

**Beteiligung von  
Somatostatin-positiven Interneuronen  
an Giant Depolarizing Potentials  
in der CA1-Region des neonatalen Hippokampus  
von Mäusen in vitro**

**Dissertation**

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Thomas Kaas

geboren am 24.03.1995 in Halberstadt

**Gutachter:**

1. **Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff**  
Hans-Berger-Klinik für Neurologie in Jena
2. **Prof. Dr. med. Christian A. Hübner**  
Institut für Humangenetik in Jena
3. **Prof. Dr. med. Dipl. phys. Stefan Hallermann**  
Carl-Ludwig-Institut für Physiologie in Leipzig

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2021**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Entwicklung des Zentralen Nervensystems.....	10
1.1.1 Klinische Bedeutung von früher synchroner Netzwerkaktivität bei der Pathogenese neurologischer und neuropsychiatrischer Störungen .....	13
1.1.2 Lokalisation und Vorkommen früher synchroner Netzwerkaktivität .....	15
1.1.3 Frühe synchrone Netzwerkaktivität im Hippokampus .....	17
1.2 GABAerge Interneurone .....	19
1.2.1 Diversität und Funktion GABAerger Interneurone des adulten Hippokampus .....	19
1.2.2 Entwicklung GABAerger Interneurone des Hippokampus .....	21
1.2.3 GABAerge Depolarisation und Depolarisations-Inhibitions-Shift .....	22
1.2.3.1 Bedeutung GABAerger Depolarisation .....	22
1.2.3.2 Rolle der Chloridtransporter NKCC1 und KCC2 .....	23
1.2.4 Einfluss von <i>Hub</i> -Zellen auf die neonatale Netzwerkdynamik .....	24
1.3 Registrierung neuronaler Aktivität .....	25
1.3.1 Messung der frühen synchronen Netzwerkaktivität durch extrazelluläre Feldpotentialableitungen.....	25
1.3.2 Messung von früher synchroner Netzwerkaktivität durch die Kalziumbildung .....	26
<b>2 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1 Tiere.....	29
3.2 Genotypisierungen.....	29
3.3 Präparation akuter Hirnschnitte.....	30
3.4 Kalzium-Imaging mit Einzelzellauflösung.....	31
3.4.1 Mikroskopaufbau .....	31
3.4.2 OGB1-AM-Indikatorapplikation.....	35
3.5 Lokale Feldpotentialableitungen .....	35
3.6 Synchronisation von Kalzium-Imaging und lokalen Feldpotentialableitungen .....	36
3.7 Bumetanid-Applikation .....	37
3.8 Datenanalyse .....	37
3.8.1 Lokale Feldpotentialableitungen .....	38
3.8.2 Kalzium-Imaging .....	39
3.8.3 Detektion von <i>Giant Depolarizing Potentials</i> im Kalzium-Imaging.....	40
3.8.4 Kombination der elektrophysiologischen Daten mit den Imaging-Daten .....	41
3.8.5 Randomisierung der Peakzeiten der Feld- <i>Giant-Depolarizing Potentials</i> (fGDPs).....	41
3.8.6 Kreuzkorrelationsanalyse der Kalzium-Imaging-Daten .....	42
3.8.7 Statistische Auswertung .....	43

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1	Registrierung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1	44
4.1.1	Konfokale Kalziumbildgebung mittels synthetischer und genetisch codierter Indikatoren	44
4.1.2	Parallele Detektion von Feld- <i>Giant-Depolarizing-Potentials</i> in den extrazellulären Ableitungen	49
4.1.2.1	Gütekriterien von extrazellulären Ableitungen der Giant Depolarizing Potentials in der CA1-Region	51
4.1.2.2	Unterschiede zwischen extrazellulär-detektierten und nicht-detektierten <i>Giant Depolarizing Potentials</i> in der Kalziumbildgebung	54
4.1.3	Einfluss von Bumetanid auf die Frequenz der <i>Giant Depolarizing Potentials</i> in den extrazellulären Ableitungen und in der Kalziumbildgebung	57
4.2	Einfluss unterschiedlicher genetisch codierter Kalziumindikatoren auf die Darstellung neuronalen Aktivität	58
4.2.1	Unterschiede in der zellulären Aktivität der Pyramidenzellen zwischen den Kalzium-Indikatoren	58
4.2.2	Darstellung der neuronalen Aktivität von Somatostatin-positiven Interneuronen durch unterschiedliche genetisch codierte Kalziumindikatoren	62
4.3	Vergleich der Spontanaktivität von SST-positiven Interneuronen und Emx1-positiven Neuronen in Bezug auf die frühe synchrone Netzwerkaktivität in der CA1	65
4.3.1	Unterschiede in der neuronalen Aktivität während und zwischen Feld- <i>Giant-Depolarizing-Potentials</i> -Ereignissen unter Kontrollbedingungen	67
4.3.2	Partizipationsraten von Emx1-Neuronen und SST-positiven Interneuronen an Feld- <i>Giant-Depolarizing-Potentials</i>	69
4.3.3	Einfluss von Bumetanid auf die neuronale Aktivität der unterschiedlichen neuronalen Populationen und Feld- <i>Giant-Depolarizing-Potentials</i>	71
4.3.4	Korrelationsanalyse der neuronalen Aktivität von Emx1-Neuronen und SST-positiven Interneuronen	72
4.3.5	Unterschiede in der Latenzverteilung zwischen Emx1-Neuronen und SST-positiven Interneuronen	74
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
5.1	Modellorganismus Maus	79
5.2	Methodische Schwierigkeiten	79
5.2.1	Heterogenität der Interneurone	79
5.2.2	Analyseverfahren der Daten aus der Kalziumbildgebung	80
5.2.3	Analyseverfahren der extrazellulären Ableitungen	81
5.2.4	Statistischer Vergleich von Aktivitätsparametern zwischen SST-positiven Interneuronen und Emx1-Neuronen	81
5.2.5	Statistischer Vergleich von früher synchroner Netzwerkaktivität zwischen synthetischen und genetisch codierten Kalzium-Indikatoren	82
5.2.6	Schnittführung und Erhalt des Konnektivitätsprofils der Neurone	83
5.3	Ergebnisse	83
5.3.1	Unterschiede in der optischen und elektrophysiologischen Messung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1	83
5.3.2	Unterschiede in der Auflösung neuronaler Aktivität zwischen GCaMP3 und GCaMP6s in Emx1- und SST-positiven Interneuronen	87
5.3.3	Spontanaktivität und Beteiligung von SST-IN an fGDPs in der CA1-Region	88
5.3.4	Einfluss der GABAergen Depolarisation auf die Spontanaktivität von SST-IN und PCs sowie auf die Ausbildung von Feld- <i>Giant-Depolarizing-Potentials</i>	93

<b>6 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>95</b>
<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>106</b>
Geräte, Software und Chemikalien.....	106
Danksagung.....	107
Lebenslauf.....	108
Ehrenwörtliche Erklärung .....	109

## Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Artificial Cerebrospinal Fluid, künstliche cerebrospinale Flüssigkeit
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AOTF	<i>acousto optic tuning filter</i> , akustooptischer Modulator
AP	Aktionspotential
b	angeschliffen
Bum	Bumetanid
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration in mM
CA1	Cornu Amonis 1
CA3	Cornu Amonis 3
CCD	Charged-Coupled-Device, ladungsgekoppeltes Bauteil
cENOs	Cortical Early Network Oscillations
CI	Kalzium Imaging, Kalziumbildgebung
$[Cl^-]_i$	intrazelluläre Chloridkonzentration in mM
CNQX	6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion
Cre	Rekombinase-Enzym
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CSU	Confocal Scanning Unit, Konfokale Scanning Einheit
DG	Gyrus dentatus
DH-Shift	Depolarisations-Hyperpolarisations Shift
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Gestationstag
ECoG	Elektrokortikographie
EEG	Elektroenzephalogramm
EGins	frühgeborene GABAerge Interneurone
Emx1	Gen des Homöobox-Proteins ( <i>Empty Spircales Homeobox Protein 1</i> )
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom
EZ	extrazelluläre Ableitung
FSN	frühe synchrone Netzwerkaktivität
fGDP	Feld-GDP, extrazelluläres Pendant zu den intrazellulären GDPs
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FoV	optische Aufnahme-region ( <i>Field of View</i> )
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GCaMP3	Kalzium-sensitives Fusionsprotein Version 3
GCaMP6s	Kalzium-sensitives Fusionsprotein Version 6s
GDP	Giant Depolarizing Potential
GE	Ganglionäre Eminenz
GYKI 53655	1-(4-Aminophenyl)-3-Methylcarbanyl- 4-Methyl-3,4-Dihydro-7,8-Methylenedioxy-5H-2,3-Benzodiazepine Hydrochlorid
Imaging	Bildgebung
IN	Interneuron
IR-DIC	infrarot Differential-Interferenz-Kontrast
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
KCC2	K-Cl-Cotransporter 2
LFP	Lokales Feldpotential
LGE	laterale ganglionäre Eminenz
O-LM	<i>Oriens Lacunosum Moleculare</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie

loxP	<i>Locus of Crossover</i> in P1 (DNA-Sequenz)
MUA	<i>Multi Unit Activity</i>
NKCC1	Na-K-2Cl-Cotransporter Unterform 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OGB1-AM	Oregon Green BAPTA1 Acetoxymethylester
OLM	<i>oriens lacunosum moleculare</i>
P	Postnataler Tag
PC	Pyramidenzelle
PPV	positiv prädiktiver Wert
PSS	Postsynaptische Ströme
PV	Parvalbumin
PWE	Platin-Wolfram-Elektroden
ROI	Auswahlregion ( <i>Region of Interest</i> )
SAT	<i>slow-activity transients</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLC12A2	<i>Solute Carrier Family 12 Member 2</i> , Gen des NKCC1-Transporters
SLC12A5	<i>Solute Carrier Family 12 Member 5</i> , Gen des KCC2-Transporters
SnR	Signal- zu Rauchverhältnis
SPA	<i>synchronous plateau assemblies</i>
SST	Somatostatin
SST-IN	Somatostatin-positive Interneurone
SVZ	subventrikuläre Zone
SW	<i>sharp waves</i>
tdTomato	<i>tandem dimer Tomato</i> Fluoreszenzindikator
ToP	<i>Time of Peak</i> (Zeit bis zum Erreichen des Signalmaximums)
ub	nicht-angeschliffen
VGCC	spannungsgesteuerter Ca <sup>2+</sup> - Kanal
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

Die Erforschung der Entwicklung des zentralen Nervensystems bietet eine einzigartige Chance, (patho-) physiologische Prozesse des Gehirns zu verstehen. Am Anfang der Entwicklung des Gehirns bestimmen hauptsächlich genetisch determinierte Programme dessen morphologische Reifung. Bemerkenswerterweise weist das sich entwickelnde zentrale Nervensystem schon frühzeitig neuronale Aktivität auf, die unter dem Verdacht steht, eine zentrale Rolle für die feinstrukturelle Reifung neuronaler Netzwerke zu spielen. Diese frühe neuronale Aktivität zeigt ein außergewöhnliches Maß an Synchronisation und kann in vielen Strukturen des ZNS *in vitro* wie auch *in vivo* bei Nagetieren, Primaten und sogar beim Menschen gemessen werden. Folglich wird eine fehlerhafte, aktivitätsabhängige Reifung des ZNS im Zusammenhang mit der Pathogenese sowohl verschiedener entwicklungsbedingter, neuropsychiatrischer Störungsbilder (wie z.B. Autismus und Schizophrenie) als auch (früh-)kindlicher Epilepsieerkrankungen gesehen. Ein prominentes Beispiel früher synchroner Netzwerkaktivität stellen die sogenannten *Giant Depolarizing Potentials* (GDPs) des neonatalen Hippokampus dar. GDPs treten zu einem Stand der Entwicklung auf, an dem der Neurotransmitter GABA durch die Dominanz des Chloridimporters NKCC1 noch depolarisierend wirkt. Besonders frühgeborene GABAerge Interneurone konnten als sogenannte Schrittmacherzellen, welche GDPs initiieren, im Hippokampus *in vitro* auffindig gemacht werden. Solche Schrittmacherzellen leiten sich embryologisch aus der medialen ganglionären Eminenz ab. Aus dieser Struktur gehen unter anderem auch die Somatostatin-positiven Interneurone (SST-IN) hervor, die interessanterweise besonders früh in der Entwicklung ihren definitiven neurochemischen Phänotyp exprimieren. Daraus leitet sich die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ab: Zeigen Somatostatin-positive Interneurone in der CA1-Region des neonatalen Hippokampus *in vitro* Spontanaktivität und nehmen sie an GDPs teil?

Um diese Frage zu beantworten, wurden Experimente an akuten Hirnschnitten des neonatalen Hippokampus (P1-P4) von Mäusen durchgeführt. GDPs waren robust in der Kalziumbildgebung mit unterschiedlichen Kalziumindikatoren (OGB1-AM, GCaMP3, GCaMP6s) messbar. Die detaillierte Messung zelltypspezifischer neuronaler Aktivität erfolgte ebenfalls durch Kalziumbildgebung mittels CreloxP-basierter zelltypspezifischer Expression von GCaMP6s, sowohl unter dem SST-Promotor in SST-IN als auch unter dem für Pyramidenzellen charakteristischen *Emx1*-Promotor. Auch die extrazellulären Korrelate der GDPs, sogenannte *Feld-GDPs* (fGDPs), konnten mit Platin-Wolfram-Elektroden hochspezifisch (PPV =  $95,1 \pm 4,3\%$ ) in Referenz zur Kalziumbildgebung (mit GCaMP6s in Pyramidenzellen) gemessen werden und traten mit einer Frequenz von  $1,36 \pm 0,24 \text{ min}^{-1}$  auf.



Durch die gleichzeitige Messung von fGDPs in Feldpotentialableitungen und von neuronaler Aktivität in der Kalziumbildgebung mit GCaMP6s ergaben sich folgende Befunde: SST-IN waren spontan aktiv ( $2,47 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$ ) und nahmen an einem Großteil ( $82,69 \pm 4,18\%$ ) der fGDPs der CA1 teil. Außerdem unterschied sich das Ausmaß der Synchronisation, gemessen als Korrelationskoeffizient  $\rho$  nach Pearson, der Aktivität der SST-IN ( $\rho = 0,37 \pm 0,05$ ) nicht signifikant von jenem der Pyramidenzellen ( $\rho = 0,40 \pm 0,02$ ). Darüber hinaus zeigte sich eine Abhängigkeit der Spontanaktivität dieser Interneurone und der GDPs von der GABAergen Depolarisation: Nach Applikation von Bumetanid, einem relativ selektiven NKCC1-Inhibitor, war eine signifikante Reduktion im Median der Frequenz ( $-1,78 \text{ min}^{-1}$ ) der Spontanaktivität der SST-IN und in der mittleren Frequenz der fGDPs ( $1,11 \pm 0,27 \text{ min}^{-1}$ ) messbar. Die Verteilung der zeitlichen Differenz zwischen dem Auftreten der fGDPs und der assoziierten Aktivität der SST-IN war, im Unterschied zu den Pyramidenzellen, bimodal. Bemerkenswerterweise zeigte ein geringer Anteil (ca. 23%) der Interneurone assoziierte Aktivität deutlich vor ( $438,12 \pm 42,12 \text{ ms}$ ) den fGDPs. Hingegen war der Großteil der Interneurone sowohl nach dem Auftreten eines fGDPs ( $284,8 \pm 13,3 \text{ ms}$ ) als auch nach den Pyramidenzellen (ca. 139 ms) aktiv. Die biologisch bedingte unterschiedliche Anzahl (ca. Faktor 10) von ausgewerteten Ereignissen und Neuronen (insgesamt und pro Hirnschnitt) limitiert jedoch statistisch die Interpretation dieses Befunds. Darüber hinaus ergaben Vergleiche von Aktivitätsparametern zwischen den Interneuronen, die vor bzw. nach einem fGDP Aktivität zeigten, keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Somatostatin-positiven Interneurone in der neonatalen CA1-Region *in vitro* hochkorrelierte Spontanaktivität und Partizipation an fGDPs zeigen, wobei die Spontanaktivität abhängig von der GABAergen Depolarisation ist.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden im Zusammenhang mit weiteren experimentellen Ansätzen publiziert. Im Rahmen dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass SST-IN GDPs in der neonatalen CA1 des Hippokampus *in vitro* auslösen können. (Flossmann et al. 2019) Darüber hinaus zeigten sich Interneurone bei der Generierung von GDPs im neonatalen Hippokampus auch *in vivo* als kausal relevant. (Murata und Colonnese 2020) Die vorliegende Dissertationsschrift liefert daher einen Beitrag zum Verständnis der aktivitätsabhängigen Reifung des limbischen Systems am speziellen Beispiel der *Giant Depolarizing Potentials* der neonatalen CA1-Region des Hippokampus *in vitro*. Dieses Verständnis bietet darüber hinaus translatorisches Potential für die klinische Anwendung durch die Entwicklung geeigneter Prognose- und Interventionsverfahren für entwicklungsbedingte neuropsychiatrische Störungsbilder sowie für Epilepsieerkrankungen im Kindesalter.

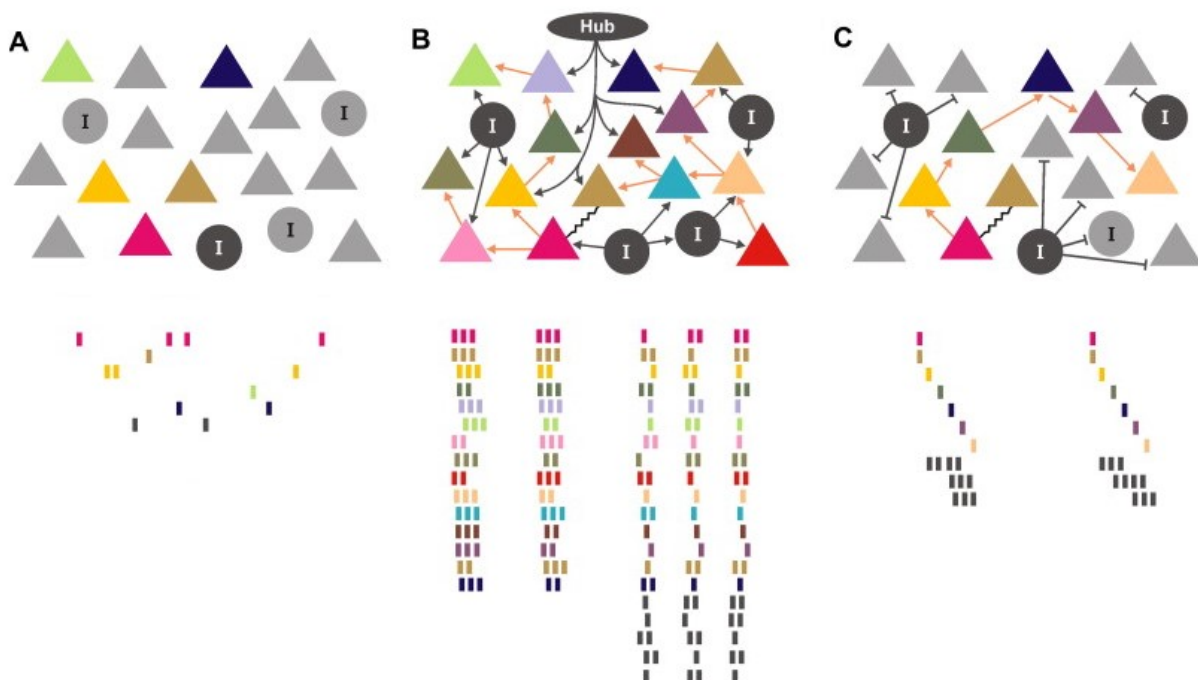
# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung des Zentralen Nervensystems

Die Erforschung der Entwicklung des zentralen Nervensystems ermöglicht es, die Funktionsweise des Gehirns sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen besser zu verstehen. (Blankenship und Feller 2010, Uhlhaas et al. 2010, Uhlhaas und Singer 2010) Die Entwicklung des zentralen Nervensystems ist von verschiedenen und größtenteils aufeinanderfolgenden Phasen geprägt. In einer frühen Phase erfolgt die Proliferation, Differentiation und Migration der Nerven- und Gliazellen sowie die feinstrukturelle Reifung der Nervenzellen durch das Dendriten- und Axonwachstum (Synapsenformation). (Silbereis et al. 2016, Sanes und Zipursky 2020) Anschließend folgt eine zweite Phase der aktivitätsabhängigen Reifung funktioneller Einheiten und neuronaler Netzwerke des zentralen Nervensystems. (Spitzer 2006, Silbereis et al. 2016) Diese letzte Phase ist zunächst erfahrungsunabhängig (Khazipov und Luhmann 2006), wird aber im Verlaufe der Entwicklung immer stärker von der Umwelt geprägt, was im Allgemeinen auch als Lernen bezeichnet wird. (Yap und Greenberg 2018) Eine essentielle Grundlage für effektive spätere Lernprozesse im Laufe der Entwicklung ist allerdings die erfahrungsunabhängige, aber aktivitätsabhängige Reifung des zentralen Nervensystems. (Khazipov und Luhmann 2006) Bemerkenswerterweise sind Oszillationen, sowohl im neonatalen als auch im adulten Gehirn, ein fundamentales Prinzip in der zeitlichen Organisation neuronaler Aktivität. Die aktivitätsabhängige Phase in der Entwicklung des ZNS ist zu Beginn gekennzeichnet von synchronen Oszillationen der neuronalen Aktivität über eine relativ große räumliche und zeitliche Dimension. Diese Aktivität wird auch frühe synchrone Netzwerkaktivität (FSN) genannt. Das neonatale Gehirn unterscheidet sich maßgeblich auf einzelzellulärer- wie auch auf Netzwerkebene hinsichtlich der Mechanismen, welche die Ausbildung von Oszillationen neuronaler Aktivität bedingen. (Dehorter et al. 2012) Diese Aktivität, in Form synchroner Oszillationen, ist ein Resultat aus der dynamischen Interaktion von komplexen elektrophysiologischen Eigenschaften individueller Neurone und der Struktur des sich entwickelnden neuronalen Netzwerks, in welchem diese eingebettet sind. (Buzsaki und Draguhn 2004, Egorov und Draguhn 2013) Im Verlauf der Entwicklung des zentralen Nervensystems nimmt die Komplexität der räumlichen und zeitlichen Organisation neuronaler Aktivität drastisch zu. Dieser Prozess der Transformation der räumlichen und zeitlichen Eigenschaften neuronaler Oszillationen im Verlauf der Entwicklung des ZNS ist durch das Verschwinden von früher synchroner Netzwerkaktivität gekennzeichnet und wird im Allgemeinen auch *sparsification* (siehe Abbildung 1) genannt.

Im Rahmen dieses Prozesses entwickeln sich die hohen Informationsverarbeitungskapazitäten kortikaler Netzwerke, welche stark abhängig von der Reifung intrinsisch-neuronaler Eigenschaften und synaptischer Eingänge sind. (Rocheffort et al. 2009, Egorov und Draguhn 2013, Rahmati et al. 2017) Dies ist ein maßgebender Prozess für die Konstruktion komplexer kortikaler Funktionsmodule, wie sie beispielsweise für die Verarbeitung sensorischer Informationen notwendig sind. (Hanganu-Opatz 2010, West und Greenberg 2011)

Frühe synchrone Netzwerkaktivität ist ein charakteristisches und ubiquitär vorkommendes Merkmal sich entwickelnder neuronaler Netzwerke: Das Gehirn ist aktiv während es sich entwickelt. (Ben-Ari und Spitzer 2010) Da FSN sich weitgehend unabhängig von sensorischen Eingängen ausbildet, wird sie als eine intrinsische Eigenschaft sich entwickelnder zentraler Netzwerke angesehen. (Sipila und Kaila 2008)



**Abbildung 1: Entwicklung der neuronalen Aktivität (*sparsification*) im zentralen Nervensystem. (Egorov und Draguhn 2013).** Im Verlauf der Entwicklung neuronaler Netzwerke des ZNS lässt sich eine Veränderung in den Eigenschaften neuronaler Aktivität beobachten: Frühe synchrone und hochkorrelierte Aktivität vieler Neurone weicht einer räumlich und zeitlich komplexer organisierten Aktivität weniger Neurone im neuronalen Netzwerk. **A)** Zu Beginn der Entwicklung eines funktionellen Netzwerkmoduls ist die neuronale Aktivität ein auf jeweils individuelle Neurone beschränktes und somit nur schwach korreliertes Phänomen. **B)** Im weiteren Verlauf lässt sich eine global synchronisierte Aktivität im gesamten Netzwerk beobachten, wobei die Neurone eine hochkorrelierte Aktivität zeigen. Ein wichtiges Beispiel dieser Aktivität sind die *Giant Depolarizing Potentials* des Hippokampus. Für das Netzwerk der CA3 konnte hierbei gezeigt werden, dass spezielle GABAerge Interneurone (I) als Schrittmacherzellen (*Hub*-Neurone) eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer solchen hochsynchronen Aktivität haben. **C)** In ausgereiften Netzwerkmodulen bedingt zeitlich und räumlich sehr präzise koordinierte neuronale Aktivität die hohen Informationsverarbeitungskapazitäten adulter neuronaler Netzwerke.

Was ist die genaue Funktion von FSN im Rahmen der Entwicklung des ZNS? Die Ausbildung der enorm komplexen neuronalen Verbindungen ( $10^{15}$  Synapsen) aus einer limitierten Anzahl von Genen (ca. 30.000) im Verlauf der Entwicklung des ZNS stellt eine große Herausforderung dar. (Ben-Ari 2008, Ben-Ari 2013a) Einen mechanistischen Erklärungsansatz für diese Ausgabe liefert unter anderem das Konzept der phänotypischen Checkpoint-Regulation. Nach diesem Konzept ist die physiologische Trajektorie der Entwicklung nicht nur abhängig von der Genexpression, sondern auch von der korrekten Ausbildung einer dem Entwicklungsstand angemessenen neuronalen Aktivität. (Ben-Ari und Spitzer 2010) Während der Entwicklung und Ausreifung des Gehirns führen demnach verschiedene Feedback-Mechanismen, ausgehend von der im Rahmen der Entwicklung entstehenden endogenen elektrischen Aktivität der Neurone, zu einer veränderten Genexpression (Ben-Ari und Spitzer 2010) und umgekehrt (Owens und Kriegstein 2002). Frühe synchrone Netzwerkaktivität stellt dabei einen möglichen Vertreter eines solchen phänotypischen Checkpoints im Verlauf der Entwicklung dar. In welchem Ausmaß jedoch FSN nur ein Epiphänomen sich entwickelnder-neuroanatomischer Verbindungen ist, ist noch nicht abschließend geklärt. (Sipila und Kaila 2008) Allerdings konnte bereits am visuellen Kortex gezeigt werden, dass die Perturbation von FSN zu spezifischen Defekten in der Konstruktion kortikaler Netzwerke führt. (Xu et al. 2011) In einer jüngeren Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass FSN im visuellen Kortex das Überleben zu einer adäquaten Konstruktion kortikaler Module beiträgt, indem sie die Apoptose von Interneuronen reguliert. (Duan et al. 2020) Darüber hinaus ist bekannt, dass FSN und die damit verbundene GABAerge Wirkung die Reifung neokortikaler glutamaterger Synapsen durch das sogenannte *unsilencing* bedingt. (Voigt et al. 2005, Hanse et al. 2013)

Die Beeinflussung der FSN steht somit im Verdacht, einen wichtigen Einfluss auf das komplexe Entwicklungsprogramm des ZNS zu nehmen. Genmutationen können daher mit einer gestörten frühen synchronen Netzwerkaktivität einhergehen, welche die physiologische Reifung neuronaler Netzwerke behindert. Auf der anderen Seite können auch nicht genetische Störfaktoren (beispielsweise Hypoxie während der Geburt), welche die Physiologie und Ausbildung der FSN behindern, die funktionelle Organisation neuronaler Netzwerke pathologisch prägen. (Ben-Ari 2008) Obwohl über den Einfluss von Umweltfaktoren auf FSN nur wenig bekannt ist, konnte bereits in früheren Untersuchungen *in utero* gezeigt werden, dass es bei Säugetieren unter der Geburt Oxytocin-vermittelt zu dramatischen Veränderungen in der Ausbildung von FSN kommt. (Tyzio et al. 2006)

Die Störung von FSN könnte daher, im Rahmen des Vulnerabilitäts-Stress-Modells, mechanistisch relevant für die Pathogenese entwicklungsbedingte Störungen des ZNS sein.

### **1.1.1 Klinische Bedeutung von früher synchroner Netzwerkaktivität bei der Pathogenese neurologischer und neuropsychiatrischer Störungen**

Eine Störung der physiologischen Ausbildung von FSN steht unter dem Verdacht, eine fehlerhafte Integration von Neuronen in die jeweiligen lokalen Netzwerkmodule zu bedingen. Dies könnte im adulten Gehirn die physiologische Ausbildung von neuronaler Aktivität behindern. Ein möglicher Mechanismus hierfür ist die unzureichende Ausreifung der adulten neuronalen Aktivitätseigenschaften von fehlerhaft in das Netzwerk eingebetteten Neuronen. In der Konsequenz kann dies zu einer verminderten Informationsverarbeitungskapazität oder sogar zu pathologischen Instabilitäten in der Netzwerkdynamik führen. (Ben-Ari 2008) Diese denkbaren entwicklungsbedingten Veränderungen stehen daher unter dringendem Verdacht, pathogenetisch sowohl für neurokognitive Störungen als auch für Epilepsieerkrankungen relevant zu sein. (Ben-Ari 2013b) In diesem Kontext wird auch die Pathogenese verschiedener, vor allem entwicklungsbedingter, psychiatrischer Störungsbilder gesehen. Beispielhaft dafür sind die Autismus-Spektrumserkrankungen (Tyzio et al. 2014, Mullins et al. 2016, Courchesne et al. 2020) und Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis. (Di Cristo 2007, Kang et al. 2019) Darüber hinaus häufen sich in der Literatur Hinweise darauf, dass kindliche Epilepsiesyndrome ebenfalls durch das oben erwähnte pathogenetische Prinzip bedingt sein könnten. (Khazipov et al. 2015, Marguet et al. 2015)

Als ein allgemeines mechanistisches Prinzip in der Genese neurokognitiver Entwicklungsstörungen hat sich das Konzept der gestörten exzitatorisch-inhibitorischen Balance (EI-Balance) etabliert. (Gatto und Brodie 2010, Sohal und Rubenstein 2019) Im adulten Gehirn wird die Aufrechterhaltung einer sogenannten EI-Balance für eine präzise und komplexe Informationsverarbeitung, welche mit hochgradig strukturierten neuronalen Aktivitätsmustern einhergeht, als essentiell angesehen. (Kepecs und Fishell 2014) Aufgrund ihrer herausragenden Rolle für die Orchestrierung neuronaler Aktivität ist die gestörte Entwicklung GABAerger Interneurone äußerst bedeutsam für die Pathogenese neurokognitiver Entwicklungsstörungen. (Di Cristo 2007, Ramamoorthi und Lin 2011, Marin 2012, Marín 2016, Paterno et al. 2020)

Störungen dieser EI-Balance, welche u.a. durch eine entwicklungs- oder umweltbedingte Disruption des GABAergen Systems wirken, stellen daher einen möglichen Erklärungsansatz der Pathogenese entwicklungsbedingter neuropsychiatrischer Erkrankungen dar. (Tatti et al. 2017, Sohal und Rubenstein 2019)

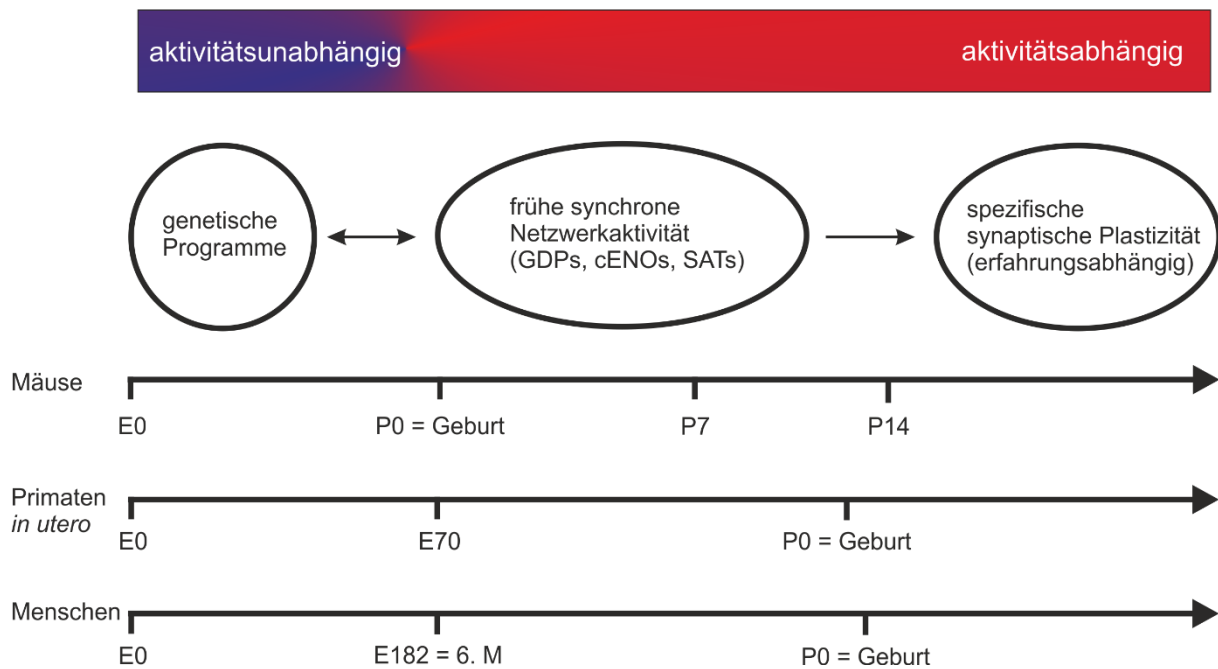
Aufgrund des allgemeinen Charakters dieses pathogenetischen Konzepts sind vielfältige Ursachen einer gestörten EI-Balance denkbar. (Anticevic und Murray 2017) Der Depolarisations-Hyperpolarisations-*switch* (DH-*switch*) des GABAergen Systems stellt einen Meilenstein in der Entwicklung neuronaler Netzwerke des Hippokampus und einen Endpunkt der Ausbildung von prominenter FSN in Form von GDPs dar. (Kilb 2012). Ein gestörter DH-*switch* könnte im weiteren Verlauf der Entwicklung eine fehlerhafte Reifung der EI-Balance bedingen. In der Literatur wurde kürzlich beschrieben, dass eine Risikomutation im DISC1-Gen zu einem pathologisch veränderten DH-*switch* führt und somit einen möglichen Pathomechanismus und Biomarker der Schizophrenie darstellt. (Kang et al. 2019)

Die Alteration in der physiologischen Konstruktion von Netzwerkmodulen ist pathogenetisch nicht nur für neuropsychiatrische Störungsbilder relevant. Ungefähr 30% der Epilepsieerkrankungen sind heutzutage nicht medikamentös adäquat behandelbar. Daher liegt ein wesentliches Augenmerk auf der Prävention dieser relativ häufigen neurologischen Erkrankung. (Couzin-Frankel 2019) So wird auch ein Zusammenhang zwischen frühkindlichen Epilepsieerkrankungen, welche bemerkenswerterweise öfter mit neurokognitiven Entwicklungsstörungen einhergehen, und der Perturbation von FSN in vulnerablen Perioden der Entwicklung des ZNS gesehen. (Courchesne et al. 2007, Marguet et al. 2015) Interessant ist außerdem, dass sich deutliche mechanistische Parallelen zwischen FSN und interiktalen pathologischen Ereignissen im Rahmen von Epilepsieerkrankungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen. Im Rahmen dessen scheint depolarisierendes GABA eine bedeutende Rolle für die Ausbildung neonataler Epilepsien (Kirmse et al. 2011, Khazipov et al. 2015) und adulter Epilepsien (Pavlov et al. 2013) zu spielen. (Khazipov 2016) Außerdem zeigt fokale epileptische Aktivität, welche am häufigsten im Temporallappen lokalisiert ist, besonders im Hippokampus große Ähnlichkeiten mit neonatalen endogenen Aktivitätsmustern, wie sie im Rahmen der Entwicklung vorzufinden sind. (Buzsaki 1986, Sipila und Kaila 2008, Khazipov 2016) Das mechanistische Verständnis von FSN birgt zusammenfassend das Potential, die Ätiologie und Pathogenese von neurokognitiven Entwicklungsstörungen und Epilepsieerkrankungen auf Netzwerkebene besser zu verstehen und somit neue protektive Maßnahmen und Therapieoptionen entwickeln zu können. (Ben-Ari 2013b, Marguet et al. 2015, Kirmse et al. 2017)

Darüber hinaus lassen sich Parallelen zwischen den Eigenschaften des neonatalen GABAergen Systems und verschiedenen neurologischen Pathologien des älteren Menschen feststellen. (Ben-Ari 2017) Ein charakteristisches Merkmal ist hierbei eine gestörte Funktion des GABAergen Systems durch eine pathologisch veränderte Chloridhomöostase. Dieser Befund zeigt sich beispielsweise bei Epilepsien, aber auch bei traumatischen Läsionen des ZNS, wie einem Schlaganfall. (Ben-Ari 2008, Blaesse et al. 2009, Ben-Ari 2013b) Neonatale Eigenschaften von Nervenzellen, wie beispielsweise die depolarisierende Wirkung von GABA, werden dabei infolge eines neuronalen Traumas, durch Mikroglia bedingt, reaktiviert. (van den Pol et al. 1996, De Koninck 2007)

### **1.1.2 Lokalisation und Vorkommen früher synchroner Netzwerkaktivität**

Die Bezeichnung frühe synchrone Netzwerkaktivität ist stark abhängig vom Kontext, in dem sie auftritt und stellt sich somit phänomenologisch wie auch mechanistisch heterogen dar. (Blankenship und Feller 2010) FSN konnte in verschiedenen sich entwickelnden Strukturen des ZNS *in vitro* und *in vivo* gemessen werden: in der Retina (Ackman et al. 2012), im Neokortex (Garaschuk et al. 2000, Allene et al. 2008, Yang et al. 2009) sowie im Hippokampus (Ben-Ari et al. 1989, Leinekugel et al. 2002). Im Hippokampus ist FSN *in vitro* in Form von sogenannten *Giant Depolarizing Potentials* (GDPs) besonders gut untersucht und konnte sogar bei Primaten *in vitro* gemessen werden. (Khazipov et al. 2001) Bemerkenswerterweise ist das Auftreten von FSN bei Primaten im Vergleich zu Nagetieren auf einen Zeitraum vor der Geburt verschoben (siehe Abbildung 2). (Khazipov et al. 2001) Darüber hinaus belegen EEG- und fMRT-Untersuchungen an Frühgeborenen das Vorhandensein von FSN (sogenannte *delta brushes* oder *slow activity transients*) in kortikalen Strukturen. (Vanhatalo et al. 2005) Diese kortikale FSN hat ihren Ursprung hauptsächlich im temporalen Lappen und insulären Kortex. (Arichi et al. 2017)



**Abbildung 2: Lokalisation und Auftreten der frühen synchronen Netzwerkaktivität in unterschiedlichen Spezies.** Der Zeitstrahl für unterschiedliche Spezies ist nicht einheitlich skaliert und damit nicht unmittelbar vergleichbar. Die Zeiträume sind primär in zeitlichem Bezug auf die Entwicklungsstadien neuronaler Netzwerke angegeben. (Ben-Ari 2002, Khazipov und Luhmann 2006, Clancy et al. 2007, Kilb 2012) Im Verlauf der Phylogenese hat sich das Auftreten von FSN bei Primaten zu Zeitpunkten vor der Geburt verschoben. *Giant Depolarizing Potential* = GDP; *cortical Early Network Oscillations* = cENOs; *Slow Activity Transients* = SATs

Diese Aktivität zeigt charakteristische Parallelen zu der in neokortikalen Strukturen der Nagetiere gemessenen FSN. (Khazipov und Luhmann 2006) Eine Transformation des neonatalen EEGs von diskontinuierlicher und synchronisierter Aktivität zu kontinuierlicher und desynchronisierter Aktivität wird als ein Meilenstein in der kortikalen Entwicklung angesehen. Die Messung dieser Transformation bei Frühgeborenen hat das Potential zum therapeutischen Monitoring auf der Neonatal-Intensivstation bezüglich pathologischer neurologischer Prozesse. (Vanhatalo und Kaila 2006)

Das neokortikale Pendant dieser Aktivität in Tierexperimenten wird auch *cortical early network oscillations* (cENOs) genannt. Im Rahmen früher neokortikaler Netzwerkaktivität konnten insgesamt drei distinkte Muster von FSN im somatosensorischen Kortex *in vivo* bei Nagetieren gemessen werden. (Yang et al. 2009) Interessanterweise wurde mehrfach gezeigt, dass die GABAerge Neurotransmission einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der FSN sowohl im Hippokampus *in vitro* (Ben-Ari 2002, Khazipov et al. 1997, Khalilov et al. 2015) als auch in neokortikalen Arealen *in vivo* nimmt. (Kirmse et al. 2015)



Allerdings zeigen sich auch mechanistische Unterschiede in der Genese von FSN bei Nagetieren *in vivo* zwischen dem Hippokampus und Neokortex. (Kirmse et al. 2015) Aus der komplexen Taxonomie der FSN wird deutlich, dass FSN ein physiologisch und mechanistisch heterogenes Phänomen (Garaschuk et al. 2000) mit relevanten Unterschieden zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen sowie Regionen des ZNS ist. Diese Arbeit konzentriert sich auf ein vergleichsweise gut untersuchtes Beispiel der synapsenabhängigen FSN im Hippokampus *in vitro*, die sogenannten *giant depolarizing potentials* (GDPs).

### **1.1.3 Frühe synchrone Netzwerkaktivität im Hippokampus**

Das früheste Zeichen neuronaler Aktivität im Hippokampus wurde in der CA1 in Form von sogenannten *spikes calciques* in einem Zeitraum von E16-20 *in vitro* in Mäusen beschrieben. *Spikes calciques* treten unter anderem bedingt durch die Expression von L-Typ Kalziumkanälen auf. (Crepel et al. 2007) Hierbei handelt es sich jedoch um intrinsische, nicht propagierende Aktivitätsoszillationen. Sie werden schließlich in einem Zeitraum von P0 von den sogenannten *synchronous plateau assemblies* (SPA) abgelöst. (Allene et al. 2008) Dies ist eine Aktivität kleiner Zellverbände, welche über Gap Junctions kommunizieren und sich somit in ihrer Aktivität synchronisieren. Im Verlauf der Entwicklung und voranschreitenden Synaptogenese werden SPAs durch das Auftreten von GDPs abgelöst. (Tyzio et al. 1999, Allene et al. 2008) Dieser entwicklungsbedingte Übergang der FSN ist von einer Reifung des interneuronalen Netzwerkes gekennzeichnet. Diese Reifung wird als eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbildung von GDPs gesehen. (Khazipov et al. 1997, Ben-Ari et al. 2004, Allene et al. 2012) Bemerkenswerterweise zeigt dieser Entwicklungsschritt eine zeitliche Koinzidenz mit dem Beginn der rapiden Entwicklung des Dendritenbaums und der Ausreifung synaptischer Spines des glutamatergen Systems. (Tyzio et al. 1999, Kilb 2012) Die Population der Pyramidenzellen in der CA1-Region ist an P0 bei Nagetieren bezüglich des Entwicklungsstands heterogen: 80% der Pyramidenzellen zeigen weder induzierbare noch spontane postsynaptische Ströme (PSS), 10% zeigen PSS, die nur auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zurückzuführen sind, und nur 10% der Pyramidenzellen zeigen PSS, welche auf Glutamat- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren basieren. (Tyzio et al. 1999) GABA kommt somit neonatal eine große Bedeutung als depolarisierender und exzitatorischer Neurotransmitter in der hippokampalen Formation *in vitro* zu. (Ben-Ari et al. 2004, Sipila et al. 2005, Sipila et al. 2006, Pfeffer et al. 2009) GDPs treten besonders häufig im Zeitraum zwischen P2 und P10 auf, sind aber bis zu P18 messbar.

Hierbei handelt es sich um synchronisierte Aktionspotentialsalven verschiedener Neurone innerhalb des Pyramidenzellbands des Hippokampus, welche erstmals mittels *Patch-Clamp*-Ableitungen *in vitro* gemessen und anschließend definiert wurden. (Ben-Ari et al. 1989) GDPs sind relativ langsame (einige Hundert Millisekunden andauernde) und polysynaptisch, also durch das Netzwerk getriebene, synchrone Events vieler Neurone. Sie lassen sich nach einem „alles-oder-nichts“-Gesetz durch elektrische Stimulation induzieren, treten jedoch in einer großen Mehrzahl auch unter Spontanbedingungen in der CA3- und CA1-Region des Hippokampus in unterschiedlicher Frequenz auf. Dabei kommt der CA3-Region eine Art Schrittmacherfunktion aufgrund ihrer höheren Spontanfrequenz an GDPs zu. (Ben-Ari et al. 2007)

Die Ausbildung der GDPs hängt von einem komplexen Wechselspiel der glutamatergen und der GABAergen Neurotransmission ab: NMDA-Antagonisten verringern die Spontanfrequenz der GDPs, während AMPA-Rezeptorantagonisten (GYKI 53655) das spontane und elektrisch induzierte Auftreten der GDPs vollständig verhindern. (Ben-Ari et al. 1989, Bolea et al. 1999, Sipila und Kaila 2008) Interessanterweise beeinflusst GABA die Ausbildung der sogenannten *voltage-dependend intrinsically bursting*. In der CA3-Region wird daher dem *voltage-dependend intrinsically bursting*, einer Eigenschaft noch unreifer Pyramidenzellen (PC), eine große Bedeutung bei der Ausbildung der GDPs zugeschrieben. Die Applikation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten verringert dabei das *voltage-dependend intrinsically bursting* der Pyramidenzellen. Gleichzeitig sorgt dies für eine Abnahme der Spontanfrequenz bis hin zu einem Verschwinden der GDPs in der CA3. Diese starke Abhängigkeit der GDPs von der Hemmung der GABAergen Wirkung gilt dabei als eine charakteristische pharmakologische Signatur der GDPs. (Ben-Ari et al. 1989, Sipila et al. 2005)

Als das *in-vivo*-Pendant zu den oben beschriebenen GDPs werden die aus der CA3-Region getriebenen *sharp waves* (SW) angesehen. (Leinekugel et al. 2002) Diese lassen sich ebenso wie die GDPs durch den NKCC1-Inhibitor Bumetanid blockieren (Sipila et al. 2006) und zeigen tendenziell eine Zunahme ihrer Aktivität sobald der Hippokampus von afferenten Verbindungen getrennt wird, was für die intrinsische Natur dieser Form der FSN spricht. Es wird vermutet, dass GDPs eine hohe mechanistische Überschneidung mit den SWs aufweisen. (Sipila und Kaila 2008) Dennoch bleibt die Frage offen, ob GDPs *in vitro* und SWs *in vivo* mechanistisch identisch sind. Im Verlauf der Ontogenese werden die *sharp waves* schließlich von den *sharp waves with ripples in vivo* abgelöst.

Die SW des sich entwickelnden neonatalen Hippokampus werden hierbei als ein wesentlicher Wegbereiter für die adulten Aktivitätsrhythmen, besonders von Gamma- und Thetawellen im Hippokampus, angesehen. (Mohs und Blumberg 2008) Zu erwähnen ist auch, dass FSN *in vivo* nicht auf die hippokampale Region begrenzt ist, sondern auch in unmittelbar benachbarten Hirnarealen, wie beispielsweise dem entorhinalen Kortex, auftritt und messbar ist. (Unichenko et al. 2015)

FSN aus dem Hippokampus kann dabei sogar in den Neokortex fortgeleitet werden. (Barger et al. 2016) Schließlich wird davon ausgegangen, dass auch *in vivo* diese distinkten oszillatorischen Aktivitätsmuster bereits neonatal eine bedeutende Rolle für die adäquate Entwicklung des räumlich und zeitlich koordinierten Zusammenspiels von Teilen des limbischen Systems und des präfrontalen Kortex spielen. (Brockmann et al. 2011)

## **1.2 GABAerge Interneurone**

Interneurone sind lokale Netzwerk- und Projektionsneurone, welche hauptsächlich über den Neurotransmitter GABA Verbindungen mit glutamatergen Pyramidenzellen (PC) sowie mit anderen GABAergen Interneuronen eingehen. Sie kommen in allen Strukturen des ZNS (Neokortex, Basalganglien, Allocortex) vor. Eine besondere Eigenschaft dieser Klasse von Nervenzellen ist, dass sie trotz ihrer quantitativen Unterlegenheit (ca. 11% im Hippokampus und 20% im Neokortex) gegenüber den Pyramidenzellen eine enorme Diversität aufweisen. (Ascoli et al. 2008, Pelkey et al. 2017) Im adulten Gehirn tragen GABAerge Interneurone entscheidend zu der komplexen zeitlichen und räumlichen Organisation neuronaler Aktivität und den damit verbundenen Informationsverarbeitungskapazitäten des ZNS bei. Die topographische Verteilung GABAerger Synapsen hat eine entscheidende funktionelle Bedeutung für die interneuronale Modulation der Signalverarbeitung der Pyramidenzellen. (Klausberger und Somogyi 2008) Darüber hinaus vermitteln Interneurone die zeitlich präzise Synchronisation der Aktivität von Pyramidenzellen in Form von oszillatorischer Aktivität über verschiedene Frequenzbänder. (Tremblay et al. 2016, Veit et al. 2017)

### **1.2.1 Diversität und Funktion GABAerger Interneurone des adulten Hippokampus**

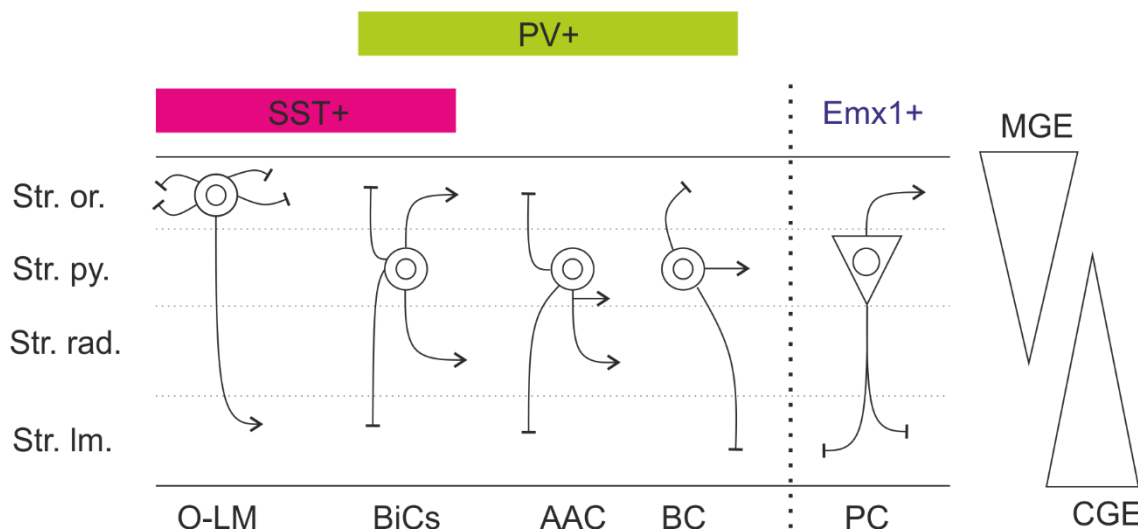
Erstaunlicherweise machen GABAerge Interneurone in der adulten CA1 des Hippokampus nur etwa 10-15% der gesamten Neurone aus. (Bezaire und Soltesz 2013) Aufgrund ihrer hochgradigen und komplexen Vernetzung reicht diese geringe Anzahl aus, um die essentielle Balance zwischen Inhibition und Exzitation in dieser Region des ZNS herzustellen.

In der CA1 des Hippokampus im adulten Gehirn sind mindestens 21 verschiedene Subtypen von IN sowie 3 verschiedene Subtypen von PC nach einem multifaktoriellen Klassifikationssystem beschrieben. (Klausberger und Somogyi 2008) Um die enorme Diversität der IN abzubilden, existieren mehrdimensionale Klassifikationssysteme. Hierbei wird nach morphologischen, neurochemischen und physiologischen (aktive und passive elektrophysiologische Eigenschaften) Merkmalen kategorisiert. (Ascoli et al. 2008, Pelkey et al. 2017) Interessanterweise sind die neurochemischen, morphologischen und physiologischen Eigenschaften teilweise abhängig voneinander, sodass sich abstrakte Cluster von IN-Typen mit komplexen Eigenschaftskombinationen in der CA1 des Hippokampus identifizieren lassen. (Tricoire et al. 2011) Die derzeitigen neurochemischen Klassifikationssysteme beziehen sich zwar auf eine begrenzte Anzahl von Markern (Ascoli et al. 2008), jedoch konnten in RNA-Sequenzanalysen in der CA1 auf molekularer Basis mehr als 45 verschiedene inhibitorische Neurone in der CA1-Region von Mäusen unterschieden werden. (Zeisel et al. 2015, Huang und Paul 2019) Neurochemische Klassifikationskriterien teilen IN sowohl nach der Expression der Kalzium-Puffer-Proteinen wie Parvalbumin (PV), Calbindin- und Calretinin als auch nach der Bildung von Neuropeptiden wie Somatostatin (SST), Neuropeptid Y und Cholezystokinin ein. Ein substantieller Anteil von Interneuronen in allo- und neokortikalen Arealen exprimiert Somatostatin (SST). (Urban-Ciecko und Barth 2016, Pelkey et al. 2017) Diese Klasse von Interneuronen zeichnet sich durch eine (im Vergleich zu anderen IN-Klassen) relativ frühzeitige Expression ihres definitiven neurochemischen Phänotyps (Taniguchi et al. 2011) sowie einen frühzeitigen Übergang in die postmitotische Phase aus. (Bandler et al. 2017) Im Neokortex wurde nachgewiesen, dass SST-Interneurone bereits vor den PV<sup>+</sup> - Interneuronen ein transientes Netzwerk mit den Pyramidenzellen im Verlauf der Entwicklung ausbilden. (Tuncdemir et al. 2016)

Daher liegt die Vermutung nahe, dass den SST-Interneuronen eine besondere Rolle im Rahmen der Entwicklung lokaler Netzwerkmodule auch im Hippokampus zukommt. *Oriens lacunosum moleculare* - Interneurone (OLM) machen ca. 4.5% der hippocampalen Interneurone und insgesamt nur 0.5% der CA1-Neurone im adulten Hippokampus aus und exprimieren den Marker Somatostatin. (Bezaire und Soltesz 2013)

Diese Neurone sitzen mit ihrem Soma vorwiegend im *stratum oriens*, senden jedoch in einer überwiegenden Mehrzahl (ca. 93%) ihr Axon durch das *stratum pyramidale* und *radiatum*, um schließlich im *stratum lacunosum moleculare* Synapsen an den apikalen Dendriten *pyramidalen* Neurone auszubilden.

Der Großteil (ca. 90%) dieser OLM-Neurone innerviert Pyramidenzellen im adulten Gehirn in einem Verhältnis von ca. 1:1450 und bildet dabei ca. 10 synaptische Kontakte pro Pyramidenzelle. Die OLM-Zellen stellen daher eine Gruppe hochvernetzter Interneurone in der adulten CA1 dar. Entwicklungsgeschichtlich leiten sich die SST-IN aus der medialen ganglionären Eminenz (MGE) ab. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass trotz der Diversität von Interneuronen (siehe Abbildung 3) die Expression des Markers SST<sup>+</sup> eine robuste Korrelation mit charakteristischen morphologisch-histologischen Merkmalen zeigt.



**Abbildung 3: Diversität und Klassifikation der Interneurone im adulten Hippokampus.** Die Einteilung der Interneurone im gesamten ZNS erfolgt entlang mehrerer Dimensionen: Neurochemie, Konnektivität und Morphologie sowie nach physiologischen Kriterien (hier nicht dargestellt). (Markram et al. 2004, Ascoli et al. 2008, Kepecs und Fishell 2014) In dieser Abbildung ist die Zuordnung neurochemischer Charakteristika der Interneurone zu anatomisch-histologischen Charakteristika in der CA1 des adulten Hippokampus dargestellt. Die Gruppe der SST-Interneurone und der PV<sup>+</sup>-Interneurone überlappen sich hinsichtlich der morphologischen Klasse der Bistratifizierten Zellen (BiCs). Die Axo-axonischen sowie die Basketzellen weisen überwiegend den neurochemischen Marker PV auf. *Oriens lacunosum moleculare* - Zellen sind hingegen fast ausschließlich SST<sup>+</sup>. Interneurone, die mit ihrem Zellsoma im *stratum oriens* und *stratum pyramidale* lokalisiert sind, stammen entwicklungsgeschichtlich von der „medialen ganglionären Eminenz“ (MGE) ab. Interneurone, die mit ihrem Zellsoma im *stratum radiatum* und *stratum lacunosum moleculare* lokalisiert sind, stammen aus der kaudalen ganglionären Eminenz (CGE) ab. (Klausberger und Somogyi 2008, Pelkey et al. 2017)

### 1.2.2 Entwicklung GABAerger Interneurone des Hippokampus

Die Interneurone werden in den ganglionären Eminenzen (GE) im sogenannten Subpallium gebildet, während die glutamatergen Neurone (Pyramidenzellen) aus den Keimzentren des Palliums hervorgehen. Die ganglionären Eminenzen bilden sich bei den Nagetieren in einem Zeitraum von E8 - E10 aus. Von den ganglionären Eminenzen migrieren die Interneurone zuerst radial dann tangential in verschiedene Bereiche des zentralen Nervensystems. Erste Migrationsbewegungen von Interneuronen finden zu E11 statt.

Bei Nagetieren sind dabei schon im Zeitraum von E15.5 und E16.5 im *stratum radiatum* und *stratum oriens* im Hippokampus native Interneurone nachweisbar. (Danglot et al. 2006, Pelkey et al. 2017). Bemerkenswerterweise ist die enorme Diversität der IN im adulten zentralen Nervensystem durch die aktivitätsabhängige Subdifferenzierung in den verschiedenen neuronalen Netzwerken nicht ausschließlich genetisch vorprogrammiert. (Kepecs und Fishell 2014, Lim et al. 2018, Fishell und Kepecs 2019)

Diese Subklassendifferenzierung zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Expression des Chlorid-Transporterproteins KCC2 sowie von der Anwesenheit von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen (VGCCs). (Bortone und Polleux 2009, De Marco Garcia et al. 2011)

### **1.2.3 GABAerge Depolarisation und Depolarisations-Inhibitions-Shift**

GABA ist während der ersten beiden postnatalen Wochen bei Nagetieren ein depolarisierender sowie *in vitro* exzitatorischer Neurotransmitter. Das GABAerge System entwickelt sich vor dem glutamatergen System. (Tyzio et al. 1999) Depolarisierende Eigenschaften von GABA konnten auch beim Menschen gemessen werden. (Dzhala et al. 2005) Ab der zweiten postnatalen Woche kommt es bei Nagetieren zu einem sogenannten Depolarisation-Hyperpolarisations-Shift (*DH-Shift*) der GABAergen Wirkung. (Fukuda et al. 1998) Anschließend präzisiert sich die neuronale Aktivität zunehmend räumlich und zeitlich (*sparsification*). Dieser Prozess koinzidiert im Hippokampus bemerkenswerterweise mit der Reifung und Ausbildung glutamaterger Synapsen und der inhibitorischen Wirkung der GABAergen Neurotransmission. (Clancy et al. 2007, Kilb 2012, Rahmati et al. 2017) Die Frequenz der GDPs ist in der ersten postnatalen Woche am höchsten und nimmt parallel zum *DH-Shift* im Verlauf der zweiten postnatalen Woche kontinuierlich ab. Dieses Phänomen zeigt sich nicht nur bei Nagetieren, sondern scheint unter den Säugetieren ein konserviertes Phänomen während der Entwicklung zu sein (Ben-Ari 2002), welches bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings hauptsächlich *in vitro* gemessen werden konnte. (Ben-Ari et al. 2007) Bei höheren Primaten ist der *DH-Shift* interessanterweise auf einen Zeitraum vor der Geburt verschoben.

#### **1.2.3.1 Bedeutung GABAerger Depolarisation**

GABA wirkt neonatal über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren depolarisierend aufgrund einer neonatal erhöhten Chloridkonzentration. Diese Depolarisation führt zu einer intrazellulären Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>] durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen (VGCC) und die Lösung des Mg<sup>2+</sup>-Blocks der NMDA-Rezeptoren.

Dieser intrazelluläre Anstieg der Kalzium-Konzentration beeinflusst darüber hinaus die Genexpression, unter anderem durch Induktion des Transkriptionsfaktors CREB. Daher ist depolarisierendes GABA verantwortlich für das Überleben, die feinmorphologische Reifung und Synaptogenese neonataler Neurone im ZNS. (Leinekugel et al. 1997, Kilb et al. 2011)

Zu erwähnen ist jedoch, dass die depolarisierende Wirkung von GABA *in vitro* in der Vergangenheit in der Literatur noch kontrovers diskutiert wurde. Dabei wurde die Frage aufgeworfen, ob die depolarisierende Wirkung von GABA nur ein experimentelles Artefakt infolge der anoxischen Bedingungen von akuten Hirnschnitten ist. (Bregestovski und Bernard 2012, Ben-Ari et al. 2012) Es konnte jedoch experimentell gezeigt werden, dass die GABAerge Depolarisation unabhängig von der Anwesenheit von Ketonkörpern (Kirmse et al. 2010) und von Pyruvat/Laktat (Tyzio et al. 2011), beides Stoffwechselprodukte anoxischer Bedingungen, ist. Darüber hinaus fehlen bislang Daten, die auf eine überwiegend exzitatorische Wirkung von GABA *in vivo* hindeuten. (Kirmse et al. 2018) Trotz der noch ungeklärten exzitatorischen Rolle von GABA bei FSN *in vivo* scheint GABA einen Einfluss auf die Synaptogenese, auch unabhängig von der Auslösung von Aktionspotentialen, zu nehmen. Dies wird auf das durch GABA bedingte lokale Zusammenspiel von NMDA-Rezeptoren und VGCCs in den jeweiligen Dendritenabschnitten zurückgeführt. Die lokale Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führt über die Induktion von Transkriptionsfaktoren zu einer lokalen feinmorphologischen Reifung. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass GABA seine depolarisierende Wirkung *in vivo* hauptsächlich unterhalb des Aktionspotential-Schwellenbereiches ausübt. Daher wird der modulierende Einfluss von GABA auf die Ausbildung der FSN in kortikalen Strukturen eher durch eine hyperpolarisierende Wirkung erklärt. (Kirmse et al. 2018)

### **1.2.3.2 Rolle der Chloridtransporter NKCC1 und KCC2**

Die neonatal depolarisierende Wirkung von GABA wird auf die hohe Leitfähigkeit der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für Chlorid zurückgeführt. Zusätzlich ist der Kanal aber auch für Bicarbonat-Ionen permeabel. Das Permeabilitätsverhältnis  $HCO_3^-/Cl^-$  beträgt hierbei etwa 0,2 - 0,4. (Kaila 1994, Kaila und Voipio 1987, Sipila und Kaila 2008) Daher wird die Wirkung von GABA hauptsächlich durch die intrazelluläre Chloridkonzentration  $[Cl^-]_i$  bestimmt und ist somit abhängig von der Chloridhomöostase. Diese wird maßgeblich vom Expressionsverhältnis des Chloridimporters NKCC1 (SLC12A2) zum Chloridexporter KCC2 (SLC12A5) bestimmt. (Hubner et al. 2001)

Das in dieser Arbeit eingesetzte Pharmakon Bumetanid zeichnet sich durch eine präferentielle Hemmung des Chloridimporters NKCC1 aus (das Verhältnis der Bindungsaffinität von NKCC1 zu NKCC2 beträgt ca. 6:1) und stört somit die depolarisierende Wirkung von GABA *in vitro*. (Pfeffer et al. 2009) Die Expression von NKCC1 ist bereits sehr früh in der Entwicklung vorhanden. Jedoch steigt die Expression des Chloridexporters KCC2 nach der Geburt im Verlauf der ersten zwei postnatalen Wochen an, bis sie zum Ende der zweiten postnatalen Woche ihr Maximum bei Nagetieren erreicht. (Kaila et al. 2014) Damit einher geht im Hippokampus auch das Verschwinden der depolarisierenden GABAergen Ströme an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sowie die stetige Frequenzabnahme der GDPs als Folge der Veränderung der  $[Cl^-]_i$  durch die Ausbildung einer adulten Chloridhomöostase. (Owens und Kriegstein 2002, Ben-Ari et al. 2007) Das Ausmaß der KCC2-Expression wird in der Literatur auch als ein Parameter zur Einschätzung des Entwicklungsstands verschiedener kortikaler Strukturen (inkl. Hippokampus) bei Säugetieren *in vivo* sowie auch beim Menschen beschrieben. (Vanhatalo et al. 2005) Interessanterweise ist die physiologische Ursache für den mit der Reifung früher neuronaler Netzwerke verbundenen Anstieg der KCC2-Expression noch nicht geklärt.

#### **1.2.4 Einfluss von *Hub*-Zellen auf die neonatale Netzwerkdynamik**

Im adulten ZNS wird die komplexe Organisation der neuronalen Aktivität in Form spezifischer Oszillationsmuster durch distinkte IN-Populationen bewerkstelligt. (Freund und Buzsaki 1996) Die Vermutung liegt daher nahe, dass spezifische IN-Subtypen eine Rolle bei der Generierung neonataler Aktivitätsmuster, besonders in Form der FSN, spielen. In der Literatur wurden bereits sogenannte *Hub*-Neurone als Interneurone in der CA3 identifiziert. Diese Neurone haben die Eigenschaft, aufgrund ihrer hochgradigen Konnektivität und Effektivität der synaptischen Kontakte einen großen Einfluss auf die Aktivitätsdynamik des gesamten lokalen Netzwerks nehmen zu können. (Bonifazi et al. 2009, Cossart 2014) Eine entwicklungsgeschichtliche Erklärung dieser besonderen Eigenschaften ist, dass sie präferentiell aus besonders frühgeborenen Interneuronen, den sogenannten EGins (*early born gabaergic neurons*) hervorgehen. (Barabasi und Albert 1999, Villette et al. 2016) Diese Neurone sind schon zu E10 postmitotisch, während die meisten hippocampalen Interneurone erst zwischen E12 und E15 in die postmitotische Phase übergehen. (Danglot et al. 2006, Picardo et al. 2011) Auch für den Neokortex konnte gezeigt werden, dass frühgeborene Interneurone einen größeren Einfluss auf die Netzwerkdynamik nehmen als andere Interneurone. (Wang et al. 2019)



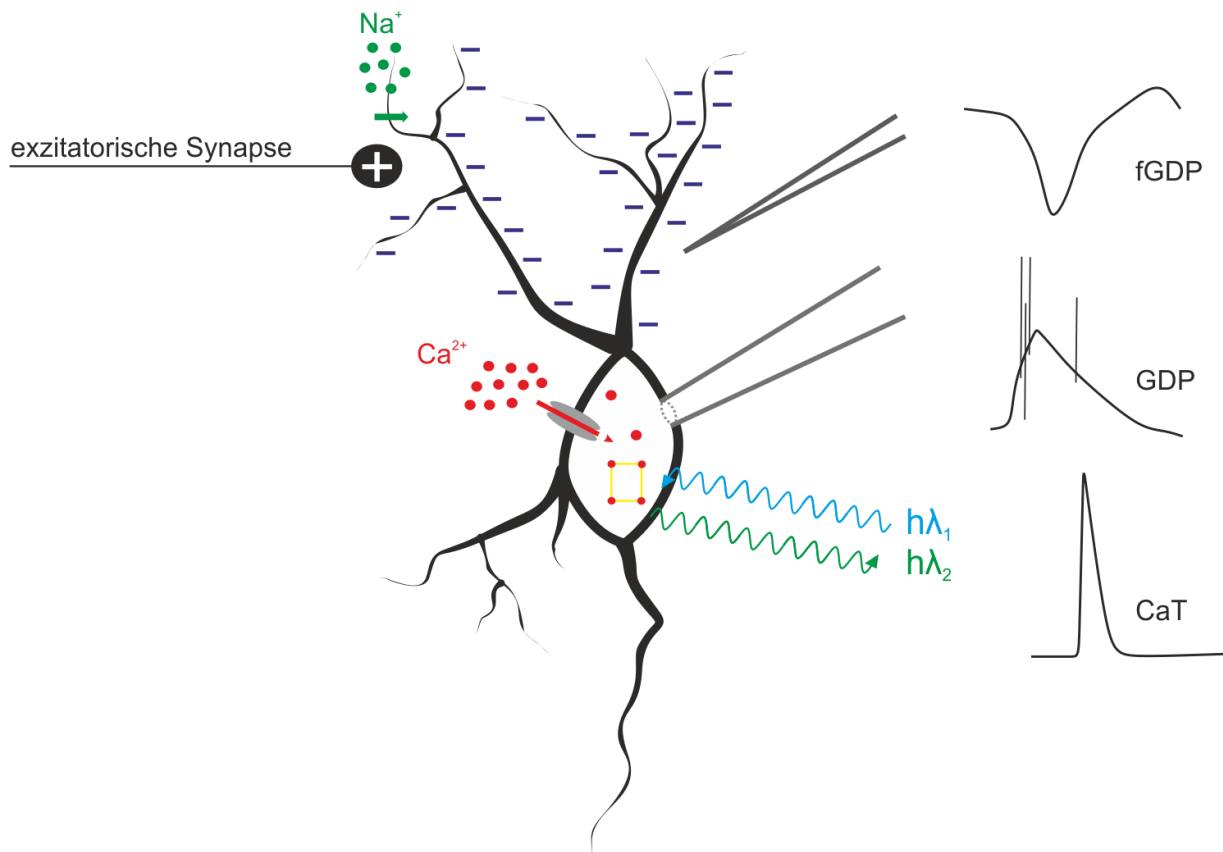
Untersuchungen zur neurochemischen Klassifikation dieser *Hub*-Neurone in der CA3 des Hippokampus ergaben, dass eine wesentliche Subpopulation der EGins und *Hub*-Neurone vorzugsweise den neurochemischen Marker SST exprimiert und große morphologische Ähnlichkeiten mit OLM-Zellen aufweist. (Picardo et al. 2011, Modol et al. 2017) Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass EGins einen großen Einfluss auf die Ausbildung von GDPs in der CA3-Region nehmen und interessanterweise morphophysiologisch reifer sind als später geborene Interneurone. (Villette et al. 2016) In der CA1 zeigt sich, dass EGins, die einen großen Einfluss auf die Ausbildung von GDPs haben, hauptsächlich aus der MGE abstammen. (Wester und McBain 2016)

Es besteht bis zum jetzigen Zeitpunkt Uneinigkeit darüber, in welchem Ausmaß *Hub*-Neurone ein transientes Phänomen im Laufe der Entwicklung darstellen. Sicher ist jedoch, dass ein Teil dieser Neurone viele Eigenschaften mit adulten Projektionsneuronen teilt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass SST-IN im adulten Gehirn Projektionen in das mediale Septum vermitteln. (Gulyas et al. 2003) Daher wird vermutet, dass diese speziellen Interneurone auch eine klinische Relevanz, beispielsweise bei der Entstehung und Progression von Temporallappenepilepsien haben. (Morgan und Soltesz 2008, Jinno 2009, Picardo et al. 2011)

### **1.3 Registrierung neuronaler Aktivität**

#### **1.3.1 Messung der frühen synchronen Netzwerkaktivität durch extrazelluläre Feldpotentialableitungen**

GDPs wurden erstmalig mittels *Patch-Clamp*-Ableitungen in der CA3-Region *in vitro* als massive und durch das Netzwerk getriebene Depolarisationsereignisse beschrieben. Solche Netzwerkereignisse sind aufgrund dieser Eigenschaften prinzipiell auch durch extrazelluläre Feldpotentialableitungen messbar (siehe Abbildung 4). In diesen Messungen zeigen sich GDPs in der CA3- und CA1-Region *in vitro* als starke Deflektionen bzw. Negativierungen des Feldpotentials (fGDPs), welchen parallel Spikesalven aufgelagert sind. (Lamsa et al. 2000, Khazipov et al. 2004, Sipila et al. 2005) Traditionell hat sich für die Messungen von extrazellulären Feldpotentialableitungen in akuten Hirnschnitten die Verwendung von sogenannten *interface*-Kammern, aufgrund der besseren Nährstoffversorgung der akuten Hirnschnitte, etabliert. (Kramer und Goldman-Rakic 1997) Diese Methode ist jedoch ungeeignet für parallele einzelzelluläre Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der notwendigen Wasserimmersion der hochauflösenden Objektive. (Huang et al. 2012)



**Abbildung 4: Methoden zur Messung synchroner neuronaler Aktivität in akuten Hirnschnitten.** Neuronale Aktivität (Erregung und Hemmung) geht mit einer Veränderung des Membranpotentials der Nervenzelle einher. Mittels *Patch-Clamp*-Ableitungen lassen sich sowohl direkte Veränderungen in der Zelle als auch indirekte Auswirkungen auf das extrazelluläre Feldpotential messen. Durch die mit der neuronalen Aktivität verbundenen Transmembranströme kommt es zu einer Verschiebung von Ladungsschwerpunkten in der extrazellulären Matrix, was ein lokales Feldpotential aufbaut. Darüber hinaus geht die Erregung von Neuronen und die damit verbundene Depolarisation mit einer Öffnung der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle VGCCs (grau) einher, sodass sekundär eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung (rot) messbar ist. (Leinekugel et al. 1995) Diese wiederum lässt sich fluoreszenzmikroskopisch durch den Einsatz geeigneter Kalziumindikatoren (gelb) messen, welche ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration verändern.

### 1.3.2 Messung von früher synchroner Netzwerkaktivität durch die Kalziumbildung

Die elektrische Erregung von Neuronen in Form einer Depolarisation führt über die Aktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen, wie z.B. über NMDA-Rezeptoren oder VGCCs, zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  (siehe Abbildung 4). Mittels verschiedener Indikatoren, die ihre Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration verändern, können diese pulsatilen Schwankungen in der  $[Ca^{2+}]_i$  als Folge und somit auch als Surrogatparameter neuronaler Aktivität gemessen werden. (Grienberger und Konnerth 2012) In der Literatur ist die Messung von *Giant Depolarizing Potentials* mit dieser Methode bereits beschrieben. (Leinekugel et al. 1997, Ben-Ari 2002)

Die Darstellung der GDPs in der Kalziumbildgebung ist stark abhängig von den verwendeten Fluoreszenzindikatoren. Als Standardtechnik hat sich die akute Netzwerkbeladung (mittels Injektionen durch Glaspipetten) von AM-Estern etabliert.

Ein zu berücksichtigender Nachteil dieser Indikatoren ist die zelltypunspezifische Färbung der Neurone und Gliazellen, während jedoch die Aktivität der angefärbten Zellen sehr detailliert aufgezeichnet werden kann. Demgegenüber eignen sich genetisch codierte Kalziumindikatoren (GECIs) besonders gut für die Aufzeichnung zelltypspezifischer Aktivität. (Grienberger und Konnerth 2012) Die Proteine der GCaMP-Familie sind etablierte und prominente Vertreter aus der Gruppe der GECIs. Ein Nachteil des Vertreters GCaMP3 war bis zum derzeitigen Forschungsstand die geringere dynamische Breite und eine deutlich niedrigere Sensitivität für Änderungen der  $[Ca^{2+}]_i$ . (Tian et al. 2009, Tian et al. 2012) Diese Proteine wurden daher weiterentwickelt, unter anderem mit dem Ziel, die dynamische Breite, die Sensitivität (GCaMP6s) und die Kinetik (GCaMP6f) weiter zu verbessern, was durch die Entwicklung der Indikatoren vom GCaMP6-Typ realisiert wurde. (Chen et al. 2013) Eine offene Frage ist allerdings, inwiefern sich dieser neue Indikator GCaMP6s eignet, um eine zelltypspezifische Charakterisierung neuronaler Aktivität im neonatalen Hippokampus vorzunehmen.

## 2 Ziele der Arbeit

Aus ethischen Gründen wurden die Untersuchungen an Nagetieren durchgeführt. Die ersten beiden postnatalen Wochen bei Mäusen können als ein Modell des letzten Trimesters beim Menschen hinsichtlich der aktivitätsabhängigen Reifung neuronaler Netzwerke im Hippokampus gesehen werden (siehe Abbildung 2). (Clancy et al. 2007, Kilb 2012, Semple et al. 2013) Zunächst war es notwendig, eine robuste Methode zur Messung extrazellulärer Feldpotentiale in der CA1 des neonatalen Hippokampus (P1 bis P4) *in vitro* in sogenannten *submerged* Kammern unter paralleler Durchführung der Kalziumbildgebung zu etablieren. Frühe synchrone Netzwerkaktivität kann mit unterschiedlichen optischen und elektrophysiologischen Methoden gemessen werden (siehe Abbildung 4). Allerdings handelt es sich bei den GDPs um komplexe Netzwerkphänomene, deren messbare Eigenschaften unter Umständen von der gewählten Methode abhängig sind. Um die indikatorbedingte Variation in der Darstellung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1 abschätzen zu können, wurden GDPs mit drei verschiedenen Kalziumindikatoren (OGB1-AM, GCaMP3 und GCaMP6s) gemessen. Anschließend wurden die Eigenschaften der GDPs, die mittels optischer Methoden und extrazellulärer Ableitungen gemessen wurden, ebenfalls verglichen.

Das Ziel dieses Vergleichs war es, herauszuarbeiten, inwiefern sich extrazelluläre Feldpotentialableitungen eignen, um GDPs sensitiv und spezifisch zu messen.

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass *Hub*-Neurone besonders aus frühgeborenen GABAergen Interneuronen hervorgehen und einen großen Einfluss auf die Netzwerkaktivität im neonatalen Hippokampus *in vitro* nehmen. (Bonifazi et al. 2009, Picardo et al. 2011, Cossart 2014) Daher stehen diese speziellen Interneurone auch unter Verdacht, eine entscheidende Rolle bei der Generierung von GDPs im neonatalen Hippokampus *in vitro* zu spielen. Für die CA3-Region konnte *in vitro* gezeigt werden, dass SST-IN einen substantiellen Teil dieser frühgeborenen GABAergen Interneurone bilden. (Villette et al. 2016) In der CA1-Region wurde nachgewiesen, dass besonders Interneurone, die sich aus der MGE ableiten, sogenannte *Hub*-Zellen bilden.

Interessanterweise entwickeln sich Somatostatin-positive Interneurone (neben Parvalbumin-positiven Interneuronen) präferentiell aus der medialen ganglionären Eminenz. (Wester und McBain 2016) Bei den SST-IN bildet sich der definitive neurochemische Phänotyp sehr früh aus, sodass sich diese Population von Interneuronen hervorragend eignet, um in der Kalziumbildgebung zelltypspezifisch neonatal untersucht zu werden. (Taniguchi et al. 2011) Daher ist das grundlegende Ziel dieser Arbeit, speziell die Aktivität von SST-IN im neonatalen Hippokampus *in vitro* zu untersuchen und deren Beteiligung an den GDPs in der CA1-Region im Vergleich zu den Pyramidenzellen (Emx1-Neuronen) zu untersuchen.

Aus diesen Befunden ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

- 1) Inwiefern ergänzen sich unterschiedliche optische und elektrophysiologische Methoden bei der Messung von GDPs in der neonatalen CA1-Region?
- 2) Eignet sich der genetisch codierte Kalziumindikator GCaMP6s unter der Expression des Somatostatin-Promotors in neonatalen SST-Interneuronen zur Messung der zelltypspezifischen neuronalen Aktivität in der CA1-Region?
- 3) Welche Eigenschaften charakterisieren die Spontanaktivität der SST-IN in der neonatalen CA1-Region und unterscheiden sich diese von jenen der Emx1-positiven Zellen?
- 4) Wie hoch ist die Partizipationsrate der SST-Interneurone an GDPs und unterscheidet sich diese von der Partizipationsrate der Emx1-positiven Zellen?
- 5) Sind die Spontanaktivität der SST-Interneurone und die Ausbildung von GDPs gleichzeitig von der GABAergen Depolarisation abhängig?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere

Alle Organentnahmen wurden unter Genehmigung des Ethikkomitees durchgeführt, da die Experimente an Tieren durchgeführt wurden, deren Gehirne im Alter von P1 bis P4 entnommen wurden. Die Zucht und Pflege der Tiere erfolgte durch die Serviceeinheit für Labortiere des Universitätsklinikums Jena. Es wurden Wildtypmäuse (C57Bl/6J) für die Experimente mit OGB1-AM-Färbungen zur unselektiven Darstellung neuronaler Aktivität von Pyramidenzellen und Interneuronen verwendet. Darüber hinaus wurden verschiedene transgene Tiermodelle unter Verwendung des CreloxP-Systems genutzt. Zuerst wurde eine  $Emx1^{IRESCre}$ -Linie (Gorski, 2003) mit der  $GCaMP3^{lsl}$  - (Tian et al. 2009) und  $GCaMP6s^{lsl}$  - (Chen et al. 2013) Cre-Reporterlinie verpaart, was zu einer zelltypspezifischen Expression der Kalziumindikatoren  $GCaMP3$  und  $GCaMP6s$  in Pyramidenzellen (und Astrozyten) führte. Die zwei daraus resultierenden transgenen Modelle mit den jeweiligen Genotypen  $Emx1^{IRESCre::GCaMP3^{lsl}}$  ( $GC3^{Emx1}$ ) und  $Emx1^{IRESCre::GCaMP6s^{lsl}}$  ( $GC6s^{Emx1}$ ) wurden zur Untersuchung der Aktivität von Pyramidenzellen verwendet. Des Weiteren wurde die  $SST^{IRESCre}$  - Linie (Taniguchi 2011) mit den bereits oben erwähnten  $GCaMP3^{lsl}$  - und  $GCaMP6s^{lsl}$  - Cre-Reporterlinien verpaart. Dies führte zu einer zelltypspezifischen Expression der Kalziumindikatoren  $GCaMP3$  ( $GC3^{SST}$ ) und  $GCaMP6s$  ( $GC6s^{SST}$ ) in Somatostatin-positiven Interneuronen in den beiden Modellen  $SST^{IRESCre::GCaMP3^{lsl}}$  und  $SST^{IRESCre::GCaMP6s^{lsl}}$ . Anhand dieser beiden transgenen Mausmodelle wurde die neuronale Aktivität der Somatostatin-positiven Interneurone untersucht.

Die visuelle Inspektion der hippocampalen Formation der vier unterschiedlichen transgenen Tiermodelle im Durchlichtmikroskop zeigte keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Es erfolgte ebenfalls eine globale visuelle Inspektion des Hirnschnittes im Fluoreszenzmikroskop, um einen theoretisch möglichen, jedoch sehr unwahrscheinlichen konditionellen Keimbahn-Knock-out auszuschließen.

#### 3.2 Genotypisierungen

Durch die Verpaarung der bereits im Vorfeld genotypisierten homozygoten Cre-Treiberlinien  $Emx1^{IRESCre}$  und  $SST^{IRESCre}$  mit den jeweils homozygoten Cre-Reportertieren  $GCaMP3^{lsl}$  und  $GCaMP6s^{lsl}$  waren für die Nachkommen keine Genotypisierungen notwendig. Während der Experimente wurde darauf geachtet, dass der erwartete Genotyp auch mit den zu erwartenden phänotypischen Eigenschaften übereinstimmte. Die vier Genotypen unterschieden sich schon vom visuellen Eindruck in der Fluoreszenzmikroskopie deutlich:

Der Farbstoff GCaMP3 zeigt eine deutlich stärkere Ruhefluoreszenz als das verwandte GCaMP6s. Die Anzahl der Emx1-positiven Zellen war durchschnittlich zehnfach höher als die der SST-positiven Zellen. Aufgrund dieser beiden basalen Unterschiede der Cre-Linien und der Kalziumindikatoren konnte eine Verwechslung der Genotypen sicher ausgeschlossen werden.

### **3.3 Präparation akuter Hirnschnitte**

Die Experimente wurden zum Erhalt der physiologischen Konnektivität an akuten horizontalen Hirnschnitten neonataler Gehirne von Mäusen im Alter von P1 bis P4 durchgeführt. Als Nährmedium wurde eine artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (aCSF) mit jeweils unterschiedlicher Zusammensetzung für Präparation und Inkubation bzw. Messung der akuten Hirnschnitte verwendet. Die Lösungen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen kontinuierlich mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begast und der pH-Wert auf 7,4 mit 1M NaOH bzw. 2M HCl justiert.

Nach einer tiefen Anästhesie mit 0,3ml Isofluran erfolgte die Dekapitation der jungen Mäuse durch Dr. rer. nat. Tom Floßmann oder PD Dr. med. Knut Kirmse. Die darauffolgende Präparation wurde jedoch selbst durchgeführt. Dafür wurde das Gehirn geschnitten und zur Vermeidung von weiteren Gewebeschäden im Zuge der Präparation in eisgekühlter Präparationslösung mit folgender Zusammensetzung bei 4°C - 7°C gekühlt: 125mM NaCl, 4mM KCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5mM CaCl<sub>2</sub>, 2,5mM MgCl<sub>2</sub> und 10mM Glucose. Die im Vergleich zum physiologischen extrazellulären Milieu niedrigere Kalziumkonzentration und höhere Magnesiumkonzentration dienen der Milderung exzitotoxischer Effekte (beispielsweise durch NMDA vermittelte Kalziumüberladung der Zelle durch Depolarisation) im Rahmen der Präparationsbedingungen. Das Gehirn wurde mit einer Pinzette an beiden Augen fixiert. Es folgte die Entfernung der Schädelhaut mit anschließender Eröffnung des Schädels durch eine mediane Inzision. Zwei rostrale und kaudale Schnitte ermöglichten die Entfernung der Schädelknorpelplatten. Daraufhin wurde das Telencephalon mittels eines rostralen und kaudalen Schnittes vom Bulbus olfactorius und vom Cerebellum isoliert und durch einen Spatel aus der Schädelhöhle in die Präparationskammer gehoben. Im Anschluss wurde das Telencephalon auf einer ebenfalls eisgekühlten Präparationskammer mit einem Cyanoacrylatkleber befestigt.

Unmittelbar darauf erfolgte das Schneiden des Gehirns in einer speziellen Schneidemaschine durch eine vorher separat gereinigte, befestigte und justierte Rasierklinge.

Die horizontalen Schnitte wurden anhand folgender Parameter am Mikrotom (Leica) hergestellt: Schwingamplitude 1mm, Breite 350 $\mu$ m und Schneidegeschwindigkeit 0,12mm/s. Während des Schneideprozesses wurden die freischwimmenden akuten Hirnschnitte sofort in eine Inkubationskammer überführt, welche mit einer Carbogen-begasteten artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeitslösung (aCSF-Lösung) bei Raumtemperatur (25°C-27°C) mit folgender Zusammensetzung gefüllt war: 125mM NaCl, 4mM KCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,25mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> und 10mM Glucose. Dort inkubierten die Schnitte für mindestens eine halbe Stunde bevor mit der Messung begonnen wurde.

Die Experimente erfolgten in der Messkammer des Mikroskops, welche konstant mit einer Flussrate von 4 ml/min perfundiert wurde. Die aCSF-Lösung, die mit der Lösung in der Inkubationskammer identisch war, wurde auf 32-33°C erwärmt (Badcontroller V, Luigs und Neumann) und mit Carbogen begast. Die Zufuhr der aCSF-Lösung in die Messkammer erfolgte durch eine Drehpumpe (Ismatec Reglo), die Absaugung hingegen durch eine Vakuumpumpe. Ein speziell angefertigter Nylongrid wurde vor der Messung auf die Schnitte aufgebracht, um den durch die Perfusion hervorgerufenen mechanischen *Drift* der Hirnschnitte in der Messkammer zu minimieren und somit stabile Messbedingungen unter aCSF-Perfusion herzustellen.

### **3.4 Kalzium-Imaging mit Einzelzellauflösung**

#### **3.4.1 Mikroskopaufbau**

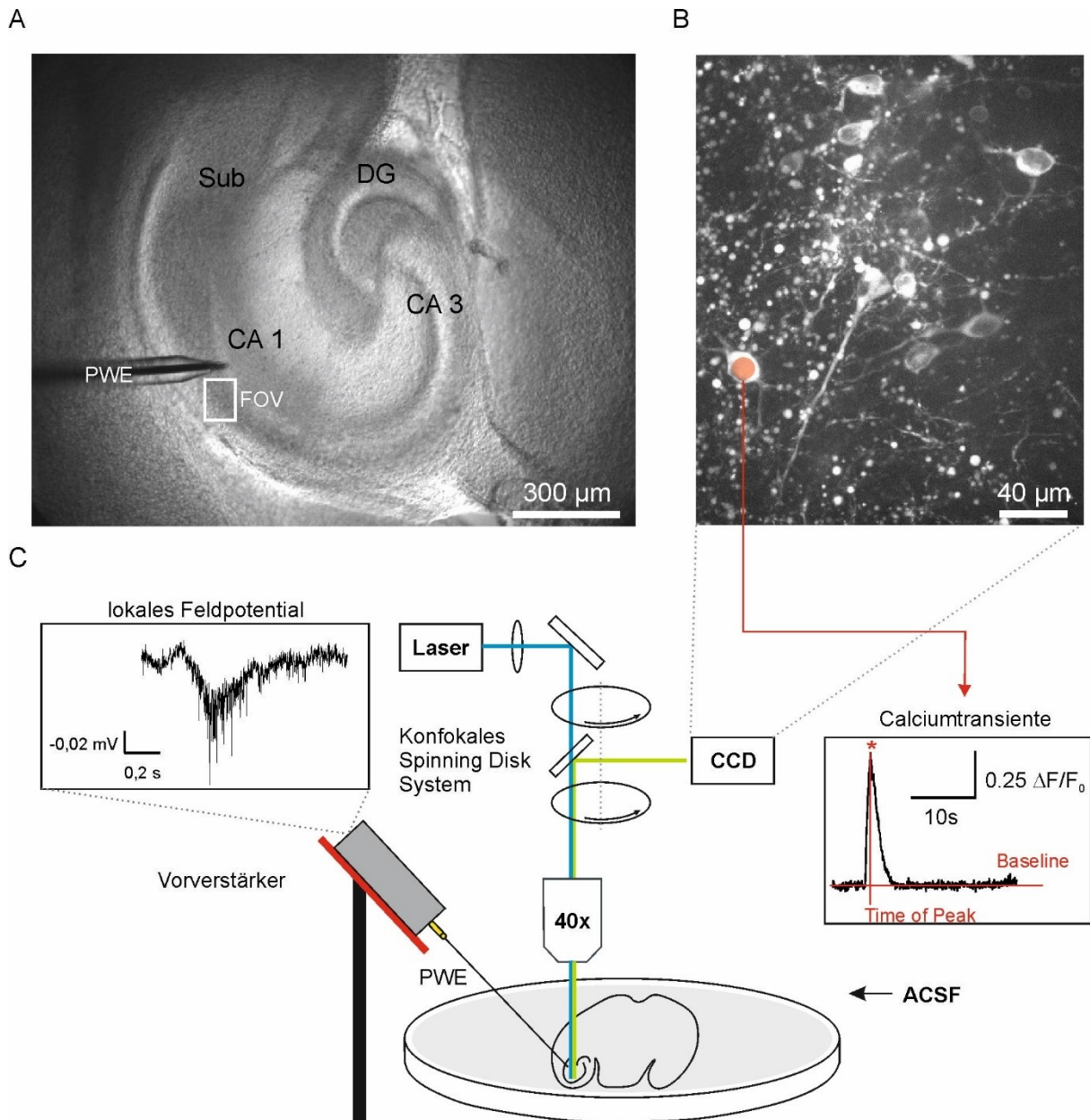
Das verwendete Setup (siehe Abbildung 5C) bestand aus zwei separaten Strahlengängen, die an einem Mikroskopgrundkörper angebracht wurden: ein Durchlichtmikroskop mit integrierter differentieller Phaseninterferenzkontrast-Optik (DIC) und ein konfokaler Fluoreszenzstrahlengang. Die Einschätzung der Qualität des Hirnschnittes erfolgte mittels Nahinfrarot-Durchlichtmikroskopie unter Verwendung eines 10fach- sowie eines 40fach-Wasserimmersionsobjektivs (Nikon N40X-NIR). Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem 40fach-Wasserimmersionsobjektiv (Nikon N40X-NIR) ohne zusätzliche analoge Vergrößerung durchgeführt. Vor Beginn der Messung wurde im Durchlichtmikroskop unter Verwendung eines 10fach-Wasserimmersionsobjektivs die Darstellung der hippokampalen Formation überprüft, um eine Schnittorientierung in optimaler Höhe und unter maximalem Erhalt der hippokampalen Struktur und Konnektivität zu garantieren. Darüber hinaus wurde unter Verwendung des 40-fachen Wasserimmersionsobjektivs und analoger Vergrößerung um das 0,35-fache, 2-fache und 4-fache die adäquate Zellqualität besonders in der CA1-Region überprüft.

Es wurde auf eine physiologische Konfiguration der Zellkörper und der apikalen Dendriten im *stratum pyramidale* geachtet. Zusätzlich wurde die Darstellung der Zellen im Ruhefluoreszenzbild durch das 40fach-Objektiv hinsichtlich der homogenen und zu erwartenden subzellulären Farbstoffverteilung (zytoplasmatisch bei GCaMP; gesamte Zelle bei OGB1-AM) überprüft, welche ebenfalls mit einem physiologischen Zustand der Zellen einhergeht (siehe Abbildung 5B). Der Fluoreszenzstrahlengang wurde für die schnelle konfokale Laserscanning-Mikroskopie benutzt (siehe Abbildung 5). Eine über dem *Setup* angebrachte 488nm Festkörperlaserlinie (Sapphire CDRH LP, Coherent) wurde über eine optische Faser in den Strahlengang des Mikroskops eingespeist. Um die Lasereingangsintensität schnell und genau regulieren zu können, wurde ein akustooptischer Filter (AOTF, Gooch und Housego) zwischen Laser und Fluoreszenzstrahlengang des Mikroskops platziert. Der AOTF wurde dabei durch die mitgelieferte Software der Firma *Gooch und Housego* angesteuert. Am oberen Ende des Strahlengangs wurde eine konfokale *spinning-disk*-Einheit (CSU-10, Yokogawa) angebracht. Diese rotierte mit 30Hz, wobei theoretisch bis zu 360 Bilder pro Sekunde aufgezeichnet werden können. Das Spinning-Disksystem besteht aus einem *pinhole-array* (Nipkow Disk) und einer darüberliegenden Mikrolinsenkonstruktion zur Kollimierung des einfallenden Laserlichts. Jedes *pinhole* hat dabei einen Durchmesser von 50 $\mu$ m. Diesen beiden Disks zwischengeschaltet befindet sich eine Filtereinheit, bestehend aus einem Dicroidspiegel (Yokogawa CSU-HC T405-488, AHF) sowie Emissions- (RazorEdge LP 488 RE, AHF) und Exzitationsfiltern zur Auftrennung des einfallenden 488nm und von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierten 515nm Lichtes. (Oreopoulos et al. 2014) Das Anregungslicht wurde unter Verwendung des 40fachen Wasserimmersions-Objektivs auf die Probe fokussiert. Das emittierte Licht des Präparats wurde mittels einer CCD-Kamera mit einer Auflösung von 696 x 520 Pixeln (Rolera XR, QImaging) detektiert, welche durch die Software „WinFluor“ (Version 3.7.5, John Dempster, University of Strathclyde Glasgow) angesteuert wurde. Bei jeder Aufnahme musste dabei ein Offset von 84 Pixeln in vertikaler Orientierung berücksichtigt werden, um mit der Akquisitionsrate der CCD-Kamera der zeitlichen Auflösung der Spinning-Disk gerecht werden zu können. Insgesamt konnten daher maximal 696 x 436 Pixel der CCD-Kamera pro Bild ausgelesen werden. Alle Aufnahmen erfolgten unter folgenden Einstellungen der CCD-Kamera: Die Beleuchtungszeit war, bei einem Gain von 45, auf 44,3 ms eingestellt. Es wurde kein Intensitätsoffset verwendet und die Gammakorrektur bei 1, also bei einem linearen Zusammenhang zwischen einfallender Lichtintensität und elektrischem Ausgabesignal, belassen.



Alle Aufnahmen erfolgten über eine Dauer von jeweils zehn Minuten. Für OGB1-AM musste kein Binning des CCD-Chips verwendet werden, sodass für diese Aufnahmen eine Bildgröße von 696 x 436 Pixeln gesetzt war. Für Aufnahmen mit den Farbstoffen GCaMP3 und GCaMP6s wurde jedoch ein Binning von 2 benutzt, sodass letztlich die Primärdaten eine Bildgröße von 348 x 218 Pixeln hatten.

Das Binning war für die genetischen Kalzium-Indikatoren notwendig und ermöglichte technisch die Erhöhung der Signalintensität auf Kosten der räumlichen Auflösung. Aufgrund der relativ niedrigen Ruhefluoreszenz hätte alternativ die Laserintensität höher eingestellt werden müssen, was wiederum zu einem signifikanten Bleaching unter der Aufnahme und der damit verbundenen Degradierung des Farbstoffs während der Messung sowie potentiellen zytotoxischen Störeffekten geführt hätte.



**Abbildung 5: Experimentalbedingungen.** A) Es wurden horizontale akute Hirnschnitte von neonatalen Mäusen verwendet. Eine Elektrode (PWE) wurde unter Durchlichtmikroskopie in die CA1-Region eingebracht. Anschließend wurde der fluoreszenzoptische Strahlengang eingestellt und ein optimales Aufnahme Fenster (FoV) in der CA1 in Nähe der Elektrode ausgewählt. In diesem Beispiel sind SST<sup>+</sup>-IN mittels GCaMP6s markiert und daher im *stratum oriens* sichtbar. C) Schematischer Aufbau des experimentellen Setups: Die zelltypspezifische Aktivität wurde mittels schneller konfokaler Laserscanning-Mikroskopie unter Verwendung eines Spinning-Disk-Systems und eines 40x - Wasserimmersionsobjektivs aufgezeichnet. Parallel dazu wurde das lokale Feldpotential in der CA1-Region gemessen, indem Platin-Wolfram-Elektroden (PWE) bis an die Grenze zwischen dem *stratum radiatum* und *stratum pyramidale* vorgeschoben wurden. Diese waren direkt am Setup mit einem Vorverstärker an einer Headstage verbunden, welcher wiederum die Signale über den Verstärker und AD-Wandler an den Computer weitergeleitet hat (nicht dargestellt). Die Hirnschnitte wurden in einer *submerged*-Kammer inkubiert und mit konstanter aCSF-Perfusion versorgt. Um den daraus resultierenden mechanischen Drift in Strömungsrichtung zu verhindern, wurde ein Nylongrid auf den Hirnschnitten platziert (nicht dargestellt).

### 3.4.2 OGB1-AM-Indikatorapplikation

Zur unselektiven Darstellung der Aktivität des neuronalen Netzwerkes der CA1-Region wurde das Gewebe mit dem Farbstoff Oregon-Green-BAPTA-1 AM (Invitrogen) gefärbt. Dieser Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt und emittiert Fluoreszenzlicht in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration bei einer Wellenlänge von 515nm. Nach der extrazellulären Applikation kann der hydrophobe Farbstoff frei über die Zellmembran diffundieren. Intrazellulär wird der AM-Esterrest dann von unspezifischen zytoplasmatischen Esterasen abgespalten und dadurch der Farbstoff polar, was seine Rückdiffusion verhindert. Diese „Diffusionsfalle“ sorgt für eine Akkumulation des Farbstoffs in den Zellen. Intrazellulär verteilt dieser sich dann weitgehend homogen, sodass Zellkern und Zytoplasma angefärbt werden. Der Indikator wurde aus einer Vorratslösung (DMSO-Lösung mit 20% Pluronic F127) entnommen und in einem Verhältnis von 1:30 mit pH-justierter aCSF-Messlösung (33°C) gemischt und gefiltert (Millex-Syring-Driven-Filtereinheit).

Dabei ergab sich in der Injektionslösung eine Endkonzentration von 0,33 mM OGB1-AM. Die Mikropipetten waren jeweils mit 7µL der Injektionslösung befüllt, wovon allerdings nur ein Bruchteil in den Hirnschnitt injiziert wurde. Die Injektion erfolgte mittels Mikropipetten, die aus Glaskapillaren vom Typ GP-150G-8P unter der Verwendung des Mikropipettenziehgeräts P-97 (Sutter Instrument Company) hergestellt wurden und somit eine standardisierte Öffnungsfläche aufwiesen. Zur Sicherstellung einer einheitlichen Öffnungsfläche wurde vor jeder Injektion auf einen elektrischen Widerstand der Glaspipetten von 3-4 MΩ geachtet. Unter Sicht der DIC-Optik im Transmissionsmikroskop wurden die Mikropipetten im Hippokampus mithilfe eines Mikromanipulators (SM-5, Luigs Neumann) im *stratum pyramidale* platziert.

Danach erfolgte die Injektion des Farbstoffs für 20 Sekunden bei einem Druck von 25-30 kPa 100-120 µm tief in den Hirnschnitt hinein. Insgesamt wurden drei bis vier separate Injektionen benutzt, um die gesamte CA1-Region anzufärben. Nach den Injektionen wurde eine Inkubationszeit (ohne jegliche Bestrahlung durch den Laser) von 20 Minuten eingehalten.

### 3.5 Lokale Feldpotentialableitungen

Die Elektroden wurden knapp über dem Schnitt positioniert und jeweils 80-120 µm vom *stratum oriens* aus in Richtung des *stratum pyramidale* in den Schnitt eingeführt, bis die Elektrodenspitze an der Grenze zwischen *stratum pyramidale* und *stratum radiatum* zum Liegen kam (siehe Abbildung 5A und C).

Die Inkubationszeit der Elektroden betrug 10 Minuten. Um parallel Kalziumbilgebung durchzuführen, wurden die Elektroden 80 $\mu$ m oberhalb oder unterhalb des Zentrums der optischen Ableitregion in der CA1-Region des Hippokampus platziert.

Für die Etablierung optimaler Ableitbedingungen, wurden zuerst Elektroden verschiedener Art ausprobiert. Dabei wurde versucht, mit Wolfram- (0,5 M $\Omega$ ), Carbonfaser- (0,2-0,5 M $\Omega$ ) - und Platin-/Iridium- (20 k $\Omega$ ) Elektroden valide Signale von FSN in der CA1-Region ohne einen Softwarefilter abzuleiten. Zusätzlich wurden Zwei-Punkt-Messungen mit Wolframelektroden erprobt, um die Sensitivität und Spezifität der Ableitungen zu erhöhen. Die Aufnahme der Signale erfolgte bei einem Gain von 1000 ohne Highpassfilter mittels eines Extrazellulärverstärkers (NPI EXT-02F/2). Außerdem erfolgten lokale Feldpotentialmessungen mit aCSF-gefüllten, angeschrägten (b) und nicht angeschrägten (ub) Mikropipetten (GP-150G-8P) (AgCl<sub>2</sub>-Draht in aCSF), die eine Impedanz von 0,8-4 M $\Omega$  aufwiesen. Für diese Messungen wurde eine separate Headstage und ein separater Verstärker (MultiClamp 700B, Molecular Devices) verwendet. Es wurde kein Highpassfilter eingesetzt und der Gain auf 50 festgesetzt. Schließlich haben sich die extrazellulären lokalen Feldpotentialableitungen mittels glisolierten Platin-Wolfram (95/5%)-Mikroelektroden (ThomasRecordings) mit einer Impedanz von 0,5-0,8 M $\Omega$  als die beste Methode zur Messung des LFPs herausgestellt. Diese waren über eine Headstage mit einem Extrazellulärverstärker (NPI EXT-02F/2) verbunden, mit dem die Signale in einem Frequenzbereich von 0-1,3kHz bei einem Gain von 1000 und einem analog eingestellten kompensatorischen Offset von annähernd 0mV aufgezeichnet wurden. Mithilfe der Akquisitionsoftware (Clampex 10.5, MolecularDevices) wurden die Aufnahmen bei 0,2 Hz Hochpass (RC-Single Pole) gefiltert, um die langsame Driftkomponente im Signal über eine Aufnahmezeit von 10 Minuten auszugleichen. Die extrazellulären Ableitungen wurden über einen Analog-Digital-Wandler (Digidata 1550A) mit einer Samplingrate von 20 kHz aufgezeichnet. In einigen Fällen war trotz der Inkubationszeit über die Aufnahmedauer eine langsame Driftkomponente vorhanden, sodass in der Mitte der Aufnahme sogar manuell der Offset auf annähernd 0mV nachjustiert wurde.

### **3.6 Synchronisation von Kalzium-Imaging und lokalen Feldpotentialableitungen**

Die optischen und elektrophysiologischen Ableitungen konnten über eine unter dem Kondensator des Mikroskopgrundkörpers angebrachte LED synchronisiert werden. Diese war mit dem AD-Wandler verbunden und konnte so manuell durch einen TTL-Puls ein- bzw. ausgeschaltet werden.

Der Output des AD-Wandlers wurde geteilt und sowohl synchron zum Input der extrazellulären Feldpotentialableitungen aufgezeichnet als auch zur LED-Lampe gesendet. Jeweils zum Beginn und Ende jeder parallelen Aufnahme wurde die LED für eine kurze Zeit von 1-2 Sekunden über die Akquisitionsoftware (Clampex 10.5, Molecular Devices) aktiviert, was als starker Helligkeitsanstieg von der CCD-Kamera registriert werden konnte. Dabei wurde immer die *Time of Peak* (ToP) des rechteckigen TTL-Pulses jeweils dem ersten von der LED beleuchteten Bild zugeordnet. Im Voraus wurde eine lineare Beziehung zwischen Bildnummer und Zeitachse in der elektrophysiologischen Ableitung am Setup durch eine hochfrequente Aktivierung der LED während einer Beispielaufnahme überprüft und bestätigt. Daher wurden für alle folgenden Aufnahmen nur zwei Synchronisationspulse verwendet, um die Bildnummer auf einer korrekten Zeitskala abbilden zu können.

### **3.7 Bumetanid-Applikation**

Bumetanid ist ein relativ selektiver NKCC1-Inhibitor mit einer sechsfach höheren Affinität für NKCC1 im Vergleich zu NKCC2. (Lykke et al. 2016) Für die experimentelle Störung der depolarisierenden Wirkung von GABA wurde Bumetanid (Sigma-Aldrich) bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in aCSF nach einer Baseline-Aufnahme für 20 Minuten mit einer Flussrate von 4 ml/min appliziert. Während der darauffolgenden Aufnahmezeit von 10 Minuten wurde die Perfusion mit Bumetanid aufrechterhalten. Für die Herstellung der Bumetanid-haltigen aCSF-Lösung wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Alliquots mit Bumetanid in DMSO verwendet.

### **3.8 Datenanalyse**

Aus Qualitätsgründen konnten nicht alle Aufnahmen zur Auswertung genutzt werden. Für die GC3<sup>Emx1</sup>- und GC6s<sup>Emx1</sup>- Aufnahmen wurden nur jene mit einer Mindestzellzahl von 20 und keinem deutlichen z-Drift verwendet. Für die GC3<sup>SST</sup>- und GC6s<sup>SST</sup>- Aufnahmen war eine rauscharme lokale Feldpotentialableitung sowie eine minimale GDP-Frequenz von 0,4/min als Selektionskriterium gefordert, um eine repräsentative Partizipationsrate der SST-positiven Zellen an den fGDPs des jeweiligen Schnittes ermitteln zu können. Aufnahmen mit erheblichem z-Drift wurden dabei ebenfalls ausgeschlossen.

### 3.8.1 Lokale Feldpotentialableitungen

Wie bereits oben beschrieben, bezieht sich der Begriff *Giant Depolarizing Potentials* ursprünglich auf intrazelluläre Ereignisse neuronaler Aktivität, welche auf einzelzellulärer Ebene gemessen wurden. Die synchrone Erregung der Pyramidenzellen an den Dendriten geht aber auch mit einer charakteristischen negativen Deflektion zwischen  $20\mu\text{V}$  und  $80\mu\text{V}$  des lokalen Feldpotentials einher, den sogenannten fGDPs (Khazipov et al. 2004, Sipila et al. 2005). Das durchschnittliche *peak-to-peak*-Rauschen betrug in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durchschnittlich  $25\mu\text{V}$ . Zuerst erfolgte eine verblindete visuelle Detektion der charakteristischen Deflektionen (fGDPs) im lokalen Feldpotential nach dem Vorbild der bereits aus der Literatur beschriebenen Signale in der CA3-Region. Außerdem wurden die fGDPs der CA1-Region mit den in der CA3-Region messbaren Signalen der eigenständig präparierten Hirnschnitte abgeglichen.

Dabei wurde darauf geachtet, dass diese Signale visuell den probatorisch gemessenen fGDPs in der CA3 und den in der Literatur beschriebenen Signalen sehr ähnlich sind. Insgesamt wurden die fGDPs in der CA3 als Referenz verwendet, da in dieser Region des Hippokampus das LFP-Signal, verglichen mit der CA1, besonders robust und relativ hochfrequent ist. Danach wurden die EZ-Ableitungen mit den parallel aufgezeichneten Kalzium-Imaging-Daten verglichen und nach der Korrelation der fGDPs aus den EZ mit GDPs im Kalzium-Imaging gesucht. Aufgrund der hohen Übereinstimmung wurden die in beiden Methoden aufgezeichneten Events für eine Template-Erstellung zur späteren semiautomatischen Detektion der extrazellulären Feldpotentiale mit der Software Clampfit 10.5 ausgewählt. Es erfolgte für die restlichen Auswertungen eine semiautomatische Detektion mit Hilfe des *template-matching*-Algorithmus (Clements und Bekkers 1997) und den oben beschriebenen ermittelten Templates. Für alle Detektionen wurde ein hoher Ähnlichkeitskoeffizient von 5 gefordert, wobei zusätzliche potentiell falsch positive Events unter visueller Kontrolle ausgeschlossen wurden. Die erste visuelle (zur Ermittlung der Templates) und die zweite semiautomatische Detektion über denselben Rohdaten führten zu nahezu identischen Gütekriterien (Sensitivität und des positiv prädiktiven Wertes) der lokalen Feldpotentialableitung (in Relation zum Kalzium-Imaging) hinsichtlich der Detektion von synchronen Netzwerkereignissen. Für alle späteren Auswertungen von Messungen der fGDPs im lokalen Feldpotential wurden dieselben Templates mit gleichem Ähnlichkeitskoeffizienten bei der Detektion genutzt, um eine spätere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

### 3.8.2 Kalzium-Imaging

Die Videosequenzen der Kalzium-Imaging-Aufnahmen wurden mithilfe der Akquisitionsoftware „Winfluor“ (Version 3.7.5) aufgezeichnet und exportiert. Anhand der Auswertungssoftware „ImageJ“ (Version 1.47) wurde eine Qualitätseinschätzung der Aufnahme durch Beurteilung von Zellqualität, Zellzahl und potentiellm Drift in z-Richtung durchgeführt. Aufnahmen mit erheblichem z-Drift und niedriger Zellzahl (<20 Zellsomata) wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Aufgrund der relativ niedrigen Ruhefluoreszenz in der Kalziumbildgebung mit GCaMP6s erfolgte eine Darkframe-Korrektur mittels eines einheitlichen Hintergrundbildes für die Aufnahmen mit dem GC6s<sup>Emx1</sup>- und dem GC6s<sup>SST</sup>-Modell. Im Anschluss wurde eine semiautomatische xy-Driftkorrektur durch das *ImageJ*-Plugin (*template matching*, Walter O'Dell) vorgenommen.

Danach wurden die sichtbaren Zellsomata im Ruhefluoreszenzbild als ROI in *ImageJ* ausgewählt und deren mittlerer Grauwert für jeden Frame kalkuliert. Für die Aufnahmen mit OGB1-AM wurde eine stereotype, 8x8 Pixel große und zirkuläre ROI ausgewählt. Für die GCaMP3- und GCaMP6s-Aufnahmen erfolgten die Ableitungen mit individuellen elliptischen ROI, die das Zellplasma und die Zellsomata gleichzeitig abdeckten. Zu beachten war dabei, dass die GCaMP-Indikatoren keine nukleäre Expression aufweisen. Eine selektive Auswahl des Zytoplasmas hätte den Einfluss von lateralem Streulicht, besonders während der GDPs, in den Emx1-Aufnahmen verstärkt. Daher wurden die Zellen jeweils mit elliptischen ROI, unter Aussparung der peripheren Zellgrenzen, markiert. Die aus *ImageJ* exportierten sogenannten Kalziumspuren, welche die absolute Fluoreszenzintensität (mittlerer Grauwert) gegen die Zeit wiedergeben, wurden nun mithilfe der Software *Clampfit* 10.5 hinsichtlich der Events, sogenannte Kalziumtransienten, ausgewertet. Zur Detektion der Kalziumtransienten wurde der in *Clampfit* 10.5 implementierte *template-matching*-Algorithmus (Clements und Bekkers 1997) angewendet. Für jedes Mausmodell (und den damit verbundenen unterschiedlichen Farbstoffcharakteristiken) wurde separat eine eigene Eventtemplate zur Detektion erstellt. Die Transienten zeigten im Allgemeinen ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Zwischen den Mausmodellen wurden die *template-matching*-Koeffizienten aufgrund der leicht unterschiedlichen Indikator- und Färbereigenschaften leicht variiert. Jedoch wurde die Detektion für alle Aufnahmen unter visueller Kontrolle ausgeführt, um falsch positive Events auszuschließen. Die detektierten Events wurden in zwei Kategorien, „A“ für korrekt bestimmte Baseline und *time of peak* sowie „AT“ für inkorrekt bestimmte Baseline, aber korrekt ermittelte *time of peak*, eingeteilt.

Schließlich wurden dann die Parameter *time of peak* für jedes Events sowie Baseline und Amplitude für „A“-Events ausgelesen.

### **3.8.3 Detektion von *Giant Depolarizing Potentials* im Kalzium-Imaging**

Für die Einschätzung der Validität der extrazellulären Ableitungen wurden verschiedene Elektroden und Ableitkonfigurationen überprüft. Die GDP-Detektion im Kalzium-Imaging erfolgte über die Selektion massiver Helligkeitsveränderungen über einer Messregion, die alle Zellen umfasste. Dieses Vorgehen wurde angewandt, um die Effizienz des Screenings der Elektroden zu erhöhen und die besonders massiven Ereignisse als Referenz zu benutzen und damit die Validität zu erhöhen.

Für alle weiteren Analysen innerhalb des Kalzium-Imagings und auch der LFP-Ableitungen mit den PWE wurde ein genauerer Analyse- und Detektionsvorgang angewendet: Mittels eines in Excel implementierten *running-bin*-Algorithmus (Dr. Tom Floßmann) wurden aus der zeitlichen Sortierung der Peakzeiten der Kalziumtransienten Momente der synchronen Netzwerkaktivierung detektiert. Dieser Algorithmus ermittelte, ob und für wie lange zu einem gegebenen Zeitpunkt der Aufnahme mehr Zellen als eine zuvor festgelegte kritische Beteiligungsrate, innerhalb der sogenannten Binggröße, aktiv waren. Die Binggröße ist definiert als der Zeitraum, in dem die synchronisierte Aktivität der Zellen mit mindestens der kritischen Beteiligungsrate stattfinden muss. Die kritische Beteiligungsrate gibt dabei den relativen Anteil der Zellen in der optischen Ableitregion an, der innerhalb der Zeit der Binggröße aktiv sein muss. Der Zeitpunkt des Auftretens eines GDPs wurde als die *time of peak* der Kalziumtransienten der ersten Zelle, die an einem jeweiligen GDP teilnahm, ermittelt. Aufgrund einer im Detektionsmechanismus des *running-bin*-Algorithmus zugelassenen Möglichkeit der Überschneidung von Zeit-Bins (1,5s) konnten auch langsamere synchrone Netzwerkereignisse aufgelöst werden. Für jeden Farbstoff wurde eine kritische Beteiligungsrate von mindestens 50% gefordert und eine Binggröße von 1,5s als sinnvolles Kriterium befunden, um GDPs im Kalzium-Imaging mit einer sehr guten zeitlichen Auflösung valide detektieren zu können. Ausgehend davon wurden die zellulären Transienten in GDP- und nicht-GDP-assoziiert eingeteilt. Die Amplituden von „A“-Events wurden als  $dF/F_0$  normiert, um zwischen den Farbstoffen quantitative Vergleiche anstellen zu können.



### **3.8.4 Kombination der elektrophysiologischen Daten mit den Imaging-Daten**

Die Events in den extrazellulären Ableitungen (fGDPs) und im Kalzium-Imaging (Transienten jeder einzelnen Zelle) wurden in einer Excelmaske zusammengeführt. Driftperioden, Rauschen sowie der Offset zwischen extrazellulären Ableitungen und Kalzium-Imaging wurden bei der Datenanalyse berücksichtigt, sodass zu jedem ausgewerteten Messzeitpunkt eine parallele und auswertbare Aufnahme von EZ und CI gefordert wurde. Anschließend wurde für jede Zelle im Kalzium-Imaging ermittelt, ob sich die Kalziumtransienten in einer Umgebung von 1,5 Sekunden benachbart zu einem fGDP-Ereignis befinden, also jeweils 1,5 Sekunden vor oder nach der Peakzeit eines fGDP-Ereignisses auftreten. Danach wurde pro Zelle bestimmt, an wie vielen unterschiedlichen fGDP-Ereignissen ein korrelierter Transient zu messen war. Durch die Berechnung des Quotienten aus dieser Anzahl und der gesamten Anzahl der im jeweiligen Schnitt gemessenen fGDP-Ereignisse wurde die sogenannte Partizipationsrate berechnet. Desweiteren wurde jeder Transient als GDP-assoziierter oder nicht-GDP-assoziierter Transient kategorisiert.

Im Unterschied zur Partizipationsrate gibt die durch die Kalzium-Imaging-Daten bestimmte Beteiligungsrate an, wie viel Prozent der Zellen, die in der Ableitregion ausgewertet wurden, überhaupt an einem jeweiligen GDP teilgenommen haben. Zur Charakterisierung LFP-assoziierter- und nicht-LFP-assoziierter- GDPs wurden zusätzliche Eigenschaften der GDPs im Kalzium-Imaging ausgewertet. Dazu gehört die Synchronisationszeit, die als die Zeitspanne definiert wurde, innerhalb derer die Zellbeteiligungsrate von 25% auf 75% der Zellen, die an einem GDP teilnehmen, während eines GDP-Ereignisses anstieg.

### **3.8.5 Randomisierung der Peakzeiten der Feld-*Giant-Depolarizing Potentials* (fGDPs)**

Unter der theoretischen Annahme, dass die Aktivität der Pyramidenzellen und Interneurone von den fGDPs total unabhängig ist, wäre in der Zusammenschau mehrerer Experimente eine Partizipationsrate, die größer als Null ist, zu erwarten. Damit die real gemessenen Daten mit dem sogenannten statistischen Rauschen vergleichbar sind, wurden Zufallssimulationen in der Analyse berücksichtigt. Um den fGDP-Zeiten zufällige Zeiten zuzuweisen, wurden die realen experimentellen Randbedingungen der möglichen fGDP-Zeitverteilungen berücksichtigt. Das Minimumintervall zwischen zwei zufällig generierten fGDP-Zeiten wurde auf 2 Sekunden festgelegt. Aufgrund der charakteristischen Template-Morphologie und dem relativ hohen geforderten Ähnlichkeitskoeffizienten zur Eventdetektion in den real gemessenen Daten konnten fast ausschließlich nur fGDPs mit einem Abstand von 2 Sekunden detektiert werden.

Des Weiteren wurden nicht verwertbare Zeitintervalle durch Drift und Rauschen in den extrazellulären Ableitungen berücksichtigt und bei der Generierung der Pseudozufallszahlen, der Grundlage für die randomisierten Eventzeiten, ausgeschlossen. Bei der zufälligen Generierung von fGDP-Zeiten aus Pseudozufallszahlen wurde darauf geachtet, dass die fGDP-Frequenz im Vergleich zu der fGDP-Frequenz aus den experimentellen Daten nicht verändert wurde. Zu jedem Zeitpunkt war die Wahrscheinlichkeit der Zuweisung einer zufälligen fGDP-Zeit gleich groß. Die Programmierung des Algorithmus zur Generierung randomisierter Datensätze entsprechend der experimentell gegebenen Rahmenbedingungen erfolgte durch PD Dr. Knut Kirmse.

### **3.8.6 Kreuzkorrelationsanalyse der Kalzium-Imaging-Daten**

Um das Ausmaß der Korrelation in der Aktivität der Zellen innerhalb einer Population quantifizieren zu können, wurde eine Kreuzkorrelationsanalyse der Kalzium-Imaging-Daten für die SST-IN und die Pyramidenzellen vorgenommen. Der im Folgenden beschriebene Algorithmus zur Ermittlung der Pearson-Korrelationskoeffizienten  $\rho$  wurde durch Vahid Rahmati (M. Sc.) und PD Dr. Knut Kirmse in die Software „Matlab“ (*MathWorks*) implementiert. Es ergab sich innerhalb einer Kalzium-Imaging-Aufnahme für jede Zelle eine binäre Zeitreihe, in welcher über eine Aufnahmedauer von insgesamt 600s zu jedem durch das Sampling-Intervall abgedeckten Zeitpunkt jeweils das Vorhandensein oder das Fehlen eines Events (Kalziumtransient) codiert wurde. Diese Zeitreihen sind allerdings von Zeitintervallen unterbrochen, in denen sich in den extrazellulären Ableitungen Drift und Rauschen ergeben hatte. Dementsprechend wurden die binären Zeitreihen um diese Perioden und den Offset zwischen Kalzium-Imaging und extrazellulären Ableitungen korrigiert. Aufgrund der diskreten Eigenschaft der Zeitachse in der Kalzium-Bildgebung kann gegebenenfalls nicht eindeutig bestimmt werden, ob ein ermittelter Unterschied in der Analyse von wenigen Frames real ist oder nur ein Detektionsartefakt darstellt. Daher wurden die Zeitreihen mittels einer Gaußfunktion gefaltet, um die Messungenauigkeiten bei der Detektion und Angabe von Events zu simulieren und dieser somit gerecht zu werden. Für die Gaußfunktion wurde eine Standardabweichung von zwei Sampling-Intervallen festgelegt, sodass sich 95% der Gauß-Verteilung über einen Zeitraum von acht Frames (ca. 354 ms) erstreckten. Schließlich wurde für die geglätteten Zeitreihen für jedes mögliche Zellpaar der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet, welcher je nach Ausmaß der Überlappung der Gauß-geglätteten Zeitreihen mit unterschiedlicher Wichtung für die jeweiligen Übereinstimmungen versehen wurde.

Zusätzlich zur Kreuzkorrelationsanalyse der experimentell gemessenen Daten wurde eine Randomisierung der Kalzium-Transientenzeiten, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, vorgenommen und anschließend der Pearson-Korrelationskoeffizient für 5000 Durchläufe berechnet. Dies war nötig, da auch die Kreuzkorrelation für unabhängige und zufallsverteilte Daten ungleich 0 ist und damit einen systematischen Bias in die quantitativen Vergleiche einbringt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die experimentell gemessenen totalen Transientenfrequenzen auch unter Randomisierung beibehalten wurden. Außerdem war die Wahrscheinlichkeit zu jedem Zeitpunkt gleich groß, ein zufälliges Event (Kalziumtransient) zugewiesen zu bekommen.

### **3.8.7 Statistische Auswertung**

Die quantitativ-statistischen Vergleiche erfolgten auf Basis der zentralen Tendenz (größtenteils als Mittelwertvergleich) als auf Nullhypothesen basierende Signifikanztests. Alle folgenden statistischen Tests wurden durch die Software „Origin Pro 9.1“ (OriginLab) durchgeführt. Zuerst wurde anhand der gemessenen Daten mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung der Grundgesamtheit getestet, wobei bei einem  $p < 0,05$  normalverteilte Daten angenommen wurden. Dieser Test wurde wegen seiner vergleichsweise hohen Teststärke bei kleinen Stichproben verwendet.

Für Mittelwertvergleiche gepaarter Stichproben von nicht normalverteilten Daten wurde der Wilcoxon-Signed-Rank-Test benutzt. Danach wurde mit Hilfe des Kolomogorow-Smirnoff-Tests auf Varianzenidentität überprüft, welche ebenfalls bei einem  $p < 0,05$  angenommen wurde. Waren die Varianzen verschieden, wurde mit der Welsch-Korrektur gerechnet.

Wenn nach dem Shapiro-Wilk-Test von einer signifikanten Normalverteilung der Grundgesamtheit ausgegangen werden konnte, wurde im Falle der Varianzenidentität jeweils der gepaarte bzw. ungepaarte zweiseitige t-Test benutzt. Nur bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde der Unterschied als signifikant bezeichnet. Die Tests erfolgten prinzipiell zweiseitig.

Ein Sternchen (\*) in den in dieser Arbeit dargestellten Graphen und Abbildungen bedeutet einen p-Wert von  $< 0,05$ , zwei Sternchen (\*\*) von  $< 0,01$  und drei Sternchen (\*\*\*) von  $< 0,001$ . Bei der Darstellung der Graphen wurde jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) eingezeichnet.

Für multiple Vergleiche und multifaktorielle Analysen wurde eine ANOVA (inkl. Post-Hoc-Tests) mit SPSS (IBM) durchgeführt. Eine Ein-Wege-ANOVA wurde mit 1W-ANOVA bezeichnet, während eine Zwei-Wege-ANOVA als 2W-ANOVA im nachfolgenden Text gekennzeichnet wurde.

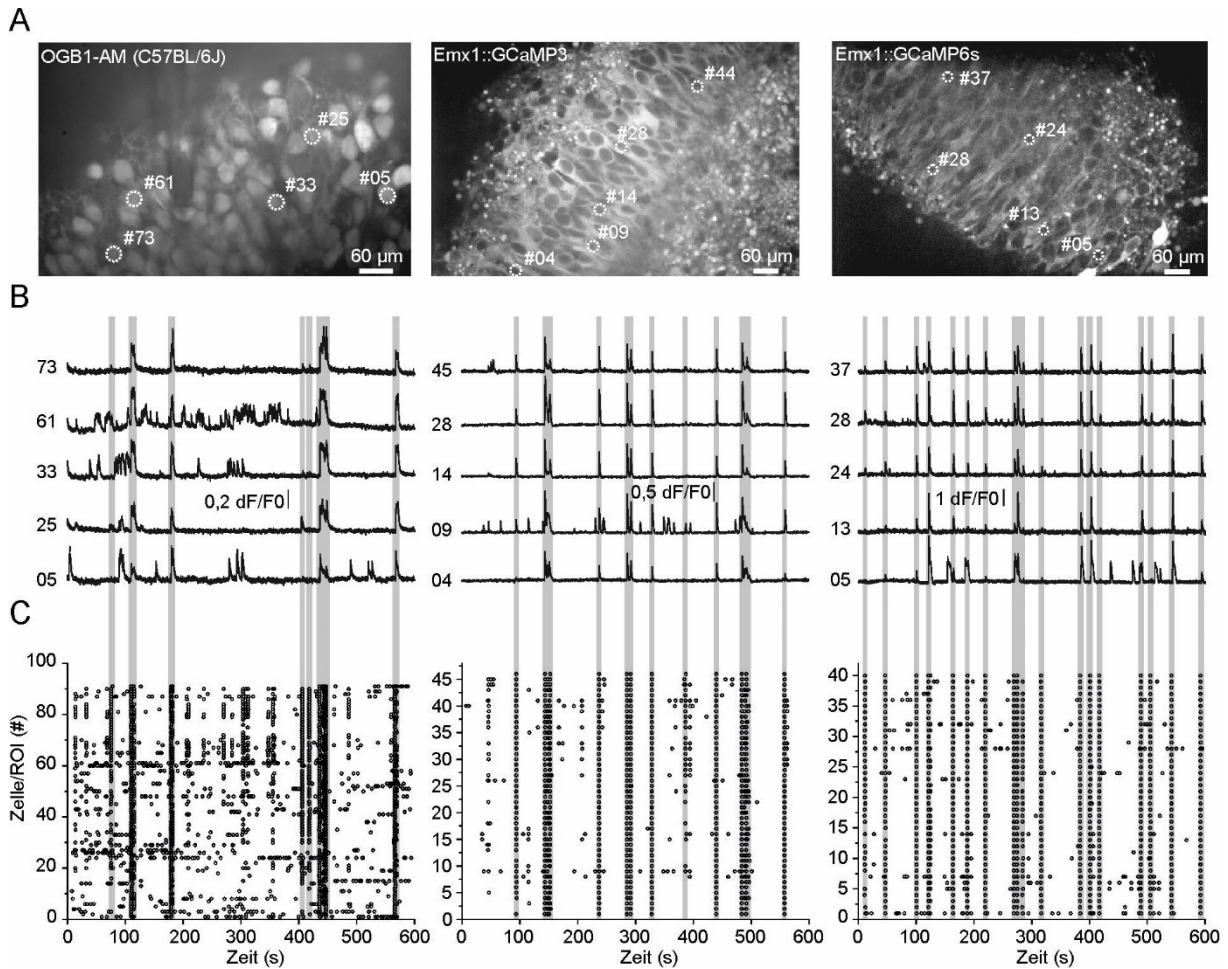
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Registrierung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1

#### 4.1.1 Konfokale Kalziumbildgebung mittels synthetischer und genetisch kodierter Indikatoren

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der frühen synchronen Netzwerkaktivität zwischen den synthetischen und den genetisch kodierten Kalzium-Indikatoren festzustellen, wurden diese an akuten hippokampalen Hirnschnitten mittels schneller Spinning-Disc-Konfokalmikroskopie gemessen. Für die anschließenden Analysen und Vergleiche wurde ein einheitliches Detektionsschema (siehe Abschnitt 3.8.3) der *Giant Depolarizing Potentials* (GDPs) im Kalziumbildgebung gefunden. Die Messung von GDPs unter Verwendung des Farbstoffs OGB1-AM stellt einen in der Literatur beschriebenen Standard zur optischen Detektion von GDPs dar, weshalb die in dieser Arbeit verwendeten genetisch codierten Kalziumindikatoren (GCaMP3 und GCaMP6s) mit den OGB1-AM-Färbungen verglichen wurden. (Stosiek et al. 2003)

Die Neurone in der optischen Ableitregion zeigten zu diskreten Zeitpunkten ein charakteristisch hohes Ausmaß an Koaktivierung und Synchronisierung der Aktivität. Bemerkenswert dabei ist, dass diese hochsynchroner Aktivität auch über räumlich relativ weit entfernte Neurone (mehrere 100µm) stattfand (siehe Abbildung 6A). Bei den Färbungen mit OGB1-AM ist davon auszugehen, dass die überwiegende Mehrheit der angefärbten Zellen Pyramidenzellen waren, da der Farbstoff in das *stratum pyramidale* der CA1 injiziert wurde. Zur Darstellung der GDPs mit den genetisch codierten Kalzium-Indikatoren wurde die *Emx1-IRES-Cre*-Treiberlinie verwendet, da die *Emx1*-positive Pyramidenzellpopulation in der CA1-Region des Hippokampus quantitativ dominierend ist und sich damit für die GDPs als tragende Population auszeichnet. Daher wurde sowohl das *Emx1<sup>IResCre</sup>::GCaMP3<sup>lsl</sup>* (*GC3<sup>Emx1</sup>*)- als auch das *Emx1<sup>IResCre</sup>::GCaMP6s<sup>lsl</sup>* (*GC6s<sup>Emx1</sup>*)-Modell verwendet. Unabhängig vom Kalzium-Indikator war in den akuten Färbungen mit OGB1-AM in C57BL/6J-WT-Mäusen (OGB1), wie auch in den genetischen Färbungen im *GC3<sup>Emx1</sup>*- und *GC6s<sup>Emx1</sup>*-Modell, die Detektion von früher synchroner Netzwerkaktivität in Form der GDPs in der Kalziumbildgebung möglich. Alle der gefärbten Schnitte zeigten qualitativ ähnliche Kalziumtransienten (CaTs) (siehe Abbildung 6B) sowie hochsynchroner Aktivitätsmuster auf Netzwerkebene zu diskreten Zeitpunkten (siehe Abbildung 6C), welche einheitlich als GDPs klassifiziert wurden. Diese Ereignisse waren von Phasen lokaler desynchronisierter Aktivität separiert.



**Abbildung 6: Registrierung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1-Region mit unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren: OGB1, GC3<sup>Emx1</sup>, GC6s<sup>Emx1</sup>.** GDPs stellen diskrete Netzwerkereignisse mit sehr hoher Zellbeteiligung dar, die von Phasen nicht-synchroner neuronaler Aktivität getrennt sind. **A)** Die drei oberen abgebildeten Ruhefluoreszenzbilder sind die Durchschnittsbilder der ersten 100 Einzelbilder einer exemplarischen Messung mit jeweils einem der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe. **B)** Kalzium-Spuren von 5 exemplarisch aus der Ableitregion ausgewählten Neurone. **C)** Der abgebildete Rasterplot ist zeitlich zu den Beispielspuren ausgerichtet und zeigt die Peak-Zeiten der Transienten aller Neurone der jeweiligen Aufnahme. Grau hinterlegt sind die mittels des Running-Bin-Algorithmus detektierten GDPs. Die weißen Balken zeigen jeweils eine Länge von 60µm an.

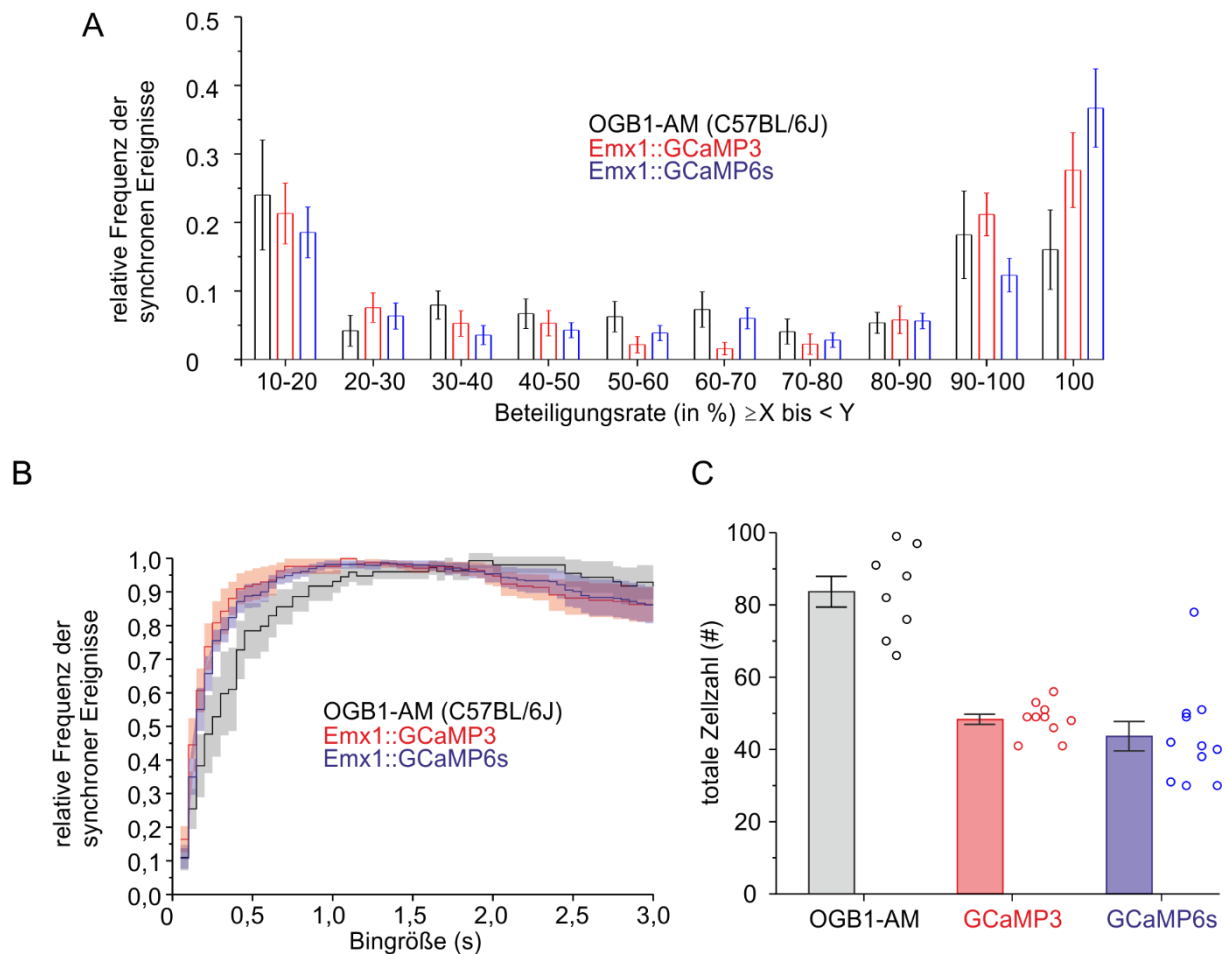
Die einheitliche Operationalisierung der GDP-Detektion in den optischen Ableitungen umfasste eine robuste Ermittlung von Netzwerkereignissen, bei denen mehr als ein bestimmter Anteil der Zellen innerhalb eines bestimmten Zeitfensters einen Kalzium-Transienten zeigte. Um die Operationalisierung der GDP-Detektion valide durchführen zu können und gleichzeitig die Anzahl detektierter synchroner Netzwerkereignisse zu maximieren, wurden die relativen Häufigkeiten der detektierten synchronen Netzwerkereignisse in Abhängigkeit vom jeweiligen Detektionsparameters (Beteiligungsrate oder Binggröße) unter Festsetzung des übrigen Parameters ermittelt. Dies erfolgte separat für alle drei Farbstoffe.

Dabei stellte sich heraus, dass die synchronen Netzwerkereignisse eine breite und kontinuierliche Verteilung hinsichtlich der Beteiligungsrate aufwiesen. Dieses Spektrum wurde anschließend in folgende drei Kategorien aufgeteilt: lokale Ereignisse mit einer niedrigen Zellbeteiligung (10% - 20% der Zellen), globale Ereignisse mit einer sehr hohen Zellbeteiligung (90% - 100%) sowie die selteneren Ereignisse mit einer breit variierenden intermediären Zellbeteiligung zwischen 20% und 90% (siehe Abbildung 7A). Für die Operationalisierung der GDP-Detektion wurde eine minimale Zellbeteiligungsrate von 50% festgelegt, um lediglich lokale Koaktivierung größtenteils auszuschließen und global synchrone Ereignisse mit einer hohen, aber nicht zwingendermaßen maximalen Zellbeteiligung einzuschließen.

Darauffolgend wurde ermittelt, wie hoch die Binggröße (Zeitraum, in dem mindestens 50% der Zellen aktiv sein müssen) festgesetzt werden sollte. Da die drei Kalzium-Indikatoren eine unterschiedliche Indikatorkinetik aufweisen und somit zu einer unterschiedlichen Netzwerkkinetik der GDPs in den jeweiligen Färbungen führen, wurde die Binggröße systematisch variiert, um einem eventuellen systematischen Bias in der Detektion entgegenzuwirken. Dabei ist zu beachten, dass eine zu kurze Binggröße der durchschnittlichen Synchronität der GDPs nicht gerecht werden würde, aber ein zu großes Zeitfenster nah beieinanderliegende und hochsynchrone Ereignisse zusammenfassen würde. Es stellte sich heraus, dass bei einer Festsetzung der Binggröße auf 1,5s für alle Indikatoren eine gleiche und größtmögliche relative Anzahl an synchronen Netzwerkereignissen detektierbar ist (siehe Abbildung 7B).

Zusammenfassend führten diese Befunde zu einer Operationalisierung und Definition der GDPs in der Kalziumbildgebung. Alle synchronen Netzwerkereignisse, die als GDPs detektiert wurden, zeichnen sich durch eine Beteiligungsrate von mindestens 50% der Zellen aus. Die an den GDPs beteiligten Zellen zeigten dabei die Peak-Zeit ihrer zellulären Transienten innerhalb eines Zeitintervalls (Binggröße) von maximal 1,5s. Diese Definition von GDPs wurde in allen nachfolgenden Experimenten weiterverwendet. Auffällig war darüber hinaus die methodisch bedingte deutlich unterschiedliche absolute Anzahl angefärbter und somit dargestellter Zellen zwischen den Indikatoren bei gleichbleibender Objektivgröße (siehe Abbildung 7C), welche bei dem verwendeten 40fach-Objektiv eine Messregion von ca. 25 mm<sup>2</sup> umfasste. Die absolute Anzahl an Zellen betrug  $84 \pm 4$  für OGB1-AM (n=8 Schnitte),  $51 \pm 3$  für GC3<sup>Emx1</sup> (n=11 Schnitte) sowie  $44 \pm 4$  für GC6s<sup>Emx1</sup> (n=11 Schnitte).

Aufgrund dieser Tatsache wurde ein relatives Maß für die Zellbeteiligungsrate festgesetzt, um anschließende Vergleiche zwischen den Indikatoren vornehmen zu können.



**Abbildung 7: Definition und Detektion von GDPs in der Kalziumbildgebung anhand der Beteiligungsrate und Bingröße.** **A)** Verteilung der Beteiligungsrate von synchronen Netzwerkereignissen in Schnitten mit unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren: OGB1 ( $n=8$ ),  $GC3^{Emx1}$  ( $n=11$ ),  $GC6s^{Emx1}$  ( $n=11$ ). Für alle Kalziumbildgebungsaufnahmen sind für die jeweiligen Farbstoffe die Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Häufigkeit synchroner Ereignisse in einem Intervall der Beteiligungsrate mit jeweils offener unterer und geschlossener oberer Intervallgrenze angegeben. Die Bingröße beträgt konstant 1,5s. **B)** Abhängigkeit der relativen Frequenz detektierter synchroner Ereignisse von der Bingröße. **C)** Deskriptiver Vergleich der absoluten Zellzahl in der Aufnahme-region (FoV) bei jeweils gleicher Vergrößerung (40fach-Objektiv) für die unterschiedlichen Indikatoren in der Kalziumbildgebung. Die drei Graphen stellen die Mittelwerte für die drei unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren dar. Deren farbige Umgebung zeigt jeweils  $\pm$  SEM. Die minimale Beteiligungsrate der Neurone ist auf mindestens 50% festgesetzt.

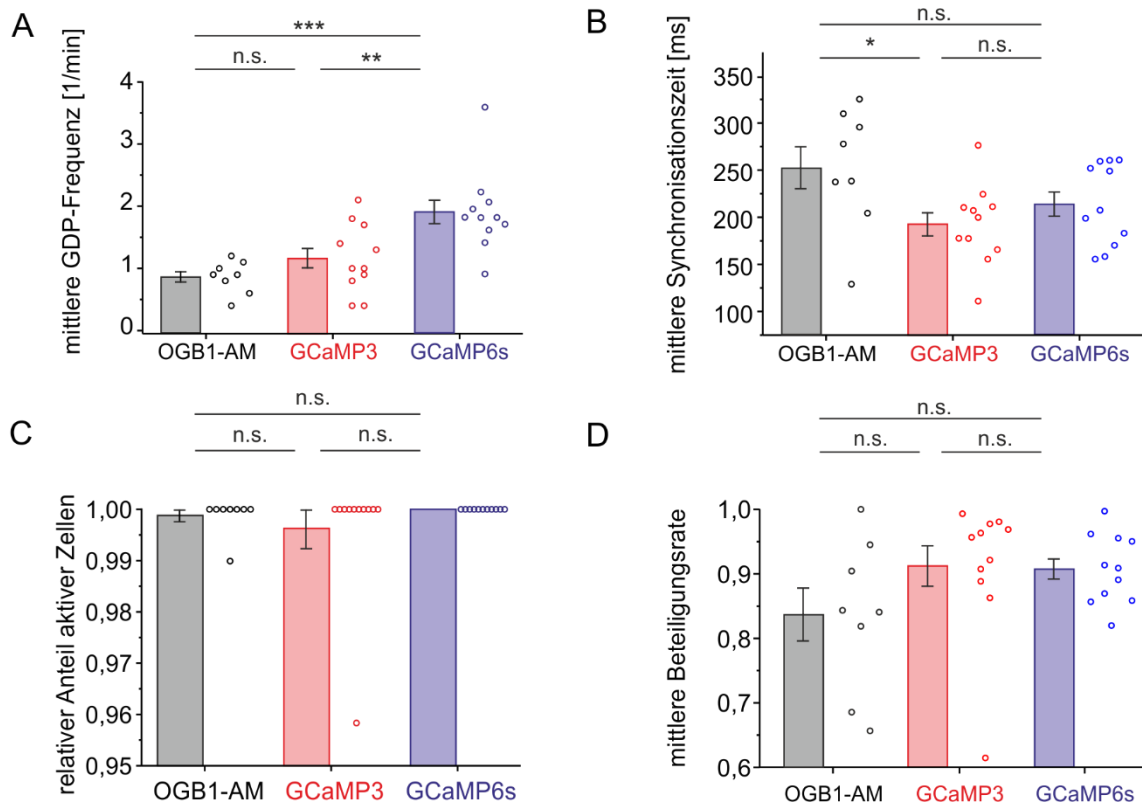
Im Anschluss wurde untersucht, inwiefern sich relevante Eigenschaften früher neuronaler Netzwerkaktivität in Form der GDPs in der Kalziumbildgebung in den verschiedenen Farbstoffen unterscheiden (siehe Abbildung 8).

Im  $GC6s^{Emx1}$ -Modell ( $n=11$  Schnitte) ist eine im Mittel um  $1,04 \pm 0,22 \text{ min}^{-1}$  signifikant höhere GDP-Frequenz als in den mit OGB1-AM ( $0,86 \pm 0,09 \text{ min}^{-1}$ ,  $n=8$  Schnitte) gefärbten Schnitten messbar ( $p < 0,001$  asymptotisch, Mann-Whitney-U-Test).

Außerdem zeigen die GC6s<sup>Emx1</sup> - Schnitte (n=11) eine im Mittel um  $0,74 \pm 0,26 \text{ min}^{-1}$  signifikant erhöhte GDP-Frequenz im Vergleich zu den GC3<sup>Emx1</sup>- Schnitten (n=11) ( $p < 0,01$  asymptotisch, Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 8A). Um Unterschiede in der Synchronisation festzustellen, wurde die Synchronisationszeit, also das Zeitintervall, in dem die Zellbeteiligung von 25% auf 75% ansteigt, zwischen den Indikatoren verglichen (siehe Abbildung 8B). Zwischen OGB1 (n = 8 Schnitte) und GC3<sup>Emx1</sup> (n = 11 Schnitte) ergab sich ein Unterschied im Mittelwert um  $60 \pm 30 \text{ ms}$  ( $p < 0,05$  ungepaarter t-Test ohne Welch-Korrektur). Hingegen unterschieden sich die OGB1-AM-Schnitte  $252 \pm 20 \text{ ms}$  nicht signifikant ( $p = 0,17$  Mann-Whitney-U-Test) von den GC6s<sup>Emx1</sup>-Schnitten  $214 \pm 10 \text{ ms}$  (n=11). Ebenso war zwischen den GC3<sup>Emx1</sup> -Schnitten  $192 \pm 10 \text{ ms}$  und den GC6s<sup>Emx1</sup>- Schnitten kein signifikanter ( $p = 0,39$  Mann-Whitney-U-Test) Unterschied in der mittleren Synchronisationszeit feststellbar. In nahezu allen der analysierten Zellen waren im Verlauf der Messung Kalziumtransienten detektierbar, wobei sich die Rate aktiver Zellen zwischen den drei untersuchten Indikatoren (OGB1-AM:  $99,9\% \pm 0,1\%$ , GC3<sup>Emx1</sup>:  $99,6\% \pm 0,4\%$ , GC6s<sup>Emx1</sup>:  $100\% \pm 0\%$ ) nicht signifikant unterschied (OGB1 vs. GC3<sup>Emx1</sup>:  $p = 0,94$  Mann-Whitney-U-Test; OGB1 vs. GC6s<sup>Emx1</sup>:  $p = 0,29$  Mann-Whitney-U-Test; GC3<sup>Emx1</sup> vs. GC6s<sup>Emx1</sup>:  $p = 0,36$  Mann-Whitney-U-Test). Die mittlere Beteiligungsrate unterschied sich zwischen den einzelnen Indikatoren nicht signifikant (OGB1 vs. GC3<sup>Emx1</sup>:  $p = 0,11$  Mann-Whitney-U-Test; OGB1 vs. GC3<sup>Emx1</sup>:  $p = 0,15$  t-Test mit Welch-Korrektur; GC3<sup>Emx1</sup> vs. GC6s<sup>Emx1</sup>:  $p = 0,26$  Mann-Whitney-U-Test; OGB1 (n=8 Schnitte)  $83,7 \pm 4,2\%$ , GC3<sup>Emx1</sup> (n=11 Schnitte)  $91,2 \pm 3,2\%$ ; GC6s<sup>Emx1</sup> (n=11 Schnitte)  $90,7 \pm 1,6\%$ ).

Abschließend lässt sich festhalten, dass eine für alle drei Indikatoren einheitliche Definition und Operationalisierung zur Detektion der GDPs gefunden wurde, unter der ein systematischer Bias in der Detektion aufgrund der unterschiedlichen Indikatorkinetik und Färbereigenschaften minimiert werden konnte. Die frühe synchrone Netzwerkaktivität (GDPs) ließ sich mit allen drei Indikatoren ohne relevante qualitative Unterschiede messen. Jedoch ergaben sich quantitative Unterschiede der GDP-Eigenschaften zwischen den Indikatoren: Besonders im GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell zeigte sich eine deutlich höhere GDP-Frequenz im Vergleich zu den anderen zwei Indikatoren. Dieser Indikator wurde im folgenden Abschnitt zur Charakterisierung der Detektion früher synchroner Netzwerkaktivität mittels extrazellulärer Ableitungen (EZ) als Referenz verwendet.





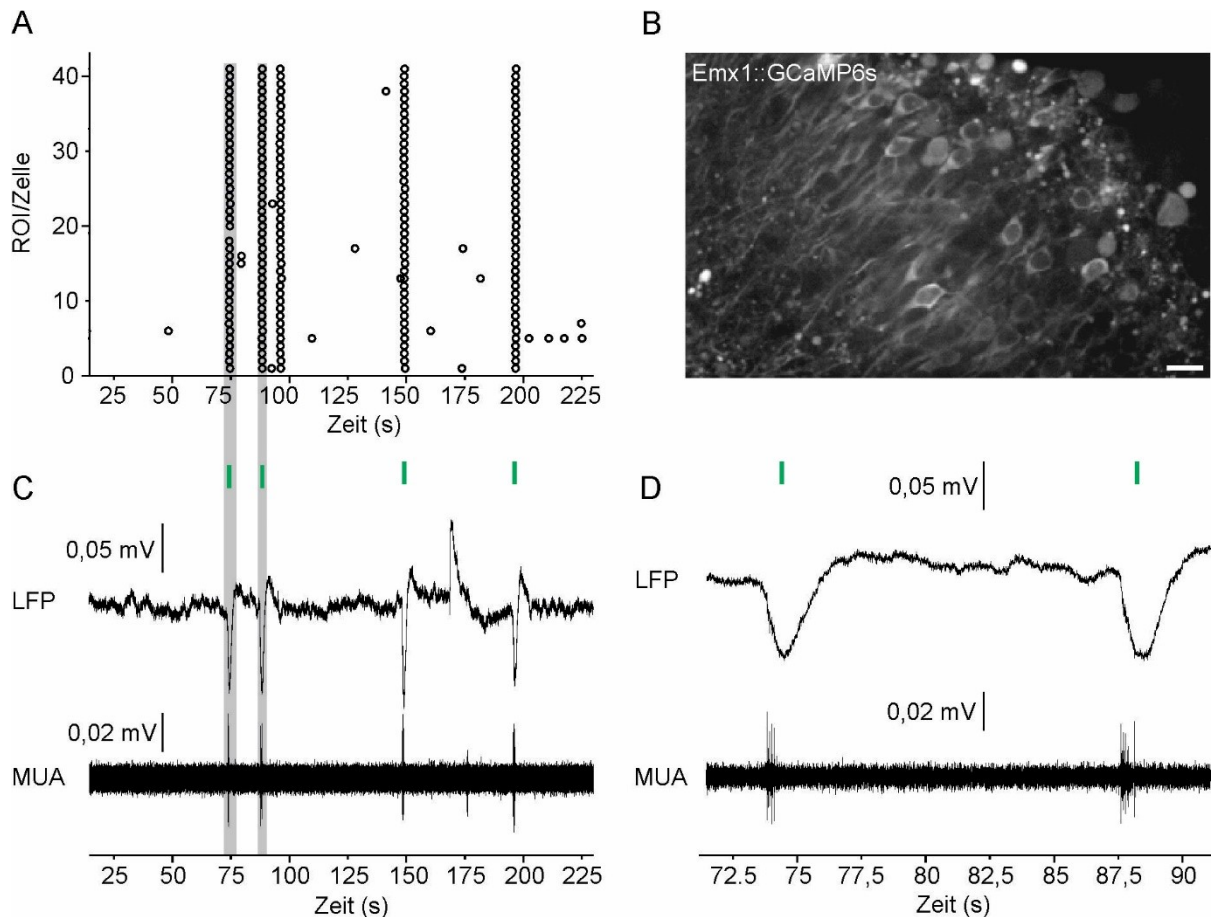
**Abbildung 8:** Unterschiedliche Eigenschaften früher synchroner neuronaler Netzwerkaktivität in der CA1-Region des Hippokampus unter Verwendung der drei unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren. Die Farbstoffe OGB1-AM (n=8 Schnitte), GC3Emx1 (n=11 Schnitte), GC6sEmx1 (n=11 Schnitte) wurden unter Kontrollbedingungen (aCSF) gemessen. Es sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM angezeigt. **A)** Vergleich der mittleren GDP-Frequenz. **B)** Vergleich der Synchronisationszeit der GDPs. **C)** Vergleich des relativen Anteils total aktiver Zellen (unabhängig von der Teilnahme an GDPs) in der optischen Ableitregion. **D)** Vergleich der mittleren Beteiligungsrate. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  (siehe Abschnitt 3.8.7).

#### 4.1.2 Parallele Detektion von Feld-Giant-Depolarizing-Potentials in den extrazellulären Ableitungen

Um später für die Somatostatin-positiven Interneurone spezifische optische Ableitungen mit genetisch codierten Kalzium-Indikatoren durchführen zu können, wurde eine von der Kalziumbildung unabhängige elektrophysiologische Detektionsmethode früher synchroner Netzwerkaktivität etabliert. Abbildung 9 zeigt die parallele Registrierung von Feld-Giant-Depolarizing-Potentials (fGDPs) in den extrazellulären Ableitungen und die Detektion von GDPs in der Kalziumbildung nach den oben beschriebenen Parametern (siehe Abschnitt 3.1.1). Die fGDPs stellen das extrazelluläre Korrelat der intrazellulär definierten GDPs auf Netzwerkebene dar. Dies basiert auf der Tatsache, dass das lokale Feldpotential allgemein als Summensignal postsynaptischer Ströme in der Ableitregion aufgefasst werden kann und somit einen Surrogatparameter für die Aktionspotentialaktivität vieler Neurone im umgebenden neuronalen Netzwerk darstellt. (Herreras 2016)

Aufgrund der späteren Kombination mit optischen Messungen war es Teil der Zielstellung, reliable Signale in sogenannten *submerged*-Kammern zu messen, welche im Vergleich zu sogenannten *interface*-Kammern prinzipiell eine weniger robuste Signaldetektion ermöglichen. (Krimmer und Goldman-Rakic 1997) Ein weiterer Faktor, welcher die Detektion von fGDPs in der CA1-Region erschwert, ist die geringere Synchronisation der Pyramidenzellen (signaltragende Population) im Vergleich zur CA3. (Seress et al. 1989, Li et al. 1994, Menendez de la Prida et al. 1998) In der Literatur ist außerdem kein Messprotokoll über extrazelluläre Feldpotentialmessungen in der CA1-Region des neonatalen Hippokampus von Mäusen *in vitro* in sogenannten *submerged*-Kammern beschrieben. Es wurden daher verschiedene Elektrodenarten und Ableitkonfigurationen mit individuellen kinetischen Kriterien für ein fGDP-Ereignis auf die Validität und Sensitivität der Detektion in Referenz zur Kalziumbildung mit unterschiedlichen Indikatoren getestet (siehe Abbildung 10). Dieses exploratorische Vorgehen war notwendig, da aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren, welche eine robuste und valide Signaldetektion mittels EZ ermöglichen, die Vorhersage einer passenden Ableittechnik *a priori* enorm aufwändig ist. (Robinson 1968, Nelson et al. 2008) Bei den in der Kalziumbildung detektierten GDPs handelte es sich vorrangig um besonders massive Ereignisse (siehe Abschnitt 3.8.3).

Schließlich zeigten sich fGDPs mit der charakteristischen Kinetik der Deflektion des lokalen Feldpotentials (LFP) besonders gut in den Ableitungen mit Platin-Wolfram-Elektroden (PWE). (Wolbarsht et al. 1960, Reitboeck 1983) Außerdem zeigte sich in einigen Ableitungen Multi-Unit-Activity (MUA), welche sich als sichtbare Spike-Salven den Deflektionen des LFPs überlagerten (siehe Abbildung 9D). Da diese jedoch nicht immer messbar waren, was die Effizienz der Analyse verringern würde, wurde die Detektion der GDPs in den EZ mit PWE auf die LFP-Komponente des Signals beschränkt.

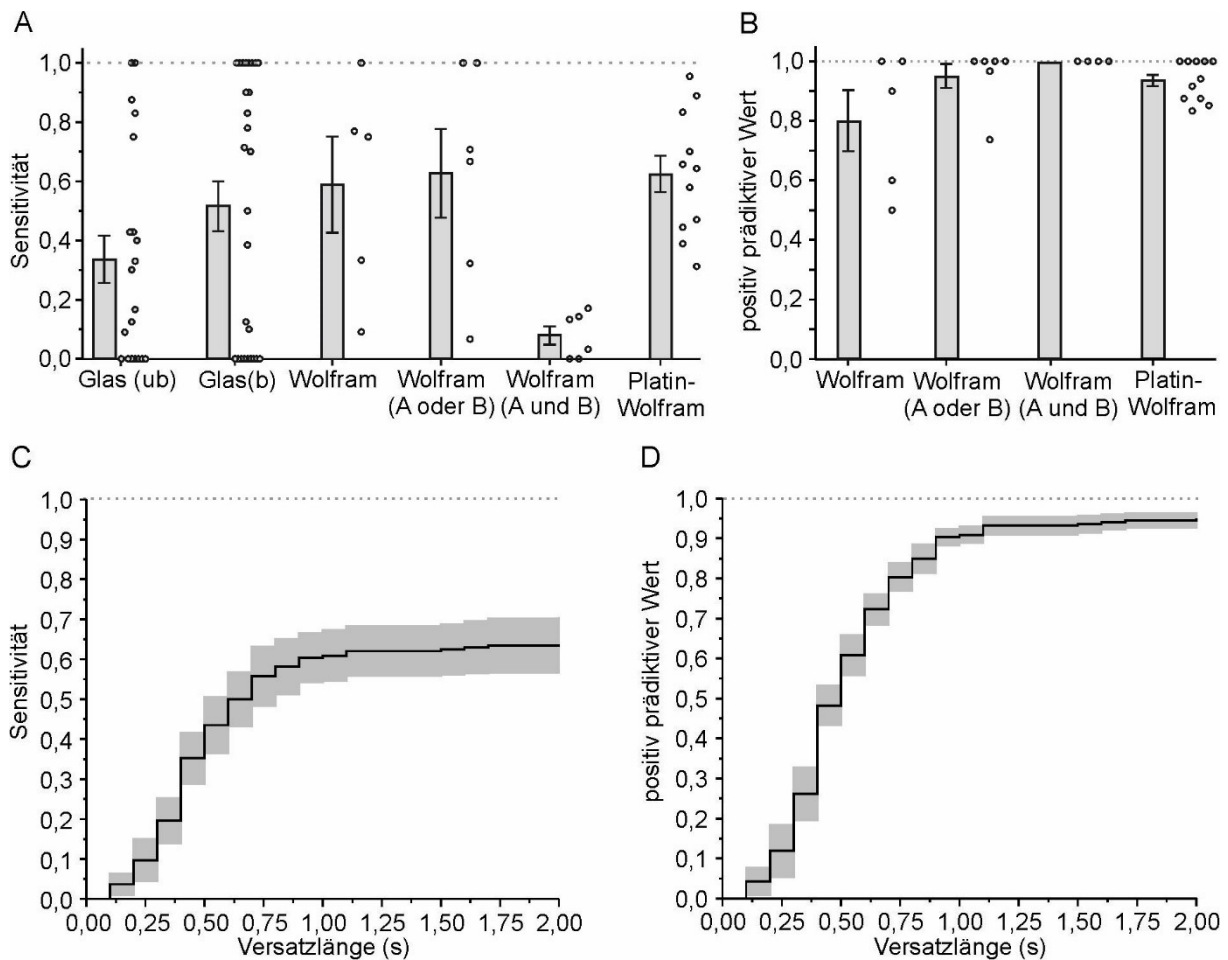


**Abbildung 9:** Parallele Detektion früher neuronaler Aktivität in der CA1-Region des Hippokampus durch extrazelluläre Ableitungen (EZ) mittels Platin-Wolfram-Elektroden (PWE) und paralleler Kalziumbildgebung (GCa6<sup>Emx1</sup>). **A)** Rasterplot der Peakzeiten der in B sichtbaren Zellen. **B)** Ruhefluoreszenzbild der ersten 100 Bilder der exemplarischen Aufnahme. Der weiße Balken zeigt 30µm an. Die grünen Balken zeigen die Peakzeit der Deflektion des LFPs als definierte fGDP-Zeit an. **C)** Darstellung der zu A synchronen extrazellulären Ableitung, wobei die LFP-Komponente (Tiefpassfilter bei 50Hz, Butterworth) und die Multi-Unit-Aktivität (Bandpassfilter 100 Hz - 500 Hz, Butterworth) separat angezeigt sind. Die LFP-Spur weist an diskreten Zeitpunkten starke Negativierungen des lokalen Feldpotentials (LFP) auf, welche von einer hochsynchronen Aktivierung der Neurone in der Kalziumbildgebung (siehe Rasterplot in Abbildung A) begleitet werden. **D)** Die LFP-Komponente zeigt charakteristische starke Negativierungen des Feldpotentials (Deflektionen) an, welche von einer Salve von Spikes im Hochfrequenzband MUA (darunter abgebildet) begleitet sind. Zeitliche Vergrößerung der zwei in C grau hinterlegten sowohl in der Kalziumbildgebung (GDPs) als auch in den EZ-Ableitungen (fGDPs) detektierten synchronen Netzwerkereignissen.

#### 4.1.2.1 Gütekriterien von extrazellulären Ableitungen der Giant Depolarizing Potentials in der CA1-Region

Nicht alle synchronen Netzwerkereignisse aus der Kalziumbildgebung gehen mit einem Ereignis in den EZ-Ableitungen einher und umgekehrt. Folglich wurde daher ermittelt, wie sich die Sensitivität und der positive prädiktive Wert der EZ mittels unterschiedlicher Ableitbedingungen sich zwischen den Elektroden, bezogen auf das Kalziumbildgebung, unterscheiden (siehe Abbildung 10A-B).

Darüber hinaus war es entscheidend, welche Methode anhand ihrer Erfolgsrate und Reproduzierbarkeit guter Ableitbedingungen am ehesten als zweite und von der Kalziumbildung unabhängigen Detektionsmethode früher synchroner Netzwerkaktivität geeignet ist.



**Abbildung 10: Unterschiede der Qualitätsparameter (Sensitivität und Spezifität) der verschiedenen Elektrodenarten und Ableitkonfigurationen zur Detektion von GDPs.** Die Kalziumbildung mit unterschiedlichen Indikatoren stellt hierbei die Referenzmethode dar. **A)** Sensitivität der unterschiedlichen EZ-Ableitungen: Glaselektroden ungebevellt (ub) oder bebevellt (b), auf Wolfram-Elektroden und Platin-Wolfram-Elektroden basierte Ableitungen. **B)** Positiver prädiktiver Wert der EZ-Ableitungen für die auf Wolframelektroden und Platin-Wolfram-Elektroden basierten Ableitungen. **C)** Abhängigkeit der mittleren Sensitivität von der durch die Detektionsmaske erlaubten maximalen Versatzlänge. **D)** Abhängigkeit des positiven prädiktiven Werts von Platin-Wolfram-Elektroden von der durch die Detektionsmaske erlaubte maximale Versatzlänge. Die graue Umgebung der Graphen aus C und D sowie die Balken in A und B zeigen jeweils den Bereich von  $\pm$ SEM an.

Zuerst wurden EZs mit nicht-angeschliffenen (ub) und angeschliffenen (b) Glaspipetten parallel zur Kalziumbildgebung mit Färbung durch OGB1-AM (C57BL/6J) und im GC3<sup>Emx1</sup>-Modell evaluiert. Die Aufnahmen erfolgten dabei mittels eines Hardware-Bessel-Tiefpassfilters unter 10kHz bei einem variierenden Elektrodenwiderstand von 0,7 M $\Omega$  - 3,5 M $\Omega$ . Die nicht-angeschliffenen Glaspipetten erreichten eine mittlere Sensitivität von 33%  $\pm$  8,1% (n=20 Schnitte), während die angeschliffenen Glaspipetten eine mittlere Sensitivität von 51,6%  $\pm$  8,56% (n=27 Schnitte) aufwiesen. Aufgrund der niedrigen Erfolgsrate und hohen Variabilität der Ableitqualität wurde auf die Ermittlung des positiven prädiktiven Werts der EZ mit Glaspipetten verzichtet.

Danach wurden einfache sowie doppelte extrazelluläre Ableitungen mit Wolfram-Elektroden durchgeführt. Die Einfach-Ableitungen erfolgten in Bezug auf die Kalziumbildgebung mit OGB1-AM (C57BL/6J). Es wurde ein Gain von 1000 sowie ein Hardware-Bandpassfilter von 3-1300 Hz eingestellt und mit einer Impedanz der Elektroden von 0,5-1 M $\Omega$  (bei 1 kHz) gemessen. Dabei zeigten die Einfach-Ableitungen mit den Wolfram-Elektroden eine mittlere Sensitivität von 58,87%  $\pm$  16,44% (n=5 Schnitte). Der mittlere positiv prädiktive Wert dieser Ableitungen betrug 80%  $\pm$  10,48% (n=5 Schnitte).

Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, wurden Doppel-Ableitungen mit den Wolfram-Elektroden durchgeführt. Der Gain wurde bei 1000 belassen, jedoch in Kanal A mit einem Hardware-Bandpassfilter von 3-1300 Hz und in Kanal B mit einem Hardware Bandpassfilter von 30-1300 Hz aufgezeichnet. Die Impedanz beider Elektroden variierte von 0,5-1 M $\Omega$ . Die Ableitungen erfolgten in Referenz zur Kalziumbildgebung mit GC6s<sup>Emx1</sup>. Es wurde für folgende Kombination der fGDP-Registrierung in beiden Kanälen separat die Sensitivität und der positiv prädiktive Wert ermittelt: 1) ein fGDP ist in Kanal A oder Kanal B aufgetreten und 2) ein fGDP ist in Kanal A und in Kanal B aufgetreten. Für Fall 1 ergibt sich eine mittlere Sensitivität der Ableitungen von 62,72%  $\pm$  15,19% (n=6 Schnitte) und ein mittlerer positiv prädiktiver Wert von 95,1%  $\pm$  4,3% (n=6 Schnitte). Für Fall 2 ergibt sich eine mittlere Sensitivität der Ableitungen von 7,98%  $\pm$  3,17% (n=6 Schnitte) und ein mittlerer positiv prädiktiver Wert von 100%  $\pm$  0% (n=4 Schnitte).

Aufgrund des hohen methodischen Aufwands und der nur mäßigen Erfolgsrate der extrazellulären Ableitungen mit den bereits beschriebenen Methoden wurde sich zuletzt für eine Charakterisierung der einfachen EZ-Ableitungen mit Platin-Wolfram-Elektroden entschieden. Der Gain wurde wiederholt auf 1000 festgesetzt und ein Hardware-Tiefpassfilter bei 1,3 kHz eingestellt. Die Datenakquisition erfolgte mittels eines Software-Highpassfilters von 0,2 Hz, um die langsame Driftkomponente der Elektroden während der Aufnahme auszugleichen.

Die mittlere Sensitivität betrug  $62,47\% \pm 6,32\%$  ( $n=11$  Schnitte) und der mittlere positiv prädiktive Wert  $93,57\% \pm 2,04\%$  ( $n=11$  Schnitte), wobei die Erfolgsrate der Ableitungen im Vergleich zu den Ableitungen mit den anderen beschriebenen Elektroden sehr hoch war. Für die Platin-Wolfram-Elektroden wurde im Anschluss ermittelt, inwiefern die Qualitätsparameter eine Abhängigkeit von der im Detektionsalgorithmus erlaubten Versatzlänge (siehe Abschnitt 3.8.4) besitzen. In Abbildung 10 C-D ist zu erkennen, dass das Optimum der Sensitivität und des positiven prädiktiven Wertes bei einer Versatzlänge von 1,5 s gegeben ist. Innerhalb dieses Zeitfensters aufgetretene fGDPs und GDPs wurden schließlich als korreliert eingestuft.

In den nachfolgenden Experimenten und Analysen wurden alle EZ-Ableitungen mit den Platin-Wolfram-Elektroden zur Detektion von fGDPs aufgrund des sehr hohen positiven prädiktiven Werts, einer geringen Variabilität der Signalkinetik, der akzeptablen Sensitivität und der hohen Erfolgsrate im Vergleich zu den Ableitungskonfigurationen mit den anderen Elektroden durchgeführt. Zusätzlich wurde für die parallelen Analysen der Kalziumbildung und der EZ-Ableitungen ein zeitlicher Versatz von  $\pm 1,5$  s der Peakzeit des LFP-Signals um die Peakzeit des ersten Kalziumtransienten eines GDPs in der Kalziumbildung als weiterer Detektionsparameter festgesetzt.

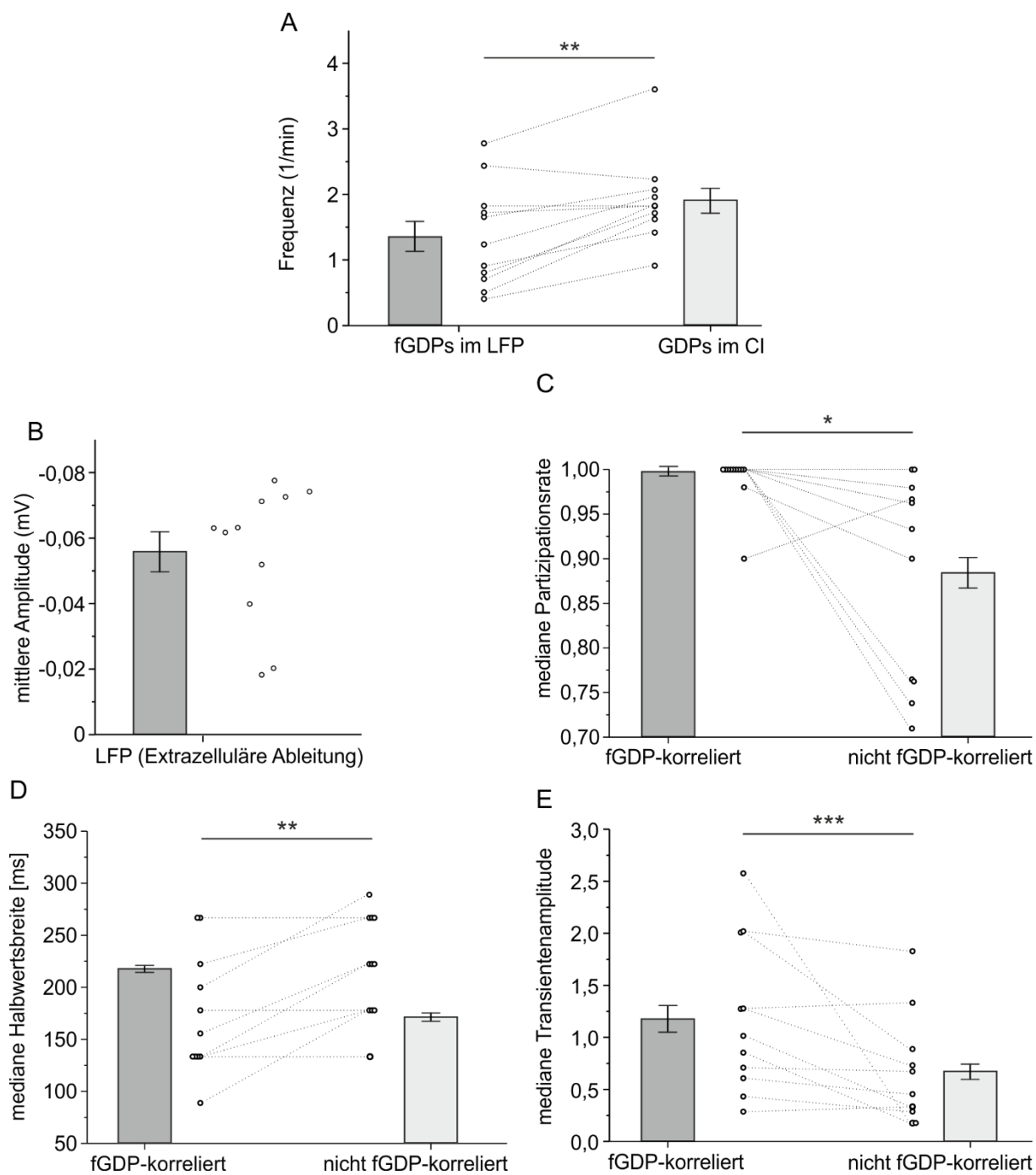
#### **4.1.2.2 Unterschiede zwischen extrazellulär-detektierten und nicht-detektierten *Giant Depolarizing Potentials* in der Kalziumbildung**

Da die EZ-Ableitungen mit PWE nicht alle GDPs in der Kalziumbildung ( $GC6s^{Emx11}$ ) ( $62,47\% \pm 6,32\%$ ) detektieren konnten, wurde nach Gründen für die fehlende Auflösung der restlichen GDPs gesucht. Außerdem wurde eine Einschätzung der Unterschiede zwischen den ebenfalls als fGDP detektierten und den restlichen GDPs in der Kalziumbildung analysiert.

In Abbildung 13 A ist dargestellt, dass die Frequenz der fGDPs um  $0,54 \pm 0,13$   $\text{min}^{-1}$  signifikant ( $p < 0,01$  exakt, Wilcoxon-Signed-Rank-Test,  $n=11$ ) niedriger ist, als die Frequenz der GDPs in der Kalziumbildung. Die mittlere Amplitude der fGDPs beträgt  $-44,2 \pm 6,3$   $\mu\text{V}$ . Schließlich wurde untersucht, inwiefern sich die GDPs in der Kalziumbildung, die synchron mit detektierbaren fGDPs in den EZ-Ableitungen auftreten, hinsichtlich der Beteiligungsrate und der mittleren Transientenamplitude unterscheiden, um scheinbar nicht-detektierte Ereignisse in den EZ zu klären (siehe Abbildung 11 B-E). Die mediane GDP-assoziierte Transientenamplitude von fGDP-synchronen zu nicht-fGDP-synchronen GDPs ist im Mittel um  $0,53 \pm 0,22$  signifikant ( $p < 0,001$  exakt, Wilcoxon-Singed-Rank-Test,  $n=11$ ) erhöht.

Die mediane Beteiligungsrate von Neuronen zu fGDP-synchronen GDPs ist im Mittel um  $10,6 \pm 3,8\%$  signifikant ( $p < 0,05$  exakt, Wilcoxon-Signed-Rank-Test,  $n=11$ ) höher als zu nicht-fGDP-synchronen GDPs in der Kalziumbildung. Außerdem ist die mediane Halbwertsbreite fGDP-korrelierter Ereignisse im Mittel um  $46 \pm 12$  ms signifikant geringer ( $p < 0,01$ , gepaarter t-Test) als die der nicht-fGDP-korrelierten Ereignisse.

Zusammenfassend zeigte sich also, dass die EZ eine niedrigere Frequenz früher synchroner Netzwerkaktivität im Vergleich zur Kalziumbildung ( $GC6s^{Emx1}$ ) anzeigen. In der EZ werden besonders Ereignisse mit einer hohen Transientenamplitude, einer hohen Beteiligungsrate und einer synchroneren Aktivierung detektiert, sodass sich in der EZ besonders die prominenten Netzwerkereignisse widerspiegeln und die nicht 100%ige Sensitivität der EZ-Ableitungen zumindest teilweise biologisch begründet ist.



**Abbildung 11: Vergleich der in den EZ-Ableitungen (PWE) detektierten fGDPs-korrelierten und nicht-fGDP-korrelierten GDPs in der Kalziumbildgebung (GC6s<sup>Emx1</sup>).** **A)** Frequenzunterschiede der fGDPs der EZ-Ableitungen und der GDPs der Kalziumbildgebung. **B)** Verteilung der Amplitude der fGDPs. Vergleich folgender Parameter zwischen fGDP und nicht-fGDP-korrelierten GDP-Ereignissen der Kalziumbildgebung: **C)** mediane Beteiligungsrate, **D)** mediane Halbwertsbreite, **E)** mediane Transientenamplitude. Die Balken stellen jeweils  $\pm$  SEM dar. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



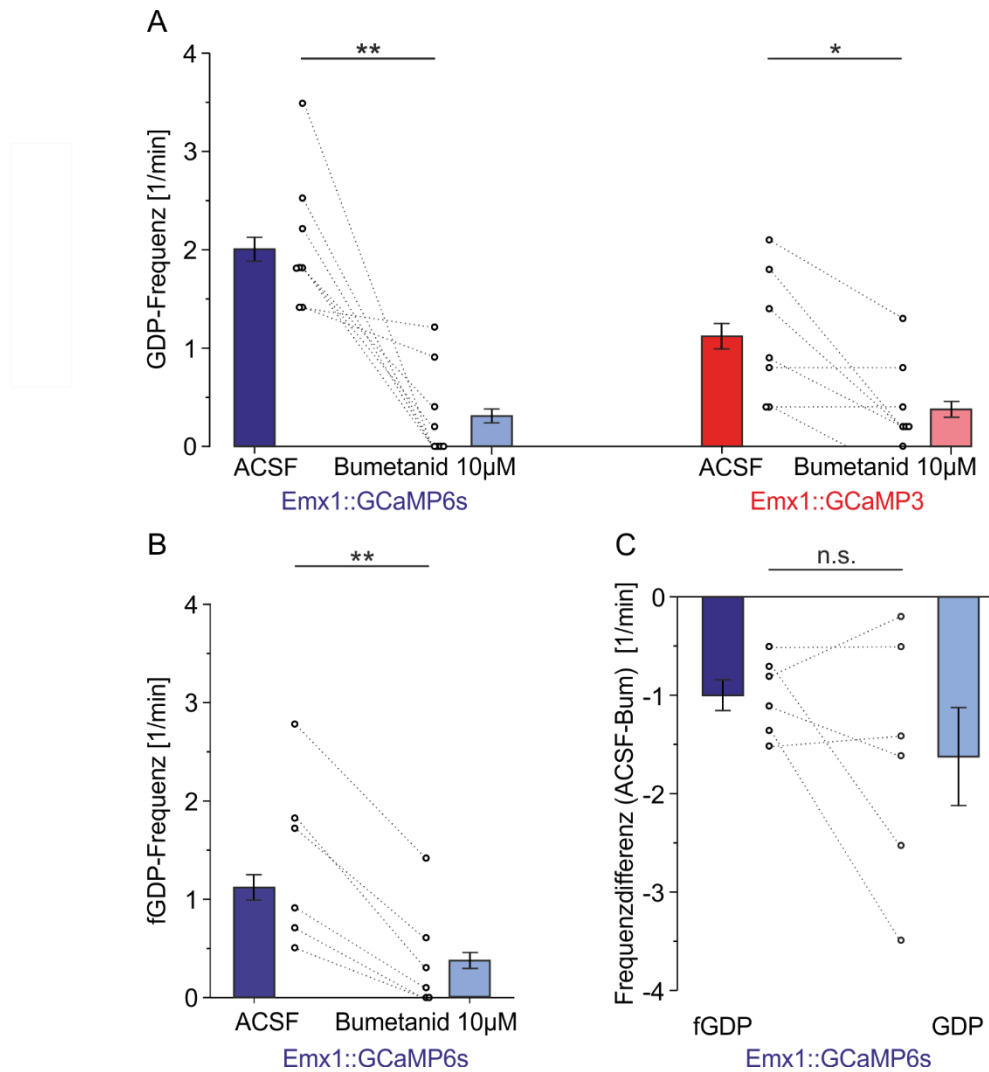
### **4.1.3 Einfluss von Bumetanid auf die Frequenz der *Giant Depolarizing Potentials* in den extrazellulären Ableitungen und in der Kalziumbildgebung**

In einem weiteren Schritt wurde ermittelt, inwiefern die in den optischen (GC3<sup>Emx1</sup> - und GC6s<sup>Emx1</sup>- gefärbten Schnitte) und elektrophysiologischen Ableitungen (EZ mit PWE) gemessene hippokampale frühe synchrone Netzwerkaktivität die in der Literatur beschriebene und für die GDPs charakteristische Abhängigkeit von der NKCC1-vermittelten GABAergen Depolarisation zeigt (siehe Abschnitt 1.2.3). Dafür wurde jeweils Bumetanid (Bum) (10  $\mu$ M) für 20 min nach einer Baseline-Aufnahme von 10 min appliziert und die GDP- bzw. fGDP-Frequenzänderung unter kontinuierlicher Perfusion mit der Bumetanid-haltigen aCSF-Lösung gemessen.

Nach Applikation von Bumetanid in GC3<sup>Emx1</sup> (n=7 Schnitte) stellt sich eine signifikante mittlere Frequenzverringering von  $0,67 \pm 0,22 \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , gepaarter t-Test) ein. Auch in den GC6s<sup>Emx1</sup> - Schnitten (n=9) verringerte sich die GDP-Frequenz im Mittel um  $1,72 \pm 0,38 \text{ min}^{-1}$  signifikant ( $p < 0,01$ , gepaarter t-Test) (siehe Abbildung 14 A). Zuletzt wurde untersucht, ob die für die Kalziumbildgebung synchronen Signale aus den EZ ebenfalls die charakteristische Abhängigkeit von der GABAergen Depolarisation zeigen. Hierfür wurde in den GC6s<sup>Emx1</sup>- Schnitten (n=6) jeweils parallel die GDP-Frequenz vor (10 min Aufnahmedauer) und nach (10 min Aufnahmedauer) Applikation von Bumetanid (10  $\mu$ M für 20 min) verglichen.

Die Frequenzabnahme unterschied sich nicht signifikant ( $p = 0,23$  gepaarter t-Test) zwischen den fGDPs  $-1,0 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$  und den GDPs in der Kalziumbildgebung (GC6s<sup>Emx1</sup>)  $-1,62 \pm 0,50 \text{ min}^{-1}$ . Jedoch zeigten sowohl die fGDPs ( $p = 0,001$  einfacher t-Test) als auch die GDPs in der Kalziumbildgebung eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme der Frequenz nach Applikation von Bumetanid (siehe Abbildung 12 B-C).

Zusammenfassend konnte mit den beschriebenen Experimenten gezeigt werden, dass die Frequenz der GDPs mit den beiden GECIs in der Kalziumbildgebung sowie die fGDP-Frequenz in den EZ mittels PWE durch Applikation von Bumetanid sich signifikant verringerte. Die synchronen Ereignisse in der Kalziumbildgebung und in den extrazellulären Ableitungen zeigen die in der Literatur beschriebene charakteristische Abhängigkeit von der GABAergen Depolarisation. Der Effekt von Bumetanid unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den fGDPs und den GDPs in der Kalziumbildgebung in den GC6s<sup>Emx1</sup>- Schnitten.



**Abbildung 12:** Einfluss von Bumetanid-haltiger (10µM) aCSF auf die Darstellung von GDPs (CI) und fGDPs (EZ) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen unter aCSF. **A**) Frequenzdifferenz der GDPs in der Kalziumbildgebung mit GC6s<sup>Emx1</sup> (n=9 Schnitte) und GC3<sup>Emx1</sup> (n=7 Schnitte). **B**) fGDP-Frequenz jeweils vor und nach Applikation von Bumetanid (10µM) in den GCaMP6s gefärbten Schnitten (n=6). **C**) Vergleich der Frequenzdifferenz von fGDP- und GDP-Ereignissen in den GCaMP6s- gefärbten Schnitten (n=6). Die Balken stellen jeweils ± SEM dar. n.s. = nicht signifikant; \* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001.

## 4.2 Einfluss unterschiedlicher genetisch codierter Kalziumindikatoren auf die Darstellung neuronalen Aktivität

### 4.2.1 Unterschiede in der zellulären Aktivität der Pyramidenzellen zwischen den Kalzium-Indikatoren

Um den methodisch bedingten systematischen Einfluss der unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren auf die Darstellung der zellulären Aktivität und die damit verbundene Variabilität der verschiedenen Aktivitätsparameter einschätzen zu können, wurden die folgenden zellulären Aktivitätsparameter zwischen den verschiedenen Kalzium-Indikatoren verglichen.

Zu beachten ist dabei, dass sich die Kennung „GDP-assoziierter Transient“ auf GDPs in der Kalziumbildung und nicht fGDPs in der EZ mit PWE-Elektroden bezieht, um alle drei Indikatoren vergleichen zu können, da für die Schnitte mit OGB1-AM keine parallelen EZ mit PWE durchgeführt wurden.

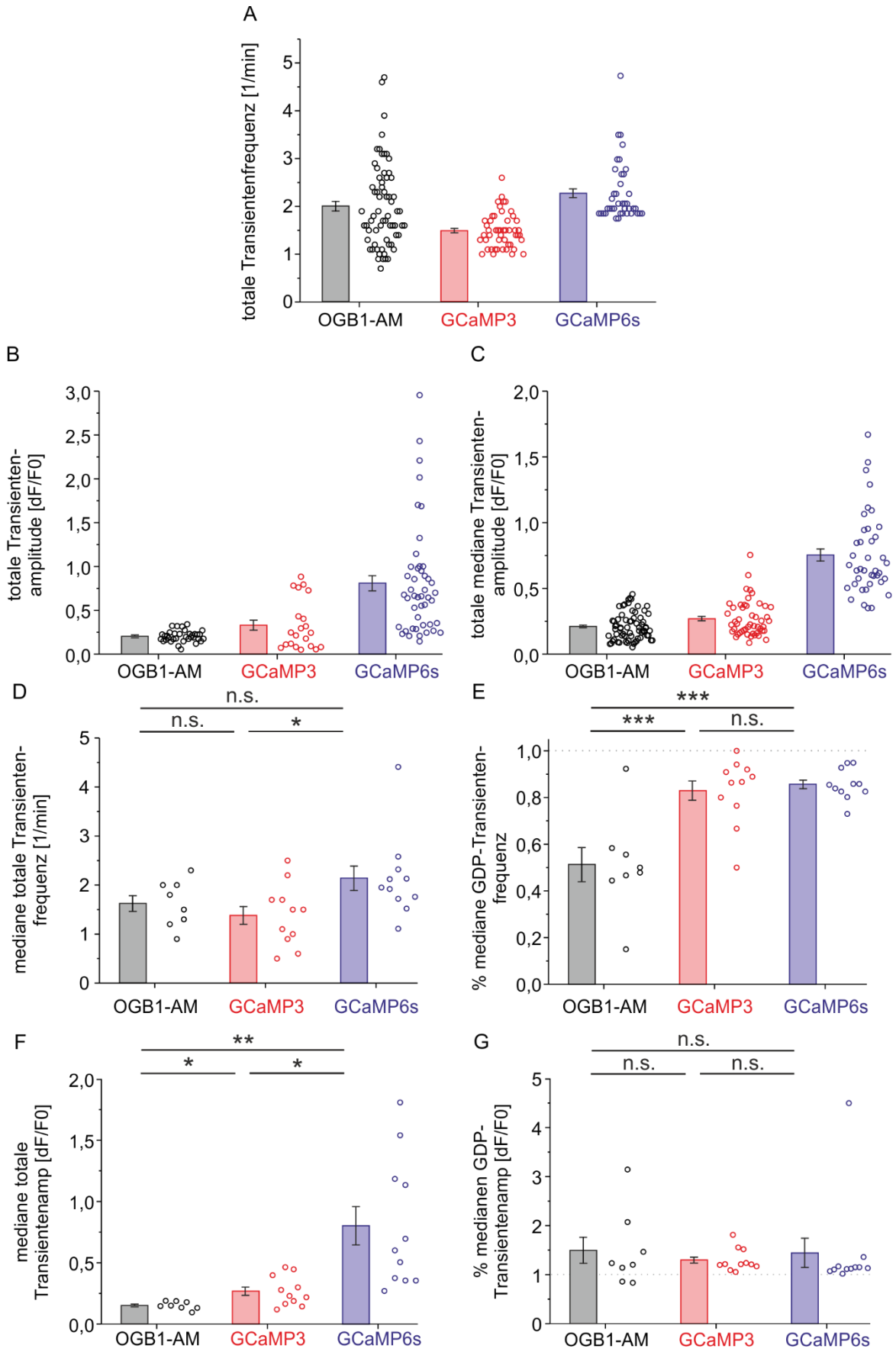
Abbildung 13 A-B zeigt eine asymmetrische Verteilung der totalen zellulären Transientenfrequenzen und -amplituden innerhalb der jeweiligen Schnitte für die unterschiedlichen Indikatoren. Daher wurden im Folgenden die Mediane der totalen Transientenfrequenzen pro Schnitt berechnet und verglichen. Die mediane totale Transientenfrequenz unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,37$  gepaarter t-Test) zwischen OGB1-AM  $1,62 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$  ( $n=8$  Schnitte) und  $\text{GC3}^{\text{Emx1}}$   $1,38 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  ( $n=11$  Schnitte). Auch zwischen OGB1-AM und  $\text{GC6s}^{\text{Emx1}}$   $2,14 \pm 0,85 /\text{min}$  ( $n=11$  Schnitte) konnten keine signifikanten Unterschiede ( $0,17$  Mann-Whitney-U-Test) in der medianen totalen Transientenfrequenz festgestellt werden. Jedoch zeigten die  $\text{GC6s}^{\text{Emx1}}$  - Schnitte ( $n = 11$  Schnitte) eine im Mittel um  $0,51 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$  signifikant erhöhte mediane totale Transientenfrequenz ( $p<0,0167$ , Bonferroni-Korrektur für drei Vergleiche Mann-Whitney-U-Test) als die  $\text{GC3}^{\text{Emx1}}$ - Schnitte ( $n = 11$  Schnitte) (siehe Abbildung 13 C).

Die 1W-ANOVA ergibt einen signifikanten ( $p<0,001$ ,  $\eta^2 = 0,534$ ) globalen Effekt für einen Unterschied im Anteil der GDP-assozierten Transientenfrequenz an der totalen Transientenfrequenz zwischen den Indikatoren. OGB1 zeigt im Mittel  $31,65 \pm 6,69\%$  signifikant ( $p<0,001$  Post-Hoc Tukey) weniger Anteil der GDP-assozierten Transienten an den totalen Transienten als  $\text{GC3}^{\text{Emx1}}$  ( $n=11$  Schnitte). Ebenso zeigt OGB1 ( $n=8$  Schnitte) einen im Mittel  $34,34 \pm 6,69\%$  signifikant geringeren ( $p<0,001$  Post-Hoc Tukey) Anteil der GDP-assozierten Transienten an den totalen Transienten als  $\text{GC6s}^{\text{Emx1}}$  ( $n=11$  Schnitte). Jedoch unterscheidet sich der Anteil der GDP-assozierten Transienten an den totalen Transienten nicht signifikant ( $p=0,90$  Post-Hoc Tukey) zwischen  $\text{GC3}^{\text{Emx1}}$   $82,92 \pm 14,22\%$  und  $\text{GC6s}^{\text{Emx1}}$   $85,61 \pm 6,57\%$  (siehe Abbildung 13 D-E).

In Abbildung 13 F ist dargestellt, dass die medianen totalen Transientenamplituden in OGB1-AM ( $n=8$  Schnitte) im Mittel um  $0,12 \pm 0,04$  signifikant erniedrigt waren ( $p<0,0167$  Bonferronikorrektur für drei Vergleiche, Welchs-t-Test) im Vergleich zu  $\text{GC3}^{\text{Emx1}}$  ( $n=11$ ). Die  $\text{GC6s}^{\text{Emx1}}$  Schnitte ( $n=11$ ) zeigten eine im Mittel um  $0,65 \pm 0,16$  signifikant erhöhte ( $p<0,0167$  Bonferronikorrektur für drei Vergleiche, Welchs-t-Test) mediane totale Transientenamplitude im Vergleich zu OGB1-AM.

Außerdem zeigten die GC6s<sup>Emx1</sup>-Schnitte (n=11) auch im Vergleich zu den GC3<sup>Emx1</sup>-Schnitten (n=11) eine im Mittel um  $0,53 \pm 0,16$  signifikant erhöhte ( $p < 0,0167$  aufgrund Bonferronikorrektur für 3 Vergleiche, Welchs-t-Test) mediane totale Transientenamplitude. Das Verhältnis der medianen GDP-assoziierten Transientenamplitude zur medianen totalen Transientenamplitude unterschied sich nicht signifikant (OGB1 vs. GC3<sup>Emx1</sup>  $p = 0,97$  Mann-Whitney-U-Test; OGB1 vs. GC6s<sup>Emx1</sup>  $p = 0,43$  Mann-Whitney-U-Test; GC3<sup>Emx1</sup> vs. GC6s<sup>Emx1</sup>  $p = 0,09$  Mann-Whitney-U-Test) zwischen den Indikatoren OGB1  $149\% \pm 27,31\%$  (n=8 Schnitte), GC3<sup>Emx1</sup>  $129,77 \pm 6,96\%$  (n=11 Schnitte) und GC6s<sup>Emx1</sup>  $144,44\% \pm 30,64\%$  (n=11 Schnitte) (siehe Abbildung 13 G).

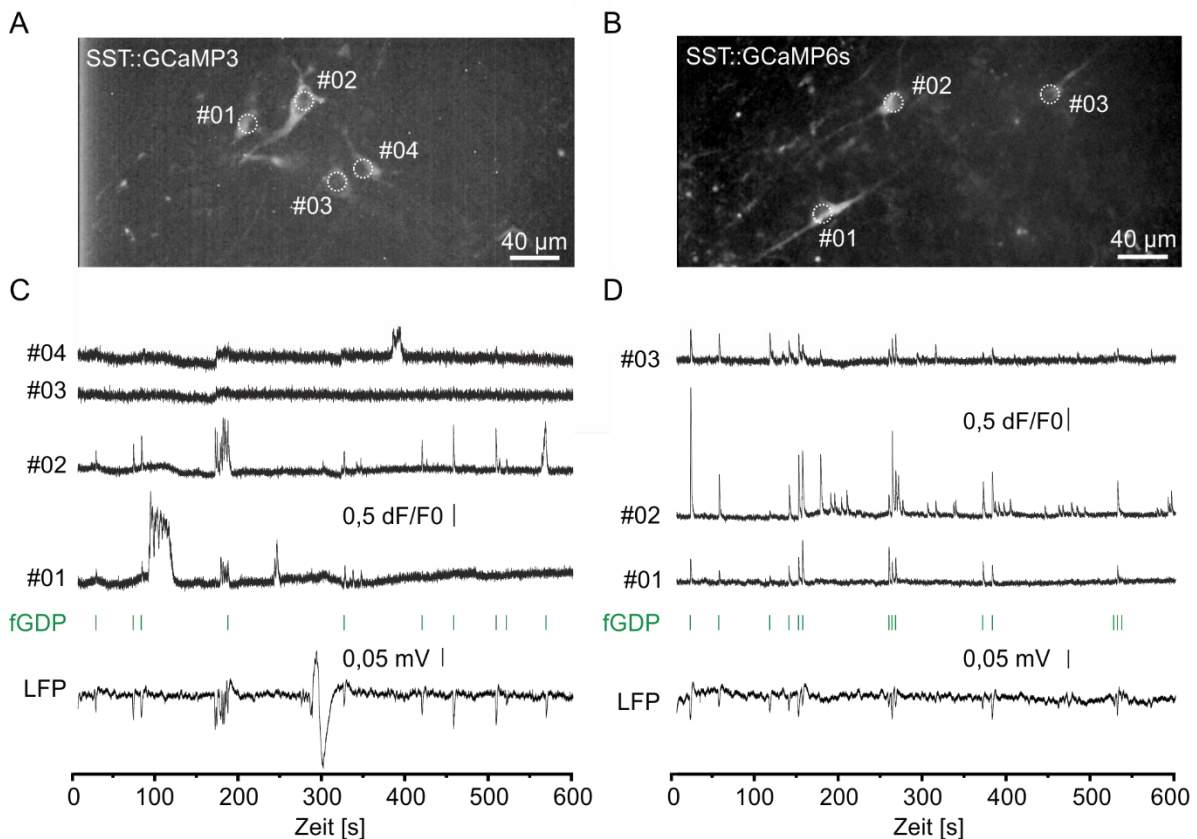
Zusammenfassend ergab sich, dass die spezifische Darstellung neuronaler Aktivität von Pyramidenzellen sowohl mit GCaMP6s als auch mit OGB1 sehr sensitiv und mit einem hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SnR) zelluläre Transienten darstellt. Jedoch waren in GCaMP6s weniger nGDP-assoziierte Transienten im Vergleich zu OGB1 messbar. Im Vergleich zu GCaMP3 zeigten Pyramidenzellen, die mit GCaMP6s gefärbt wurden, eine höhere mittlere totale Transientenfrequenz und damit deutlich mehr zelluläre Aktivität. Für die spezifische Darstellung neuronaler Aktivität Emx1-positiver Zellen wurde daher in den folgenden Experimenten und Analysen GCaMP6s verwendet.



**Abbildung 13: Vergleich der fGDP-assozierten und nicht-fGDP-assozierten Aktivität von Pyramidenzellen mit unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren in OGB1-AM (C57BL/6J), GC3<sup>Emx1</sup> und GC6s<sup>Emx1</sup>.** A-C zeigen die deskriptive Darstellung der Aktivitätsparameter auf Ebene der einzelnen Zellen und Schnitte. In D-G werden die Vergleiche der Aktivitätsparameter, die auf Ebene der Schnitte ermittelt wurden, dargestellt. **A)** Totale Transientenfrequenzen aller Zellen eines für jeden Indikator repräsentativen Schnitts. **B)** Totale Transientenamplitude aller Events einer repräsentativen Zelle aus C. **C)** Totale mediane Transientenamplitude aller Zellen eines Schnitts. **D)** Vergleich der medianen totalen Transientenfrequenzen zwischen den Indikatoren. **E)** Vergleich des prozentualen Anteils der GDP-assozierten Transientenfrequenz zwischen den Indikatoren. **F)** Vergleich der medianen totalen Transientenamplitude zwischen den Indikatoren. **G)** Vergleich des prozentualen Anteils der medianen GDP-assozierten Transientenamplitude an der totalen medianen Transientenamplitude. Die Balken zeigen jeweils  $\pm$  SEM an. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2 Darstellung der neuronalen Aktivität von Somatostatin- positiven Interneuronen durch unterschiedliche genetisch codierte Kalziumindikatoren

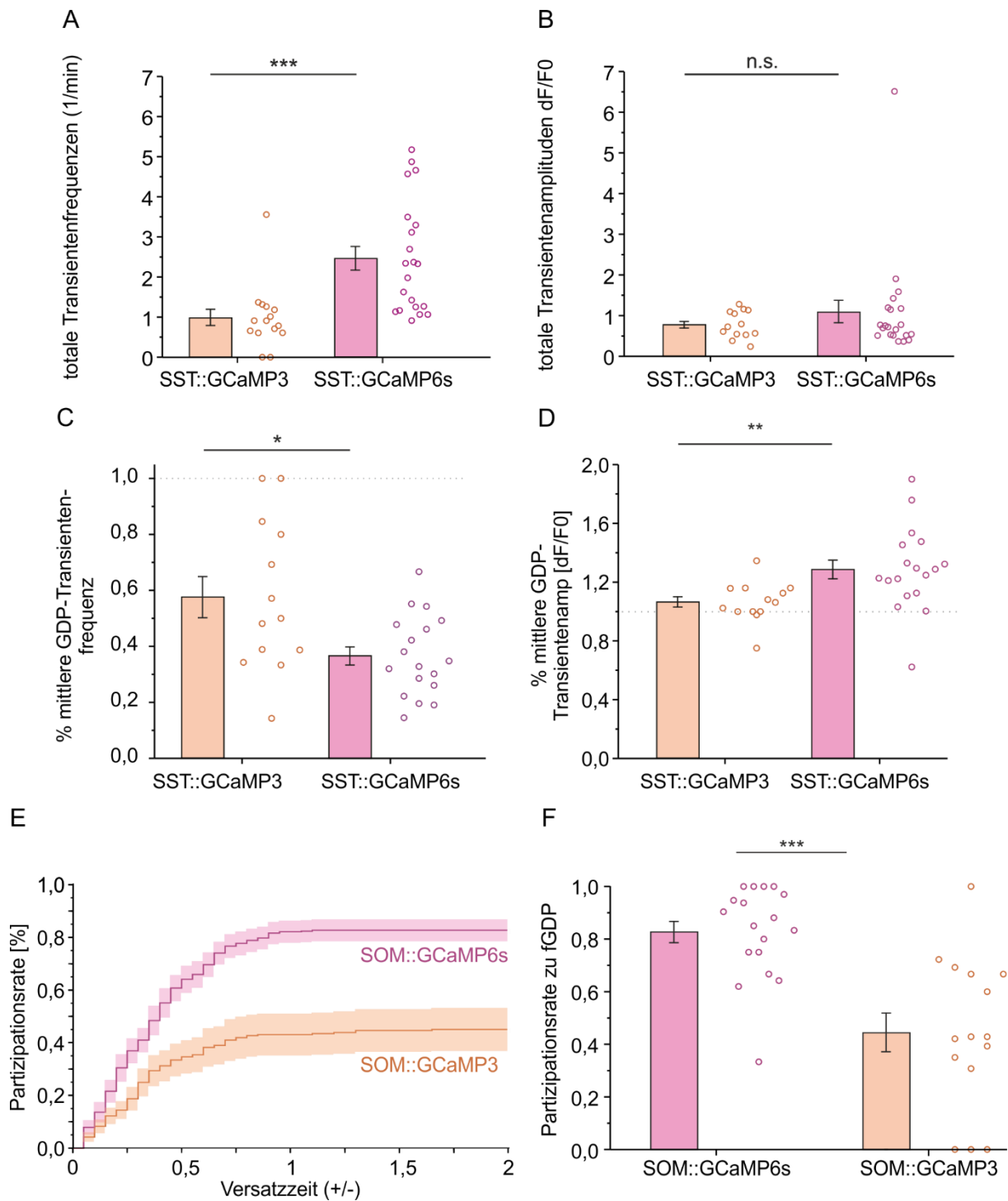
Um zu überprüfen, ob GCaMP6s auch bei der spezifischen Darstellung neuronaler Aktivität während und zwischen fGDP-Ereignissen von Somatostatin-positiven Interneuronen (SST-IN) besser als GCaMP3 geeignet ist, wurden Vergleiche der Aktivitätsparameter zwischen dem SST<sup>Cre</sup>::GCaMP3<sup>Isl</sup> (GC3<sup>SST</sup>)- und SST<sup>Cre</sup>::GCaMP6s<sup>Isl</sup> (GC6s<sup>SST</sup>)-Modell durchgeführt (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Vergleich der fGDP-assozierten und nicht-fGDP-assozierten Aktivität SST-IN mit unterschiedlichen Kalzium-Indikatoren in GC3<sup>SST</sup> und GC6s<sup>SST</sup>.** **A)** Ruhefluoreszenzbild mit 4 SST-IN im *stratum oriens* in der CA1-Region im GC3<sup>SST</sup>-Modell. **B)** Ruhefluoreszenzbild mit 3 SST-IN im *stratum oriens* in der CA1-Region im GC6s<sup>SST</sup>-Modell. **C)** Kalzium-Spuren der 4 in A dargestellten SST-IN über die gesamte Aufnahmedauer von 10min. Darunter befindet sich die zeitlich synchronisierte LFP-Spur (Tiefpass 50Hz Butterworth) des Signals der EZ-Ableitung. Zwei Interneurone sind hochaktiv und zeigen zu fast allen fGDPs korrelierte Aktivität, während die anderen 2 Interneurone kaum Aktivität aufweisen. **D)** Kalzium-Spuren der 3 in B dargestellten SST-IN. Darunter befindet sich ebenfalls die zeitlich synchronisierte LFP-Spur (Tiefpass 50Hz Butterworth). Alle drei Interneurone zeigen Aktivität, von denen viele Kalzium-Transienten mit einem fGDP aus der EZ-Ableitung korreliert sind. Die Interneurone weisen eine hohe Beteiligungsrate an den fGDPs auf. Insgesamt ist ein größeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu den Ableitungen in C erkennbar. Die grünen Balken stellen sowohl für C als auch für D die Peakzeiten der fGDPs im LFP (EZ-Ableitung mit PWE) dar. Die Balken in den Diagrammen markieren jeweils  $\pm$  SEM und die weißen Balken in den Ruhefluoreszenzbildern jeweils 60 $\mu$ m an.

Aufgrund der niedrigen Zellzahl ( $1 \leq n \leq 5$ ) der SST-IN pro Schnitt wurden die Parameter mehrerer Zellen innerhalb eines Schnittes als Mittelwert berechnet und zusammengefasst. Dafür wurden die folgenden Parameter zwischen dem GC3<sup>SST</sup>- (n=15 Schnitte) und GC6s<sup>SST</sup>- (n=18 Schnitte) Modell verglichen: mittlere totale Transientenfrequenz der Zellen, mittlere totale Amplituden und Partizipationsraten (siehe Abbildung 15).

In den GC6s<sup>SST</sup>- (n=18) zeigte sich im Vergleich zu den GC3<sup>SST</sup>- Schnitten (n=13) eine im Mittel um  $1,47 \pm 0,37 \text{ min}^{-1}$  signifikant ( $p < 0,001$  asymptotisch, Mann-Whitney-U-Test) erhöhte totale Transientenfrequenz. Die totale Transientenamplitude unterschied sich zwischen den GC6s<sup>SST</sup>- Schnitten (n=18)  $1,1 \pm 0,29$  und den GC3<sup>SST</sup>- Schnitten (n=13)  $0,78 \pm 0,09$  nicht signifikant. Der prozentuale Anteil GDP-assoziierter Transienten an der totalen mittleren Transientenfrequenz ist in den GC3<sup>SST</sup>- Schnitten (n=13) um  $21 \pm 8 \%$  ( $p < 0,05$  Welchs t-Test) höher als in den GC6s<sup>SST</sup>- Schnitten (n=18). Hingegen zeigten die GC6s<sup>SST</sup>- Schnitte (n=18) einen um  $22,1 \pm 7,7 \%$  signifikant erhöhten ( $p < 0,01$  Welchs t-Test) Anteil GDP-assoziierter Transienten an der mittleren totalen Transientenamplitude im Vergleich zu den GC3<sup>SST</sup>- (n=13) Schnitten. Zuletzt wurden die ermittelten Partizipationsraten der SST-IN zwischen den beiden GECIs verglichen. Die Partizipationsraten errechneten sich, indem die Anzahl der fGDPs, zu denen die Interneurone einen Transienten in der Kalziumbildung zeigten, durch die Gesamtanzahl der fGDPs während der Aufnahmezeit geteilt wurde. Für die Zuordnung wurde ein zeitliches Versatzfenster definiert.



**Abbildung 15:** Vergleich der Aktivität von SST-IN zwischen den GECIs jeweils im GC3<sup>SST</sup> - und GC6<sup>SST</sup> -Modell. **A)** Unterschiede in der totalen Transientenfrequenz zwischen den Indikatoren. **B)** Unterschiede in den totalen Transientenamplituden zwischen den Indikatoren. **C)** Prozentualer Anteil der mittleren GDP-assoziierten Transientenfrequenz an der totalen mittleren Transientenfrequenz. **D)** Prozentualer Anteil der mittleren GDP-assoziierten Transientenamplitude an der totalen Transientenamplitude. **E)** Abhängigkeit der ermittelten Partizipationsrate der SST-IN von der bei der Detektion erlaubten Versatzzeit von fGDP-Peakzeit und Peakzeit des Kalziumtransienten. **F)** Vergleich der Partizipationsraten zwischen den Schnitten bei einer festgelegten Versatzlänge von 1,5s. Die Balken in den Diagrammen markieren jeweils  $\pm$  SEM. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

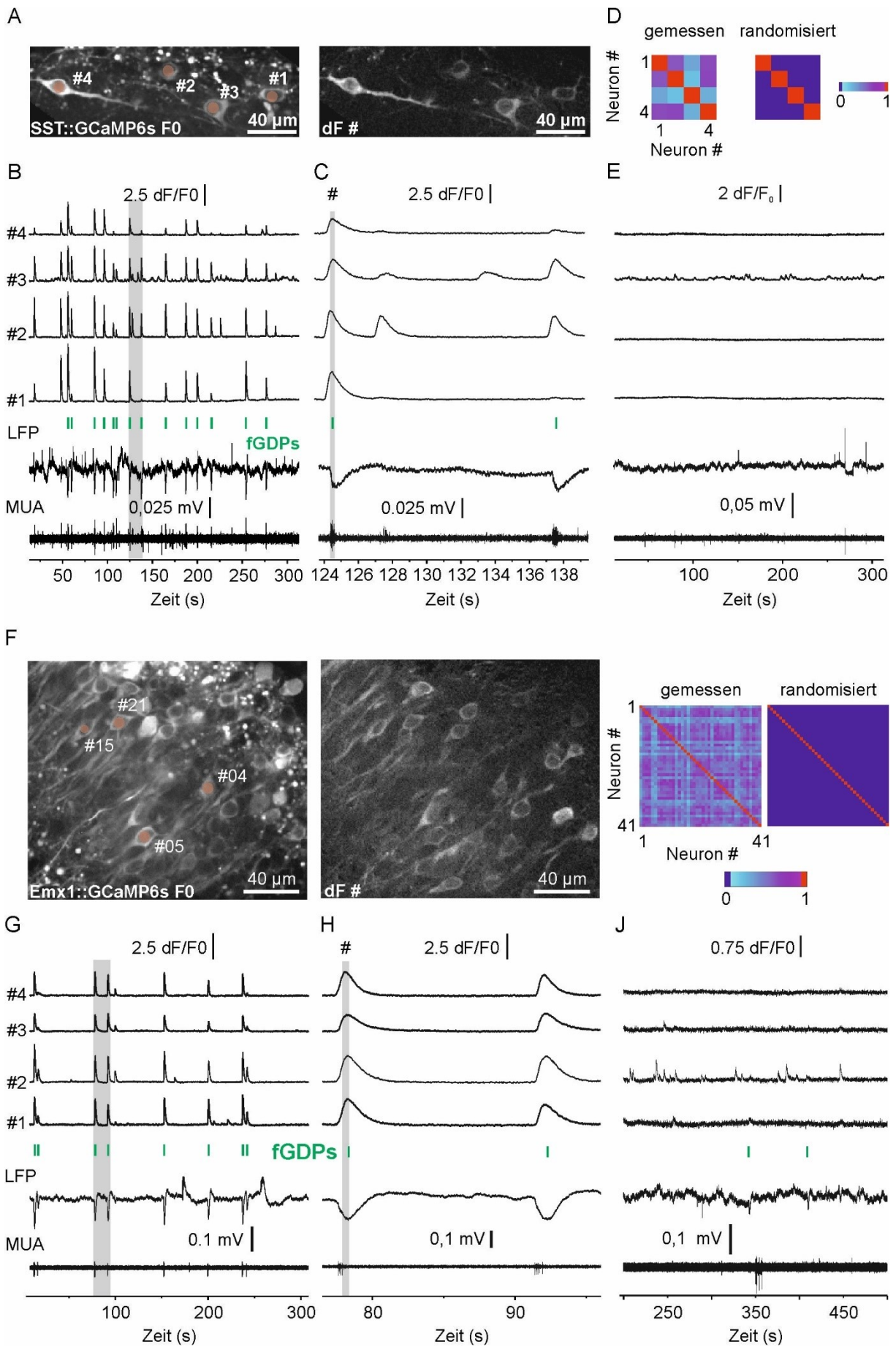


Die Partizipationsrate wurde zunächst in Abhängigkeit des erlaubten Zeitversatzes für beide Modelle separat ermittelt (siehe Abbildung 15). Da das Optimum bei 1,5 s lag, wurde diese Fenstergröße festgelegt, sodass letztlich die Teilnahme eines Interneurons an einem fGDP als die Koinzidenz der Peakzeit eines Transienten 1,5 s vor oder nach der Peakzeit des fGDPs im LFP-Signal definiert wurde (siehe Abschnitt 2.8.3). Weiterhin stellte sich heraus, dass für die Färbung SST-IN mit GCaMP6s im GC6s<sup>SST</sup>- Modell (n=18) eine im Mittel um  $38,1 \pm 8,6$  % signifikant höhere Partizipationsrate ( $p < 0,001$  asymptotisch, Mann-Whitney-U-Test) aufwies, als Färbungen im GC3<sup>SST</sup> - Modell (n=15).

Zusammenfassend ergab sich ein deutlicher Vorteil in der Auflösung neuronaler Aktivität von SST-IN mit GCaMP6s im Vergleich zu GCaMP3. Es konnten mehr Transienten, besonders solche mit geringeren Amplituden, im GC6s<sup>SST</sup>- Modell dargestellt werden. Daher wurde für die folgenden Vergleiche der neuronalen Aktivität zwischen Pyramidenzellen und SST-IN der Farbstoff GCaMP6s verwendet. Zusätzlich konnte eine einheitliche Versatzlänge für die Bestimmung der Partizipationsrate auf 1,5 s festgelegt werden.

#### **4.3 Vergleich der Spontanaktivität von SST-positiven Interneuronen und Emx1-positiven Neuronen in Bezug auf die frühe synchrone Netzwerkaktivität in der CA1**

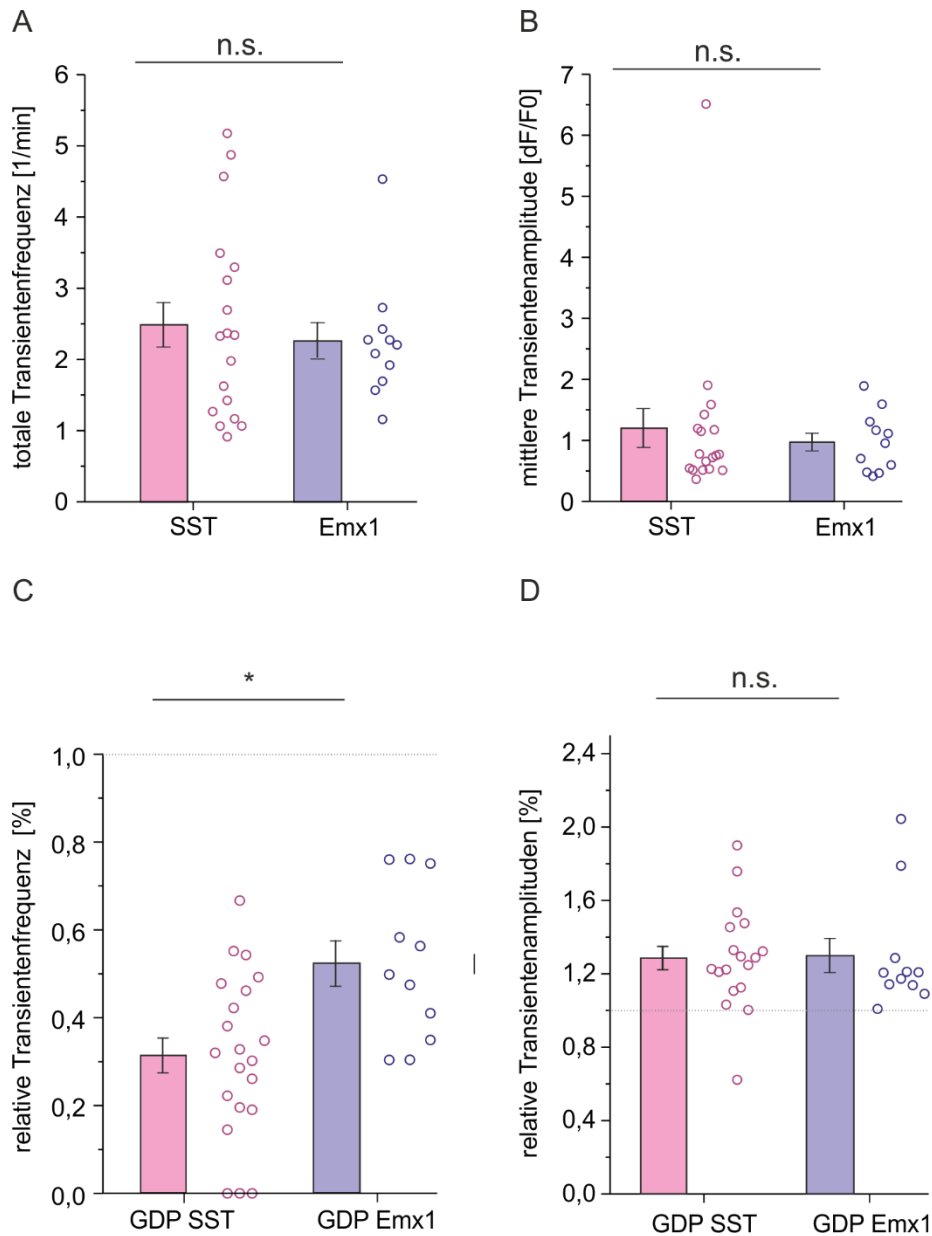
In den nachfolgenden Abschnitten wurde die Aktivität von Pyramidenzellen und SST-IN während und zwischen früher synchroner Netzwerkaktivität (fGDPs), wie in Abbildung 16 dargestellt, ermittelt und verglichen.



**Abbildung 16: Vergleich der neuronalen Aktivität von SST-IN ( $GC6s^{SST}$ ) und Pyramidenzellen ( $GC6s^{Emx1}$ ) während und zwischen früher synchroner Netzwerkaktivität (fGDPs) mittels  $GCaMP6s$ .** Zu den Kalziumtransienten in B, C, E, G, H und J wurden die synchronisierten EZ-Ableitungen (mittels PWE) als LFP (Tiefpass 50Hz Butterworth) und MUA-Komponente (Bandpass 100 – 500Hz Butterworth) jeweils zusätzlich dargestellt. Die grünen Striche markieren die Peakzeiten der Deflektionskomponente der EZ-Ableitung. **A)** Links: Ruhefluoreszenzbild mit 4 SST-IN im *stratum oriens* der CA1-Region des Hippokampus. Rechts: korreliertes dF-Bild des in C markierten fGDPs. **B)** Kalziumtransienten der 4 SST-IN in A über eine Aufnahmedauer von 5min. Grau hinterlegt ist der Zeitraum der Spuren aus C. **C)** Aktivität der 4 SST-IN in Korrelation zu zwei fGDPs im grau in B hinterlegten Zeitraum. **D)** Vergleich der Korrelationsmatrix (Pearson-Korrelationskoeffizient) der Aktivität der 4 SST-IN aus A über die gesamte Aufnahmedauer von 10min für die experimentell gemessenen und randomisierten Daten der Peakzeiten der Kalziumtransienten. **E)** Aktivität der 4 in A dargestellten SST-IN nach 20min Applikation von  $10\mu M$  Bumetanid über einen Aufnahmezeitraum von 5min. **F)** Links: Ruhefluoreszenzbild der im *stratum pyramidale* der CA1 gelegenen *Emx1*-positiven Zellen. Rechts: Zum grau hinterlegten fGDP aus H korreliertes dF-Bild. **G)** Kalziumtransienten der Pyramidenzellen aus F über eine Aufnahmedauer von 5min. Grau hinterlegt ist der Zeitraum der Spuren aus H. **H)** Aktivität der Pyramidenzellen in Korrelation zu zwei fGDPs im grau in G hinterlegten Zeitraum. **I)** Vergleich der Korrelationsmatrix (Pearson-Korrelationskoeffizient) der Aktivität der Pyramidenzellen aus F über die gesamte Aufnahmedauer von 10min für die experimentell gemessenen und randomisierten Daten der Peakzeiten der Kalziumtransienten. **J)** Aktivität der Pyramidenzellen aus F nach 20min Applikation von  $10\mu M$  Bumetanid über einen Aufnahmezeitraum von 5min. Die weißen Balken zeigen  $30\mu m$  an.

#### 4.3.1 Unterschiede in der neuronalen Aktivität während und zwischen Feld-*Giant-Depolarizing-Potentials*-Ereignissen unter Kontrollbedingungen

Um zu überprüfen, ob SST-IN ein ähnliches Aktivitätsmuster in Bezug auf frühe synchrone Netzwerkaktivität (fGDPs) wie die Pyramidenzellen (tragende Population der fGDPs) zeigen, wurde die totale Transientenfrequenz, die totale Transientenamplitude sowie der relative Anteil der Frequenz und Amplitude der GDP-assozierten Transienten an allen Transienten für beide Populationen bestimmt und verglichen (siehe Abbildung 17). Die mittlere totale Transientenfrequenz der SST-IN (n=18 Schnitte) von  $2,47 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$  unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,80$ , Mann-Whitney-U-Test) von der der Pyramidenzellen (n=11 Schnitte)  $2,26 \pm 0,26 \text{ min}^{-1}$ . Im Folgenden wurde die Aktivität während und zwischen den fGDPs untersucht. Im Unterschied zu Abschnitt 3.2.1 bezieht sich die Kategorisierung der Transienten in GDP- und nGDP-assoziert auf die fGDP-Detektion der EZ mittels PWE für beide neuronale Populationen. Die SST-IN (n=18 Schnitte) zeigten im Mittelwert anteilig um  $26,73 \pm 6,78\%$  signifikant mehr ( $p=0,001$ , gepaarter t-Test) nGDP-assozierte Transienten als GDP-assozierte Transienten. Der relative Anteil der mittleren GDP-assozierten Transientenfrequenzen an der totalen Transientenfrequenz bei den SST-IN (n=18 Schnitte) war im Mittel um  $15,72 \pm 6,31\%$  signifikant ( $p=0,01$  gepaarter t-Test) niedriger als bei den Pyramidenzellen (n=11 Schnitte).



**Abbildung 17: Unterschiede der Charakteristika neuronaler Aktivität zwischen SST-IN ( $GC6s^{SST}$ ) und Pyramidenzellen ( $GC6s^{Emx1}$ ) in  $GCaMP6s$  unter Kontrollbedingungen (ACSF). **A**) Vergleich der totalen mittleren Transientenfrequenz. **B**) Vergleich der totalen mittleren Transientenamplitude. **C**) Prozentualer Anteil der mittleren GDP-assozierten Transientenfrequenz an der totalen mittleren Transientenfrequenz zwischen SST-positiven und Emx1-positiven Neuronen in  $GCaMP6s$ . **D**) Vergleich des prozentualen Anteils der mittleren GDP-assozierten Transientenamplitude an der totalen mittleren Transientenamplitude zwischen SST-positiven und Emx1-positiven Neuronen in  $GCaMP6s$ . Die Balken in den Diagrammen markieren jeweils  $\pm$  SEM. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .**

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern sich die mittleren Amplituden der Transienten zwischen den SST-IN (n=18 Schnitte) und Pyramidenzellen (n=11 Schnitte) unterscheiden. Die mittlere totale Transientenamplitude unterschied sich nicht signifikant ( $p = 0,33$  Mann-Whitney-U-Test) zwischen den SST-IN mit  $1,2 \pm 0,33$  und Emx1-Zellen mit  $0,83 \pm 0,17$ .

Ebenfalls zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den SST-Interneuronen (n=18) und den Pyramidenzellen (n=11 Schnitte) in der mittleren GDP-assozierten Transientenamplitude in GC6s<sup>SST</sup> mit  $1,47 \pm 0,33$  und in GC6s<sup>Emx1</sup> mit  $1,0 \pm 0,2$  (p=0,45 asymptotisch Mann-Whitney-U-Test). Außerdem unterschied sich die nGDP-assozierte Transientenamplitude zwischen GC6s<sup>SST</sup> und GC6s<sup>Emx1</sup> nicht (p=0,56 asymptotisch Mann-Whitney-U-Test):  $0,98 \pm 0,33$  in GC6s<sup>SST</sup> und  $0,61 \pm 0,13$  in GC6s<sup>Emx1</sup>. Allerdings wiesen die SST-IN (n=18 Schnitte) eine im Vergleich zu der mittleren nGDP-assozierten Transientenamplitude um  $0,5 \pm 0,1$  signifikant erhöhte (p<0,001, exakt Wilcoxon-Signed-Rank-Test) mittlere GDP-assozierte Transientenamplitude auf. Auch die Emx1-Zellen hatten im Mittel um  $0,4 \pm 0,1$  signifikant höhere mittlere Amplituden (p<0,01 gepaarter t-Test) in den GDP-assozierten Transienten im Vergleich zu den nGDP-assozierten Transienten. Zusammenfassend zeigte sich, dass zwar keine Unterschiede in der totalen Transientenfrequenz und -amplitude in beiden Populationen feststellbar waren, die SST-Interneurone jedoch im Unterschied zu den Emx1-positiven Zellen mehr Aktivität außerhalb der fGDPs als während der fGDPs aufwiesen.

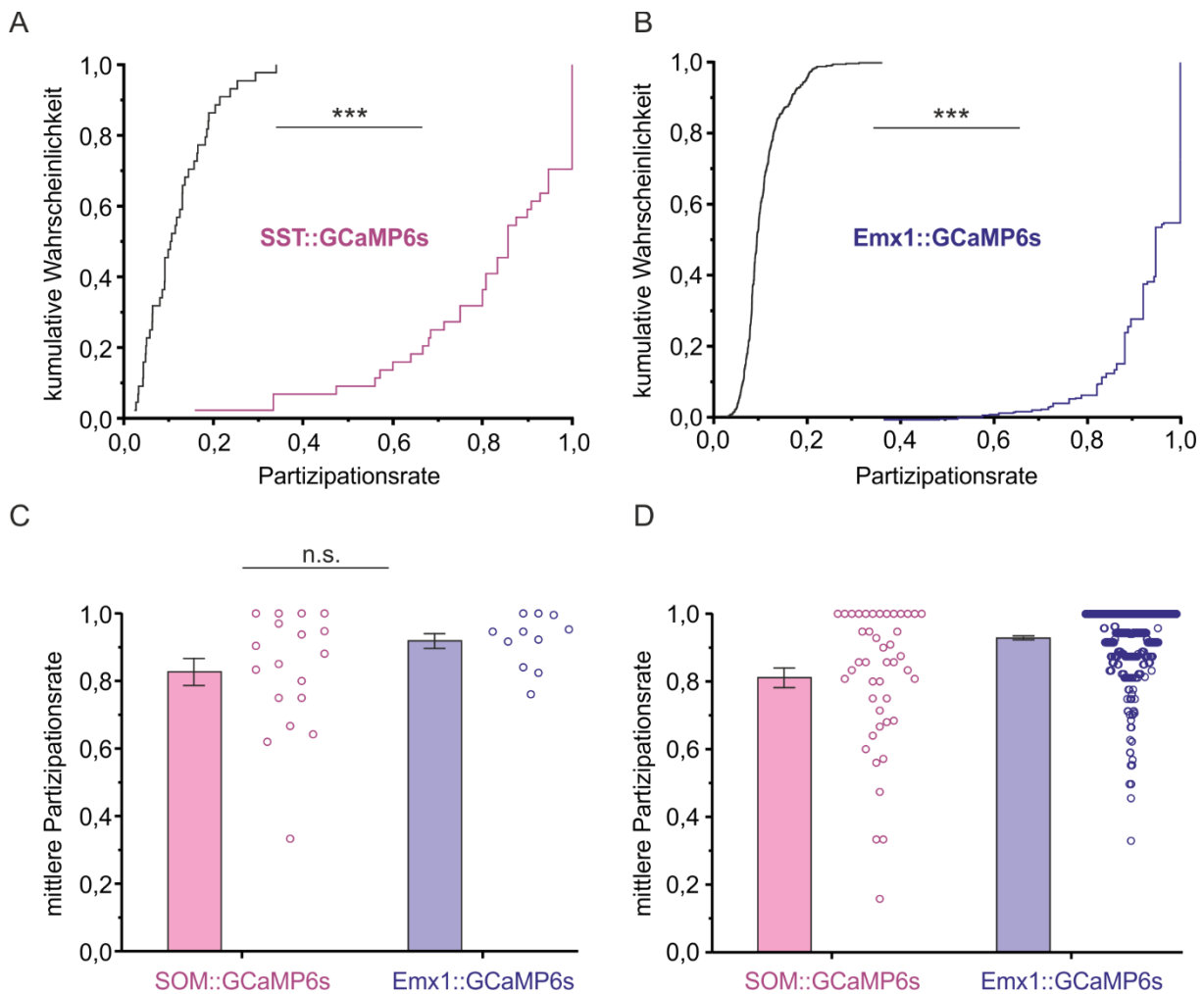
#### **4.3.2 Partizipationsraten von Emx1-Neuronen und SST-positiven Interneuronen an Feld-Giant-Depolarizing-Potentials**

Es wurde anschließend überprüft, ob die Aktivität von SST-IN ebenso stark wie die der Pyramidenzellpopulation mit fGDP-Ereignissen assoziiert ist.

Um die Beteiligung der SST-IN im GC6s<sup>SST</sup>-Modell an den fGDPs einzuschätzen, wurde diese mit der Partizipationsrate der Pyramidenzellen (Referenzpopulation) im GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell verglichen. Die Überprüfung erfolgte zuerst, indem ermittelt wurde, ob die beiden Neuronenpopulationen überzufällig an fGDPs teilnehmen. Die experimentell gemessenen Partizipationsraten der SST-IN (n=44 Zellen) und Pyramidenzellen (Emx1) (n=480 Zellen) wurden mit einer zufälligen Verteilung der fGDP-Peakzeiten (siehe Abschnitt 3.8.5) verglichen. Für die SST-IN zeigten die experimentellen Daten eine im Mittel um  $69,11 \pm 2,83\%$  signifikant höhere (p<0,001 asymptotisch, gepaarter Wilcoxon-Signed-Rank-Test) Partizipationsrate im Vergleich zu den zufällig verteilten Daten. Auch die experimentell gemessene Partizipationsrate der Emx1-Zellen war im Mittel um  $77,87 \pm 1,04\%$  signifikant (p<0,001, asymptotisch, Wilcoxon-Signed-Rank-Test) höher als die der zufällig verteilten Daten (m=5000 Durchläufe).

Die experimentell gemessenen mittleren Partizipationsraten der SST-IN pro Schnitt ( $n = 18$ ) von  $82,69 \pm 4,18\%$  und der Pyramidenzellen (Emx1) ( $n=11$ ) von  $91,85 \pm 2,37\%$  zeigten keinen signifikanten ( $p=0,23$  Mann-Whitney-U-Test) Unterschied (siehe Abbildung 18).

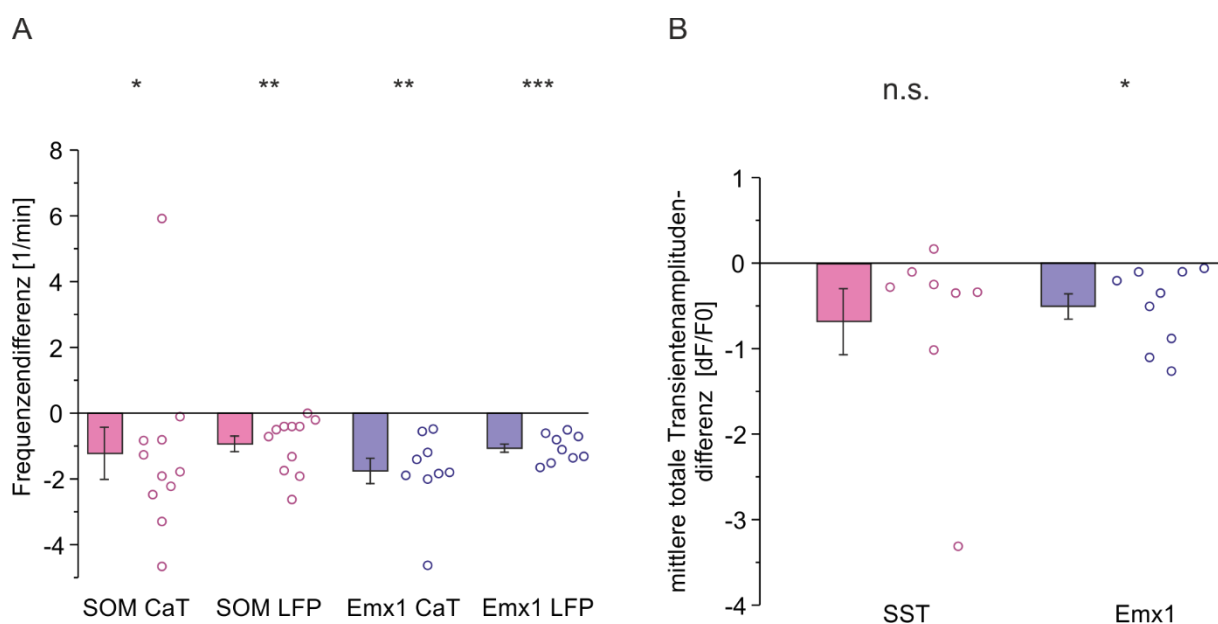
Es stellte sich zusammenfassend heraus, dass auch die SST-IN hochgradig an fGDPs beteiligt sind und ihre Aktivität in einem den Pyramidenzellen ähnlichem Ausmaß mit frühen synchronen Netzwerkereignissen assoziiert ist.



**Abbildung 18: Vergleich der Partizipationsrate von SST-IN und Emx1-Neuronen an fGDPs.** Kumulative Darstellung des Vergleichs der gemessenen und randomisierten Partizipationsraten ( $m=5000$  Durchläufe) im **A)**  $GC6s^{SST}$ -Modell sowie im **B)**  $GC6s^{Emx1}$ -Modell. **C)** Induktiver Vergleich der gemessenen Partizipationsraten der SST-IN mit den Partizipationsraten der Emx1-Neurone (auf Ebene der Schnitte gemittelt). **D)** Deskriptiver Vergleich der Partizipationsraten entsprechend der Darstellung in C auf Ebene der Zellen. Die Balken zeigen jeweils  $\pm$  SEM an. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 4.3.3 Einfluss von Bumetanid auf die neuronale Aktivität der unterschiedlichen neuronalen Populationen und Feld-Giant-Depolarizing-Potentials

Um die Abhängigkeit der neuronalen Aktivität von der GABAergen Depolarisation zu überprüfen, wurde die totale Transientenfrequenz der SST-IN ( $GC6s^{SST}$ ) und der Pyramidenzellen ( $GC6s^{Emx1}$ ) sowie die dazugehörige fGDP-Frequenz des entsprechenden Schnitts jeweils vor und nach Applikation von 10  $\mu M$  Bumetanid (siehe Methodenteil 3.7) verglichen. Im Rahmen dieser Experimente sollte überprüft werden, ob die Applikation von Bumetanid auf die SST-IN, die Emx1-positiven Neurone und schließlich auf die fGDPs in der CA1 einen gleichgerichteten Effekt zeigt (siehe Abbildung 19).



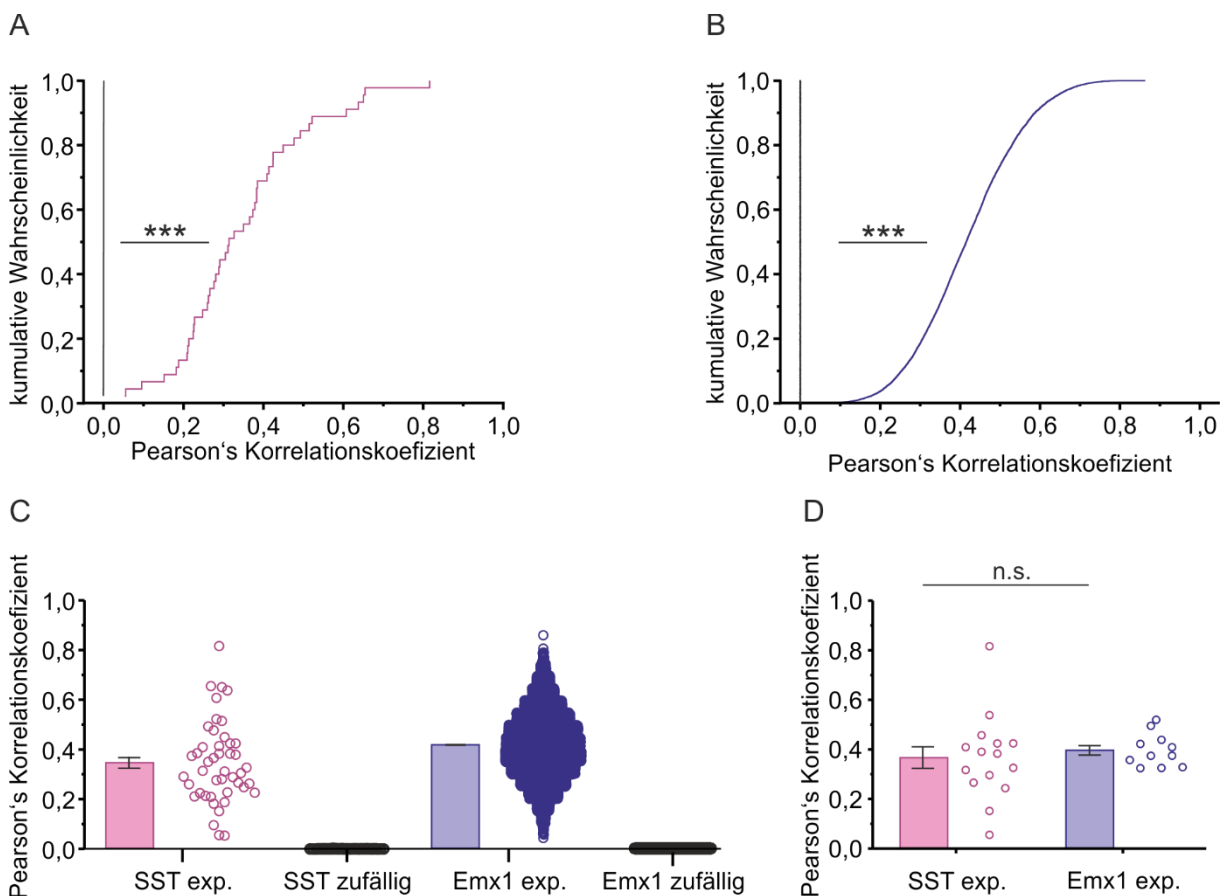
**Abbildung 19:** Effekt der Bumetanid-Applikation auf zelluläre- und Netzwerkaktivität in  $GC6s^{SST}$ - und  $GC6s^{Emx1}$ - Schnitten. **A)** Einfluss auf die CaT- und fGDP-Frequenz sowie **B)** die Transientenamplituden der CaTs von SST-IN und Emx1-positiven Pyramidenzellen. Die Balken zeigen jeweils  $\pm$  SEM an. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Nach der Bumetanid-Applikation verringerten sich folgende zelluläre Parameter signifikant: die mittlere totale Transientenfrequenz der SST-IN ( $n=9$  Schnitte) im Mittel um  $0,88 \pm 0,9 \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,05$  Vorzeichen-Test; Median der Frequenzabnahme:  $1,78 \text{ min}^{-1}$ ) sowie die mittlere totale Transientenfrequenz der Emx1-Neurone ( $n=6$  Schnitte) im Mittel um  $1,71 \pm 0,63 \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,01$  Vorzeichentest). Parallel nahmen die fGDP-Frequenzen in den jeweiligen Schnitten nach Applikation von Bumetanid ebenfalls signifikant ab: in den  $GC6s^{Emx1}$ - Schnitten ( $n=6$ ) im Mittel um  $1,0 \pm 0,16 \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,001$  gepaarter t-Test) und in den  $GC6s^{SST}$ - Schnitten im Mittel um  $1,11 \pm 0,27 \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,01$  gepaarter t-Test).

Die mittleren totalen Transientenamplituden der SST-IN (n=7 Schnitte) reduzierten sich nicht signifikant ( $p = 0,12$  Sign-Test) im Mittel um  $-0,74 \pm 0,45$  nach Bumetanid-Applikation. Außerdem war die mittlere totale Transientenamplitude der Pyramidenzellen (n=9 Schnitte) nach Bumetanidapplikation, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, im Mittel um  $0,51 \pm 0,15$  signifikant ( $p = 0,01$  gepaarter t-Test) niedriger. Zusammenfassend konnte ein einheitlich hemmender Effekt von Bumetanid auf die beiden neuronalen Populationen sowie auf die Ausbildung von FSN in der CA1 gezeigt werden.

#### 4.3.4 Korrelationsanalyse der neuronalen Aktivität von Emx1-Neuronen und SST-positiven Interneuronen

Aus vorherigen Datensätzen wurde ersichtlich, dass die Pyramidenzellen ( $GC6s^{Emx1}$ ) maßgeblich an der Ausbildung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1, in Form einer temporär hohen Synchronisation in der Aktivität, beteiligt sind. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob Ähnliches auch für die SST-IN ( $GC6s^{SST}$ ) gilt, und quantifiziert, ob sich die Korrelation und Synchronisation der Aktivität innerhalb der neuronalen Populationen unterscheidet.





**Abbildung 20: Korrelationsanalyse (Pearson-Rho) der neuronalen Aktivität von SST-IN (GC6s<sup>SST</sup>) und der Pyramidenzellen (GC6s<sup>Emx1</sup>) jeweils untereinander.** Vergleich der experimentell ermittelten Korrelationskoeffizienten mit den berechneten Werten nach Randomisierung: **A)** SST-Interneurone (gemessen pink) sowie **B)** Emx1-Neurone (gemessen blau). **C)** Darstellung der einzelnen Korrelationskoeffizienten für jedes Neuronenpaar der SST-IN (linker Teil) und der Pyramidenzellen (rechter Teil) für die experimentell gemessenen sowie für die randomisierten Daten (m=5000 Durchläufe). **D)** Auf Ebene der Schnitte gemittelte Korrelationskoeffizienten der Neuronenpaare: Vergleich der Korrelationskoeffizienten zwischen SST-IN und Emx1-Neuronen in GCaMP6s. Die Balken zeigen jeweils  $\pm$  SEM an. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Nachdem eine signifikante Assoziation (hohe Partizipationsraten) zwischen der Aktivität der SST-IN und den fGDP-Ereignissen im LFP gemessen werden konnte, wurde jeweils die Korrelation der Aktivität der SST-IN und Pyramidenzellen untereinander untersucht. Dies erfolgte indem für die Schnitte mit  $\geq 2$  Neuronen die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten durchgeführt wurde (siehe Methodenteil 3.8.6, m=5000 Durchläufe).

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass zunächst die Kreuzkorrelation (Pearson-Korrelationskoeffizient  $\rho$ ) der Aktivität der Neurone innerhalb der jeweiligen Populationen zwischen den experimentell gemessenen Daten und den zufällig generierten Daten der Peakzeiten der Kalziumtransienten verglichen wurde. Es zeigte sich, dass die experimentell gemessenen Daten der Aktivität der SST-IN (n=45 Zellpaare) einen im Mittel um  $0,35 \pm 0,02$  signifikant ( $p < 0,001$ , exakt, Wilcoxon Signed-Rank) höheren Korrelationskoeffizienten aufweisen als die zufällig generierten Daten. Ebenso wiesen die Emx1-positiven Neurone (n=11178 Zellpaare) experimentell einen im Mittel um  $0,42 \pm 0$  signifikant ( $p < 0,001$ , asymptotisch, Wilcoxon-Signed-Rank) höheren Korrelationskoeffizienten als die zufällig generierten Daten auf. Beim Vergleich der über die Zellen der Schnitte gemittelten Korrelationskoeffizienten der SST-IN (n=15 Schnitte) von  $0,37 \pm 0,05$  und der Emx1-Neurone (n=11 Schnitte) von  $0,40 \pm 0,02$  war kein signifikanter Unterschied im Mittelwert ( $p = 0,54$  Welchs ungepaarter t-Test) feststellbar.

Zusätzlich zu der im vorherigen Abschnitt gezeigten starken Assoziation der SST-Interneurone mit den fGDP-Ereignissen stellte sich nun eine ebenfalls hochkorrelierte Aktivität der SST-IN untereinander heraus. Diese unterschied sich nicht signifikant von der Korrelation der Aktivität der Pyramidenzellpopulation.

#### 4.3.5 Unterschiede in der Latenzverteilung zwischen Emx1-Neuronen und SST-positiven Interneuronen

Da die SST-IN hinsichtlich vieler Parameter der Aktivität in Bezug auf die fGDP-Ereignisse stark den Pyramidenzellen ähneln, wurde nun abschließend untersucht, ob sich dennoch in der Kalziumbildung sichtbar werdende Unterschiede in der Aktivierungskinetik zwischen den beiden Zellpopulationen finden lassen. Deshalb wurden die Latenzen der Aktivierung der SST-IN ( $GC6s^{SST}$ ) zum fGDP-Signal mit den Latenzen der Emx1-Neurone ( $GC6s^{Emx1}$ ) verglichen. Dazu wurde für jedes korrelierte Ereignis, also die Aktivierung des jeweiligen Neurons im zeitlichen Zusammenhang mit einem fGDP-Signal (siehe Methodenteil 3.8.4), die Latenz als Differenz zwischen der Peakzeit des Kalziumtransienten und der Peakzeit des fGDPs im LFP ermittelt. Die Verteilung der relativen Frequenz der Latenzen der SST-Interneurone ( $n=436$  Ereignisse) und Emx1-Neurone ( $n=5643$  Ereignisse) ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Histogramme wurden um eine nicht-lineare Kurvenanpassung erweitert. Die Anpassung der Latenzen der SST-IN mit einer uni- und bimodalen Gaußverteilung war hoch-signifikant ( $p<0,001$ , F-Test). Dabei lieferte jedoch eine bimodale Gaußverteilung eine signifikant bessere Kurvenanpassung ( $p<0,001$ , F-Test und AIC-Test) als eine unimodale Gaußverteilung. Für die Verteilung der Latenzen der Pyramidenzellen jedoch stellte sich eine unimodale Gaußverteilung als signifikant besser ( $p<0,001$ , F-Test und AIC-Test) als eine bimodale Gaußverteilung zur Anpassung des Histogramms der Eventlatenzen heraus. Die Anpassung war sowohl mit einer unimodalen Gaußverteilung als auch mit einer bimodalen Gaußverteilung hoch-signifikant ( $p<0,001$ , F-Test) möglich.

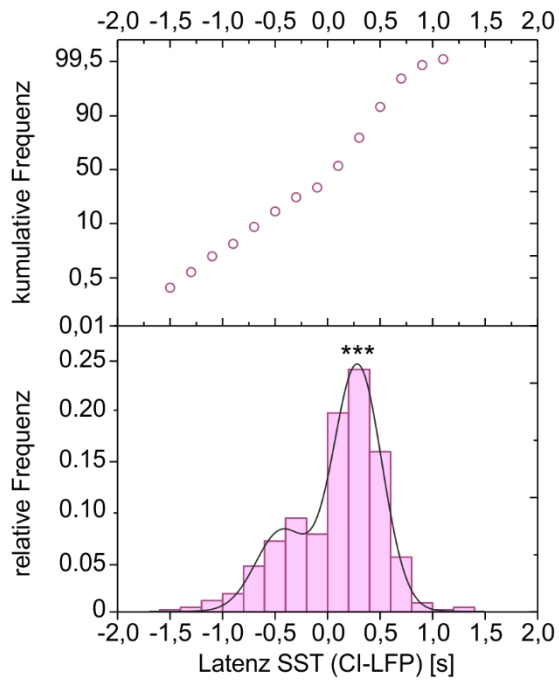
Während der Peak in der Latenzzeit der Emx1-Neurone bei  $146,2 \pm 12,9$  ms lag, befand sich der spätere Peak der bimodalen Latenzverteilung der SST-IN etwas später bei  $284,8 \pm 13,3$  ms. Hingegen zeigte sich der kleinere Peak der bimodalen Gaußverteilung bei Latenzen der SST-Interneurone deutlich früher: bei  $-438,12 \pm 42,12$  ms. Aufgrund der bimodalen Verteilung der SST-Interneuron-Latenzzeiten wurden die Zellen hypothetisch in funktionell unterschiedliche Gruppen eingeteilt und anschließend hinsichtlich verschiedener Parameter verglichen (siehe Abbildung 21 C-E).

Die Gruppe „präaktiver“ SST-IN wurde aus Neuronen gebildet, die für  $\geq 80\%$  ihrer zu einem fGDP-korrelierten Events eine Latenzzeit von  $\geq 0,1$ s aufwiesen, also 100ms früher als das fGDP-Signal einen Peak im Kalziumtransienten zeigte. Alle anderen SST-IN wurden der Gruppe der „postaktiven“ SST-IN zugeteilt. Anschließend wurde ermittelt, ob die Neuronengruppen unterschiedliche Charakteristika in der Aktivität in der Kalziumbildung aufweisen.

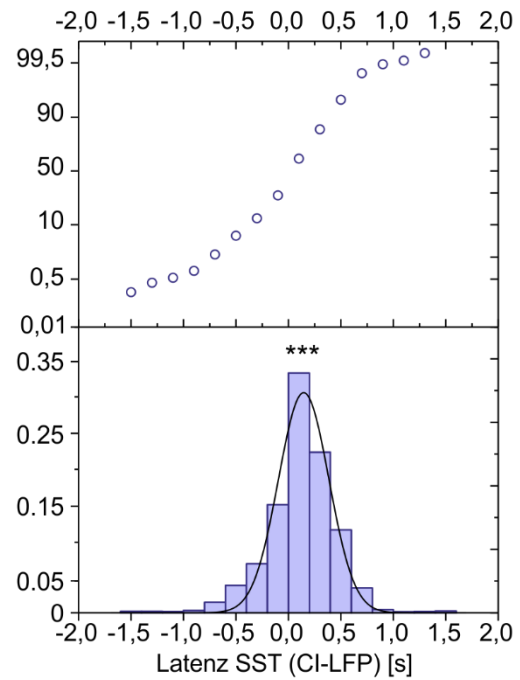
Es zeigte sich allerdings, dass die Gruppe der „präaktiven“ (n=10 Zellen) sich von den „postaktiven“ (n=34 Zellen) SST-IN nicht signifikant in der Partizipationsrate (pre:  $84 \pm 2\%$  vs. post:  $80 \pm 4\%$ ;  $p= 0,58$  Mann-Whitney-U-Test), der mittleren GDP-assozierten Transienten-amplitude (pre:  $1,09 \pm 0,27$  vs. post:  $1,35 \pm 0,21$ ;  $p= 0,62$  Mann-Whitney-U-Test) und der mittleren GDP-assozierten Transientenfrequenz (pre:  $0,77 \pm 0,12 \text{ min}^{-1}$  vs. post:  $1,09 \pm 0,75 \text{ min}^{-1}$   $p= 0,45$  Mann-Whitney-U-Test) unterschied.

Abschließend lässt sich konstatieren, dass sich die SST-IN in ihrer Aktivierungskinetik stark von den Pyramidenzellen unterscheiden: Ein Großteil der SST-IN scheint erst nach den Pyramidenzellen aktiv zu sein. Ein kleinerer Teil der SST-IN jedoch ist noch vor den Pyramidenzellen, welche die fGDP-Ereignisse tragen und ausprägen, aktiv. Jedoch ließen sich keine weiteren Unterschiede dieser durch die Analyse zwei funktionell eingeteilten Subpopulationen von SST-IN in der Kalziumbildung auffinden.

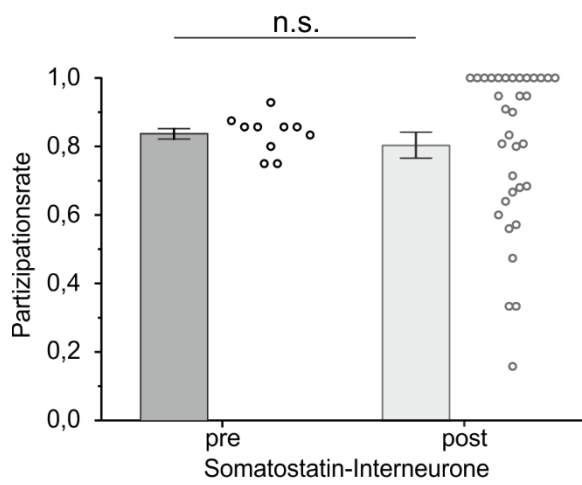
A



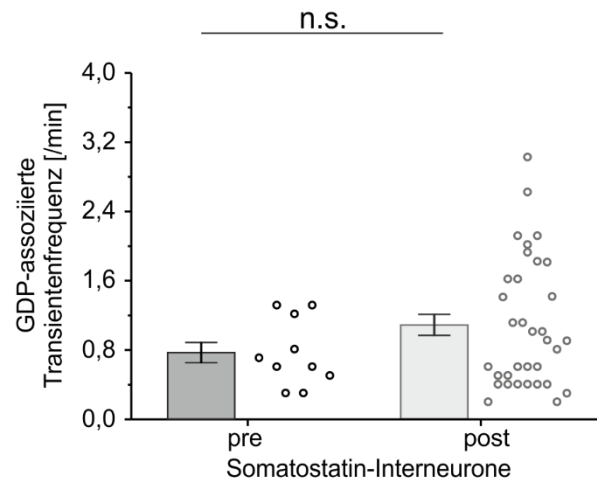
B



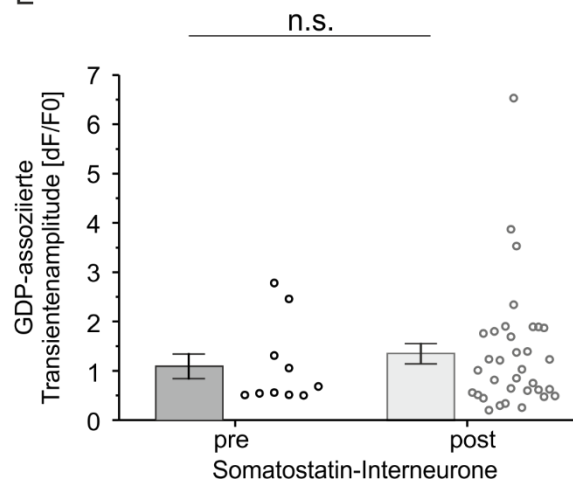
C



D



E



**Abbildung 21:** Darstellung des Aktivitätsverlaufs der beiden neuronalen Populationen (SST-IN GC6s<sup>SST</sup> sowie Emx1-positive Zellen GC6s<sup>Emx1</sup>) während der Beteiligung an synchronen Netzwerkereignissen (fGDPs) in der CA1. Latenzverteilung der Aktivität zu fGDP-Ereignissen von A) SST-IN und B) Emx1-Neuronen. In A und B ist oben jeweils die kumulative Verteilung sowie unten die Dichteverteilung der Latenz mit nicht-linearer Kurvenanpassung an das Histogramm. C, D und E: Vergleich der nach funktionellen Gesichtspunkten eingeteilten SST-IN in sogenannte „pre-SST-IN“ ( $\geq 80\%$  der GDP-assozierten Transienten mit einer Latenzzeit von  $\geq 100\text{ms}$ ) und „post- SST-IN“ (Rest). Vergleich der C) Partizipationsrate, D) der GDP-assozierten Transientenfrequenz sowie der E) GDP-assozierten Transientenamplitude. Die Balken zeigen jeweils  $\pm$  SEM an. n.s. = nicht signifikant; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## 5 Diskussion

Aus den experimentellen Befunden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie und extrazellulären Feldpotentialableitungen ergeben sich zusammenfassend folgende Ergebnisse:

- 1) GDPs lassen sich in der Kalziumbildgebung mit unterschiedlichen Indikatoren robust messen. OGB1-AM gefärbte Schnitte zeigen mehr angefärbte Zellen und eine niedrigere GDP-Frequenz im Vergleich zu GCaMP6s-gefärbten Schnitten.
- 2) In den mit GCaMP6s gefärbten Schnitten lassen sich mehr Kalziumtransienten bei Emx1-positiven Pyramidenzellen und SST-IN messen, als mit GCaMP3.
- 3) Die LFP-Komponente (fGDPs) der EZs mit Platin-Wolfram-Elektroden ist für GDPs in der CA1 sehr spezifisch (positiv prädiktiver Wert  $93,57\% \pm 2,04\%$ ). Allerdings lassen sich nicht alle in der Kalziumbildgebung mit GCaMP6s als GDPs klassifizierten Ereignisse detektieren (Sensitivität  $62,47\% \pm 6,32\%$ ).
- 4) SST-Interneurone sind in der neonatalen CA1-Region spontan aktiv ( $2,47 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$ ) und unterschieden sich in ihrer Kalziumtransientenfrequenz nicht signifikant von den Pyramidenzellen.
- 5) SST-Interneurone zeigen ebenso wie die Pyramidenzellen jeweils innerhalb ihrer Population signifikant hochgradig korrelierte Aktivität in der neonatalen CA1-Region.
- 6) Die spontane zelluläre Aktivität der SST-Interneurone ist hochgradig mit fGDPs in der CA1-Region assoziiert (Partizipationsrate  $82,69 \pm 4,18\%$ ), tritt jedoch, im Unterschied zu den Pyramidenzellen in mehr als der Hälfte der Fälle unabhängig davon auf.
- 7) Die pharmakologische Blockade der GABAergen Depolarisation mittels Bumetanid verringert um ca. 50% parallel sowohl die Ausbildung von Spontanaktivität beider neuronaler Populationen als auch die Frequenz von fGDPs in der CA1-Region.
- 8) Ein geringer Teil der SST-IN ist vor (438ms) dem Auftreten eines GDPs aktiv, während der Großteil der SST-IN erst nachträglich (285ms) zum Peak des fGDP-Signals einen Kalziumtransienten zeigt. Die Pyramidenzellen zeigen im Mittel 162ms nach dem Peak des fGDP-Signals zelluläre Aktivität.
- 9) In einer Subgruppenanalyse zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitätsparametern in der Kalziumbildgebung zwischen den (in Bezug auf die fGDPs) frühzeitig und nachträglich aktiven SST-IN.

## 5.1 Modellorganismus Maus

Die detaillierten physiologischen Eigenschaften der frühen synchronen Netzwerkaktivität in der CA1 des Hippokampus sind bei Menschen noch unklar. Dennoch stellt FSN in der CA1 beim Menschen, wie auch bei anderen Säugetieren, einen Meilenstein in der funktionellen Entwicklung neuronaler Netzwerke dar. Ein großes Problem ist, dass weder das EEG noch ECoG geeignete Methoden sind, um FSN in subkortikalen Strukturen hinreichend genau messen und auswerten zu können. Darüber hinaus sind fMRT-Messungen bei Menschen nicht in der Lage, die Beteiligung spezifischer neuronaler Populationen an FSN aufzulösen. (Logothetis 2008) Da FSN jedoch ein ubiquitäres biologisches Phänomen ist, wurden akute Hirnschnitte von Mäusen als ein *in vitro* Modell genutzt. Mäuse eignen sich dafür besonders gut aufgrund der großen Ähnlichkeit des Genoms zum menschlichen Genom (Waterston et al. 2002) und der kurzen Generationsfolge, welche die Durchführung der Experimente in einem angemessenen zeitlichen Rahmen überhaupt möglich macht.

## 5.2 Methodische Schwierigkeiten

### 5.2.1 Heterogenität der Interneurone

Weder funktionelle noch anatomisch-morphologische Subgruppen von Interneuronen können derzeit gezielt genetisch adressiert werden. Die Verwendung genetischer Marker zur differentiellen Messung von IN-Subpopulationen ist ein geeignetes Verfahren, um das Problem der Heterogenität der Interneurone experimentell zu adressieren. Allerdings sind auch neurochemische Klassen von Interneuronen nicht vollständig homogen. (Kepecs und Fishell 2014) Folglich ist zu erwarten, dass auch die Population der SST-Interneurone heterogen hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer physiologischen Eigenschaften und der Expression weiterer neurochemischer Marker ist. (Yavorska und Wehr 2016, Pelkey et al. 2017) Im Rahmen der Messungen in dieser Arbeit waren SST-Interneurone auch im *stratum pyramidale* und vereinzelt sogar im *stratum radiatum* detektierbar. Aufgrund der für die SST-IN charakteristischen Lage im *stratum oriens* sowie der deutlichen quantitativen Überlegenheit von SST-IN in dieser Region der CA1 wurden während der Experimente und Analysen auch nur solche Nervenzellen berücksichtigt. Diese IN kommen dabei der adulten morphologischen Klasse der OLM-Zellen im Hippokampus am nächsten. Insgesamt ermöglichte die Verwendung genetisch codierter Kalziumindikatoren unter dem SST-Promotor eine methodische Eingrenzung der Untersuchungen auf eine definierte Gruppe von Interneuronen, welche bei der Interpretation der Ergebnisse jedoch nicht als vollständig homogen angesehen werden sollte.

Um außerdem eine unwahrscheinliche (aber dennoch mögliche) ektope Expression von GCaMP6s in PCs unter der SST<sup>IRES<sup>Cre</sup></sup>-Treiberlinie auszuschließen, wurden weitere Experimente durch Dr. Tom Flossmann (M. Sc.) im Labor durchgeführt und ergänzend veröffentlicht. Hierbei wurde in einem SST<sup>IRES<sup>Cre</sup></sup>::tdTomato<sup>Isl</sup>-Modell nach einer Überschneidung der Expression von tdTomato-markierten Zellen in der Cre-Treiberlinie und Satb2<sup>+</sup>-Zellen, als Marker von PC-Vorläuferzellen, gesucht. Mittels eines polyklonalen Antikörpers wurden die Satb2<sup>+</sup>-Zellen schließlich im konfokalen Fluoreszenzmikroskop markiert. Es zeigte sich eine minimale Co-Expression von 1,9% zwischen den Satb2-positiven und tdTomato-positiven Zellen, sodass davon auszugehen ist, dass die genetische Adressierung spezifisch für die Population der SST-IN ist. (Flossmann et al. 2019)

### 5.2.2 Analyseverfahren der Daten aus der Kalziumbildung

Die verwendeten optischen Methoden zur Messung neuronaler Aktivität stellen einen Kompromiss zwischen zeitlicher und räumlicher Auflösung (Konfokalität) dar. Daher konnte axiales Streulicht nicht gänzlich eliminiert werden, was theoretisch zu einer überschätzten Transientenfrequenz in den durch ROI markierten Neuronen führen könnte. Besonders ein konfokales Spinning-Disk-Mikroskopie-System ist hinsichtlich der zeitlichen Auflösung optimiert. (Conchello und Lichtman 2005, Wang et al. 2005, Shimozawa et al. 2013) Diese Überlegungen sind besonders für die Auswertung der Aktivität der Emx1-positiven Zellen aufgrund ihrer hohen Dichte im *stratum pyramidale* bedeutsam. (Klausberger und Somogyi 2008) Für die SST-Interneurone haben diese methodischen Schwierigkeiten keine große Relevanz, da aufgrund der spärlichen Verteilung und relativ hohen räumlichen Separation dieser Neurone Streulicht aus der unmittelbaren axialen Umgebung durch weitere Neurone des gleichen Typus vernachlässigt werden konnte. In Vorversuchen und Analysen wurde das Ausmaß dieses methodischen Problems abgeschätzt und versucht, es wie folgt zu minimieren: Aus der Literatur ist bekannt, dass GCaMP-Indikatoren keine nukleäre Expression aufweisen und folglich ein theoretisch detektierbares Kernsignal ein experimentelles Artefakt darstellt. (Nakai et al. 2001) In den Aufnahmen der Kalziumbildung war jedoch ein Fluoreszenzsignal im Kern detektierbar. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um axiales Streulicht aus nicht-fokalen Regionen. Dieses Streulicht wird vermutlich besonders aus dem axialen Zytoplasmabereich, welcher den Zellkern unmittelbar umgibt, generiert. Jedoch lässt sich axiales Streulicht aus anderen Zellen nicht gänzlich ausschließen. Bei der Auswertung ergab sich die Frage, welche zellulären Strukturen in die Auswahl der ROI zur Analyse der Daten eingehen sollten.



Um diese Frage zu klären, wurden zwei unterschiedliche ROI-Markierungen der Emx1-positiven Neurone quantitativ verglichen. Dabei wurde untersucht, inwiefern sich eine rein zytoplasmatische Markierung der Zellen von einer elliptischen ROI, die sowohl den Zellkern als auch das Zytoplasma erfasst, hinsichtlich der Detektion von Kalziumtransienten unterscheidet. Aufnahmespuren von Neuronen, bei denen allein das Zytoplasma als ROI markiert wurde, zeigten eine minimal erhöhte (ohne inferenzstatistische Auswertung) CaT-Frequenz im Vergleich zu den anderen ROI. Die hier zusätzlich detektierbaren Events zeichneten sich aber besonders durch ihre relativ niedrige Amplitude aus. Die Events mit einer hohen Amplitude waren jedoch in beiden ROI-Konfigurationen ohne signifikante quantitative Unterschiede detektierbar. Prinzipiell ist diskutabel, ob es sich bei diesen niedrigamplitudigen Transienten um ein echtes biologisches Signal oder um ein methodisches Artefakt in Form von axialem Streulicht handelt. Daher wurde der Vorteil einer isoliert zytoplasmatischen Markierung als fraglich eingestuft. Abgesehen davon ist zu vermuten, dass der Einfluss von axialem Streulicht aus anderen Neuronen im Zentrum der Zellen nicht größer ist als in der Zellperipherie. Aus diesen Gründen und mit Blick auf die Praktikabilität der Auswertung wurden die Zellen durch elliptische ROIs markiert, welche sowohl den Zellkern als auch das Zytoplasma der jeweiligen Neurone umfassten.

### **5.2.3 Analyseverfahren der extrazellulären Ableitungen**

Eine weitere methodische Herausforderung betraf die semiautomatische Eventdetektion von fGDPs mittels empirisch generierter Templates. Besonders rasch aufeinanderfolgende Events konnten aufgrund der dadurch möglichen sehr heterogenen Morphologie nicht vollständig aufgelöst und detektiert werden. Dennoch wurden die Templates optimiert, um möglichst viele solcher Events aufzulösen. Insgesamt wurde sich jedoch für einen konservativen Ansatz in Form eines relativ hohen geforderten Ähnlichkeitskoeffizienten entschieden, sodass der Detektionsbias eher hin zu falsch-negativen als zu falsch-positiven Events ausgerichtet war.

### **5.2.4 Statistischer Vergleich von Aktivitätsparametern zwischen SST-positiven Interneuronen und Emx1-Neuronen**

Ein statistisches Problem stellte sich beim Vergleich der Aktivitätsparameter zwischen SST-Interneuronen und Pyramidenzellen heraus. In der Regel waren pro akutem Hirnschnitt nur zwei SST-Interneurone gleichzeitig registrierbar, während in den Emx1-gefärbten Schnitten durchschnittlich 40 Pyramidenzellen parallel pro Hirnschnitt messbar waren.

Wäre keine Mittelwertbildung über die in einem Schnitt messbaren Neurone erfolgt, dann hätten Störfaktoren, die sich theoretisch jeweils auf einzelne Hirnschnitte auswirken können, sehr viele Messpunkte (alle Pyramidenzellen des jeweiligen Schnitts) in der Auswertung beeinflusst. Darüber hinaus hätte ein Vergleich auf der Ebene einzelner Neurone aufgrund der quantitativen Überlegenheit der Pyramidenzellen zu stark unterschiedlichen Varianzen geführt, was die Power der statistischen Tests deutlich negativ beeinflusst hätte. Doch das bedeutete auch, dass der mittelwertbasierte Vergleich aufgrund der niedrigen Anzahl an Neuronen in den GC6s<sup>SST</sup> -Schnitten, die zur Mittelwertberechnung benutzt werden konnten, sensibel für Ausreißer in den Aktivitätsparametern einzelner SST-Interneurone war. Dieses aus den biologischen Gegebenheiten resultierende Problem konnte nicht optimal statistisch gelöst werden, sodass hier ein Kompromiss zugunsten der Mittelwertbildung auf Ebene der akuten Hirnschnitte zum Vergleich beider Modelle geschlossen wurde.

### **5.2.5 Statistischer Vergleich von früher synchroner Netzwerkaktivität zwischen synthetischen und genetisch codierten Kalzium-Indikatoren**

Die letzte größere methodische Besonderheit betrifft den Vergleich der Kalzium-Indikatoren im Emx1- sowie im C57BL6/J-Modell. Die absoluten Zellzahlen in der optischen Messregion unterschieden sich zwischen den synthetischen und den genetischen Kalzium-Indikatoren insofern, als dass in den mit OGB1-AM gefärbten Wildtypmodellen viel mehr Neurone auf einer konfokalen Ebene lagen und dadurch vermehrt gleichzeitig messbar waren. Aufgrund der fehlenden nukleären Expression von GCaMP gibt es im Vergleich zu OGB1-AM weniger Schnittebenen pro Zelle, die eine zweifelsfreie Selektion der gefärbten Zelle in der Auswertung als ROI gewährleisten. Die Unterschiede in der Anzahl der gefärbten Zellen könnten auch durch folgende Gegebenheiten bedingt sein: Zum einen verändert die akute Netzwerkbeladung die Architektur des Gewebes. Dabei ist es denkbar, dass Zellen in der Nähe der Applikationsstelle verdrängt werden und sich daher an anderer Stelle dem Druckgradienten folgend anhäufen. Zum anderen ist die unselektive Färbung von Zellen mit OGB1-AM bedeutsam. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Gliazellen mit dieser Färbemethode markiert wurden. Es ist zwar in der Literatur beschrieben, dass diese Zellen neonatal keine starken Depolarisationsereignisse aufweisen (Zhong et al. 2016), jedoch kann der Beitrag der Gliazellen zum Signal nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist auch davon auszugehen, dass nicht alle Pyramidenzellen Emx1 exprimieren, sodass in den mit GCaMP gefärbten Schnitten auch weniger dargestellte Pyramidenzellen zu erwarten sind. (Chan et al. 2001)

Ein potentielles Problem besteht in der Klassifizierung der synchronen Netzwerkaktivität und der zu GDPs assoziierten Kalziumtransienten auf der Basis der relativen Zellbeteiligung in der Kalziumbildung. Aufgrund der methodisch, durch den Indikator, bedingten unterschiedlichen absoluten Zellzahl pro Schnitt ergibt sich folgendes Problem: Ereignisse, welche in OGB1-AM gefärbten Schnitten aufgrund der geforderten minimalen relativen Zellbeteiligung als lokales Netzwerkereignis eingestuft wurden, wären in GCaMP6s als GDPs aufgrund der dennoch hohen absoluten Zellbeteiligung gewertet worden. (siehe Abbildung 7A). Somit besteht durchaus die Möglichkeit, dass der Unterschied in der GDP-Frequenz zwischen den Hirnschnitten, welche mit GCaMP gefärbt waren, und den mit OGB1-AM gefärbten Schnitten leicht überschätzt wurde und daher methodisch bedingt ist. Eine einheitliche Definition synchroner Netzwerkaktivität anhand eines quantitativ absoluten Minimums von teilnehmenden Zellen birgt ebenfalls konzeptionelle Probleme und wirkt zum derzeitigen Stand der Forschung arbiträr. Daher wurde versucht die unterschiedliche absolute Anzahl gefärbter Zellen in der Interpretation der Ergebnisse ausdrücklich zu berücksichtigen.

### **5.2.6 Schnittführung und Erhalt des Konnektivitätsprofils der Neurone**

Um das Konnektivitätsprofil der gesamten hippocampalen Formation weitgehend zu erhalten, wurden die akuten Hirnschnitte unter horizontaler Schnittführung hergestellt. (Boulton et al. 1992, Xiong et al. 2017) Darüber hinaus wurde vor jedem Experiment geprüft, ob eine adäquate Schnittqualität (hohen Anteil physiologischer Neurone in der DIC-Mikroskopie) vorhanden war (siehe Abschnitt 3.4.1).

## **5.3 Ergebnisse**

### **5.3.1 Unterschiede in der optischen und elektrophysiologischen Messung früher synchroner Netzwerkaktivität in der CA1**

Frühe synchrone Netzwerkaktivität (GDPs, fGDPs) zeigte sich durch zwei voneinander unabhängige Methoden als ein konstantes Phänomen in der CA1-Region des neonatalen (P1 bis P4) Hippokampus von Mäusen. Auffällig war jedoch, dass im GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell eine fast doppelt so hohe GDP-Frequenz im Vergleich zu OGB1-AM messbar war, während die GDP-Frequenz zwischen GC3<sup>Emx1</sup>- und OGB1-AM keine signifikanten Unterschiede aufwies (siehe Abbildung 8A).

Da im Verlauf der Experimente allerdings die GC6s<sup>Emx1</sup> -Hirnschnitte benutzt wurden, um extrazelluläre Feldpotentialableitungen zur Detektion von GDPs zu validieren, wurde dieser Befund genauer untersucht. Die Zellzahl im FoV der GC6s<sup>Emx1</sup>-Schnitte war im Mittel um ca. 40% niedriger als in mit OGB1-AM gefärbten Schnitten (siehe Abbildung 7C). Wie bereits in Abschnitt 5.2.5 diskutiert, waren Analysen von FSN zwischen den beiden Indikatoren nicht unbedingt miteinander vergleichbar. Es bleibt jedoch zu klären, ob neben der Anzahl der in einer konfokalen Ebene dargestellten Zellen weitere Indikatoreigenschaften einen GDP-Frequenzunterschied zwischen OGB1-AM und GCaMP6s bedingen könnten. Hierbei ist ein interessanter Befund, dass sich die totale mediane Transientenfrequenz nicht signifikant zwischen Pyramidenzellen, die mit OGB1-AM, und jenen, die mit GCaMP6s gefärbt wurden, unterscheidet (Abbildung 13D). Eine weitere mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass beide Kalziumindikatoren in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der Aktionspotentiale Aktionspotentialsalven unterschiedlich gut abbilden können. (Chen et al. 2013) Beide Indikatoren gelten in der Literatur als sehr sensitiv. Zu beachten ist jedoch, dass die Sensitivität von GCaMP6s und OGB1-AM von der Aktionspotentialfrequenz abhängt, die den resultierenden Kalziumtransienten zugrunde liegt: OGB1-AM hat eine stärkere Abnahme im SnR des Kalziumsignals bei hohen Aktionspotentialsalven im Vergleich zu GCaMP6s. (Chen et al. 2013). GCaMP6s kann besser als OGB1-AM kurz aufeinanderfolgende GDPs, welche von jeweils einer hochfrequenten Salve von mehreren Aktionspotentialen begleitet sind, auflösen. OGB1-AM könnte hingegen theoretisch kleine Salven von Aktionspotentialen, die unabhängig von massiven Netzwerkereignissen wie GDPs sind, detaillierter auflösen als GCaMP6s. Für diese Hypothese gibt es allerdings keine direkten Belege oder Daten aus den Experimenten dieser Arbeit, da keine direkten Messungen einzelzellulärer elektrophysiologischer Aktivität bei paralleler Kalziumbildung vorgenommen wurden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es sich hierbei um Entwicklungseffekte handeln könnte. Während Färbungen mit OGB1-AM akute Netzwerkbeladungen sind, werden GCaMP-Indikatoren im Verlauf der Entwicklung exprimiert und stellen intrazellulär einen zusätzlichen endogenen Kalziumpuffer dar. Dies könnte theoretisch intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen. Außerdem wäre es möglich, dass akute Netzwerkbeladungen mit OGB1-AM die Neurone in ihrer Aktivitätsausbildung nachhaltig beeinträchtigen. Allerdings gibt es in der Literatur keine Hinweise auf solche Effekte. Abgesehen davon wäre es denkbar, dass ebenfalls in Färbungen mit GCaMP3 solche Entwicklungseffekte sichtbar sein müssten.

Allerdings ist zu bedenken, dass GCaMP3 deutlich weniger Sensitivität als OGB1-AM aufweist, trotz der Tatsache, dass GCaMP3 ein stärkeres Signal bei hohen Aktionspotentialsalven als OGB1-AM zeigt. (Chen et al. 2013) Darüber hinaus ist die mediane relative GDP-assozierte Transientenfrequenz auch bei GCaMP3 im Vergleich zu OGB1-AM signifikant erhöht, wobei die totale Transientenfrequenz signifikant niedriger in GCaMP3-gefärbten Schnitten im Vergleich zu OGB1-AM ist.

Die deutlichen quantitativen Unterschiede in der Darstellung von GDPs lassen sich zusammenfassend eher auf die limitierte Vergleichbarkeit von GDPs in der Analyse zwischen verschiedenen Kalziumindikatoren und eventuell auch unterschiedlichen Indikatoreigenschaften als auf biologische Effekte zurückführen. Obwohl sich das GC6s<sup>Emx1</sup> -Modell gut zur Detektion von GDPs in der neonatalen CA1 eignet, ist dieser Befund bei weiteren Interpretationen zu bedenken.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, die Partizipationsraten zu GDPs zwischen den SST-IN und den Emx1-positiven Neuronen zu vergleichen. Für diese Vergleiche wurden GDPs mittels EZ gemessen. Daher war es von Interesse, wie viel der tatsächlichen FSN in der neonatalen CA1 durch die EZ detektiert werden konnten und welche Eigenschaften jene Netzwerkereignisse aufwiesen, welche nicht durch die EZ messbar waren. Die mittlere Sensitivität zur Detektion von *Giant Depolarizing Potentials* in Bezug auf die Kalziumbildung durch die EZ mittels PWE lag bei  $62,47\% \pm 6,32\%$ . Der mittlere positiv prädiktive Wert ist bei einem Wert von  $93,57\% \pm 2,04\%$  als hervorragend einzustufen (siehe Abbildung 10). Diese Detektionsparameter beziehen sich auf Referenzmessungen in GC6s<sup>Emx1</sup> -Schnitten. Es stellte sich daher die Frage, warum ein substantieller Bestandteil der (in der Kalziumbildung mit GCaMP6s angezeigten) GDPs nicht in den EZ gemessen werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass einige GDPs, welche durch Färbungen mit GCaMP6s detektiert werden konnten, zu wenige gleichzeitig aktive Zellen aufweisen, um ein ausreichendes SnR im extrazellulären Feldpotential zu bewirken. Dies steht im Einklang mit den Befunden, dass sich fGDP- und nicht-fGDP-korrelierte synchrone Netzwerkereignisse (GDPs) in der Kalziumbildung signifikant unter den Gesichtspunkten der medianen Transientenamplitude, Partizipationsrate und Synchronisationszeit unterschieden (siehe Abbildung 11). Hinsichtlich der Synchronisationszeit muss jedoch berücksichtigt werden, dass der gemessene Unterschied in Millisekunden nur ca. zwei Aufnahme frames, also zwei diskreten Datenpunkten, entspricht (siehe Abbildung 11D). Bei der relativ geringen Anzahl der ausgewerteten Ereignisse ist daher eine zufällige Variation, welche durch den semiautomatischen *template-matching*-Algorithmus bedingt ist, nicht auszuschließen.

Außerdem muss bedacht werden, dass bei der Analyse der extrazellulären Ableitungen auf eine hohe Spezifität in der Signaldetektion geachtet wurde (siehe 3.8.1), wodurch einige Ereignisse, die eine von der charakteristischen Feldpotentialdeflektion abweichende Morphologie hatten, im Detektionsverfahren abgewiesen wurden. Dies betrifft besonders kurz aufeinanderfolgende fGDPs. Des Weiteren muss beachtet werden, dass in extrazellulären Ableitungen elektrodennahe Aktivität sicherer detektiert werden kann als elektrodenferne Aktivität. (Buzsáki et al. 2012) Aus der Literatur ist bekannt, dass GDPs keine statischen und alle Zellen umfassenden Ereignisse sind, sondern in Form einer Aktivitätswelle „wandern“. (Bolea et al. 2006) In der vorliegenden Arbeit wurden die Elektroden allerdings stets in der dem *subiculum* zugewandten Seite der CA1-Region platziert (siehe Abschnitt 3.5), sodass es durchaus möglich ist, dass nicht sämtliche GDPs in der CA1 durch die extrazellulären Ableitungen gemessen werden konnten. Ein interessanter Punkt ist auch, dass sowohl die Sensitivität als auch der positiv prädiktive Wert in Abhängigkeit von der Versatzlänge bis zu einem Wert von 750 ms stark anstiegen. Letztlich wurde bei der Auswertung eine Versatzlänge von bis zu 1500 ms zwischen dem Signal in der Kalziumbildgebung und dem fGDP-Signal in den EZ zugelassen (siehe Abbildung 10 und Abschnitt 3.8.4). Dies hatte mehrere Gründe: Zum einen variierte die absolute *time to peak* bei den fGDP-Signalen deutlich. Dies liegt begründet in der Tatsache, dass die Amplitude des fGDP-Signals abhängig von der Entfernung zur Elektrode ist. Eine durchaus plausible Erklärung ist außerdem, dass die Inkubationseigenschaften der Elektrode zwischen den jeweiligen Hirnschnitten variierte. Dadurch kämen jeweils unterschiedlich starken Filtereffekte (besonders Hochpassfilter) und damit verbundene Morphologien des fGDP-Signals an der Grenze zwischen der Metallelektrode und dem neuronalen Gewebe zum Tragen. (Robinson 1968, Bedard et al. 2004, Rivnay et al. 2017) Abgesehen davon ist die Zeit des Auftretens eines GDPs in der Kalziumbildgebung als der absolute Anfang des Ereignisses definiert (siehe 3.8.3) während die *time of peak* des fGDP-Signals keineswegs den Anfang des Ereignisses darstellt. Außerdem tritt das Signal in der Kalziumbildgebung methodenbedingt immer im zeitlichen Verzug zum elektrophysiologischen Signal auf. Ein kleiner Anteil dieses zeitlichen Verzuges des Kalziumsignals ist durch die Kalzium-vermittelte Konformationsänderung des GCaMP-Proteins und den vorgeschalteten Depolarisations-vermittelten Kalziumstrom über die Zellmembran bedingt. (Grienberger und Konnerth 2012) Schließlich bedingen auch potentiell die propagierenden Eigenschaften der GDPs (siehe oben) ebenfalls einen zeitlichen Verzug zwischen der Signaldetektion in der Kalziumbildgebung und den extrazellulären Ableitungen.

In Anbetracht der Tatsache, dass auch zwischen den Kalziumindikatoren große Unterschiede in der GDP-Frequenz zu finden sind (siehe oben), wurde die eingeschränkte Sensitivität der extrazellulären Ableitungen nicht als eine problematische methodische Limitation gewertet.

Es bleibt festzuhalten, dass die extrazellulären Ableitungen hochspezifisch besonders massive und hochsynchrone GDPs in der CA1-Region des neonatalen Hippokampus anzeigen und sich durchaus als unabhängige Detektionsmethode von FSN eignen.

### 5.3.2 Unterschiede in der Auflösung neuronaler Aktivität zwischen

#### GCaMP3 und GCaMP6s in Emx1- und SST-positiven Interneuronen

Erwartungsgemäß zeigte der GECI GCaMP6s sowohl in Emx1-Neuronen als auch in SST-Interneuronen deutlich mehr Kalziumtransienten an als GCaMP3 (siehe Abbildungen 13 und 15). Wie bereits oben diskutiert (siehe Abschnitt 5.3.2), liegt dies an der höheren Sensitivität, der Antwortrate und dem stärkeren *SnR* von GCaMP6s. (Chen et al. 2013) Theoretisch wäre allerdings denkbar, dass ein Teil der vermehrten Signalgebung in GCaMP6s auch durch einen verstärkten *pinhole-crosstalk* aufgrund der signifikant höheren medianen Transientenamplitude (siehe Abbildung 13) zustande kommt. Dennoch lässt sich die im GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell im Vergleich zum GC3<sup>Emx1</sup>-Modell gemessene erhöhte Transientenfrequenz nicht allein auf axiales Streulicht zurückführen, sondern ist hauptsächlich durch eine bessere Auflösung der neuronalen Aktivität durch GCaMP6s bedingt. Für diese Vermutung spricht, dass im Vergleich der Rohdaten zwischen GC6s<sup>Emx1</sup> und GC3<sup>Emx1</sup>, wie auch zwischen GC6s<sup>SST</sup> und GC3<sup>SST</sup>, keine auffällige Zunahme von CaTs mit niedriger Amplitude zu sehen war. Diese niedrigamplitudigen Signale wären jedoch charakteristisch für axiales Streulicht und den sogenannten *pinhole-crosstalk* gewesen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, wie genau CaTs die ihnen zugrundeliegenden elektrophysiologischen Parameter (wie beispielsweise das Aktionspotential) der Interneurone widerspiegeln. Aus exploratorischen Experimenten mit parallelen *Patch-Clamp*-Ableitungen und Kalziumbildgebung im GC6s<sup>SST</sup>-Modell der CA1 im neonatalen Hippokampus konnte gezeigt werden, dass jede Kalziumtransiente mit Aktionspotentialen einhergeht. (Flossmann et al. 2019) Allerdings steht die im Rahmen dieser Arbeit gemessene mittlere totale CaT-Frequenz der SST-Interneurone im GC6s<sup>SST</sup>-Modell von  $2,6 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$  (siehe Abbildung 17A) in einem starkem Kontrast zu der durch *Patch-Clamp*-Ableitungen ermittelten Transientenfrequenz von  $2,0 \pm 0,3 \text{ Hz}$  aus der Literatur. (Flossmann et al. 2019) Die Befunde deuten darauf hin, dass trotz der Verwendung des Indikators GCaMP6s die Aktivität der neonatalen SST-Interneurone systematisch unterschätzt wird.

Dies liegt zum einen daran, dass GCaMP6s hochfrequente Aktionspotentialsalven aufgrund der relativ langsamen Kinetik (beispielweise im Vergleich zu GCaMP6f und OGB1-AM) nicht separat anzeigt. Darüber hinaus sind tonische Aktionspotentialfolgen nicht vollständig mit GCaMP6s abbildbar. (Chen et al. 2013, Flossmann et al. 2019) Auffällig ist, dass GCaMP6s im neonatalen GC6s<sup>SST</sup>-Modell nicht das Ausmaß an Sensitivität für Aktionspotentiale aufweist, das in der Literatur für diesen Indikator beschrieben ist. (Chen et al. 2013) Dies könnte in erster Linie am frühen Entwicklungsstand dieser Neurone liegen. Die geringere Sensitivität könnte durch einen verminderten Kalziumeinstrom (im Vergleich zu den adulten Neuronen), als Reaktion auf eine Depolarisation der Zellmembran, bedingt sein. Aus in der Literatur beschriebenen Experimenten kann ein relevanter funktioneller Eingang von NMDA-Rezeptoren auf SST-Interneurone zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden. (Flossmann et al. 2019) Daher scheint das Kalziumsignal der neonatalen SST-Interneurone als Reaktion auf eine Depolarisation der Zellmembran hauptsächlich durch VGCCs vermittelt zu werden. (Leinekugel et al. 1995)

Zusammengefasst eignet sich die Cre-loxp-vermittelte Expression des GCaMP6s-Indikators zur spezifischen Messung neuronaler Aktivität in neonatalen Pyramidenzellen und SST-Interneuronen in der CA1 des Hippokampus. Obwohl GCaMP6s ein hochsensitiver Kalziumindikator ist, wird die zelluläre Aktivität in neonatalen SST-IN und Emx1-positiven Zellen durch die Kalziumbildung systematisch unterschätzt.

### **5.3.3 Spontanaktivität und Beteiligung von SST-IN an fGDPs in der CA1-Region**

Diese Arbeit hat das Ziel, die Beteiligung von SST-IN an GDPs in der neonatalen CA1-Region besser zu verstehen. Prinzipiell ergeben sich mehrere mögliche mechanistische Szenarien für die Beziehung zwischen SST-IN und der Ausbildung von GDPs, aus denen folgende Hypothesen hervorgehen:

- 1) SST-IN zeigen keine Spontanaktivität zu diesem Stand der Entwicklung und können daher auch keine physiologische Rolle bei der Generierung von GDPs spielen.
- 2) SST-IN sind zwar spontan aktiv, allerdings nicht an GDPs beteiligt.
- 3) SST-IN nehmen zwar an GDPs teil, sind allerdings nicht kausal für deren Genese relevant.
- 4) SST-IN sind eine heterogene Population von Interneuronen. Ein Teil dieser Neurone sind Schrittmacherzellen, während andere wiederum durch die Pyramidenzellen in ihrer Aktivität synchronisiert werden.
- 5) SST-IN sind autonome Schrittmacherzellen und lösen GDPs aus.



Hypothesen 1 und 2 bilden die Grundlage der zentralen Fragestellungen dieser Arbeit. Die Klärung dieser Hypothesen ist relevant, da deren Widerlegung eine mechanistisch relevante Rolle von SST-IN wahrscheinlicher macht. Die SST-IN in der neonatalen CA1 zeigten hochkorrelierte Spontanaktivität ( $2,47 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$ ;  $\rho = 0,37 \pm 0,05$ ) und waren in einem sehr hohen Maß ( $82,69 \pm 4,18\%$ ) an GDPs beteiligt. Bemerkenswerterweise weisen Emx1-positive Neurone und SST-Interneurone keine signifikanten Unterschiede sowohl in der mittleren totalen CaT-Frequenz als auch in der Partizipationsrate auf (siehe Abbildung 17A sowie Abbildung 18). Da das Ausmaß der Spontanaktivität und Partizipation der SST-IN sich nicht signifikant von den Pyramidenzellen, der tragenden Population der GDPs, unterscheidet, kann von einem physiologisch relevanten Befund gesprochen werden. Diesbezüglich lassen sich allerdings nicht unmittelbar Aussagen über die tatsächlichen Unterschiede in der elektrophysiologischen Aktivität treffen. Vergleiche mit den Pyramidenzellen sind in ihrer Aussagekraft aufgrund der verwendeten Methoden und ihren bereits in Teilen diskutierten Limitationen begrenzt. Dies liegt unter anderem daran, dass Einflussfaktoren, wie die individuelle endogene Kalzium-Pufferkapazität (unabhängig von GCaMP6s), die potentiell unterschiedlichen Leitfähigkeiten für Kalzium (siehe Abschnitt 5.3.2) sowie die Unterschiede in den endogenen elektrophysiologischen Eigenschaften beider Populationen, nicht genau quantitativ bekannt sind. Allerdings ist die Kenntnis dieser Parameter unbedingt notwendig, um valide Rückschlüsse von den Kalziumtransienten auf die tatsächliche elektrophysiologische Aktivität ziehen zu können. (Rahmati et al. 2016, Rahmati et al. 2018) Um dieses Problem wissend, stellt sich die Frage, warum in dieser Arbeit dennoch die Kalziumbildgebung verwendet wurde, um die Aktivität der SST-IN zu charakterisieren. Die Wahl der Kalziumbildgebung liegt darin begründet, dass es dadurch möglich ist, von mehreren SST-IN gleichzeitig die Aktivität aufzuzeichnen. Abgesehen davon muss trotz all der Limitationen erwähnt werden, dass Kalziumtransienten im GC6s<sup>SST</sup> - Modell dennoch hochspezifisch für Aktionspotentiale sind. Aus dem Nachweis von Kalzium-transienten kann durchaus geschlossen werden, dass auch neuronale Aktivität in den gemessenen Zellen vorhanden ist. Zwar führen nicht alle Aktionspotentiale zu Kalziumtransienten, jedoch liegen allen Kalziumtransienten Aktionspotentiale zugrunde. (Flossmann et al. 2019) In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie belastbar der Befund ist, dass SST-IN und Pyramidenzellen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Aktivität aufweisen. Beispielsweise könnte eine unterschiedliche Leitfähigkeit für Kalziumionen fehlende Unterschiede in der Häufigkeit der Kalziumtransienten zwischen beiden neuronalen Populationen, trotz unterschiedlicher elektrophysiologischer Aktivität, bedingen.

Während sich in Pyramidenzellen durch NMDA-Rezeptoren und durch die nach GABA<sub>A</sub>-Rezeptoraktivierung vermittelte Öffnung von VGCCs die  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht, sind in neonatalen Interneuronen hauptsächlich VGCCs für eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  infolge einer Depolarisation verantwortlich. (Yuste und Katz 1991, Leinekugel et al. 1995, Leinekugel et al. 1997) Aufgrund dieser Befunde aus der Literatur gibt es keinen Grund, anzunehmen, dass die Leitfähigkeit (und somit das Ausmaß des Kalziumeinstroms infolge einer Depolarisation) in PCs grundlegend niedriger ausfällt als in den SST-IN. Da selbige Daten jedoch nicht für neonatale SST-IN vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass SST-IN eine relevant unterschiedliche Leitfähigkeit im Vergleich zu den Pyramidenzellen aufweisen. Obwohl sich die SST-IN und Pyramidenzellen in der Kalziumbildung nicht signifikant in ihrer absoluten Transientenfrequenz unterscheiden, ergaben sich signifikante Unterschiede in der Verteilung dieser Transienten: SST-Interneurone zeigten prozentual mehr als die Hälfte ihrer Transienten (ca. 65%) zwischen den fGDP-Ereignissen. Hingegen wiesen Emx1-positive Zellen nur ca. 50% ihrer Kalziumtransienten zwischen fGDP-Ereignissen (siehe Abbildung 17 C) auf. Dieser Befund könnte ein Hinweis für die stärkere Autonomie der Aktivität der SST-IN im Vergleich zu den Pyramidenzellen sein, wie man sie auch bei Schrittmacherzellen erwarten würde. Allerdings könnte auch das sogenannte *voltage-dependend intrinsically bursting* (VDIB) der neonatalen hippocampalen Pyramidenzellen diesen Befund teilweise erklären. VDIB bezeichnet die elektrophysiologische Eigenschaft neonataler hippocampaler Pyramidenzellen mit einer starken Salve von Aktionspotentialen als Reaktion auf ein depolarisierendes und überschwelliges Ereignis zu reagieren. (Sipila et al. 2005) Hingegen ist eine vergleichbare Eigenschaft für SST-IN nicht bekannt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass GCaMP6s ein relativ langsamer Kalziumindikator ist (Chen et al. 2013) und erwartungsgemäß nicht sämtliche Aktivität der Pyramidenzellen im Rahmen des VDIBs darstellen kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Effektgröße der unterschiedlichen Verteilung der Kaliumtransienten nicht groß ist und viele potentielle Ursachen haben könnte, lässt sich dieser Befund im Folgenden nicht als starkes Argument verwenden.

Um die Hypothesen 3,4 und 5 definitiv zu klären sind die Methoden dieser Arbeit nicht geeignet, da keine detaillierte und getrennte experimentelle Manipulation der Aktivität beider neuronaler Populationen vorgenommen wurde. Nichtsdestotrotz können die Daten dieser Arbeit einen spekulativen Ausblick bzw. einen Hinweis für die Klärung dieser Hypothesen liefern, indem die Vereinbarkeit der gemessenen Daten mit den hypothetischen Szenarien diskutiert wird.

Die Korrelationsanalysen (Pearson-Korrelationskoeffizient) ergaben, dass die Neurone innerhalb einer Population nicht unabhängig voneinander aktiv sind (siehe Abbildung 20 A-B). Dies war für die Emx1-positiven Neurone nicht überraschend, da sie als quantitativ dominierende Population die frühe synchrone Netzwerkaktivität tragen. (Ben-Ari et al. 1989) Überraschend war jedoch der Befund, dass auch die SST-Interneurone im Ausmaß der Korrelation ihrer Aktivität keine signifikanten Unterschiede in der Kalziumbildung zu den Pyramidenzellen aufwiesen (siehe Abbildung 20 D). Dies wirft unmittelbar die Frage auf, durch welche neuronalen Verbindungen das Ausmaß an Korrelation in der Aktivität der SST-IN bedingt sein könnte. Infrage kommen dafür rekurrente Verbindungen innerhalb der Population der SST-IN sowie exzitatorische Synapsen der Pyramidenzellen. Für adulte SST-IN ist bekannt, dass sie funktionell relevante glutamaterge Eingänge von Pyramidenzellen in der CA1 bekommen. (McBain et al. 1994, Ali und Thomson 1998) Obwohl bis zum jetzigen Zeitpunkt in der Literatur nicht spezifisch beschrieben ist, in welchem Ausmaß Verbindungen von PCs in der Lage sind, neonatale SST-IN in der CA1 in ihrer Aktivität zu beeinflussen, konnte in der neonatalen CA1 gezeigt werden, dass Interneurone durchaus erregende Eingänge von Pyramidenzellen erhalten und darüber hinaus auch untereinander hochgradig vernetzt sind. (Riebe und Hanse 2012) Dies lässt die aus den Hypothesen 3 und 4 hervorgehenden mechanistischen Fragen ungeklärt: Ist die synchronisierte Aktivität des SST-Interneuronen-Netzwerks durch das fGDP und die exzitatorischen Eingänge der PCs getrieben? Stößt umgekehrt ein kleiner Teil der SST-Interneurone das gesamte neuronale Netzwerk in der CA1-Region an und sorgt somit für eine globale Synchronisation der Aktivität aller Nervenzellen im hippocampalen Netzwerk?

Um Hinweise zur Beantwortung dieser Frage zu sammeln, wurde die zeitliche Aktivierungskinetik der neuronalen Populationen während eines fGDPs untersucht (siehe Abbildung 21 A-B). SST-Interneurone zeigten eine bimodale Latenzverteilung, während die Emx1-positiven Zellen eine unimodale Latenzverteilung aufwiesen. Dabei war ein kleiner Teil der SST-Interneurone ca. 400ms vor der Emx1-Population aktiv, während die Mehrzahl der SST-Interneurone ca. 150ms nach der Emx1-Population Aktivität zeigte. Definitiv wurden Neurone als „beteiligt“ klassifiziert, wenn sie einen Kalziumtransienten in einem Zeitraum von 1,5 Sekunden vor oder nach dem detektierten fGDP-Ereignis aufwiesen (siehe Abschnitte 3.8.4 und 4.2.2). Dieses zeitliche Kriterium wurde ausgewählt, da die Detektion aufgrund folgender Faktoren einer gewissen Unschärfe unterlag: Den größten Beitrag zur Messunsicherheit (neben dem variablen Elektroden-Neuronen-Abstand) lieferte die semiautomatische Detektion des Signalpeaks aufgrund der für das fGDP charakteristischen langsamen Signalkinetik.

Die dadurch bedingte Unsicherheit wurde verstärkt durch variierende Filtereffekte der Grenzfläche zwischen Gewebe und Elektrode, was zu Signalen mit unterschiedlicher absoluter *time to peak* des fGDP-Signals führte (siehe Abschnitt 5.3.1). Die Klassifikation von Kalziumtransienten als fGDP-assoziiert allein anhand eines zeitlichen Kriteriums ist definitiv. Je größer das zugelassene zeitliche Intervall (siehe Abbildung 15 E) gewählt wurde, desto höher war auch die Wahrscheinlichkeit, dass in Wirklichkeit nicht zwingendermaßen zusammenhängende Aktivität fälschlicherweise als solche klassifiziert wurde. Solche korrelativen Zusammenhänge hätten streng genommen keine Aussagekraft. Der Unterschied der Verteilungen zwischen den beiden Modellen könnte auch darin begründet sein, dass sich die Anzahl der ausgewerteten Ereignisse sich um eine Größenordnung zwischen dem GC6s<sup>SST</sup>-Modell (n=436) und dem GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell (n=5643) unterschied und aus diesem Grund formal nicht auf Verteilungsunterschiede zwischen den Modellen getestet wurde. Eine alternative Erklärung ist allerdings auch, dass sich im Zusammenhang mit der in der Literatur vermuteten Schrittmacherfunktion von frühgeborenen GABAergen Interneuronen (Bonifazi et al. 2009, Vilette et al. 2016, Wester und McBain 2016) hier für die SST-IN eine solche funktionelle Heterogenität zeigt: Ein kleiner Teil der Interneurone (sogenannte *Hub*-Neurone) wäre frühzeitig noch vor den Pyramidenzellen aktiv, während der Rest der SST-IN nachfolgend durch erregende Eingänge der Pyramidenzellen synchronisiert wird und ebenfalls am GDP teilnimmt. Hingegen zeigten sich in weiteren Analysen keine manifesten Unterschiede in den Aktivitätsparametern in der Kalziumbildung (Abbildung 21 C-E), was eher gegen eine solche Vermutung spricht. Streng genommen lässt dieser Befund, aus den oben genannten Gründen, letztlich keine finalen Rückschlüsse auf eine tatsächliche funktionelle Homogenität der SST-IN-Population zu.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich SST-IN nicht signifikant von Pyramidenzellen hinsichtlich der absoluten Frequenz ihrer Spontanaktivität, Partizipation und Synchronisation in der Kalziumbildung unterscheiden. Dieser Befund spricht klar gegen Hypothesen 1 und 2, sodass davon ausgegangen werden kann, dass SST-IN an FSN in Form der fGDPs in der neonatalen CA1 des Hippokampus *in vitro* beteiligt sind. In der Tat konnte eine im Kontext dieses Promotionsprojektes veröffentlichte Studie, unter anderem durch die optogenetische Manipulation der SST-IN und eine anschließende theoretische Modellierung, auf der Basis mehrerer experimentell ermittelter Parameter zeigen, dass SST-Interneurone eine bedeutende Rolle bei der Beeinflussung der Netzwerkdynamik und Ausbildung von FSN in der CA1 im neonatalen Hippokampus *in vitro* spielen. (Flossmann et al. 2019)

In diesem Zusammenhang wurde in einer weiteren Publikation der bedeutende Einfluss von Interneuronen auf die Ausbildung von GDPs der CA1-Region des neonatalen Hippokampus auch *in vivo* demonstriert. (Murata und Colonnese 2020) Darüber hinaus stellt sich die Frage, wodurch neonatale SST-IN unter physiologischen Bedingungen initial aktiviert werden, sollten sie eine anstoßende Rolle für die Ausbildung von FSN besitzen. Prinzipielle Möglichkeiten sind zum einen interregionale Einflüsse, unter anderem aus der CA3, zum anderen aber auch weitere Subpopulationen von Interneuronen sowie endogene Eigenschaften der SST-IN in der CA1.

### **5.3.4 Einfluss der GABAergen Depolarisation auf die Spontanaktivität von SST-IN und PCs sowie auf die Ausbildung von Feld-Giant-Depolarizing-Potentials**

Bumetanid ist ein aus der Literatur bekanntes Pharmakon, welches durch die präferentielle Blockade des NKCC1-Transporters (siehe Abschnitt 3.7) gezielt die GABAerge Depolarisation hemmt. Es ist bekannt, dass NKCC1 einen wesentlichen Beitrag zur depolarisierenden Wirkung von GABA sowie zur Ausbildung von GDPs in der CA1-Region des neonatalen Hippokampus *in vitro* leistet. (Pfeffer et al. 2009) Daher war es für diese Arbeit von Interesse, in welchem Ausmaß (und im Vergleich zu den Emx1-positiven Neuronen) die Aktivität der SST-IN durch die Applikation von Bumetanid beeinflusst wird. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass Bumetanid einen globalen Effekt auf das gesamte Netzwerk der hippocampalen Formation (CA1 und CA3) hatte, da keine physischen Entkopplungsschnitte zwischen der CA1 und CA3 in den akuten Hirnschnitten durchgeführt wurden. (Shi et al. 2014) Darüber hinaus ist die Blockade der GABAergen Depolarisation durch Bumetanid auch nicht spezifisch für die SST-IN, sondern wirkt unspezifisch auf die gesamte Population hippocampaler Interneurone.

Es zeigte sich, dass sich nach der Applikation von Bumetanid sowohl die Frequenz der fGDPs (um ca. 50%) als auch gleichzeitig die Spontanaktivität jeweils der SST-Interneurone und der Emx1-positiven Zellen in der CA1 reduzierte. Die Effektstärke der Reduktion der Transientenfrequenz war bei den Emx1-positiven Neuronen stärker ausgeprägt als bei den SST-IN. Die Frequenzabnahme der Emx1-positiven Zellen ist im Mittel ungefähr doppelt so hoch im Vergleich zu jener der SST-IN (siehe Abbildung 19A). Interessanterweise nimmt die mittlere Transientenamplitude der SST-IN nicht signifikant ab, während dies jedoch für die Population der Emx1-positiven Neurone der Fall ist (siehe Abbildung 19B). Angesichts der relativ hohen Varianz der Messungen im GC6s<sup>SST</sup>-Modell im Vergleich zur potentiellen Effektgröße ist es eine durchaus mögliche Erklärung, dass diese Experimentalserie eine zu geringe statistische Power hatte. Daher stellt sich die Frage, warum die Daten der SST-IN eine deutlich größere Varianz aufweisen als die der Emx1-positiven Neurone.

Wie bereits oben beschrieben (siehe Abschnitt 5.2.4), war die Anzahl der Neurone pro Schnitt sehr unterschiedlich, was unweigerlich eine höhere Varianz der Messdaten bedingte. Abgesehen davon ist es auch möglich, dass die höhere Varianz der Messergebnisse, zusätzlich zu den methodischen Schwierigkeiten, durch die enorme Diversität der Interneurone begründet ist. (Klausberger und Somogyi 2008) Die Reduktion der Frequenz von fGDPs nach Applikation von Bumetanid entsprach den Erwartungen und stellt eine charakteristische Signatur (siehe Abschnitt 1.2.3) dieser Form von FSN in der neonatalen CA1 dar. (Ben-Ari et al. 2007) Darüber hinaus geht interessanterweise aus den Daten hervor, dass auch die zelluläre Aktivität der SST-IN von der NKCC1-vermittelten GABAergen Depolarisation abhängig ist. Es stellt sich nun die Frage, wodurch sich diese Abhängigkeit mechanistisch begründen lässt und welche theoretischen Konsequenzen sich daraus für die Netzwerkdynamik der CA1 ableiten lassen. Ein naheliegender Erklärungsansatz zielt auf ein funktionell relevantes Ausmaß rekurrenter Verbindungen innerhalb der Population der SST-IN ab, was hinsichtlich der gemessenen hohen Korrelation der Aktivität (siehe Abschnitt 5.3.3) innerhalb dieser Population von Neuronen plausibel erscheint. In nachfolgenden Experimenten wäre nun zu klären, wie genau depolarisierendes GABA die Synchronisation der neuronalen Aktivität über die Populationsgrenzen hinweg beeinflusst. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte tatsächlich mittels optogenetischer Hemmung der SST-IN ein modulierend hemmender Einfluss der SST-IN auf die Ausbildung von GDPs in der CA1 *in vitro* gemessen werden. (Flossmann et al. 2019)

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Spontanaktivität der SST-Interneurone ebenso wie die GDP-Frequenz von der GABAergen Depolarisation abhängig sind. Dieser Befund deutet auf eine die Population der Pyramidenzellen überschreitende, allgemeinere Rolle der GABAergen Depolarisation bei der Gestaltung und Synchronisation neuronaler Aktivität in der neonatalen CA1-Region hin. Die hier durchgeführten Experimente liefern einen Beleg dafür, dass depolarisierendes GABA einen großen Einfluss auf die Spontanaktivität der SST-IN nimmt und ergänzen somit die im Abschnitt 5.3.3 diskutierten Ergebnisse. Allerdings bleibt der genaue Mechanismus, der dies bedingt, ungeklärt. In diesem Zusammenhang ergibt sich folgende Frage, welche in weiteren experimentellen Ansätzen geklärt werden könnte: Warum sind die Spontanaktivität der SST-IN und die fGDP-Frequenz gleichzeitig abhängig von der GABAergen Depolarisation?

## 6 Schlussfolgerungen

GDPs zeigten sich in der Kalziumbildung mit verschiedenen Indikatoren (OGB1-AM, GCaMP3- und GCaMP6s-Expression jeweils unter dem Emx1-Promotor) als ein robustes Netzwerkphänomen. Auch die in der Literatur beschriebene charakteristische Abhängigkeit von der NKCC1-vermittelten GABAergen Depolarisation konnte in Experimenten nach der Applikation von Bumetanid gezeigt werden: Die Frequenz der nachgewiesenen GDPs halbierte sich im Mittel signifikant. Auffällig war der Befund, dass in GC6s<sup>Emx1</sup>-gefärbten Schnitten mit  $1,90 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  im Mittel ca. doppelt so viele GDPs messbar waren im Vergleich zu jenen, welche mit OGB1-AM ( $0,86 \pm 0,09 \text{ min}^{-1}$ ) gefärbt wurden. Dieser Befund ist eher auf eine limitierte Vergleichbarkeit von FSN zwischen den Indikatoren (aufgrund der Zellzahl im FoV) zurückzuführen, als auf tatsächliche Indikatoreigenschaften oder biologische Effekte. FSN findet jeweils mit einem unterschiedlichen Ausmaß an Synchronisation statt, wobei nur solche Ereignisse als GDPs gewertet wurden, bei denen mindestens 50% der Zellen in der Messregion aktiv waren. In den jeweiligen Färbungen mit OGB1-AM waren allerdings deutlich mehr Zellen gleichzeitig im FoV messbar als in den Hirnschnitten, in denen Pyramidenzellen mit GCaMP6s gefärbt wurden. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass GCaMP6s (exprimiert unter dem Emx1- und SST-Promotor) ein sehr vielversprechender und hochauflösender Kalzium-Indikator für die selektive, jedoch indirekte Messung der neuronalen Aktivität von neonatalen Pyramidenzellen und Somatostatin-positiven Interneuronen in der CA1 *in vitro* ist.

Zur Validierung der extrazellulären Feldpotentialableitungen wurde das GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell verwendet, da es hochspezifisch für die Aktivität der Pyramidenzellen und deren Synchronisation im Rahmen der GDPs ist. Unter verschiedenen getesteten Ableitelektroden und -konfigurationen stellten sich Messungen mit Platin-Wolfram-Elektroden als besonders geeignet heraus, um GDPs zu detektieren. GDPs wurden als Negativierungen des lokalen Feldpotentials ( $-44,2 \pm 6,3 \text{ } \mu\text{V}$ ), sogenannte „Feld-Giant-Depolarizing-Potentials“ (fGDPs), mit einer Frequenz von  $1,36 \pm 0,24 \text{ min}^{-1}$  gemessen. Diese Messmethode wies eine sehr hohe Spezifität (ca. 96%) bei eingeschränkter Sensitivität (ca. 62%) auf. Hierbei ist zu beachten, dass Messungen in der Kalziumbildung im GC6s<sup>Emx1</sup>-Modell als Referenz zur Einschätzung der extrazellulären Feldpotentialableitung verwendet wurden. Interessanterweise stellten sich fGDPs in der Kalziumbildung als synchrone Netzwerkereignisse mit einer besonders hohen Zellbeteiligung und Amplitude der Kalziumtransienten der teilnehmenden Zellen heraus.

In den darauffolgenden Experimenten wurde zelltypspezifisch die einzelzelluläre Aktivität der SST-IN und Pyramidenzellen in der Kalziumbildung mit GCaMP6s gemessen, während GDPs in der CA1 durch parallele extrazelluläre Feldpotentialableitungen detektiert wurden.

Im Rahmen dieser Messungen ergaben sich folgende Befunde: In der neonatalen CA1 waren Somatostatin-positive Interneurone spontan aktiv ( $2,47 \pm 0,31 \text{ min}^{-1}$ ) und nahmen an früher synchroner Netzwerkaktivität sehr häufig teil ( $82,69 \pm 4,18\%$ ). Bemerkenswerterweise unterscheidet sich das Ausmaß ihrer Partizipation an GDPs nicht signifikant von jenem der Pyramidenzellen ( $91,85 \pm 2,37\%$ ), der tragenden Population dieser massiven Netzwerke ereignisse. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Somatostatin-positiven Interneurone ein hohes Ausmaß an Korrelation ( $\rho = 0,37 \pm 0,05$ ) in der Aktivität untereinander hatten, welches sich im Ausmaß nicht signifikant von dem der Pyramidenzellen ( $\rho = 0,40 \pm 0,02$ ) unterschied. Die Applikation von Bumetanid reduzierte parallel sowohl die mediane Aktivität der Somatostatin-positiven Interneurone ( $-1,78 \text{ min}^{-1}$ ) als auch die Frequenz der GDPs ( $-1,11 \pm 0,27 \text{ min}^{-1}$ ). Zusätzlich zeigte sich in den Messungen des zeitlichen Bezugs der Aktivität der Somatostatin-positiven Interneurone zu den GDPs, dass ein kleiner Teil dieser Nervenzellen vor den GDPs aktiv war, während ein Großteil erst nachfolgend Kalziumtransienten aufwies. Dieser Befund stellt aufgrund der methodischen Limitationen jedoch allenfalls einen Hinweis auf die Existenz von sogenannten *Hub*-Neuronen dar. Zusammengenommen lässt sich aus diesen Befunden schließen, dass Somatostatin-positive Interneurone in der neonatalen CA1 in einem relevanten Ausmaß an GDPs beteiligt sind. Darüber hinaus konnte eine ausgeprägte parallele Abhängigkeit der Spontanaktivität der SST-IN von der GABAergen Depolarisation gemessen werden. Die korrelativen Befunde dieser Arbeit ergänzen somit die in der Literatur beschriebenen Befunde, dass Interneurone mit entwicklungsgeschichtlichem Ursprung in der MGE, zu denen die Population der SST-IN gehört, die Netzwerkdynamik in der CA1 maßgeblich beeinflussen können. (Wester und McBain 2016) Der eindeutige Nachweis einer speziellen kausalen Beteiligung der SST-IN bei der Generierung von GDPs in der CA1 *in vitro* ist durch die Kombination der Befunde dieser Arbeit mit weiteren experimentellen Ansätzen (optogenetische Manipulation und *Patch-Clamp*-Ableitungen der SST-IN sowie Kalziumbildgebung unter Verwendung von OGB1-AM) publiziert worden. (Flossmann et al. 2019) Im Rahmen dieser Arbeit bleibt die Rolle weiterer Subtypen GABAerger Interneurone (wie beispielsweise der PV<sup>+</sup>-Interneurone) und deren Vorläuferzellen sowie interregionaler Einflüsse allerdings ungeklärt. Den daraus resultierenden Fragestellungen konnte aufgrund des hohen methodischen Aufwands, welcher mit der Berücksichtigung dieser Störfaktoren einherginge, im Rahmen dieser Arbeit nicht Rechnung getragen werden. Schließlich bilden die Befunde aus dieser Arbeit eine vielversprechende Grundlage für weitere Untersuchungen zur Generierung von GDPs und der damit verbundenen aktivitätsabhängigen Reifung in der CA1 der hippocampalen Formation *in vivo*. (Murata und Colonnese 2020)



## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ackman JB, Burbridge TJ, Crair MC. 2012. Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, 490 (7419):219-225.
- Ali AB, Thomson AM. 1998. Facilitating pyramid to horizontal oriens-alveus interneurone inputs: dual intracellular recordings in slices of rat hippocampus. *J Physiol*, 507 ( Pt 1):185-199.
- Allene C, Picardo MA, Becq H, Miyoshi G, Fishell G, Cossart R. 2012. Dynamic changes in interneuron morphophysiological properties mark the maturation of hippocampal network activity. *J Neurosci*, 32 (19):6688-6698.
- Allene C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R. 2008. Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci*, 28 (48):12851-12863.
- Anticevic A, Murray JD. 2017. Rebalancing Altered Computations: Considering the Role of Neural Excitation and Inhibition Balance Across the Psychiatric Spectrum. *Biol Psychiatry*, 81 (10):816-817.
- Arichi T, Whitehead K, Barone G, Pressler R, Padormo F, Edwards AD, Fabrizi L. 2017. Localization of spontaneous bursting neuronal activity in the preterm human brain with simultaneous EEG-fMRI. *Elife*, 6.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 9 (7):557-568.
- Bandler RC, Mayer C, Fishell G. 2017. Cortical interneuron specification: the juncture of genes, time and geometry. *Curr Opin Neurobiol*, 42:17-24.
- Barabasi AL, Albert R. 1999. Emergence of scaling in random networks. *Science*, 286 (5439):509-512.
- Barger Z, Easton CR, Neuzil KE, Moody WJ. 2016. Early network activity propagates bidirectionally between hippocampus and cortex. *Dev Neurobiol*, 76 (6):661-672.
- Bedard C, Kroger H, Destexhe A. 2004. Modeling extracellular field potentials and the frequency-filtering properties of extracellular space. *Biophys J*, 86 (3):1829-1842.
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3 (9):728-739.
- Ben-Ari Y. 2008. Neuro-archaeology: pre-symptomatic architecture and signature of neurological disorders. *Trends Neurosci*, 31 (12):626-636.
- Ben-Ari Y. 2013a. The developing cortex. *Handb Clin Neurol*, 111:417-426.
- Ben-Ari Y. 2013b. Neuropaediatric and neuroarchaeology: understanding development to correct brain disorders. *Acta Paediatr*, 102 (4):331-334.
- Ben-Ari Y. 2017. NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. *Trends in Neurosciences*, 40 (9):536-554.
- Ben-Ari Y, Spitzer NC. 2010. Phenotypic checkpoints regulate neuronal development. *Trends Neurosci*, 33 (11):485-492.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol*, 416:303-325.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Represa A, Gozlan H. 2004. Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci*, 27 (7):422-427.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*, 87 (4):1215-1284.
- Ben-Ari Y, Woodin MA, Sernagor E, Cancedda L, Vinay L, Rivera C, Legendre P, Luhmann HJ, Bordey A, Wenner P, Fukuda A, van den Pol AN, Gaiarsa JL, Cherubini E. 2012. Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci*, 6:35.

- Bezaire MJ, Soltesz I. 2013. Quantitative assessment of CA1 local circuits: knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus*, 23 (9):751-785.
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. 2009. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, 61 (6):820-838.
- Blankenship AG, Feller MB. 2010. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci*, 11 (1):18-29.
- Bolea S, Sanchez-Andres JV, Huang X, Wu JY. 2006. Initiation and propagation of neuronal coactivation in the developing hippocampus. *J Neurophysiol*, 95 (1):552-561.
- Bolea S, Avignone E, Berretta N, Sanchez-Andres JV, Cherubini E. 1999. Glutamate controls the induction of GABA-mediated giant depolarizing potentials through AMPA receptors in neonatal rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*, 81 (5):2095-2102.
- Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. 2009. GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science*, 326 (5958):1419-1424.
- Bortone D, Polleux F. 2009. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*, 62 (1):53-71.
- Boulton CL, v. Haebler D, Heinemann U. 1992. Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus*, 2 (2):99-106.
- Bregestovski P, Bernard C. 2012. Excitatory GABA: How a Correct Observation May Turn Out to be an Experimental Artifact. *Front Pharmacol*, 3:65.
- Brockmann MD, Poschel B, Cichon N, Hanganu-Opatz IL. 2011. Coupled oscillations mediate directed interactions between prefrontal cortex and hippocampus of the neonatal rat. *Neuron*, 71 (2):332-347.
- Buzsaki G. 1986. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res*, 398 (2):242-252.
- Buzsaki G, Draguhn A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304 (5679):1926-1929.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. 2012. The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci*, 13 (6):407-420.
- Chan C-H, Godinho LN, Thomaidou D, Tan S-S, Gulisano M, Parnavelas JG. 2001. Emx1 is a Marker for Pyramidal Neurons of the Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, 11 (12):1191-1198.
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499 (7458):295-300.
- Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. 2007. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 28 (5):931-937.
- Clements JD, Bekkers JM. 1997. Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template. *Biophys J*, 73 (1):220-229.
- Conchello JA, Lichtman JW. 2005. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*, 2 (12):920-931.
- Cossart R. 2014. Operational hub cells: a morpho-physiologically diverse class of GABAergic neurons united by a common function. *Curr Opin Neurobiol*, 26:51-56.
- Courchesne E, Gazestani VH, Lewis NE. 2020. Prenatal Origins of ASD: The When, What, and How of ASD Development. *Trends in Neurosciences*, 43 (5):326-342.
- Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, Morgan J. 2007. Mapping Early Brain Development in Autism. *Neuron*, 56 (2):399-413.
- Couzin-Frankel J. 2019. Epilepsy's next frontier. *Science*, 366 (6471):1300.
- Crepel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. 2007. A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron*, 54 (1):105-120.
- Danglot L, Triller A, Marty S. 2006. The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus*, 16 (12):1032-1060.
- De Koninck Y. 2007. Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol*, 7 (1):93-99.

- De Marco Garcia NV, Karayannis T, Fishell G. 2011. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature*, 472 (7343):351-355.
- Dehorter N, Vinay L, Hammond C, Ben-Ari Y. 2012. Timing of developmental sequences in different brain structures: physiological and pathological implications. *Eur J Neurosci*, 35 (12):1846-1856.
- Di Cristo G. 2007. Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clin Genet*, 72 (1):1-8.
- Duan ZRS, Che A, Chu P, Modol L, Bollmann Y, Babij R, Fetcho RN, Otsuka T, Fuccillo MV, Liston C, Pisapia DJ, Cossart R, De Marco García NV. 2020. GABAergic Restriction of Network Dynamics Regulates Interneuron Survival in the Developing Cortex. *Neuron*, 105 (1):75-92.e75.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med*, 11 (11):1205-1213.
- Egorov AV, Draguhn A. 2013. Development of coherent neuronal activity patterns in mammalian cortical networks: common principles and local heterogeneity. *Mech Dev*, 130 (6-8):412-423.
- Fishell G, Kepecs A. 2019. Interneuron Types as Attractors and Controllers. *Annual review of neuroscience*, 43.
- Flossmann T, Kaas T, Rahmati V, Kiebel SJ, Witte OW, Holthoff K, Kirmse K. 2019. Somatostatin Interneurons Promote Neuronal Synchrony in the Neonatal Hippocampus. *Cell Rep*, 26 (12):3173-3182.e3175.
- Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6 (4):347-470.
- Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H. 1998. Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by GABAA receptor activation and reduction in Cl<sup>-</sup> gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol*, 79 (1):439-446.
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A. 2000. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci*, 3 (5):452-459.
- Gatto C, Broadie K. 2010. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2 (4).
- Grienberger C, Konnerth A. 2012. Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 73 (5):862-885.
- Gulyás AI, Hajos N, Katona I, Freund TF. 2003. Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci*, 17 (9):1861-1872.
- Hanganu-Opatz IL. 2010. Between molecules and experience: role of early patterns of coordinated activity for the development of cortical maps and sensory abilities. *Brain Res Rev*, 64 (1):160-176.
- Hanse E, Seth H, Riebe I. 2013. AMPA-silent synapses in brain development and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 14 (12):839-850.
- Herreras O. 2016. Local Field Potentials: Myths and Misunderstandings. *Front Neural Circuits*, 10:101.
- Huang Y, Williams JC, Johnson SM. 2012. Brain slice on a chip: opportunities and challenges of applying microfluidic technology to intact tissues. *Lab Chip*, 12 (12):2103-2117.
- Huang ZJ, Paul A. 2019. The diversity of GABAergic neurons and neural communication elements. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. 2001. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, 30 (2):515-524.
- Jinno S. 2009. Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front Neuroanat*, 3:13.
- Kaila K. 1994. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 42 (4):489-537.
- Kaila K, Voipio J. 1987. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature*, 330 (6144):163-165.
- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 15 (10):637-654.

- Kang E, Song J, Lin Y, Park J, Lee JH, Hussani Q, Gu Y, Ge S, Li W, Hsu K-s, Berninger B, Christian KM, Song H, Ming G-l. 2019. Interplay between a Mental Disorder Risk Gene and Developmental Polarity Switch of GABA Action Leads to Excitation-Inhibition Imbalance. *Cell Reports*, 28 (6):1419-1428.e1413.
- Kepecs A, Fishell G. 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505 (7483):318-326.
- Khalilov I, Minlebaev M, Mukhtarov M, Khazipov R. 2015. Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. *J Neurosci*, 35 (37):12635-12642.
- Khazipov R. 2016. GABAergic Synchronization in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6 (2):a022764.
- Khazipov R, Luhmann HJ. 2006. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci*, 29 (7):414-418.
- Khazipov R, Valeeva G, Khalilov I. 2015. Depolarizing GABA and developmental epilepsies. *CNS Neurosci Ther*, 21 (2):83-91.
- Khazipov R, Leinekugel X, Khalilov I, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. 1997. Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *J Physiol*, 498 ( Pt 3):763-772.
- Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. 2004. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 19 (3):590-600.
- Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben-Ari Y. 2001. Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci*, 21 (24):9770-9781.
- Kilb W. 2012. Development of the GABAergic system from birth to adolescence. *Neuroscientist*, 18 (6):613-630.
- Kilb W, Kirischuk S, Luhmann HJ. 2011. Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. *Eur J Neurosci*, 34 (10):1677-1686.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K. 2010. GABA depolarizes immature neocortical neurons in the presence of the ketone body ss-hydroxybutyrate. *J Neurosci*, 30 (47):16002-16007.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K. 2011. GABAergic depolarization during early cortical development and implications for anticonvulsive therapy in neonates. *Epilepsia*, 52 (9):1532-1543.
- Kirmse K, Hübner CA, Isbrandt D, Witte OW, Holthoff K. 2017. GABAergic Transmission during Brain Development: Multiple Effects at Multiple Stages. *The Neuroscientist*, 24 (1):36-53.
- Kirmse K, Hubner CA, Isbrandt D, Witte OW, Holthoff K. 2018. GABAergic Transmission during Brain Development: Multiple Effects at Multiple Stages. *Neuroscientist*, 24 (1):36-53.
- Kirmse K, Kummer M, Kovalchuk Y, Witte OW, Garaschuk O, Holthoff K. 2015. GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nat Commun*, 6:7750.
- Klausberger T, Somogyi P. 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321 (5885):53-57.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS. 1997. An interface holding chamber for anatomical and physiological studies of living brain slices. *J Neurosci Methods*, 75 (1):55-58.
- Lamsa K, Palva JM, Ruusuvuori E, Kaila K, Taira T. 2000. Synaptic GABA(A) activation inhibits AMPA-kainate receptor-mediated bursting in the newborn (P0-P2) rat hippocampus. *J Neurophysiol*, 83 (1):359-366.
- Leinekugel X, Tseeb V, Ben-Ari Y, Bregestovski P. 1995. Synaptic GABA activation induces Ca<sup>2+</sup> rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J Physiol*, 487 ( Pt 2):319-329.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. 1997. Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron*, 18 (2):243-255.
- Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsaki G. 2002. Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science*, 296 (5575):2049-2052.

- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsaki G. 1994. The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*, 339 (2):181-208.
- Lim L, Mi D, Llorca A, Marin O. 2018. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*, 100 (2):294-313.
- Logothetis NK. 2008. What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, 453 (7197):869-878.
- Lykke K, Töllner K, Feit PW, Erker T, MacAulay N, Löscher W. 2016. The search for NKCC1-selective drugs for the treatment of epilepsy: Structure–function relationship of bumetanide and various bumetanide derivatives in inhibiting the human cation-chloride cotransporter NKCC1A. *Epilepsy & Behavior*, 59:42-49.
- Marguet SL, Le-Schulte VT, Merseburg A, Neu A, Eichler R, Jakovcevski I, Ivanov A, Hanganu-Opatz IL, Bernard C, Morellini F, Isbrandt D. 2015. Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nat Med*, 21 (12):1436-1444.
- Marin O. 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 13 (2):107-120.
- Marín O. 2016. Developmental timing and critical windows for the treatment of psychiatric disorders. *Nature Medicine*, 22 (11):1229-1238.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*, 5 (10):793-807.
- McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA. 1994. Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci*, 14 (7):4433-4445.
- Menendez de la Prida L, Bolea S, Sanchez-Andres JV. 1998. Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus. *Eur J Neurosci*, 10 (3):899-906.
- Modol L, Sousa VH, Malvache A, Tressard T, Baude A, Cossart R. 2017. Spatial Embryonic Origin Delineates GABAergic Hub Neurons Driving Network Dynamics in the Developing Entorhinal Cortex. *Cereb Cortex*, 27 (9):4649-4661.
- Mohs EJ, Blumberg MS. 2008. Synchronous bursts of neuronal activity in the developing hippocampus: modulation by active sleep and association with emerging gamma and theta rhythms. *J Neurosci*, 28 (40):10134-10144.
- Morgan RJ, Soltesz I. 2008. Nonrandom connectivity of the epileptic dentate gyrus predicts a major role for neuronal hubs in seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (16):6179-6184.
- Mullins C, Fishell G, Tsien Richard W. 2016. Unifying Views of Autism Spectrum Disorders: A Consideration of Autoregulatory Feedback Loops. *Neuron*, 89 (6):1131-1156.
- Murata Y, Colonnese MT. 2020. GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Science Advances*, 6 (24):eaba1430.
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K. 2001. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 19 (2):137-141.
- Nelson MJ, Pouget P, Nilsen EA, Patten CD, Schall JD. 2008. Review of signal distortion through metal microelectrode recording circuits and filters. *J Neurosci Methods*, 169 (1):141-157.
- Oreopoulos J, Berman R, Browne M. 2014. Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. *Methods Cell Biol*, 123:153-175.
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, 3 (9):715-727.
- Paterno R, Casalia M, Baraban SC. 2020. Interneuron deficits in neurodevelopmental disorders: Implications for disease pathology and interneuron-based therapies. *European Journal of Paediatric Neurology*, 24:81-88.
- Pavlov I, Kaila K, Kullmann DM, Miles R. 2013. Cortical inhibition, pH and cell excitability in epilepsy: what are optimal targets for antiepileptic interventions? *J Physiol*, 591 (4):765-774.
- Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ. 2017. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev*, 97 (4):1619-1747.
- Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y, Hentschke M, Rune GM, Jentsch TJ, Hubner CA. 2009. NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci*, 29 (11):3419-3430.

- Picardo MA, Guigue P, Bonifazi P, Batista-Brito R, Allene C, Ribas A, Fishell G, Baude A, Cossart R. 2011. Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron*, 71 (4):695-709.
- Rahmati V, Kirmse K, Holthoff K, Kiebel SJ. 2018. Ultra-fast accurate reconstruction of spiking activity from calcium imaging data. *J Neurophysiol*, 119 (5):1863-1878.
- Rahmati V, Kirmse K, Marković D, Holthoff K, Kiebel SJ. 2016. Inferring Neuronal Dynamics from Calcium Imaging Data Using Biophysical Models and Bayesian Inference. *PLOS Computational Biology*, 12 (2):e1004736.
- Rahmati V, Kirmse K, Holthoff K, Schwabe L, Kiebel SJ. 2017. Developmental Emergence of Sparse Coding: A Dynamic Systems Approach. *Sci Rep*, 7 (1):13015.
- Ramamoorthi K, Lin Y. 2011. The contribution of GABAergic dysfunction to neurodevelopmental disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 17 (8):452-462.
- Reitboeck HJ. 1983. Fiber microelectrodes for electrophysiological recordings. *J Neurosci Methods*, 8 (3):249-262.
- Riebe I, Hanse E. 2012. Development of synaptic connectivity onto interneurons in stratum radiatum in the CA1 region of the rat hippocampus. *BMC Neurosci*, 13:14.
- Rivnay J, Wang H, Fenno L, Deisseroth K, Malliaras GG. 2017. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Science Advances*, 3 (6):e1601649.
- Robinson DA. 1968. The Electrical Properties of Metal Microelectrodes Proceedings of the IEEE, 56:1065-1071.
- Rochefort NL, Garaschuk O, Milos RI, Narushima M, Marandi N, Pichler B, Kovalchuk Y, Konnerth A. 2009. Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (35):15049-15054.
- Sanes JR, Zipursky SL. 2020. Synaptic Specificity, Recognition Molecules, and Assembly of Neural Circuits. *Cell*, 181 (3):536-556.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107:1-16.
- Seress L, Frotscher M, Ribak CE. 1989. Local circuit neurons in both the dentate gyrus and Ammon's horn establish synaptic connections with principal neurons in five day old rats: a morphological basis for inhibition in early development. *Exp Brain Res*, 78 (1):1-9.
- Shi Y, Ikrar T, Olivas ND, Xu X. 2014. Bidirectional global spontaneous network activity precedes the canonical unidirectional circuit organization in the developing hippocampus. *J Comp Neurol*, 522 (9):2191-2208.
- Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, Hayashi S, Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F, Takayama J, Onami S, Nakayama H, Kosugi Y, Watanabe TM, Fujita K, Mimori-Kiyosue Y. 2013. Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (9):3399.
- Silbereis John C, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. 2016. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89 (2):248-268.
- Sipila ST, Kaila K. 2008. GABAergic control of CA3-driven network events in the developing hippocampus. *Results Probl Cell Differ*, 44:99-121.
- Sipila ST, Huttu K, Soltesz I, Voipio J, Kaila K. 2005. Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J Neurosci*, 25 (22):5280-5289.
- Sipila ST, Schuchmann S, Voipio J, Yamada J, Kaila K. 2006. The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol*, 573 (Pt 3):765-773.
- Sohal VS, Rubenstein JLR. 2019. Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 24 (9):1248-1257.
- Spitzer NC. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444 (7120):707-712.
- Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A. 2003. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12):7319-7324.

- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ. 2011. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*, 71 (6):995-1013.
- Tatti R, Haley MS, Swanson OK, Tselha T, Maffei A. 2017. Neurophysiology and Regulation of the Balance Between Excitation and Inhibition in Neocortical Circuits. *Biol Psychiatry*, 81 (10):821-831.
- Tian L, Hires SA, Looger LL. 2012. Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012 (6):647-656.
- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL. 2009. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods*, 6 (12):875-881.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B. 2016. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, 91 (2):260-292.
- Tricoire L, Pelkey KA, Erkkila BE, Jeffries BW, Yuan X, McBain CJ. 2011. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci*, 31 (30):10948-10970.
- Tuncdemir SN, Wamsley B, Stam FJ, Osakada F, Goulding M, Callaway EM, Rudy B, Fishell G. 2016. Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. *Neuron*, 89 (3):521-535.
- Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L. 1999. The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci*, 19 (23):10372-10382.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hubner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R. 2006. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science*, 314 (5806):1788-1792.
- Tyzio R, Nardou R, Ferrari DC, Tsintsadze T, Shahrokhi A, Eftekhari S, Khalilov I, Tsintsadze V, Brouchoud C, Chazal G, Lemonnier E, Lozovaya N, Burnashev N, Ben-Ari Y. 2014. Oxytocin-Mediated GABA Inhibition During Delivery Attenuates Autism Pathogenesis in Rodent Offspring. *Science*, 343 (6171):675.
- Tyzio R, Allene C, Nardou R, Picardo MA, Yamamoto S, Sivakumaran S, Caiati MD, Rheims S, Minlebaev M, Milh M, Ferre P, Khazipov R, Romette JL, Lorquin J, Cossart R, Khalilov I, Nehlig A, Cherubini E, Ben-Ari Y. 2011. Depolarizing actions of GABA in immature neurons depend neither on ketone bodies nor on pyruvate. *J Neurosci*, 31 (1):34-45.
- Uhlhaas PJ, Singer W. 2010. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 11 (2):100-113.
- Uhlhaas PJ, Roux F, Rodriguez E, Rotarska-Jagiela A, Singer W. 2010. Neural synchrony and the development of cortical networks. *Trends Cogn Sci*, 14 (2):72-80.
- Unichenko P, Yang JW, Luhmann HJ, Kirischuk S. 2015. Glutamatergic system controls synchronization of spontaneous neuronal activity in the murine neonatal entorhinal cortex. *Pflugers Arch*, 467 (7):1565-1575.
- Urban-Ciecko J, Barth AL. 2016. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nat Rev Neurosci*, 17 (7):401-409.
- van den Pol AN, Obrietan K, Chen G. 1996. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J Neurosci*, 16 (13):4283-4292.
- Vanhatalo S, Kaila K. 2006. Development of neonatal EEG activity: From phenomenology to physiology. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 11 (6):471-478.
- Vanhatalo S, Palva JM, Andersson S, Rivera C, Voipio J, Kaila K. 2005. Slow endogenous activity transients and developmental expression of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 in the immature human cortex. *Eur J Neurosci*, 22 (11):2799-2804.
- Veit J, Hakim R, Jadi MP, Sejnowski TJ, Adesnik H. 2017. Cortical gamma band synchronization through somatostatin interneurons. *Nat Neurosci*, 20 (7):951-959.

- Villette V, Guigue P, Picardo MA, Sousa VH, Leprince E, Lachamp P, Malvache A, Tressard T, Cossart R, Baude A. 2016. Development of early-born gamma-Aminobutyric acid hub neurons in mouse hippocampus from embryogenesis to adulthood. *J Comp Neurol*, 524 (12):2440-2461.
- Voigt T, Opitz T, de Lima AD. 2005. Activation of Early Silent Synapses by Spontaneous Synchronous Network Activity Limits the Range of Neocortical Connections. *The Journal of Neuroscience*, 25 (18):4605-4615.
- Wang CZ, Ma J, Xu YQ, Jiang SN, Chen TQ, Yuan ZL, Mao XY, Zhang SQ, Liu LY, Fu Y, Yu YC. 2019. Early-generated interneurons regulate neuronal circuit formation during early postnatal development. *Elife*, 8.
- Wang E, Babbey CM, Dunn KW. 2005. Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems. *J Microsc*, 218 (Pt 2):148-159.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korfi I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420 (6915):520-562.
- West AE, Greenberg ME. 2011. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3 (6).
- Wester JC, McBain CJ. 2016. Interneurons Differentially Contribute to Spontaneous Network Activity in the Developing Hippocampus Dependent on Their Embryonic Lineage. *J Neurosci*, 36 (9):2646-2662.
- Wolbarsht ML, MacNichol EF, Wagner HG. 1960. Glass Insulated Platinum Microelectrode. *Science*, 132 (3436):1309-1310.
- Xiong G, Metheny H, Johnson BN, Cohen AS. 2017. A Comparison of Different Slicing Planes in Preservation of Major Hippocampal Pathway Fibers in the Mouse. *Frontiers in neuroanatomy*, 11:107-107.
- Xu HP, Furman M, Mineur YS, Chen H, King SL, Zenisek D, Zhou ZJ, Butts DA, Tian N, Picciotto MR, Crair MC. 2011. An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. *Neuron*, 70 (6):1115-1127.



- Yang JW, Hanganu-Opatz IL, Sun JJ, Luhmann HJ. 2009. Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J Neurosci*, 29 (28):9011-9025.
- Yap EL, Greenberg ME. 2018. Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron*, 100 (2):330-348.
- Yavorska I, Wehr M. 2016. Somatostatin-Expressing Inhibitory Interneurons in Cortical Circuits. *Front Neural Circuits*, 10:76.
- Yuste R, Katz LC. 1991. Control of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron*, 6 (3):333-344.
- Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lonnerberg P, La Manno G, Jureus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S. 2015. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*, 347 (6226):1138-1142.
- Zhong S, Du Y, Kiyoshi CM, Ma B, Alford CC, Wang Q, Yang Y, Liu X, Zhou M. 2016. Electrophysiological behavior of neonatal astrocytes in hippocampal stratum radiatum. *Mol Brain*, 9:34.

## Anhang

### Geräte, Software und Chemikalien

Gerät/Software	Firma
AOTF	Gooch und Housego
Badcontroller V	Luigs und Neumann
CFI75 LWD 16x/0.80 W	Nikon
Borosilikat Glaskapillaren GB150G-8P	Science Products
CSU10	Yokogawa
Digidata 1550A	Axon CNS Molecular Devices
Hand wheel manipulator	Luigs und Neumann
Microscope Eclipse FN1	Nikon
Mikroelektroden für andere Manipulatoren	Thomas Recordings
AN000060 (EF8025, Typ D)	
Mikropipetten-Zuggerät (Puller) P-97	Sutter Instruments Company
Mikrotom VT 1200S	Leica
Schlauchpumpe	Ismatec Reglo
pH-Meter 765	Knick
Picospritzer II	Parker
RazorEdge LP 488 RE	AHF
Rolera XR	QImaging
Sapphire CDRH LP	Coherent
Stereomikroskop SOM-82	Kaps
Tunglass-1 W1011-20 microelectrodes	Kation Scientific
Verstärker MultiClamp 700B	Axon CNS Molecular Devices
Verstärker Headstage CV-7B	Axon CNS Molecular Devices
Verstärker EXT-02F/2	npi electronics GmbH
Verstärker Headstage EXT-02F/2	npi electronics GmbH

Chemikalien	Firma
Bumetanid	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Carbogen	Linde
Cyanoacrylatkleber	UHU
DMSO	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Glucose	Carl Roth
HCl	Merck
Isofluran	Actavis
KCl	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Millipore
NaOH	Honeywell
OGB1-AM	Invitrogen
Pluronic F127	Sigma-Aldrich

## **Danksagung**

Ich möchte mich in erster Linie bei meinen lieben Eltern, Marianne und Stanislav Kaas, bedanken, die mich über all die Jahre emotional und finanziell auf meinem Bildungsweg unterstützt und mir Selbstvertrauen und Mut für meine akademische Laufbahn mit auf den Weg gegeben haben.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner liebevollen Lebenspartnerin, Bianca Tripps, die mich im gesamten Verlauf meines Studiums begleitet und besonders in den anstrengenden Phasen unterstützt hat. Vielen Dank für dein offenes Ohr, deine fortwährende Ermutigung und Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich zudem besonders bei Prof. Dr. Knut Holthoff für das Vertrauen in mich und das Dissertationsprojekt, die Bereitstellung aller Materialien und Ressourcen im Labor sowie die ständige Begleitung, die vielen anregenden Diskussionen und Ratschläge in allen Phasen des Promotionsprojektes. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank PD Dr. Knut Kirmse für die intensive Betreuung und Hilfe im Laufe des gesamten Dissertationsprojektes. Vielen Dank für die immens konstruktive Kritik, die vielen methodischen Ratschläge und Lehre statistischer Methoden und komplexerer Analyseverfahren. Was ich während dieser Zeit von ihm fachlich lernen konnte, ist von unschätzbarem Wert für mich. Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Dr. Tom Floßmann bedanken für die anregenden Diskussionen im Labor, das offene Ohr bei technisch-methodologischen Problemen und die intensive Betreuung und Einarbeitung in die experimentellen Methoden, besonders in der Anfangszeit des Projektes.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Otto Witte für die Bereitstellung der Infrastruktur der experimentellen Neurologie im Forschungszentrum Lobeda des Universitätsklinikums Jena. Darüber hinaus möchte ich auch dem *Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung* (IZKF) in Jena für die finanzielle Unterstützung während der experimentellen Arbeit im Labor vom Oktober 2016 bis September 2017 bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich auch der *Studienstiftung des Deutschen Volkes* für die finanzielle und ideelle Förderung während des gesamten Studiums.

Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch dem gesamten Team der AG BioImaging, darunter besonders Dr. Chuanqianq Zhang. Danken möchte ich auch Dr. Alexander Jörk und Niklas Langguth für die Unterstützung und die bereichernde Zusammenarbeit im Labor. Bei Ina Ingrisch bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Aufbereitungsmethoden zur Herstellung von Proben zur konfokalen Laserscanningmikroskopie.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen der Veröffentlichung nicht beigefügt.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff

PD Dr. med. Knut Kirmse

Dr. rer. nat. Tom Floßmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 06.07.2021

Ort, Datum