

V Ergebnisse

V.1 SPW-R *in vitro*.

Im Hippocampus-Schnittpräparat von C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen gelang es unter Normalbedingungen, d.h. ohne Modifikation des extrazellulären Mediums, *sharp waves* zu beobachten (Abb. 2 hier und Abb. 1, 2 in (2)). Sie traten rhythmisch mit Frequenzen von 2.7 ± 1.5 Hz in CA3 und 2.7 ± 1.1 Hz in CA1 auf ($n = 12$ aus gepaarten Ableitungen; nicht verschieden, $P > 0.05$; siehe (2), Abb. 1 und 3A). Analog zu den *in vivo* beschriebenen SPW-R-Signalen waren dem *in vitro*-Äquivalent kleinamplitudige, hochfrequente *ripple*-Oszillationen von ~ 200 Hz aufgelagert (siehe Datenbeispiel in Abb. 1A in (2), das Nebenmaximum bei 200-250 Hz im Leistungsdichtespektrum in Abb. 2C hier und Abb. 1B in (2) sowie das bei 150-300 Hz Bandpass-gefilterte Signal, das die isolierten *ripple*-Oszillationen darstellt).

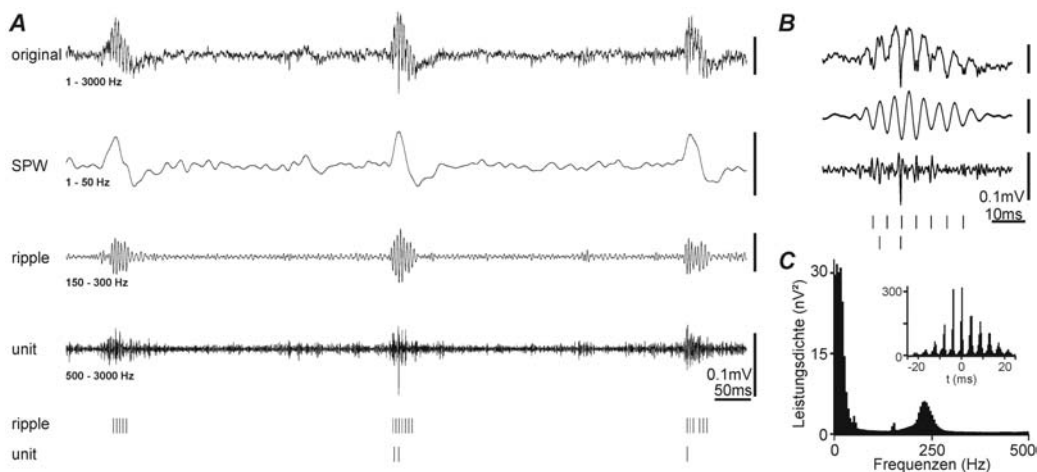


Abbildung 2 SPW-R *in vitro*. Aufzeichnung aus der Pyramidenzellschicht der Region CA3b aus dem Hippocampus der Maus. **A**, *original*: Originalregistrierung; *SPW*: bei 50 Hz Tiefpass-gefiltertes Signal; *ripple*: die 150-300 Hz Bandpass-Filterung verdeutlicht die ~ 200 Hz-Oszillationen, während ein Hochpass-Filter (500-3000 Hz) *unit*-Aktivität isoliert (*unit*). Die Markierungen der beiden untersten Spuren zeigen Ereignisse, die aus den *ripple*- bzw. *unit*-Daten abgeleitet wurden. **B**, zeitlich expandiert dargestellter SPW-R (entsprechend dem mittleren Ereignis in A). Beachte, dass *units* nicht auf jedem Zyklus der *ripple*-Oszillation entladen, was ausschließt, dass die Oszillation von nur einer Zelle generiert wird und somit den Netzwerkcharakter des Phänomens nachweist. **C**, Leistungsdichtespektrum, bestimmt aus 5 min Daten der in A gezeigten Messung. Beachte die beiden Maxima des Spektrums, welche die dominierenden Frequenzen des Signals bei ~ 3 Hz (SPWs) und ~ 200 Hz (*ripples*) widerspiegeln. **Einsatz**: Kreuzkorrelationsfunktion von *unit*- mit *ripple*-Ereignissen (5 min) aus der in A gezeigten Messung. Die Maxima sind mit ~ 5 ms moduliert, was Frequenzen von ~ 200 Hz entspricht. Die Ordinate zeigt die Anzahl korrelierter Ereignisse.

Bei gepaarten Ableitungen aus den Regionen CA3 und CA1 zeigte sich weder ein Unterschied in der Inzidenz der *ripples* (CA3: 1.9 ± 1.5 Hz versus CA1: 1.9 ± 1.0 Hz; $P > 0.9$; siehe Abb. 3B in (2)), noch eine Differenz der Anzahl der registrierten Oszillationszyklen pro *ripple* (4.1 ± 0.6 in CA3 und 4.0 ± 0.6 in CA1, $P > 0.9$; siehe (2), Abb. 3E). Hingegen war die mittlere Oszillationsfrequenz der *ripples* in CA3 niedriger als in CA1 (193 ± 14 Hz in CA3 versus 210 ± 16 Hz in CA1; $P < 0.05$; Abb. 3D, F in (2)).

V.2 Räumliche Ausbreitung.

Zur Bestimmung ihres Generationsortes wurden SPW–R mit Mehrfachableitungen simultan aus verschiedenen Regionen des Hippocampus abgeleitet und die Propagationszeiten mit Kreuzkorrelationsfunktionen quantifiziert (Abb. 4, 5 in (2)). Dabei zeigte sich, dass SPW–R, die in CA3 abgeleitet wurden, zeitlich vor den Signalen der Area CA1 auftraten. Abhängig von den Ableitpositionen ergaben sich Überleitzeiten von 7.4 ± 4.3 ms ($n = 10$ aus acht Tieren). Aus dem Subiculum abgeleitete SPW–R hatten gegenüber CA1-Signalen Latenzen von 6.1 ± 2.8 ms ($n = 8$ aus sechs Tieren), traten also nach den in CA3 und CA1 gemessenen auf. Auch aus der Area dentata abgeleitete SPW–R traten später als die in der CA3-Region registrierten auf; die Latenzen lagen hier zwischen 3.0 ms und 9.5 ms (6.2 ± 2.5 ms; $n = 6$ aus sechs Tieren; siehe auch Abb. 4A in (2)). Insgesamt zeigte sich also, dass der Ort der Initiierung von SPW–R innerhalb der Area CA3 liegt und SPW–R dann in die übrigen Regionen des Hippocampus propagieren.

Weiterhin wurden in den Regionen CA3 und CA1 simultan die extrazellulären Potentiale orthogonal zur Pyramidenzellschicht gemessen und laminare Spannungsprofile aufgezeichnet ($n = 2$ für CA3 (nicht gezeigt) und $n = 8$ für CA1; Abb. 7 in (2)). Diese zeigten positive Potentialverläufe in den somatischen Regionen (Stratum oriens/pyramidale) mit einer abrupten Phasenumkehr in den dendritischen Regionen (Stratum radiatum/lacunosum-moleculare). Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass der unmittelbare Reiz zur Auslösung von SPWs in CA1 über die Schaffer-Kollateralen vermittelt wird.

V.3 Pharmakologie von SPW–R.

A) Glutamaterges System.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden grundlegende pharmakologische Eigenschaften von SPW–R untersucht. Zunächst wurde die Rolle der schnellen glutamatergen synaptischen Übertragung getestet. Das Einwaschen des AMPA/Kainat-

Rezeptor-Antagonisten CNQX (20 μM) führte zu einer raschen und reversiblen Blockade von spontanen und stimulationsinduzierten SPW-R ($n = 5$; Abb. 8 in (2)). Der gleiche Effekt war nach Applikation des selektiven AMPA-Rezeptor-Antagonisten GYKI 53655 (20 μM) zu beobachten ($n = 5$; N. Maier und D. Schmitz, unveröffentlicht). Die pharmakologische Blockade des NMDA-Rezeptors mit \pm -APV (30 μM) zeigte hingegen keine Änderung der Inzidenz von SPW-R oder ihrer inneren Struktur ($n = 4$). Sowohl für die Initiierung spontaner SPW-R als auch für die Generierung dieses Phänomens ist die AMPA-Rezeptor-vermittelte glutamaterge Transmission demnach notwendig.

B) GABAerges System.

Die Frage nach der Bedeutung der schnellen GABA_A-Rezeptor-vermittelten Transmission für die Initiierung oder Generierung von SPW-R wurde zunächst im kompletten Hippocampuschnitt untersucht (Abb. 9 in (2)). Die Applikation des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten SR95531 (Gabazine; 3 μM ; $n = 26$) induzierte großamplitudige (> 2 mV messende), epileptiforme Entladungen in den Regionen CA3 und CA1. Da der Ursprung dieser Signale im Gabazine-induzierten „Disinhibitionsmodell“ in der Region CA3-CA2 liegt (27) und diese Ereignisse mögliche Veränderungen an SPW-R unter Blockade des GABA_A-Rezeptors überlagern könnten, wurde nach einem Modell gesucht, in dem die Rolle schneller synaptischer Inhibition ohne Störung durch pathologische Spontanaktivität untersucht werden konnte. Es wurde hierzu der CA1-*minislice* gewählt. An diesem durch Deafferenzierung von Eingängen aus anderen Regionen reduzierten System kann das Gleichgewicht exzitatorischer und inhibitorischer Einflüsse pharmakologisch gestört werden, ohne epileptiforme Aktivität zu induzieren. Die wichtigste Voraussetzung, nämlich das Auftreten spontaner SPW-R auch in diesem Modell, war gegeben (Abb. 6 in (2)): Auch im CA1-*minislice* können SPW-R nachgewiesen werden, wenngleich mit geringerer Inzidenz ($0.7 \pm 0.4 \text{ Hz}$ versus $3.1 \pm 0.6 \text{ Hz}$ in der parallel abgeleiteten isolierten CA3-Region; $n = 6$ aus vier Tieren; $P < 0.05$; Abb. 1 in (3)). Die Wirkung der GABA_A-Rezeptor-Blockade auf SPW-R in diesem Modell war deutlich: Schon bei der niedrigen Konzentration von 0.3 μM unterdrückte Gabazine SPW-R (Abb. 2A in (3)). Um die Potenz der Rezeptorblockade durch Gabazine zu quantifizieren, wurden in Ganzzelleableitungen in der Spannungsklemme verschiedene Konzentrationen auf stimulationsinduzierte inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) getestet: Bereits unter 0.3 μM Gabazine kam es zu einer Amplitudenreduktion

auf $33.1 \pm 10.4\%$ der Kontrolle, bei $1.0 \mu\text{M}$ Gabazine auf $4.8 \pm 3.3\%$ der Kontrolle (sieben bzw. vier Zellen; Abb. 2D-F in (3)).

Es bleibt also festzuhalten, dass die spontane Initiierung von SPW-R an GABA_A-Rezeptor-vermittelte Transmission gekoppelt ist.

V.4 Synchronisierung hochfrequenter *ripple*-Oszillationen.

Um nachzuweisen, dass die Generierung von ~ 200 Hz-*ripples* nicht notwendigerweise an funktionelle GABA_A-Rezeptoren gekoppelt ist, sollte in einem weiteren Schritt versucht werden, SPW-R unter GABA_A-Rezeptor-Blockade zu re-induzieren. Mit einer Druckapplikationseinheit wurde dazu KCl (1M; in ACSF) in die dendritische Region (Stratum radiatum) des CA1-*minislice* eingebracht; damit sollte der exzitatorische Eingang aus der Area CA3 über die Schaffer-Kollateralen imitiert und somit der Reiz für die Generierung von SPW-R in CA1 gegeben werden. Mit der Druckinjektion adäquater Mengen KCl konnten tatsächlich den SPW-R ähnliche Signale hervorgerufen werden (Abb. 3A1,2 in (3)). Um auszuschließen, dass es wegen der lokalen K⁺-Applikation und der dadurch möglichen verstärkten Rekrutierung von Interneuronen (mit extrazellulärer Akkumulation von GABA) zu einer kompetitiven Verdrängung von Gabazine am GABA_A-Rezeptor kommen könnte, wurden mehrere Konzentrationen des Antagonisten getestet; dennoch konnten auch bei hohen Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$) SPW-R-ähnliche Signale mit K⁺-Puffs induziert werden (Abb. 3A1-3 in (3)). Um sicher nachzuweisen, dass trotz der verwendeten hohen Konzentrationen von Gabazine die Synchronisierung der induzierten Oszillationen nicht GABA_A-Rezeptor-vermittelt war, wurde mit scharfen Mikroelektroden in $1 \mu\text{M}$ Gabazine aus Pyramidenzellen abgeleitet und dabei wiederum *sharp waves* und *ripple*-Oszillationen induziert ($n = 5$). Die extrazellulär registrierten SPW-R waren intrazellulär regelmäßig von depolarisierenden Potentialänderungen begleitet (siehe Abb. 3B links in (3)). Auch die aktive Depolarisierung der Zellen durch Injektion positiven Stroms auf Potentiale von ca. -45 mV zeigte keine Phasenumkehr des intrazellulären SPW-Äquivalents in hyperpolarisierende Richtung (Abb. 3B rechts in (3)). Somit konnte eine wesentliche Beteiligung der Cl⁻-getragenen schnellen GABA_A-Rezeptor-vermittelten Inhibition an der Synchronisierung der ~ 200 Hz-Oszillationen sicher ausgeschlossen werden.

Die Analyse des Frequenzgehaltes der induzierten Oszillationen mit Interspike-Intervall-Histogrammen zeigte unter allen experimentellen Bedingungen deutliche Maxima bei 4-5 ms, entsprechend dominierenden Frequenzen von ~ 200 Hz. Auch die Bestimmung

der dominierenden Frequenz induzierter *ripples* durch das erste positive Nebenmaximum in den Autokorrelationsfunktionen zeigte keinen Unterschied zwischen spontanen oder induzierten *ripples* unter Kontrollbedingungen und induzierten Ereignissen in Anwesenheit von 10 μM Gabazine ($227.6 \pm 64.3 \text{ Hz}$ [$n = 12$; induzierte Ereignisse unter Kontrollbedingungen] *versus* $208.2 \pm 27.3 \text{ Hz}$ [$n = 25$; induzierte Ereignisse in 10 μM Gabazine], $P > 0.05$; Abb. 4A-C in (3)). Interessanterweise veränderte auch die zusätzliche Blockade der ionotropen Glutamat-Rezeptoren das Frequenzband der induzierten Oszillationen nur geringfügig (Abb. 4B-C in (3)).

Daher wurde – wiederum pharmakologisch – getestet, ob die elektrische Kopplung von Zellen über Gap junctions eine Rolle bei der Synchronisierung der Oszillationen spielen könnte. Das Einwaschen des Gap junction-Blockers 1-Octanol (1 mM) bewirkte sowohl eine deutliche Desynchronisierung der Autokorrelationsfunktionen der induzierten Oszillationen als auch eine markante Reduktion der Leistungsdichte (Abb. 4D, E in (3)). Die Mittelung von Flächenintegralen der Leistungsdichtespektren in den Grenzen des *ripple*-Frequenzbandes (120-250 Hz) erlaubte eine statistische Beurteilung der Leistungsdichte-Änderung unter 1-Octanol. In sechs analysierten Experimenten war der Anteil der Frequenzen im *ripple*-Frequenzband um $59.7 \pm 33.0\%$ im Vergleich zu Kontrollwerten reduziert ($P < 0.05$; Abb. 4F in (3)). Dieser Effekt war partiell reversibel (Wiederanstieg auf $31.2 \pm 56.5\%$; $n = 4$; $P > 0.05$; Abb. 4F in (3)). Ähnliche Resultate wurden auch mit Carbenoxolone, einem weiteren verwendeten Gap junction-Blocker, beobachtet (Abnahme der Leistungsdichte um $41.8 \pm 50.3\%$; $n = 3$, nicht gezeigt).

Der Beitrag der elektrisch-synaptischen Übertragung zur Genese von SPW-R wurde auch in Hippocampusschnitten von Tieren überprüft, die eine Defizienz für Connexin36 (Cx36) – ein ausschließlich neuronal exprimiertes Connexin – aufwiesen (1). In extrazellulären Ableitungen aus der Area CA1 wurde dazu zunächst die Frequenz des Auftretens von SPW-R untersucht. Es zeigte sich, dass die Inzidenz von SPWs in Schnitten von Cx36^{-/-}-Mäusen deutlich reduziert war ($34.0 \pm 5.0 \text{ min}^{-1}$ in KO-Mäusen *versus* $95.4 \pm 5.8 \text{ min}^{-1}$ in der Kontrollgruppe; $P < 0.001$; 53 Schnitte aus KO-Mäusen *versus* 42 Schnitte aus Wildtyp-Tieren; Abb. 3C in (1)). Entsprechend war auch die Inzidenz der *ripples* reduziert: $16.1 \pm 2.7 \text{ min}^{-1}$ in Cx36^{-/-}-Mäusen *versus* $25.3 \pm 3.2 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrolltieren ($P < 0.05$; siehe Abb. 3D in (1)). Darüber hinaus war ebenfalls die Oszillationsfrequenz der *ripples* verringert ($176.0 \pm 5.0 \text{ Hz}$ in Cx36^{-/-}-Tieren gegenüber $192.0 \pm 4 \text{ Hz}$ in Kontrollmäusen, $P < 0.05$; Abb. 3E in (1)). Die mittlere Anzahl von Oszillations-

zyklen pro *ripple* blieb dagegen unverändert (3.8 ± 0.1 versus 3.5 ± 0.1 in KO- bzw. WT-Tieren; $P > 0.1$; Abb. 3F in (1)).

Da berichtet worden ist, dass unter der Wirkung des K^+ -Kanalblockers 4-AP Interneurone in der CA3-Region synchronisierte epileptiforme Populationsentladungen generieren (28), die weiterhin sensitiv auf den Gap junction-Blocker Carbenoxolone reagieren (29), wurde die mögliche Rolle von Cx36 in der Generierung auch dieser Art (pathologischer) Aktivität getestet. Tatsächlich konnte eine Reduktion der epileptiformen Signale im Cx36^{-/-}-Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 4 in (1)).

Im Connexin36-„knock out“-Modell konnte also die Beteiligung von Gap junctions an der SPW-Initiierung und an der Synchronisierung pathologischer Populationsaktivität gezeigt werden.

V.5 Zelluläre Korrelate der SPW-R.

Extrazelluläre Daten wurden zur Isolierung von Einzelzellaktivität Hochpass-gefiltert (500 Hz Hochpass; je sieben Messungen aus CA3 und CA1; siehe Abb. 11 in (2) und Abb. 2 hier). Die auf diese Weise gefilterten Daten zeigten sog. *multiunit*-Aktivität, die als extrazelluläres Korrelat von Aktionspotentialen nahegelegener einzelner Neurone gilt (30). Solche *units* wurden mit den Maxima der *sharp waves* kreuzkorreliert (Daten-segmente von je 5 min Dauer). Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der zellulären Aktivität während der SPWs (22 ± 12 fache Zunahme gegenüber der Baseline, je $n = 7$ für CA3 und CA1; siehe Abb. 11B links in (2)). Eine genauere zeitliche Analyse (Kreuzkorrelation von *unit*-Aktivität und *ripples*) ließ das zeitliche Zusammenfallen von *units* und negativen Zyklen der *ripples* mit einer Modulation bei 4-5 ms erkennen (siehe Abb. 11B in (2) rechts und Abb. 2C hier). Auf diese Weise konnte also die Aktivierung vieler Neurone der betrachteten Zellpopulation während der *sharp wave*-Perioden nachgewiesen werden. Nicht geklärt werden konnte mit dieser Analyse, welchen Typen von Neuronen während der SPW-R aktiviert werden.

Mit scharfen Mikroelektroden wurden deshalb, parallel zu extrazellulären Feldpotentialen, in der Area CA1 Ableitungen aus Pyramidenzellen durchgeführt ($n = 20$). Die spontan auftretenden *sharp waves* waren regelmäßig von postsynaptischen Potentialen (PSPs) begleitet, die einem von drei Mustern zugeordnet werden konnten: Von insgesamt 400 ausgewerteten PSPs waren 57% depolarisierend, 19% hyperpolarisierend und 24% zweiphasig (de- und hyperpolarisierend; jeweils 20 PSPs pro Zelle analysiert; Abb. 12B1 in (2)). In einem zweiten Analyseschritt wurde betrachtet, welches Muster

dominierend, zu mehr als 80%, in einem gegebenen Neuron vorlag. Sieben der 20 abgeleiteten Zellen zeigten ein klares Überwiegen des depolarisierenden Musters, während in zwei Zellen vorwiegend hyperpolarisierende Ereignisse auftraten und in nur einer die biphasische Wellenform dominierte. In den restlichen zehn Zellen lag eine Mischung der drei Aktivitätsmuster vor (siehe Abb. 3.12B2 in (2)).

Obwohl in der Mehrzahl der abgeleiteten Pyramidenzellen also depolarisierende PSPs beobachtet wurden, zeigte keine von ihnen bereits am Ruhemembranpotential eine aktive Beteiligung mit spontanen Entladungen. Daher wurden die Zellen durch Injektion positiven Stroms an die Schwelle zur Generierung von Aktionspotentialen geführt, so dass sie kontinuierlich „feuerten“. Trotzdem zeigten wiederum 15 von 20 Zellen eine deutliche Inhibition während der SPW–R mit hyperpolarisierenden PSPs (siehe Abb. 13B1 in (2)). In vier der 20 abgeleiteten Zellen wurde hingegen keine Inhibition, sondern eine Aktivierung der Zellen mit Aktionspotential-Entladungen beobachtet (Abb. 13B2 in (2)).

Zusammenfassend konnte mit den zellulären Ableitungen also gezeigt werden, dass die gesamte Zellpopulation während SPW–R zwar deutlich aktiviert wird, die Mehrzahl der Pyramidenzellenellen dabei aber starken inhibitorischen Einflüssen ausgesetzt ist.

Um die ionale Basis der abgeleiteten PSPs zu klären, wurde in vier Zellen der Zusammenhang zwischen Membranpotential und Phasenverlauf der PSPs geprüft: Bei Hyperpolarisation der Zellen durch Injektion negativen Stroms konnte eine Phasenumkehr der PSPs beobachtet werden; diese fand bei etwa -70 mV statt, was sich nach dem Auftragen der gemessenen Amplituden über das jeweilige Membranpotential mit einem Nulldurchgang bei diesem Potential zeigte (Abb. 13A3 in (2)). Da das Gleichgewichtspotential von Cl^- bei ca. -70 mV liegt, entspricht dieses Phasenumkehr-Verhalten einer Cl^- -getragenen – und damit GABA_A -Rezeptor-vermittelten – Aktion und steht somit auch im Einklang mit der deutlichen inhibitorischen Komponente, die in den meisten Fällen intrazellulär während der SPW–R beobachtet wurde.