Stimulation. Der zerebrale Blutfluss wird relativ zur Baseline in Prozent angegeben. Um Veränderungen des zerebralen Blutflusses durch plötzliche Veränderungen des systemischen Blutdrucks als möglichen Störfaktor zu berücksichtigen, erfolgte außerdem die Berechnung des zerebrovaskulären Widerstandes durch Division des durchschnittlichen systemischen arteriellen Blutdrucks während der Aufnahme jedes Bildes durch den relativen zerebralen Blutfluss (in %), der für dieses Bild berechnet wurde. Der zerebrovaskuläre Widerstand wird in dieser Arbeit ausgedrückt als Prozentsatz der Baseline des zerebrovaskulären Widerstandes.

Für die Analyse wurden 6 kortikale Regionen mit einem Durchmesser von je annähernd 1,5 mm definiert: ipsilateraler und kontralateraler Barrel-Kortex (1 mm posterior und 3 mm lateral des Bregmas), ipsilateraler und kontralateraler Motorkortex (2 mm anterior und 2 mm lateral des Bregmas), sowie ipsilateraler und kontralateraler visueller Kortex (3,5 mm posterior und 2,5 mm lateral des Bregmas).

Für einen Teil der Experimente wurde die Laser Speckle Flowmetry auch dafür verwendet, die optogenetisch induzierte kortikale Streudepolarisierung zu erfassen, sowie die Antwort des zerebralen Blutflusses auf Lichtstimulation nach kortikaler Streudepolarisierung.

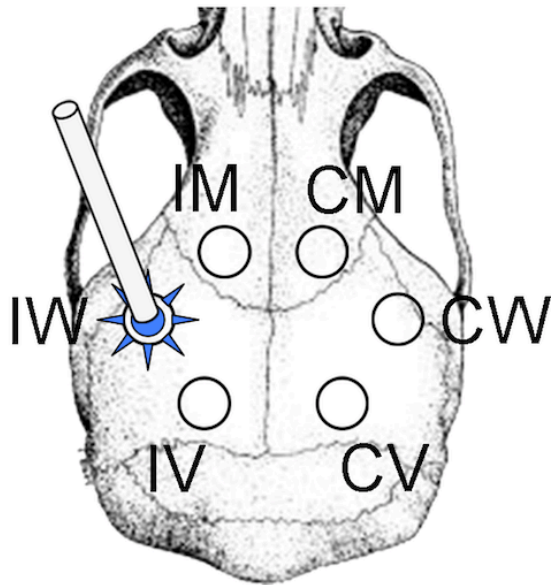


Abbildung 3: Definierte kortikale Regionen. IW = ipsilateraler (Whisker-)Barrel-Kortex, CW = kontralateraler (Whisker-)Barrel-Kortex, IM = ipsilateraler Motorkortex, CM = kontralateraler Motorkortex, IV = ipsilateraler visueller Kortex, CV = kontralateraler visueller Kortex. Abbildung modifiziert nach Böhm et al.³⁶.

5.5 Evozierte Potenziale

Sowohl für optogenetisch evozierte, als auch für somatosensibel evozierte Potenziale erfolgte die gleiche chirurgische Vorbereitung wie für die Experimente mit Laser Speckle Flowmetry, mit Ausnahme der Katheterisierung der Femoralarterie zur arteriellen Blutdruckmessung. Die Stimulation des ipsilateralen Barrel-Kortex erfolgte entweder optogenetisch durch einen Lichtstimulus alle 5 Sekunden mit wechselnder Intensität (1, 3, 5 mW bei einer Pulsdauer von 6 ms) und wechselnder Pulsdauer (2, 6, 10 ms bei einer Intensität von 3 mW) oder somatosensibel durch elektrische Stimulation (3 mA, 1 ms) des ipsilateralen Schnurrhaarkissens, je mit einer Frequenz von 0,2 Hz. Für die optogenetisch evozierten Potenziale wurden für jedes Stimulusprotokoll 20 Aufnahmen gemittelt. Die Aufnahme der optogenetisch evozierten Potenziale erfolge mittels einer Ballelektrode über der intakten Schädelkalotte in den in Abschnitt 2.4 definierten Koordinaten der 6 kortikalen Regionen. Zur Testung von transhemisphärischer Inhibition erfolgte die Aufnahme der somatosensibel evozierten Potentiale mittels Ballelektrode auf dem kontralateralen Barrel-Kortex unter gleichzeitiger Lichtstimulation des ipsilateralen Barrel-Kortex.

Für die Gruppe von Tieren, in denen eine Streudepolarisation induziert wurde, erfolgte die Aufnahme der optogenetisch evozierten Potenziale vor und bis zu 60 Minuten nach induzierter Streudepolarisation über zwei Ballelektroden gleichzeitig, die über dem ipsilateralen Barrel-Kortex und ipsilateralen Motorkortex auf den unter 2.4 beschriebenen Koordinaten positioniert wurden.

Die Aufnahme aller evozierten Potenziale erfolgte mithilfe eines Verstärkers (Axoprobe 1A, Axon Instruments, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) und der Software Scope (ADInstruments, Colorado Springs, MO, USA).

5.6 Statistische Auswertung

Die Stichprobengrößen wurden empirisch so gewählt, dass eine Power von 80 % erreicht wird, um 50 % der Effektgröße bei einem geschätzten Variationskoeffizienten von 30 % nachzuweisen ($\alpha = 0,05$). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Der Vergleich des Einflusses der verschiedenen Parameter der Lichtstimulation (Intensität, Pulsdauer, Frequenz) auf den zerebralen Blutfluss in den definierten kortikalen Regionen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit einer post-hoc-Analyse durch den Dunn's Test. Die Analyse der Inhibition der kontralateral abgeleiteten somatosensibel evozierten Potenziale durch die ipsilaterale Lichtstimulation (interhemisphärische Inhibition) erfolgte durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Holm-Šídák-Test. In der Gruppe der experimentellen Tiere, bei denen der Einfluss der Streudepolarisation auf den zerebralen Blutfluss und die evozierten Potenziale untersucht wurde, erfolgte die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Dunnett's Test. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle Daten werden als Durchschnitt, teils mit Fehlerbalken zur Darstellung der Standardabweichung, angegeben. Wenn keine statistische Analyse erfolgte, wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken zwecks einer besseren Leserlichkeit verzichtet.

6 Ergebnisse

6.1 Einfluss von Stimulation mit Licht auf den kortikalen zerebralen Blutfluss in Thy1-ChR2-YFP-Mäusen

Bei allen untersuchten Stimulusparametern führte eine 30-sekündige Stimulation mit Licht über dem ipsilateralen Barrel-Kortex zu einer lokalen Hyperämie. Die Hyperämie korrelierte positiv mit steigender Intensität sowie mit steigender Frequenz und zeigte keine Abhängigkeit von der Pulsdauer. Die Hyperämie begann ~ 3 Sekunden nach Beginn der Stimulation, erreichte nach ~ 7 Sekunden die Hälfte der Amplitude und zeigte danach ein Plateau. Das Maximum der hyperämischen Antwort wurde in der Regel erst wenige Sekunden nach Ende der 30-sekündigen Stimulation erreicht. Nach Stimulation fiel der Blutfluss binnen einer Minute auf sein Ausgangsniveau zurück. Bei maximaler Frequenz (12 Hz) und Intensität (5 mW) betrug die durchschnittliche Hyperämie ~ 40% der Baseline.

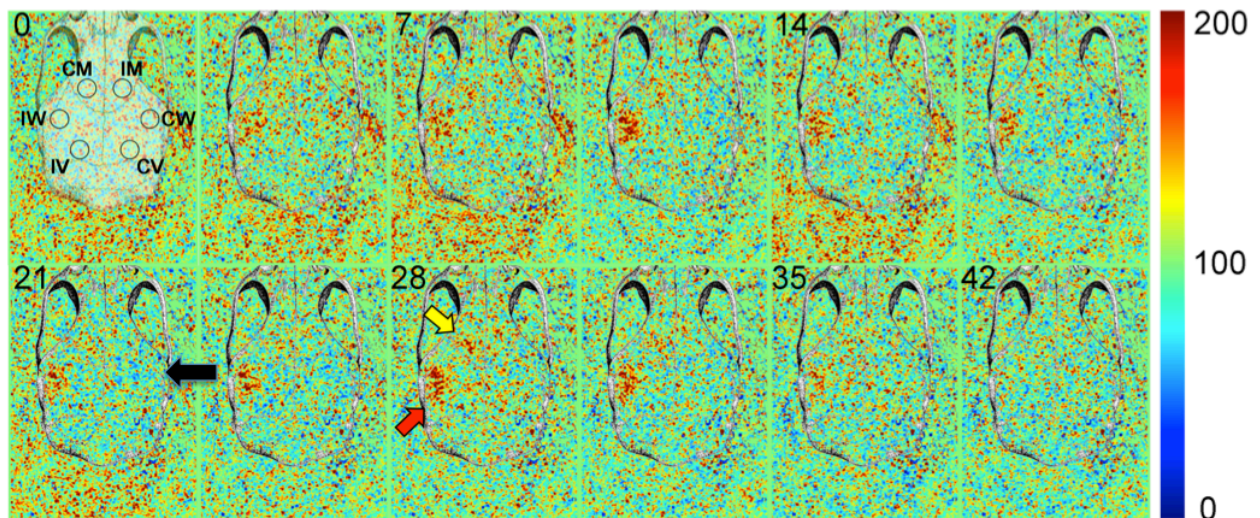


Abbildung 4: Repräsentative Laser-Speckle-Bilder, welche die relativen Veränderungen des zerebralen Blutflusses (Farbskala in % der Baseline) während einer Lichtstimulation (3 mW, 6 ms, 8 Hz) darstellen. Die Zeit (in Sekunden) ist oben links in den jeweiligen Aufnahmen angegeben. Die Lichtstimulation erfolgte über 30 Sekunden ab dem Zeitpunkt 0. Der Umriss des Schädels und die definierten kortikalen Regionen (s. auch Abbildung 3), in denen die Veränderungen des zerebralen Blutflusses quantifiziert wurden, sind ebenfalls dargestellt. Der direkt stimulierte ipsilaterale Barrel-Kortex (IW, rote Pfeilspitze) und der entfernt aktivierte ipsilaterale Motorkortex (IM, gelbe Pfeilspitze) reagierten mit einem Anstieg des zerebralen Blutflusses, während der kontralaterale Barrel-Kortex (CW, schwarze Pfeilspitze) eine leichte Oligämie zeigte. Abbildung modifiziert nach Böhm et al.³⁶.

Etwas zeitversetzt, mit einer Verzögerung von $\sim 3,5$ Sekunden, setzte auch im ipsilateralen Motorkortex eine hyperäme Antwort ein, die räumlich von der lokalen Hyperämie des stimulierten Barrel-Kortex abgegrenzt war. Die hyperäme Antwort des ipsilateralen Motorkortex zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die des ipsilateralen Barrel-Kortex und ebenso eine deutliche positive Korrelation mit steigender Intensität und Frequenz des Stimulus. Anders als beim ipsilateralen Barrel-Kortex ließ sich, weniger deutlich ausgeprägt, auch eine positive Korrelation zwischen steigender Pulsdauer und hyperämer Antwort beobachten. Die durchschnittliche hyperäme Antwort ($\sim 20\%$) war im ipsilateralen Motorkortex geringer ausgeprägt als im ipsilateralen Barrel-Kortex. Der ipsilaterale visuelle Kortex zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen des Blutflusses, bis auf eine geringe Oligämie bei einer Frequenz von 6 Hz (3 mW, 6 ms), die bei diesen Parametern ebenfalls im kontralateralen visuellen Kortex zu beobachten war.

Der kontralaterale Barrel-Kortex zeigte während der Stimulation eine kleine, aber deutlich reproduzierbare Oligämie von bis zu $\sim 10\%$. Ähnlich dazu schien auch der kontralaterale Motorkortex eine leichte Oligämie zu zeigen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

Um systemische Blutdruckschwankungen bei der Interpretation dieser Daten zu berücksichtigen, berechneten wir den zerebrovaskulären Widerstand und erhielten hiermit identische Ergebnisse.

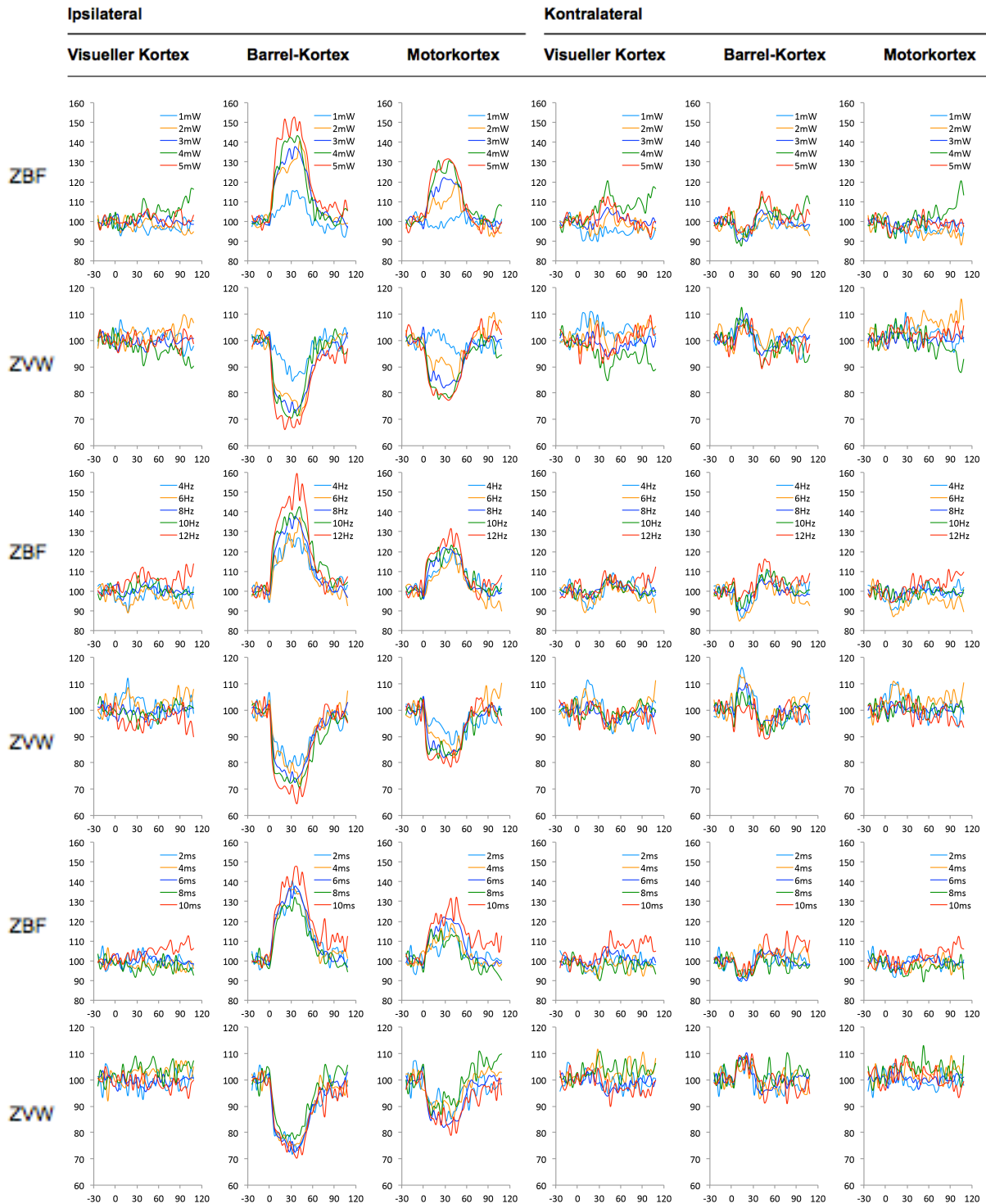


Abbildung 5: Zeitliche Verläufe der Veränderung des zerebralen Blutflusses (ZBF) in % der Baseline in den sechs definierten kortikalen Regionen. Ergänzend zu den in der Originalpublikation dargestellten Daten sind in dieser Abbildung auch die zeitlichen Verläufe des zerebrovaskulären Widerstands (ZVW) in % der Baseline dargestellt. Die x-Achsen geben die Zeit in Sekunden an. Die Lichtstimulation erfolgte zwischen Sekunde 0 und 30. Die ersten beiden Reihen stellen die Versuche mit steigender Intensität (1 – 5 mW, 6 ms, 8 Hz), die beiden mittleren Reihen die Versuche mit steigender Frequenz (4 – 12 Hz, 3 mW, 6 ms) und die beiden unteren Reihen die Versuche mit steigender Pulsdauer (2 – 10 ms, 3 mW, 8 Hz) dar. Jede Kurve ist ein Durchschnitt von acht Thy1-ChR2-YFP-Mäusen. Modifiziert nach Böhm et al. ³⁶.

Um, wie kürzlich beschrieben,⁴¹ einen Einfluss der Lichtstimulation selbst (unabhängig einer ChR2-Aktivierung) auf den kortikalen Blutfluss auszuschließen, führten wir die Lichtstimulation mit den höchsten in dieser Studie verwendeten Stimulusparametern (5 mW, 12 Hz, 10 ms) in einer Gruppe von Wildtypmäußen (n = 4) durch. Es zeigten sich keine Veränderungen des kortikalen Blutflusses durch Lichtstimulation in Tieren ohne ChR2-Expression.

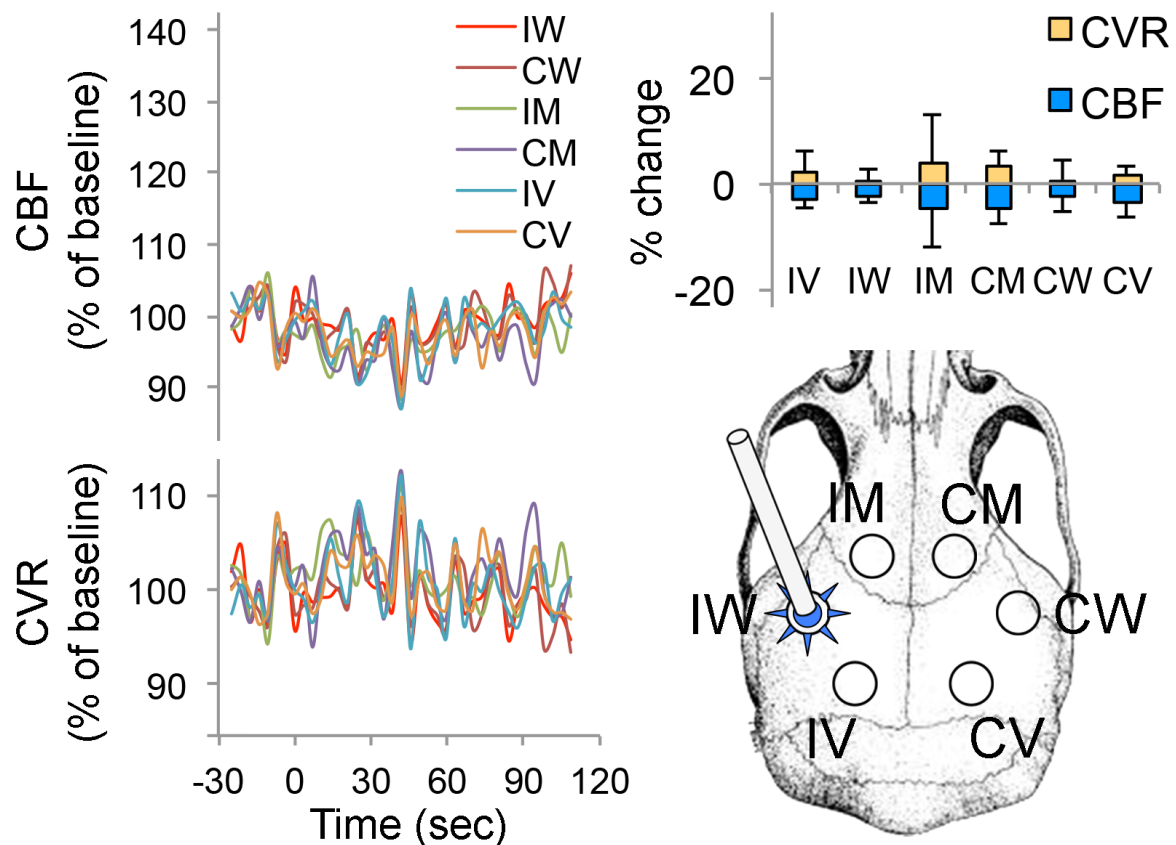


Abbildung 6: Abwesenheit von durch Lichtstimulation induzierten Veränderungen des zerebralen Blutflusses (CBF, in % der Baseline) des ipsilateralen (Whisker-)Barrel-Kortex (IW) in Wildtypmäusen. Ergänzend zu den in der Originalpublikation dargestellten Daten ist in dieser Abbildung auch der zeitliche Verlauf des zerebrovaskulären Widerstands (CVR, in % der Baseline) dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach Böhm et al.³⁶.

6.2 Durch Lichtstimulation evozierte Potenziale

Um zu untersuchen, ob die in 3.1 beobachteten hyperämischen und oligämischen Antworten mit elektrophysiologischer Aktivität korreliert werden können, wurden durch Lichtstimulation auf dem ipsilateralen Barrel-Kortex evozierte Potenziale über den in 2.4

definierten kortikalen Regionen epikraniell abgeleitet. Über dem stimulierten ipsilateralen Barrel-Kortex zeigte sich als einzige der untersuchten Regionen eine unmittelbare negative Potenzialverschiebung, überlagert von einer zweiten negativen Potenzialverschiebung, die korrelierend mit der Leistung des Stimulus war. Diese unmittelbare negative Potenzialverschiebung war wahrscheinlich das lokale Feld, das direkt durch die Aktivierung von ChR2 erzeugt wird.³⁹

Über dem kontralateralen Barrel-Kortex sowie über dem ipsi- und kontralateralen Motorkortex ließen sich morphologisch ähnliche biphasische evozierte Potenziale mit einer initial positiven Komponente, gefolgt von einer negativen Komponente, ableiten. Die Latenzen waren in der kontralateralen Hemisphäre länger als in der entsprechenden ipsilateralen Region. Mit zunehmender Intensität des Lichtstimulus nahmen die Amplituden der evozierten Potenziale in den meisten Regionen zu, während sich die Latenzen verkürzten. Eine Erhöhung der Pulsdauer hingegen zeigte einen deutlich geringeren Einfluss auf die Höhe der Amplituden und keinen Einfluss auf die Latenzen.

Die evozierten Potenziale über dem ipsi- und kontralateralen visuellen Kortex waren monophasisch und deutlich niedrigamplitudiger als die der anderen Regionen. Ipsilateral zeigte sich ein negativer Ausschlag, kontralateral meist ein leichter positiver Ausschlag.

Elektrophysiologisch zeigte sich somit durch Lichtstimulation des ipsilateralen Barrel-Kortex eine lokale Aktivierung sowie eine Aktivierung von allen untersuchten entfernten kortikalen Regionen. Es konnte kein allgemeiner Zusammenhang zwischen Morphologie oder Amplitude der evozierten Potenziale und den durch Lichtstimulation induzierten Veränderungen des kortikalen Blutflusses festgestellt werden. Lediglich die Intensitätsabhängigkeit von Amplitude der evozierten Potenziale und Hyperämie im ipsilateralen Barrel-Kortex und ipsilateralen Motorkortex war übereinstimmend. Obwohl die evozierten Potenziale des kontralateralen Barrel-Kortex jenen des ipsilateralen Motorkortex stark ähnelten, hatte sich im kontralateralen Barrel-Kortex eine oligäme Antwort auf die Lichtstimulation gezeigt.

In Wildtyp-Mäusen zeigte sich bei der höchsten in der Studie verwendeten Intensität (5 mW) und Pulsdauer (10 ms) des Lichtstimulus keine Potenzialverschiebung in den untersuchten distalen Regionen, bis auf einen kleinen negativen Ausschlag von ~ 0,1 mV im stimulierten Barrel-Kortex.

6.3 Interhemisphärische Inhibition von somatosensibel evozierten Potenzialen durch optogenetisch evozierte Potenziale

Eine Erklärung für die fehlende Kongruenz zwischen den hochamplitudigen evozierten Potenzialen über dem kontralateralen Barrel-Kortex und der gleichzeitig oligämen Antwort auf Lichtstimulation in dieser Region war, dass die ipsilaterale Lichtstimulation, mutmaßlich über Bahnen des Corpus callosum, einen inhibitorischen Effekt auf die kontralaterale Kortexregion ausübte. Um dies zu überprüfen, untersuchten wir den Effekt von Lichtstimulation des ipsilateralen Barrel-Kortex auf somatosensibel evozierte Potenziale, die durch elektrische Stimulation des ipsilateralen Schnurrhaarkissens generiert und über dem kontralateralen Barrel-Kortex abgeleitet wurden. Die elektrische Stimulation des ipsilateralen Schnurrhaarkissens (3 mA, 1 ms, 0.2 Hz) erzeugte hochamplitudige somatosensibel evozierte Potenziale über dem kontralateralen Barrel-Kortex. Die gleichzeitige einminütige Stimulation mit Licht des ipsilateralen Barrel-Kortex (3 mW, 6 ms, 4 oder 12 Hz) führte zu einer signifikanten Verringerung der Amplitude der somatosensibel evozierten Potenziale, die über dem kontralateralen Barrel-Kortex abgeleitet wurden. Die Verringerung der Amplitude war unabhängig von der verwendeten Frequenz der Lichtstimulation (4 oder 12 Hz) zu beobachten.

Diese Beobachtung kann im Rahmen eines interhemisphärischen inhibitorischen Effekts der optogenetischen Aktivierung gedeutet werden und eine potentielle Erklärung für die kontralaterale oligäme Antwort auf ipsilaterale Lichtstimulation darstellen.

6.4 Neurovaskuläre Entkopplung durch kortikale Streudepolarisierung

Aufgrund der räumlich abgegrenzten hyperämen Antwort des ipsilateralen Motorkortex ist am ehesten von einer tatsächlichen neurovaskulären Kopplungsreaktion in dieser Region auszugehen, die durch synaptische Verbindungen zwischen Motorkortex und dem aktivierten Barrel-Kortex vermittelt wird. Die lokale hyperäme Antwort im optogenetisch aktivierten Barrel-Kortex hingegen, könnte anders vermittelt sein als durch neurovaskuläre Kopplung, beispielsweise durch einen Einfluss der Stimulation auf den lokalen Gefäßtonus. Eine gut charakterisierte Eigenschaft der neurovaskulären Kopplung ist, dass sie durch eine kortikale Streudepolarisation unterbrochen wird.⁴² Um zu prüfen, ob die optogenetisch induzierte hyperäme Antwort ebenfalls diese charakteristische Eigenschaft der physiologischen neurovaskulären Kopplung besitzt,

induzierten wir nach einem kürzlich etablierten Protokoll ³⁹ ipsilateral eine kortikale Streudepolarisation durch intensive optogenetische Stimulation und untersuchten durch Lichtstimulation induzierte hyperämische Antworten sowie evozierte Potenziale vor und nach Induktion der kortikalen Streudepolarisierung.

Die kortikale Streudepolarisierung unterbrach kurzzeitig alle evozierten Potenziale in den beiden untersuchten Regionen (ipsilateraler Barrel-Kortex und ipsilateraler Motorkortex) mit einem schnelleren Wiedereinsetzen der elektrischen Aktivität im Barrel-Kortex (~ 1 min) als im Motorkortex (~ 3 min) sowie nachfolgend einer größeren Amplitude der Potenziale.

Wie erwartet, reduzierte sich der zerebrale Blutfluss in Ruhe (ohne Lichtstimulation) nach induzierter Streudepolarisierung deutlich, um ~ 50% in allen untersuchten ipsilateralen Kortexregionen. Nach etwa 60 Minuten näherte sich der zerebrale Blutfluss in Ruhe wieder dem Ausgangswert an. In der kontralateralen Hemisphäre entwickelte der Barrel-Kortex eine andauernde Hyperämie, während der Motorkortex eine leichte Oligämie im Vergleich zum Ausgangswert zeigte.

Nach kortikaler Streudepolarisierung reduzierten sich die hyperämischen Antworten des ipsilateralen Barrel- und Motorkortex auf Lichtstimulation um ~ 50% während des beobachteten Zeitraums von 60 Minuten, trotz Rückkehr des kortikalen Blutflusses auf den Ausgangswert nach 60 Minuten und Rückkehr der elektrischen Aktivität nach bereits 1-4 Minuten. Auch die kontralateralen oligämischen Antworten waren während des Beobachtungszeitraums von 60 Minuten reduziert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die optogenetisch induzierte Hyperämie durch kortikale Streudepolarisierung gestört wird. Somit weist die optogenetisch induzierte Hyperämie ein entscheidendes Merkmal der neurovaskulären Kopplung bei physiologischer neuronaler Aktivierung auf.

6.5 Einfluss von Lichtstimulation auf die Temperatur kortikalen Gewebes

Als möglicher Störfaktor ist eine Erhöhung der Temperatur des kortikalen Gewebes durch die Lichtstimulation zu berücksichtigen. Zum Ausschluss dieses Störfaktors erfolgte in einer separaten Gruppe (n= 4) die Messung der kortikalen Temperatur mit einer durch ein Bohrloch eingeführten Temperatursonde, die direkt unterhalb des auf der Schädelkalotte im Bereich des Barrel-Kortex aufliegenden Lichtwellenleiters

positioniert wurde. Wie vorbeschrieben, ⁴³ war die kortikale Temperatur nach Bohrlochtrepation (~ 33°C) niedriger als die Körperkerntemperatur (37 °C). Eine Stimulation mit Licht mit den jeweils höchsten in dieser Arbeit verwendeten Parametern des Lichtstimulus (5 mW, 12 Hz, 10 ms) führte zu keiner Erhöhung der kortikalen Temperatur.

6.6 Einfluss von weißem Licht auf den zerebralen Blutfluss in Ruhe

Ein weiterer möglicher Störfaktor ist die unbeabsichtigte Aktivierung von ChR2 durch Raumlicht oder Licht des für die chirurgische Vorbereitung verwendeten Operationsmikroskops. Raumlicht zeigte keinen Einfluss auf den zerebralen Blutfluss von Thy1-ChR2-YFP-Mäusen (n = 5) oder von Wildtyp-Mäusen (n = 5). Das weiße Licht des Operationsmikroskops mit einer Intensität von durchschnittlich 6,2 mW hingegen führte zu einer signifikanten Erhöhung des zerebralen Blutflusses sowohl in der Thy1-ChR2-YFP-Gruppe (11 %) als auch in der Wildtyp-Gruppe (7 %), ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Als Konsequenz aus diesem Ergebnis wurden alle Experimente dieser Arbeit bei Raumlicht und abgeschaltetem Licht des Operationsmikroskops durchgeführt.

7 Diskussion

In dieser Arbeit etablierten meine Koautor*innen und ich ein minimal-invasives optogenetisches Modell zur Untersuchung neurovaskulärer Kopplung *in vivo* und suchten nach Überschneidungen unseres optogenetischen Ansatzes mit bisherigen Erkenntnissen über die physiologische neurovaskuläre Kopplung. Wir nutzten, unter kontinuierlicher Überwachung der Vitalparameter, Lichtstimulation zur gezielten neuronalen Aktivierung des Kortex in Thy1-ChR2-YFP-Mäusen und detektierten die Antwort des kortikalen Blutflusses mittels Laser Doppler Flowmetry. Unsere Experimente zeigten eine frequenz- und intensitätsabhängige Hyperämie im stimulierten Barrel-Kortex und räumlich davon abgegrenzt im ipsilateralen Motorkortex, mit dazu korrelierend hochamplitudigen evozierten Potenzialen. Die Amplitude und der zeitliche Verlauf dieser optogenetischen hyperämischen Antworten ähnelten stark der hyperämischen Reaktion auf die konventionelle somatosensible Stimulation. ¹⁹ Im

kontralateralen Barrel-Kortex fanden wir eine durch Lichtstimulation induzierte Oligämie, die elektrophysiologisch mit interhemisphärischer Inhibition verbunden war. Neben der Reproduktion bekannter kortikaler Konnektivität zeigte die optogenetisch induzierte Antwort des zerebralen Blutflusses mit ihrer Unterbrechung durch kortikale Streudepolarisierung ein weiteres entscheidendes Merkmal der physiologischen neurovaskulären Kopplung. Diese Ergebnisse begründen den Einsatz unseres minimal-invasiven Modells in weiteren Studien zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung in Krankheitsmodellen.

7.1 Mechanistische Überlegungen zur Funktionsweise des Modells

Die Eindringtiefe des Lichtstimulus in unserem Modell und somit die Frage, welche Zellschichten genau aktiviert wurden, ist nicht abschließend zu klären. Es ist davon auszugehen, dass die intakte Schädeldecke und die Meningen den Lichtstimulus abschwächen, bevor er auf die Kortexoberfläche trifft.³⁹ Sobald das Licht auf die Kortexoberfläche trifft, kommt es zu einer weiteren Abschwächung durch Absorption und Streuung, die mit steigender Entfernung von der Lichtquelle rasch zunimmt.⁴⁴ Aravanis et al. quantifizieren die Intensität in einem Umkreis von 0,5 mm der Lichtquelle mit lediglich 1% der ursprünglichen Intensität.⁴⁴ Es ist somit unwahrscheinlich, dass Kortexschichten, die tiefer als 0,5 mm unter der Oberfläche liegen (Laminae V und VI), durch das Licht aktiviert wurden. Eine Stimulation mit der niedrigsten verwendeten Intensität (1 mW) führte zu keiner signifikanten Reaktion des Blutflusses, sodass bei dieser Intensität vermutlich keine oder kaum Aktivierung selbst der oberflächlichen Kortexschichten stattfand. Wir gehen davon aus, dass apikale Dendriten der oberflächlichsten Schicht (Lamina I) ab einer Intensität von 2 mW depolarisiert wurden und die der nachfolgenden Laminae II, III und IV bei steigender Intensität des Stimulus. Neben der Intensitätsabhängigkeit sahen wir eine Frequenzabhängigkeit der hämodynamischen Antwort. Die Öffnungswahrscheinlichkeit von ChR2 mit steigender Stimulusfrequenz sinkt erst ab Frequenzen zwischen 20-40 Hz,⁴⁵ sodass wir in Übereinstimmung hiermit mit den in dieser Studie verwendeten Frequenzen bis 12 Hz keine Abflachung der Frequenz-Hyperämie-Dosiskurve feststellen konnten. Dies bestätigt vorherige Studien.^{20, 33} Obwohl eine Pulsdauer von 2 ms weniger wahrscheinlich eine Aktivierung von ChR2 verursacht,⁴⁶ führte eine Pulsdauer von 2 ms im stimulierten Barrel-Kortex ebenso zu einer Hyperämie wie eine Pulsdauer von 10

ms. Dies könnte bedeuten, dass Depolarisationen unterhalb der Spike-Schwelle bereits ausreichend sein könnten, um eine lokale Hyperämie hervorzurufen.

7.2 Reproduktion bekannter kortikaler Konnektivität

Im ipsilateralen Motorkortex, der stark exzitatorische efferente Projektionen aus dem stimulierten Barrel-Kortex erhält, ^{47, 48} konnte eine deutliche intensitäts- und frequenzabhängige Hyperämie gemessen werden. Aufgrund der räumlichen Abgrenzung von der Hyperämie des Barrel-Kortex, ist von einer funktionellen Hyperämie durch neuronale Aktivierung infolge transsynaptischer Übertragung auszugehen. Dafür spricht auch, dass keine Hyperämie im ipsilateralen visuellen Kortex aufgezeichnet wurde, obwohl sich die Koordinaten von visuellem und motorischen Kortex der ipsilateralen Hemisphäre äquidistant vom Lichtwellenleiter befanden. Somit erscheint eine artifizielle Hyperämie des motorischen Kortex durch akzidentelle Kontamination mit blauem Licht unwahrscheinlich. Passend hierzu zeigten sich elektrophysiologisch großamplitudige, optogenetisch evozierte Potenziale über dem stimulierten Barrel-Kortex und dem ipsilateralen Motorkortex, während die über den visuellen Kortex abgeleiteten Potenziale niedrigamplitudig waren. Dass jedoch keine Rückschlüsse von Amplitude oder Polarität der optogenetisch evozierten Potenziale auf die Antwort des kortikalen Blutflusses auf Lichtstimulation möglich sind, zeigt die überraschenderweise oligäme Reaktion des kontralateralen Barrel-Kortex, über dem morphologisch dem ipsi- und kontralateralen Motorkortex sehr ähnliche evozierte Potenziale abgeleitet wurden. Eine solche oligäme Reaktion ist in der Literatur bisher nicht explizit beschrieben. Möglicherweise wurde eine ähnliche oligäme Reaktion der kontralateralen homotopen Kortexhälfte jedoch in einer Studie mit IOSI in wachen Mäusen detektiert. ³³ Im Gegensatz hierzu und zu unseren Ergebnissen konnte eine kürzliche Studie von Kozberg et al. ⁴⁹ in erwachsenen Mäusen keine Abnahme der neuronalen Aktivität in der homotopen kontralateralen Kortexregion während taktile Schnurrhaarstimulation feststellen. Dies könnte durch die in der Studie verwendete tiefe Anästhesie mit Urethan erklärbar sein, die die Detektion einer weiteren Abnahme der bereits supprimierten neuronalen Aktivität während der Stimulation unmöglich macht. ⁵⁰ ⁵¹ In unserer Studie wurde hingegen nach der operativen Vorbereitung unter Anästhesie mit Isofluran auf eine Sedierung mit Chloralhydrat gewechselt.

Wir denken, dass die in unseren elektrophysiologischen Experimenten über dem

kontralateralen Barrel-Kortex aufgezeichneten evozierten Potenziale über transkallosale Verbindungen durch kortikale Neurone der Lamina II/III vermittelt wurden, die die interhemisphärische Inhibition von Neuronen der Lamina V vermitteln.^{52, 53} Damit konsistent konnten wir eine inhibitorische Verbindung zwischen ipsi- und kontralateralem Barrel-Kortex in unserem Modell durch die interhemisphärische Inhibition von somatosensibel evozierten Potenzialen durch optogenetisch evozierte Potenziale demonstrieren. Somit könnte die in unserer Studie beobachtete Oligämie des kontralateralen Barrel-Kortex direkt durch inhibitorische Verbindungen zwischen den Hemisphären vermittelt sein. Weitere Studien sind erforderlich, um zu verstehen, welcher Subtyp von Neuronen diese Oligämie und die Inhibition der somatosensibel evozierten Potenziale vermittelt. Zusammenfassend sind diese Beobachtungen eine gute Reflektion bekannter Konnektivität des Kortex.

7.3 Neurovaskuläre Entkopplung im optogenetischen Modell

Iordanova et al. fanden in ihrer Studie, dass die neurovaskuläre Kopplung während der optogenetischen Kontrolle glutamaterger Neuronen weitgehend der eines sensorischen Reizes entspricht.²⁰ Dem widersprechen die Ergebnisse von Scott et al.,⁵⁴ die optogenetisch induzierte hämodynamische Antworten unabhängig von intrakortikaler glutamaterger synaptischer Transmission beobachten konnten. Diese widersprüchlichen Ergebnisse liegen möglicherweise an der Invasivität der lokalen pharmakologischen Blockade von ionotropen Glutamatrezeptoren. Um weitere Gemeinsamkeiten zwischen der optogenetischen Hyperämie und der physiologischen neurovaskulären Kopplung zu etablieren, untersuchten wir deswegen nicht invasiv den Einfluss einer experimentell induzierten kortikalen Streudepolarisierung auf die funktionelle Hyperämie und fanden, dass die neurovaskuläre Reaktion in unserem optogenetischen Modell hierdurch ebenso entkoppelt wird wie in nicht-optogenetischen Modellen.⁴²

7.4 Stärken und Limitationen des Modells

Unter Zusammenschau dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass optogenetisch induzierte Veränderungen des zerebralen Blutflusses signifikante mechanistische

Überschneidungen mit der neurovaskulären Kopplung haben. Darüber hinaus denken wir, dass unser in dieser Arbeit etabliertes Modell entscheidende Vorteile gegenüber vorangegangenen Arbeiten besitzt. Dazu zählt in erster Linie die nur minimale Invasivität mit Erhaltung der Schädelkalotte, während andere Modelle eine Kraniotomie erfordern.^{20, 26, 32, 34} Ein weiterer entscheidender Vorteil des optogenetischen Ansatzes ist die Möglichkeit der direkten und gezielten Aktivierung der zu untersuchenden kortikalen Region. Herkömmliche Modelle der neurovaskulären Kopplung basieren auf der peripheren, in der Regel somatosensiblen Stimulation,^{18, 19, 20, 49} sodass eine transsynaptische Übertragung über multiple subkortikale Strukturen stattfindet. Falls die neurovaskuläre Kopplung in einem Krankheitsmodell untersucht werden soll, könnte dies Ergebnisse verfälschen, falls der Krankheitsprozess auch die subkortikalen Bahnen, die den Stimulus übertragen, schädigt oder modifiziert.

Da der zerebrale Blutfluss trotz Autoregulation teilweise vom systemischen Blutdruck abhängt und durch Blutdruckschwankungen beeinflusst werden kann,⁵⁵ führten wir ein kontinuierliches Blutdruckmonitoring durch und berechneten den zerebrovaskulären Widerstand als zweites Maß neben dem zerebralen Blutfluss. Dies wurde in einigen vorangegangenen Studien nicht berücksichtigt.^{26, 33, 34}

Zuletzt ist als Vorteil unserer Arbeit hervorzuheben, dass wir kontinuierlich das akzidentelle Auftreten einer kortikalen Streudepolarisierung überwachten, da diese, wie in dieser Arbeit demonstriert, lang anhaltende Veränderungen des zerebralen Blutflusses verursacht. Mögliche Störfaktoren, wie einen Einfluss von weißem Raumlicht auf den zerebralen Blutfluss von Thy1-ChR2-YFP-Mäusen, einen Effekt der Stimulation mit blauem Licht unabhängig einer ChR2-Aktivierung auf den kortikalen Blutfluss, sowie eine Erhöhung der kortikalen Temperatur durch Lichtstimulation, schlossen wir in unserer Studie aus.

Neben den oben erläuterten Vorteilen unseres Modells sind einige Limitationen zu berücksichtigen. Eine der offensichtlichsten Limitationen ist die Beschränkung der Anwendung auf den Kortex, aufgrund der verwendeten Bildgebung des zerebralen Blutflusses mittels Laser Speckle Flowmetry. Weiterhin ist kürzlich eine Licht-induzierte Vasodilatation in Wildtyp-Mäusen beschrieben worden.⁴¹ Möglicherweise im Zusammenhang hiermit fanden wir eine Erhöhung des zerebralen Blutflusses durch weißes Licht des Operationsmikroskops auch in Wildtyp-Mäusen. Auch wenn wir keinen ähnlichen Einfluss des Raumlichts feststellen konnten, könnten somit dennoch die hyperämischen Antworten in unserer Studie überschätzt und die oligämischen Antworten

unterschätzt worden sein. Als alternative Erklärung ist denkbar, dass das Licht des Operationsmikroskops über eine Hyperthermie zu einer Vasodilatation und somit Zunahme des kortikalen Blutflusses führte.

Da die Expression von ChR2-YFP regional verschieden ist,³⁹ ist der Vergleich von verschiedenen Regionen innerhalb desselben Versuchstiers erschwert. Das Modell eignet sich besser zum Vergleich der gleichen Region in verschiedenen Kohorten. Weiterhin ist als Limitation das männliche Geschlecht sowie das relativ junge Alter der Versuchstiere (12 – 32 Wochen) zu bedenken. Auch wenn die Erforschung des Einflusses des Geschlechts auf die neurovaskuläre Kopplung noch am Anfang steht, gibt es Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede.^{56, 57, 58} Die mit dem Alter zunehmende mikrovaskuläre Dysfunktion bis hin zur neurovaskulären Entkopplung ist bekannt.⁵⁹ Somit könnten unsere Ergebnisse in senilen Mäusen möglicherweise weniger reproduzierbar sein.

7.5 Ausblick auf weitere Forschung und klinische Relevanz

Unsere Daten zeigten, dass optogenetisch induzierte funktionelle Hyperämie signifikante Überschneidungen mit der physiologischen funktionellen Hyperämie aufweist und in Kombination mit Laser Speckle Flowmetry als minimal invasives Modell zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung *in vivo* genutzt werden kann. Direkte Möglichkeiten für eine klinische Anwendung ergeben sich hieraus noch nicht. Aufgrund der großen Bedeutung der (abnormalen) neurovaskulären Kopplung in der Pathophysiologie von neurovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel ischämischer Hirninfarkt, Subarachnoidalblutung, arterielle Hypertonie oder Morbus Alzheimer,^{2, 3, 4} gibt es jedoch einen großen Bedarf an validen Tiermodellen zur longitudinalen Charakterisierung der neurovaskulären Kopplung in diesen Pathologien. In einem nächsten Schritt ist also eine Kombination des in dieser Arbeit etablierten Modells mit bereits etablierten Tiermodellen der zu untersuchenden Pathologien denkbar. Beispielsweise könnte so – unter Berücksichtigung der unter 7.4 erläuterten Vor- und Nachteile unseres Modells – die neurovaskuläre Kopplung in einem Tiermodell des ischämischen Hirninfarkts untersucht werden. Falls hiermit bestätigt werden würde, dass eine abnorme neurovaskuläre Kopplung tatsächlich eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarkts (oder einer anderen Pathologie) spielen könnte, wäre ein möglicher Angriffspunkt für eine

therapeutische Intervention identifiziert, sodass in einem nächsten Schritt verschiedene therapeutische Interventionen im Tiermodell in Bezug auf klinische Endpunkte getestet werden könnten. Somit könnte letztendlich auch eine Grundlage für eine klinische Studie mit Patient*innen geschaffen werden.

Neben der weiteren Anwendung des in dieser Arbeit etablierten Modells in Kombination mit anderen Modellen und longitudinalen Studien ist jedoch auch weitere Forschung notwendig, um die Funktionsweise unseres Modells besser zu verstehen. Trotz der in dieser Studie demonstrierten signifikanten Überschneidungen der optogenetisch induzierten neurovaskulären Kopplung mit der neurovaskulären Kopplung durch einen peripher induzierten (z.B. somatosensiblen) Reiz, könnten die Mechanismen und Mediatoren der neurovaskulären Kopplung verschieden sein. Es ist weitere Forschung notwendig, um diese genauer zu charakterisieren. Insbesondere die erstmalig in unserer Studie beschriebene optogenetisch induzierte Oligämie des kontralateralen Barrel-Kortex, welche direkt durch inhibitorische Verbindungen zwischen den Hemisphären vermittelt sein könnte, erfordert weitere Studien, um zu verstehen, welcher Subtyp von Neuronen diese Oligämie und die wahrscheinlich interhemisphärische Inhibition der somatosensibel evozierten Potenziale vermittelt.

Je nach Fragestellung kann es für zukünftige Anwendungen unseres Modells auch relevant sein, die genaue Eindringtiefe des Lichtstimulus in das Kortexgewebe zu kennen, um genauer eingrenzen zu können, welche Zellschichten durch die Lichtstimulation aktiviert werden. Unsere Überlegungen zur Funktionsweise unseres Modells stützen sich lediglich auf Schätzungen zur Eindringtiefe des Lichtstimulus, die auf Studien mit ähnlichen Tiermodellen basieren. Auch bezüglich dieser Frage sind also weitere Experimente notwendig, um eine genauere Aussage über die Funktionsweise unseres Modells zu treffen und seine Validität zu erhöhen.

Trotz dieser offenen Fragen und somit noch notwendigen mechanistischen Studien zur Funktionsweise unseres Modells sind wir zuversichtlich, dass es als neuartige und minimal-invasive Methode von uns und anderen Forscher*innen verwendet werden kann, um die neurovaskuläre Kopplung in Modellen von neurovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen.

8 Literaturverzeichnis

-
- ¹ Huneau C, Benali H, Chabriat H. Investigating Human Neurovascular Coupling Using Functional Neuroimaging: A Critical Review of Dynamic Models. *Front Neurosci*. 2015 Dec 18;9:467. doi: 10.3389/fnins.2015.00467.
- ² Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Jan;100(1):328-35. doi: 10.1152/jappphysiol.00966.2005. .
- ³ Kazama K, Wang G, Frys K, Anrather J, Iadecola C. Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Nov;285(5):H1890-9. doi: 10.1152/ajpheart.00464.2003. Epub 2003 Aug 7.
- ⁴ Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 22;109(21):E1387-95. doi: 10.1073/pnas.1121359109. Epub 2012 Apr 30.
- ⁵ Chaigneau E, Oheim M, Audinat E, Charpak S. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):13081-6. doi: 10.1073/pnas.2133652100. Epub 2003 Oct 20.
- ⁶ Raichle ME, Mintun MA. Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:449-76. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112819.
- ⁷ Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):232-43. doi: 10.1038/nature09613.
- ⁸ Golanov EV, Reis DJ. Nitric oxide and prostanoids participate in cerebral vasodilation elicited by electrical stimulation of the rostral ventrolateral medulla. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994 May;14(3):492-502. doi: 10.1038/jcbfm.1994.61.
- ⁹ Li J, Iadecola C. Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex. *Neuropharmacology*. 1994 Nov;33(11):1453-61. doi: 10.1016/0028-3908(94)90049-3.
- ¹⁰ Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017 Sep 27;96(1):17-42. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.030.
- ¹¹ Freeman RD, Li B. Neural-metabolic coupling in the central visual pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016 Oct 5;371(1705):20150357. doi: 10.1098/rstb.2015.0357.
- ¹² Ko KR, Ngai AC, Winn HR. Role of adenosine in regulation of regional cerebral blood flow in sensory cortex. *Am J Physiol*. 1990 Dec;259(6 Pt 2):H1703-8. doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.6.H1703.
- ¹³ Fox PT, Raichle ME. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Feb;83(4):1140-4. doi: 10.1073/pnas.83.4.1140.
- ¹⁴ Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci*. 2002 Dec;25(12):621-5. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02264-6.

-
- ¹⁵ Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):232-43. doi: 10.1038/nature09613.
- ¹⁶ Drew PJ, Shih AY, Kleinfeld D. Fluctuating and sensory-induced vasodynamics in rodent cortex extend arteriole capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 17;108(20):8473-8. doi: 10.1073/pnas.1100428108. Epub 2011 May 2.
- ¹⁷ Kim KJ, Ramiro Diaz J, Iddings JA, Filosa JA. Vasculo-Neuronal Coupling: Retrograde Vascular Communication to Brain Neurons. *J Neurosci*. 2016 Dec 14;36(50):12624-12639. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1300-16.2016. Epub 2016 Nov 7.
- ¹⁸ Ma J, Ayata C, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA. Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression. *Am J Physiol*. 1996 Mar;270(3 Pt 2):H1085-90. doi: 10.1152/ajpheart.1996.270.3.H1085.
- ¹⁹ Ayata C, Ma J, Meng W, Huang P, Moskowitz MA. L-NA-sensitive rCBF augmentation during vibrissal stimulation in type III nitric oxide synthase mutant mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Jul;16(4):539-41. doi: 10.1097/00004647-199607000-00002.
- ²⁰ Iordanova B, Vazquez AL, Poplawsky AJ, Fukuda M, Kim SG. Neural and hemodynamic responses to optogenetic and sensory stimulation in the rat somatosensory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Jun;35(6):922-32. doi: 10.1038/jcbfm.2015.10. Epub 2015 Feb 11.
- ²¹ Buxton RB. The physics of functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Rep Prog Phys*. 2013 Sep;76(9):096601. doi: 10.1088/0034-4885/76/9/096601. Epub 2013 Sep 4.
- ²² Strangman G, Culver JP, Thompson JH, Boas DA. A quantitative comparison of simultaneous BOLD fMRI and NIRS recordings during functional brain activation. *Neuroimage*. 2002 Oct;17(2):719-31.
- ²³ Hillman EM. Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *J Biomed Opt*. 2007 Sep-Oct;12(5):051402. doi: 10.1117/1.2789693.
- ²⁴ Morone KA, Neimat JS, Roe AW, Friedman RM. Review of functional and clinical relevance of intrinsic signal optical imaging in human brain mapping. *Neurophotonics*. 2017 Jul;4(3):031220. doi: 10.1117/1.NPh.4.3.031220. Epub 2017 Jun 9.
- ²⁵ Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J, Takaku A. The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery*. 1995 Feb;36(2):358-64. doi: 10.1227/00006123-199502000-00016.
- ²⁶ Vazquez AL, Fukuda M, Crowley JC, Kim SG. Neural and hemodynamic responses elicited by forelimb- and photo-stimulation in channelrhodopsin-2 mice: insights into the hemodynamic point spread function. *Cereb Cortex*. 2014 Nov;24(11):2908-19. doi: 10.1093/cercor/bht147. Epub 2013 Jun 12.
- ²⁷ Liao LD, Tsytsarev V, Delgado-Martínez I, Li ML, Erzurumlu R, Vipin A, Orellana J, Lin YR, Lai HY, Chen YY, Thakor NV. Neurovascular coupling: in vivo optical techniques for functional brain imaging. *Biomed Eng Online*. 2013 Apr 30;12:38. doi: 10.1186/1475-925X-12-38.
- ²⁸ Miao P, Rege A, Li N, Thakor NV, Tong S. High resolution cerebral blood flow imaging by registered laser speckle contrast analysis. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2010 May;57(5):1152-7. doi: 10.1109/TBME.2009.2037434. Epub 2010 Feb 5.
- ²⁹ Ayata C, Dunn AK, Gursoy-OZdemir Y, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Jul;24(7):744-55. doi: 10.1097/01.WCB.0000122745.72175.D5.

-
- ³⁰ Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:389-412. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113817.
- ³¹ Christie IN, Wells JA, Kasparov S, Gourine AV, Lythgoe MF. Volumetric Spatial Correlations of Neurovascular Coupling Studied using Single Pulse Opto-fMRI. *Sci Rep.* 2017 Feb 8;7:41583. doi: 10.1038/srep41583.
- ³² Uhlirova H, Kiliç K, Tian P, Thunemann M, Desjardins M, Saisan PA, Sakadžić S, Ness TV, Mateo C, Cheng Q, Weldy KL, Razoux F, Vandenberghe M, Cremonesi JA, Ferri CG, Nizar K, Sridhar VB, Steed TC, Abashin M, Fainman Y, Masliah E, Djurovic S, Andreassen OA, Silva GA, Boas DA, Kleinfeld D, Buxton RB, Einevoll GT, Dale AM, Devor A. Cell type specificity of neurovascular coupling in cerebral cortex. *Elife.* 2016 May 31;5:e14315. doi: 10.7554/eLife.14315.
- ³³ Bauer AQ, Kraft AW, Baxter GA, Wright PW, Reisman MD, Bice AR, Park JJ, Bruchas MR, Snyder AZ, Lee JM, Culver JP. Effective Connectivity Measured Using Optogenetically Evoked Hemodynamic Signals Exhibits Topography Distinct from Resting State Functional Connectivity in the Mouse. *Cereb Cortex.* 2018 Jan 1;28(1):370-386. doi: 10.1093/cercor/bhx298.
- ³⁴ Pisauro MA, Dhruv NT, Carandini M, Benucci A. Fast hemodynamic responses in the visual cortex of the awake mouse. *J Neurosci.* 2013 Nov 13;33(46):18343-51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2130-13.2013.
- ³⁵ Lee JH, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim DS, Fenno LE, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature.* 2010 Jun 10;465(7299):788-92. doi: 10.1038/nature09108.
- ³⁶ Böhm M, Chung DY, Gómez CA, Qin T, Takizawa T, Sadeghian H, Sugimoto K, Sakadžić S, Yaseen MA, Ayata C. Neurovascular coupling during optogenetic functional activation: Local and remote stimulus-response characteristics, and uncoupling by spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020 Apr;40(4):808-822. doi: 10.1177/0271678X19845934. Epub 2019 May 7.
- ³⁷ Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 2007 Apr 19;54(2):205-18. doi: 10.1016/j.neuron.2007.03.005.
- ³⁸ Slupe AM, Kirsch JR. Effects of anesthesia on cerebral blood flow, metabolism, and neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018 Dec;38(12):2192-2208. doi: 10.1177/0271678X18789273. Epub 2018 Jul 16.
- ³⁹ Chung DY, Sadeghian H, Qin T, Lule S, Lee H, Karakaya F, Goins S, Oka F, Yaseen MA, Houben T, Tolner EA, van den Maagdenberg AMJM, Whalen MJ, Sakadžić S, Ayata C. Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cereb Cortex.* 2019 Mar 1;29(3):1150-1161. doi: 10.1093/cercor/bhy021.
- ⁴⁰ Briers JD, Fercher AF. Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982 Feb;22(2):255-9.
- ⁴¹ Rungta RL, Osmanski BF, Boido D, Tanter M, Charpak S. Light controls cerebral blood flow in naive animals. *Nat Commun.* 2017 Jan 31;8:14191. doi: 10.1038/ncomms14191.
- ⁴² Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev.* 2015 Jul;95(3):953-93. doi: 10.1152/physrev.00027.2014.

-
- ⁴³ Kalmbach AS, Waters J. Brain surface temperature under a craniotomy. *J Neurophysiol.* 2012 Dec;108(11):3138-46. doi: 10.1152/jn.00557.2012. Epub 2012 Sep 12.
- ⁴⁴ Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, Meltzer LA, Mogri MZ, Schneider MB, Deisseroth K. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng.* 2007 Sep;4(3):S143-56. doi: 10.1088/1741-2560/4/3/S02. Epub 2007 May 31.
- ⁴⁵ Mattis J, Tye KM, Ferenczi EA, Ramakrishnan C, O'Shea DJ, Prakash R, Gunaydin LA, Hyun M, Fenno LE, Gradinaru V, Yizhar O, Deisseroth K. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods.* 2011 Dec 18;9(2):159-72. doi: 10.1038/nmeth.1808.
- ⁴⁶ Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 2005 Sep;8(9):1263-8. doi: 10.1038/nn1525. Epub 2005 Aug 14.
- ⁴⁷ Zakiewicz IM, Bjaalie JG, Leergaard TB. Brain-wide map of efferent projections from rat barrel cortex. *Front Neuroinform.* 2014 Feb 5;8:5. doi: 10.3389/fninf.2014.00005.
- ⁴⁸ Fabri M, Burton H. Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats. *J Comp Neurol.* 1991 Sep 15;311(3):405-24. doi: 10.1002/cne.903110310.
- ⁴⁹ Kozberg MG, Ma Y, Shaik MA, Kim SH, Hillman EM. Rapid Postnatal Expansion of Neural Networks Occurs in an Environment of Altered Neurovascular and Neurometabolic Coupling. *J Neurosci.* 2016 Jun 22;36(25):6704-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2363-15.2016.
- ⁵⁰ Shumkova V, Sitdikova V, Rechapov I, Leukhin A, Minlebaev M. Effects of urethane and isoflurane on the sensory evoked response and local blood flow in the early postnatal rat somatosensory cortex. *Sci Rep.* 2021 May 5;11(1):9567. doi: 10.1038/s41598-021-88461-8.
- ⁵¹ Huh Y, Cho J. Urethane anesthesia depresses activities of thalamocortical neurons and alters its response to nociception in terms of dual firing modes. *Front Behav Neurosci.* 2013 Oct 10;7:141. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00141.
- ⁵² Palmer LM, Schulz JM, Murphy SC, Ledergerber D, Murayama M, Larkum ME. The cellular basis of GABA(B)-mediated interhemispheric inhibition. *Science.* 2012 Feb 24;335(6071):989-93. doi: 10.1126/science.1217276.
- ⁵³ Ferbert A, Priori A, Rothwell JC, Day BL, Colebatch JG, Marsden CD. Interhemispheric inhibition of the human motor cortex. *J Physiol.* 1992;453:525-46. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019243.
- ⁵⁴ Scott NA, Murphy TH. Hemodynamic responses evoked by neuronal stimulation via channelrhodopsin-2 can be independent of intracortical glutamatergic synaptic transmission. *PLoS One.* 2012;7(1):e29859. doi: 10.1371/journal.pone.0029859. Epub 2012 Jan 10.
- ⁵⁵ Dalkara T, Irikura K, Huang Z, Panahian N, Moskowitz MA. Cerebrovascular responses under controlled and monitored physiological conditions in the anesthetized mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995 Jul;15(4):631-8. doi: 10.1038/jcbfm.1995.78.
- ⁵⁶ Martens EG, Peeters LL, Gommer ED, Mess WH, van de Vosse FN, Passos VL, Reulen JP. The visually-evoked cerebral blood flow response in women with a recent history of preeclampsia and/or eclampsia. *Ultrasound Med Biol.* 2009 Jan;35(1):1-7. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.08.004. Epub 2008 Oct 8.
- ⁵⁷ Kaufmann C, Elbel GK, Gössl C, Pütz B, Auer DP. Frequency dependence and gender effects in visual cortical regions involved in temporal frequency dependent pattern processing. *Hum Brain Mapp.* 2001 Sep;14(1):28-38. doi: 10.1002/hbm.1039.

⁵⁸ Duque C, Feske SK, Sorond FA. Cerebrovascular Hemodynamics in Women. *Semin Neurol*. 2017 Dec;37(6):679-688. doi: 10.1055/s-0037-1608881. Epub 2017 Dec 21.

⁵⁹ Toth P, Tarantini S, Csiszar A, Ungvari Z. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017 Jan 1;312(1):H1-H20. doi: 10.1152/ajpheart.00581.2016. Epub 2016 Oct 28.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maximilian Böhm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Optogenetisch induzierte funktionelle Hyperämie als Modell der neurovaskulären Kopplung *in vivo* (*Optogenetically induced functional hyperemia as a model of neurovascular coupling in vivo*) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Böhm M, Chung DY, Gómez CA, Qin T, Takizawa T, Sadeghian H, Sugimoto K, Sakadžić S, Yaseen MA, Ayata C. Neurovascular coupling during optogenetic functional activation: Local and remote stimulus-response characteristics, and uncoupling by spreading depression. J Cereb Blood Flow Metab. 2020 Apr;40(4):808-822. [doi: 10.1177/0271678X19845934](https://doi.org/10.1177/0271678X19845934). Epub 2019 May 7.

Beitrag im Einzelnen:

- Konzeption und Planung der Experimente in Rücksprache mit Ayata C
- Praktische Durchführung aller Experimente der Studie
- Auswertung und Organisation aller Rohdaten (Die Auswertung der mittels Laser Speckle Flowmetry gewonnenen Rohdaten erfolgte durch eigens hierfür konzipierte MATLAB® Codes, die von den Autoren Gómez CA, Sakadžić S und Yaseen MA geschrieben wurden. Die statistische Analyse erfolgte durch Chung DY.)
- Literaturrecherche, Verfassung des ersten Manuskripts für die Publikation und Begleitung der Überarbeitung in Zusammenarbeit mit allen Koautor*innen bis zur finalen Version
- Erstellung aller Tabellen und Abbildungen der Publikation in Zusammenarbeit mit Ayata C.
- Anteil an der Publikation mindestens 60 %

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 261 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	40,834	32.635	0.069940
2	NATURE NEUROSCIENCE	59,426	19.912	0.153710
3	ACTA NEUROPATHOLOGICA	18,783	15.872	0.041490
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	25,391	15.557	0.040790
5	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	8,900	15.071	0.010130
6	Annual Review of Neuroscience	13,320	14.675	0.016110
7	NEURON	89,410	14.318	0.216730
8	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	13,065	14.163	0.015550
9	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	42,494	11.982	0.056910
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	18,460	11.640	0.047200
11	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	9,079	11.613	0.008600
12	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,061	11.439	0.026860
13	BRAIN	52,061	10.840	0.075170
14	SLEEP MEDICINE REVIEWS	6,080	10.602	0.010720
15	ANNALS OF NEUROLOGY	37,251	10.244	0.053390
16	Translational Stroke Research	2,202	8.266	0.005260
17	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	24,279	8.037	0.048460
18	NEUROSCIENTIST	4,738	7.461	0.008730
19	NEURAL NETWORKS	10,086	7.197	0.015290
20	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	3,924	6.875	0.006040
21	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	24,537	6.544	0.042870
22	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	14,190	6.541	0.034670
23	Molecular Neurodegeneration	3,489	6.426	0.009850
24	CEREBRAL CORTEX	29,570	6.308	0.058970
25	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	12,583	6.306	0.026850
26	BRAIN PATHOLOGY	4,952	6.187	0.007750
27	Brain Stimulation	4,263	6.120	0.014510
28	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,654	6.059	0.006350
29	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,450	6.045	0.028280
30	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	176,157	5.970	0.265950
31	Molecular Autism	1,679	5.872	0.006320
31	Translational Neurodegeneration	589	5.872	0.002280
33	GLIA	13,417	5.846	0.020530
34	Neurotherapeutics	3,973	5.719	0.008980
35	PAIN	36,132	5.559	0.038000
36	NEUROIMAGE	92,719	5.426	0.152610
37	Acta Neuropathologica Communications	2,326	5.414	0.011550
38	Multiple Sclerosis Journal	10,675	5.280	0.021890

Publikation

Böhm M, Chung DY, Gómez CA, Qin T, Takizawa T, Sadeghian H, Sugimoto K, Sakadžić S, Yaseen MA, Ayata C. Neurovascular coupling during optogenetic functional activation: Local and remote stimulus-response characteristics, and uncoupling by spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020 Apr;40(4):808-822. <https://doi.org/doi:10.1177/0271678X19845934>. Epub 2019 May 7.

Artikel: Seiten 43 – 57

Supplemental Material: Seiten 58 – 62

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Janach GMS, **Böhm M**, Döhne N, Kim HR, Rosário M, Strauss U. Interferon- γ enhances neocortical synaptic inhibition by promoting membrane association and phosphorylation of GABA_A receptors in a protein kinase C-dependent manner. *Brain Behav Immun*. 2022;101:153-164. doi:10.1016/j.bbi.2022.01.001

Sugimoto K, Chung DY, **Böhm M**, Fischer P, Takizawa T, Aykan SA, Qin T, Yanagisawa T, Harriott A, Oka F, Yaseen MA, Sakadžić S, Ayata C. Peri-Infarct Hot-Zones Have Higher Susceptibility to Optogenetic Functional Activation-Induced Spreading Depolarizations. *Stroke*. 2020 Aug;51(8):2526-2535. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.029618. Epub 2020 Jul 9.

Takizawa T, Qin T, Lopes de Morais A, Sugimoto K, Chung JY, Morsett L, Mulder I, Fischer P, Suzuki T, Anzabi M, **Böhm M**, Qu WS, Yanagisawa T, Hickman S, Khoury JE, Whalen MJ, Harriott AM, Chung DY, Ayata C. Non-invasively triggered spreading depolarizations induce a rapid pro-inflammatory response in cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020 May;40(5):1117-1131. doi: 10.1177/0271678X19859381. Epub 2019 Jun 26.

Böhm M, Chung DY, Gómez CA, Qin T, Takizawa T, Sadeghian H, Sugimoto K, Sakadžić S, Yaseen MA, Ayata C. Neurovascular coupling during optogenetic functional activation: Local and remote stimulus-response characteristics, and uncoupling by spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020 Apr;40(4):808-822. doi: 10.1177/0271678X19845934. Epub 2019 May 7.

Schlunk F, **Böhm M**, Boulouis G, Qin T, Arbel M, Tamim I, Fischer P, Bacskai BJ, Frosch MP, Endres M, Greenberg SM, Ayata C. Secondary Bleeding During Acute Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*. 2019 May;50(5):1210-1215. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021732.

Chung DY, Sugimoto K, Fischer P, **Böhm M**, Takizawa T, Sadeghian H, Morais A, Harriott A, Oka F, Qin T, Henninger N, Yaseen MA, Sakadžić S, Ayata C. Real-time non-invasive in vivo visible light detection of cortical spreading depolarizations in mice. *J Neurosci Methods*. 2018 Nov 1;309:143-146. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.09.001. Epub 2018 Sep 5.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Endres und Dr. Frieder Schlunk möchte ich mich für die Betreuung meiner Dissertation bedanken, sowie für die Vermittlung und Ermöglichung meines Auslandsaufenthalts im Labor von Prof. Dr. Cenk Ayata.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Cenk Ayata und seinem gesamten Team für die Bereitschaft, mich in ihrem Labor willkommen zu heißen. Ich danke ihnen für ihre Zeit und Geduld bei meiner Einarbeitung, für das Teilen ihres Wissens und ihrer Ideen und für die stete fachlich kompetente und herzliche Unterstützung bei kleinen und großen Problemen des Alltags.

Beim Boehringer Ingelheim Fonds bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeiten der Weiterbildung im Rahmen meiner *MD fellowship*.

Meinen Eltern, Monika und Gerhard Böhm, und meiner Schwester, Dr. Sophie Böhm, danke ich für die unermüdliche Unterstützung und Motivation, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.