

---

**Zelltypspezifische funktionelle Konnektivität im primären  
somatosensorischen Kortex der Ratte**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Dirk Schubert**

aus Iserlohn

Düsseldorf 2003

---

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. J. Luhmann

Korreferent: Prof. Dr. W. -R. Schluë

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2003

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Vibrissensystem der Ratte.....	2
1.1.1	Anatomie des Vibrissensystems.....	2
1.1.2	Funktionelle Aspekte des Vibrissensystems.....	4
1.1.3	Der <i>Barrel</i> -Kortex: Ein Sonderfall somatosensorischer Kortizes?.....	5
1.2	Signalverarbeitung im <i>Barrel</i> -Kortex der Ratte.....	6
1.2.1	Kolumnäre Organisation des <i>Barrel</i> -Kortex.....	6
1.2.2	Zellulärer Aufbau funktioneller Kolumnen im <i>Barrel</i> -Kortex.....	6
1.2.3	Intrakolumnäre Verarbeitung sensorischer Signale .....	8
1.2.4	Transkolumnäre Integration sensorischer Information .....	10
1.2.5	Plastizität im primären somatosensorischen Kortex .....	11
1.3	Eingehende Betrachtung exzitatorischer Neuronen der Laminae IV und Vb.....	12
1.3.1	Exzitatorische Neuronen der Lamina IV .....	13
1.3.2	Exzitatorische Neuronen der Lamina Vb .....	14
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1	Präparation der <i>in vitro</i> Hirnschnittpräparate.....	18
3.2	Experimenteller Aufbau .....	19
3.3	Durchführung der Experimente .....	20
3.3.1	Elektrophysiologische Ableitung.....	20
3.3.2	Untersuchung photolyseinduzierter Aktivität.....	21
3.3.2.1	Direkte Auswirkungen der Photostimulation auf neuronale Aktivität.....	22
3.3.2.2	Auswirkungen von Caged-Glutamat auf neuronale Aktivität .....	22
3.3.2.3	Kalibrierung der Photostimulation.....	24
3.3.2.4	Kartierung von photolyseinduzierter Aktivität .....	24
3.4	Datenerfassung und Analyse .....	25
3.4.1	Histologische Aufbereitung und Rekonstruktion.....	25
3.4.2	Morphologische Klassifizierung .....	26
3.4.3	Elektrophysiologische Charakterisierung der Neuronen.....	27
3.4.4	Analyse photolyseinduzierter Aktivität .....	28
3.4.4.1	Unterscheidung von photolyseinduzierter neuronaler Aktivität und Spontanaktivität .....	28
3.4.4.2	Auswertung der topographischen Karten .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
4.1	Charakterisierung exzitatorischer Neuronen in Lamina IV und V.....	31
4.1.1	Bedornte Neuronen der Lamina IV .....	31
4.1.1.1	Morphologie bedornter Neuronen in Lamina IV .....	31
4.1.1.2	Elektrophysiologie bedornter Neuronen in Lamina IV .....	34
4.1.2	Pyramidenzellen der Lamina Vb.....	38
4.1.2.1	Morphologie der Pyramidenzellen der Lamina Vb.....	38
4.1.2.2	Elektrophysiologie der Pyramidenzellen der Lamina Vb .....	40
4.2	Eigenschaften photolyseinduzierter neuronaler Aktivität.....	44
4.2.1	Direkte photolyseinduzierte neuronale Aktivität .....	44

---

4.2.1.1	Eigenschaften direkter Aktivität .....	45
4.2.1.2	Reproduzierbarkeit photolyseinduzierter direkter Aktivität.....	47
4.2.2	Synaptisch vermittelte photolyseinduzierte Aktivität .....	48
4.2.2.1	Separation von synaptischer und direkter Aktivität .....	48
4.2.2.2	Aktionspotentialauslösung in normalem ACSF.....	50
4.2.2.3	Eigenschaften photolyseinduzierter synaptischer Aktivität .....	50
4.2.2.4	Photolyseinduzierte inhibitorische Eingänge.....	52
4.3	Topographie synaptischer Eingänge .....	52
4.3.1	Synaptische Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV.....	53
4.3.1.1	Intrakolumnäre synaptische Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV.....	53
4.3.1.2	Transkolumnäre synaptische Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV ...	55
4.3.1.3	Korrelieren funktionelle Konnektivität und Aktionspotential-Feuermuster?.....	56
4.3.2	Synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb.....	56
4.3.2.1	Intrakolumnäre synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb.....	57
4.3.2.2	Transkolumnäre synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb .....	59
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
5.1	Methodische Betrachtungen.....	62
5.2	Zelltypspezifische Eigenschaften bedorneter Neuronen in Lamina IV.....	65
5.2.1	Strukturelle und elektrophysiologische Eigenschaften von bedorneten Neuronen der Lamina IV .....	65
5.2.2	Funktionelle Konnektivität bedorneter Neuronen der Lamina IV.....	66
5.3	Analyse von Pyramidenzellen der Lamina Vb.....	70
5.3.1	Eigenschaften von Pyramidenzellen der Lamina Vb .....	70
5.3.2	Funktionelle Konnektivität von Pyramidenzellen der Lamina Vb .....	71
5.4	Funktionelle Bedeutung .....	73
5.4.1	Lokale und globale Signalverarbeitung in der Lamina IV .....	73
5.4.2	Filterung und Synchronisation von Signalen in Lamina Vb .....	74
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungen.....</b>	<b>92</b>

## 1 Einleitung

Im Gehirn der Säugetiere finden sich für alle Sinnesorgane entsprechende Repräsentationen in der Großhirnrinde, die sensorischen Kortizes. Die Verarbeitungsprozesse in den sensorischen Kortizes ermöglichen, dass Informationen, die aus der Umwelt durch die Rezeptoren der Sinnesorgane aufgenommen werden, nicht nur bewusst als komplexe Bilder, Gerüche, Geschmäcke, Geräusche und Formen wahrgenommen, sondern auch durch komplexe Interaktionen mit anderen Hirnarealen in die Planung verhaltensrelevanter motorischer Aktionen integriert sowie bei Lernen und Gedächtnisbildung herangezogen werden können. Die primären sensorischen Kortizes aller bisher untersuchten Säugetiere zeigen eine besondere Organisation: vermutlich um Verarbeitungsprozesse möglichst effizient durchzuführen und verhaltensrelevante Eigenschaften externer Ereignisse schnellstmöglich zu extrahieren (Diamond et al., 1999), werden die Rezeptoren der peripheren sensorischen Oberflächen im primären somatosensorischen, auditorischen sowie im visuellen Kortex in Form topographischer Karten abgebildet (Diamond et al., 1999; Kaas, 1997; Welker, 1971). Aufgrund dieser Organisation, bei der eine vergleichsweise einfache Korrelation zwischen kortikalen Eingängen und intrakortikaler Aktivität zu finden ist, eignen sich die primären sensorischen Areale besonders gut für die Untersuchung der grundlegenden Prinzipien intrakortikaler Signalverarbeitung im Säugetiergehirn.

Die Basis der intrakortikalen Signalverarbeitung ist die komplexe Interaktion zwischen einer Vielzahl erregender (exzitatorischer) und hemmender (inhibitorischer) Neuronenklassen, die wiederum strukturell und funktionell in kortikalen Modulen organisiert sind (Mountcastle, 1997). Die strukturelle Organisation dieser funktionellen Module folgt dabei in fast allen kortikalen Arealen einem vergleichbaren Grundbauplan. Horizontal, also parallel zur pialen Oberfläche, ist der Isokortex mehr oder weniger ausgeprägt in 6 Laminae untergliedert. Vertikal ist der Kortex wiederum funktionell, in einigen Fällen auch strukturell, in Kolumnen organisiert, die die 6 Laminae durchspannen. In den sensorischen Kortizes bedeutet dies, dass die Neuronen innerhalb einer Kolumne bevorzugt oder gar ausschließlich auf adäquate Sinnesreize der gleichen Submodalität reagieren (Hubel et al., 1977; Mountcastle, 1957). Wie allerdings die unterschiedlichen Neuronenklassen in diese Netzwerke funktioneller Module, bzw. der Laminae und Kolumnen, integriert sind, ist bisher weitgehend unbekannt. Dabei ist die Kenntnis über die zelltypspezifischen funktionellen Konnektivitäten, also darüber, von wo Neuronen

synaptische Eingänge erhalten und wohin sie ihre Signale weiterleiten, eine entscheidende Basis für ein grundlegendes Verständnis intrakortikaler Signalverarbeitung.

Ein etabliertes Modellsystem, in dem die strukturelle und funktionelle Organisation kortikaler Module besonders deutlich ist (Agmon und Connors, 1991; Welker, 1971; Woolsey und Van der Loos, 1970) und das sich daher besonders gut für die Untersuchung funktioneller Konnektivität einzelner Neuronenklassen eignet, ist der zum Vibrissensystem gehörige Teil des primären somatosensorischen Kortex der Ratte (S1 nach Paxinos und Watson, 1998; SSp nach Swanson, 1998; Abbildung 1).

## 1.1 Das Vibrissensystem der Ratte

Die großen Vibrissen, also die Schnurrhaare auf der Schnauze, dienen Ratten und anderen Nagetieren, höchstwahrscheinlich kompensatorisch für ihr relativ schwaches Sehvermögen, sowohl zur räumlichen Orientierung (Brecht et al., 1997; Vincent, 1912) als auch zur Identifizierung von Oberflächen und Gegenständen (Carvell und Simons, 1990). Das Vibrissensystem, dessen Rezeptoren in dem Sinus um die Haarwurzeln herum lokalisiert sind, ist dabei Teil des trigeminalen somatosensorischen Systems (Waite und Tracey, 1995), das noch eine Vielzahl weiterer Rezeptoren in der Haut des Gesichtes, der oralen und nasalen Mucosa und in tieferen Strukturen (subkutane Gewebe und Gesichtsmuskeln) umfasst. Diese Gesichtsrezeptoren des trigeminalen somatosensorischen Systems sind im primären somatosensorischen Kortex überproportional stark repräsentiert. Dort nimmt die Repräsentation des trigeminalen Systems etwa 66% der Repräsentation des gesamten somatosensorischen Systems ein (Welker, 1971), welche in Anlehnung an den „*Homunculus*“ beim Menschen „*Rattunculus*“ genannt wird (Riddle und Purves, 1995; Welker, 1971, Abbildung 2). Ein großer Teil der Gesichtsrepräsentation wird dabei wiederum der Repräsentation der großen Vibrissen zugeordnet. Die ausgedehnte kortikale Repräsentation dieser Vibrissen zeigt deutlich, dass das Vibrissensystem bei den nachtaktiven Nagetieren das wohl wichtigste Sinnessystem für die Wahrnehmung der Umwelt darstellt (Glassman, 1994).

### 1.1.1 Anatomie des Vibrissensystems

Die Besonderheit des Vibrissensystems ist, dass für jede Gesichtsvibrisse (Abbildung 2A) im Verhältnis 1 : 1 deutlich strukturelle Korrelate im kontralateralen primären somatosensorischen Kortex zu finden sind (Jones und Diamond, 1995; Welker, 1971; Woolsey

und Van der Loos, 1970, Abbildung 2D). Diese strukturellen Korrelate, die aus Ansammlungen von in sensorischen Kortizes typischen Körnerzellen in der *Lamina granularis* (Lamina IV) bestehen, werden aufgrund ihres fassartigen 3-dimensionalen Aussehens *Barrels* genannt (Welker und Woolsey, 1974; Woolsey und Van der Loos, 1970). Diese *Barrels* in der Lamina IV sind nicht nur nach histologischer Färbung, wie beispielsweise für Cytochromoxidase (Wong-Riley und Welt, 1980; Abbildung 2DI), sondern bereits im ungefärbten Vitalhirnschnitt (Agmon und Connors, 1991; Kötter et al., 1998; Abbildung 2D2) deutlich zu erkennen. *Barrels* stellen aber außer für die großen Vibrissen auch strukturelle Korrelate für andere Tasthaare im Bereich der Schnauze und der Pfoten dar (Waite und Tracey, 1995). Daher können bei den Ratten und bei anderen Nagetieren *Barrels* mit Ausnahme des Bereichs der Rumpfrepräsentation im gesamten primären somatosensorischen Kortex gefunden werden, weswegen dieser allgemein als der *Barrel-Kortex* bezeichnet wird. Dabei werden zwei unterschiedliche *Barrel-Felder* unterschieden: zum einen das anterolaterale *Barrelfield* (Welker, 1976), zum anderen das hier relevante posteromediale *Barrelfield* (Woolsey und Van der Loos, 1970). In letzterem finden sich die Repräsentationen der großen Vibrissen, bei denen, anders als bei Repräsentationen im anterolateralen *Barrelfield*, Vibrisse und *Barrel* im Verhältnis 1 : 1 und in einer topographisch korrekten Anordnung miteinander assoziiert sind. Topographisch korrekt bedeutet, dass hier die einzelnen *Barrels* analog zur Vibrissenmatrix auf der Schnauze der Ratte mit ihren 5 horizontalen Reihen (dorsal-ventral: A-E) und 5-7 vertikalen Bögen (caudal-rostral; Abbildung 2A) angeordnet sind.

Eine topographisch korrekte Repräsentation der räumlichen Organisation der Vibrissenmatrix findet sich nicht erst im Vibrissenfeld des *Barrel-Kortex*. Auch in den dem Kortex vorgeschalteten Relaisstationen im Gehirn finden sich den *Barrels* ähnliche Strukturen, die die räumliche Organisation der Gesichtsvibrissen wiedergeben (Waite und Tracey, 1995; Abbildung 2DI). Bei dieser als „*labeled-line*“ bezeichneten Verschaltung wird die Information über in Serie geschaltete Axone mit hoher topographischer Präzision von der Peripherie bis zum Kortex geleitet.

Dabei werden die Berührungen einer Vibrisse zuerst von Mechanorezeptoren an ihren Wurzeln innerhalb der Vibrissenfollikel registriert (Rice et al., 1993). Von dort gelangen die sensorischen Informationen über den infraorbitalen Zweig des *Nervus trigeminus* (V) zuerst vor allem in den *Nucleus principalis nervi trigemini* (PrV) des Hirnstamms. Im PrV finden sich als „*Barrelettes*“ bekannte Neuronenansammlungen, die

topographisch die räumliche Anordnung der Vibrissen repräsentieren (Jones und Diamond, 1995; Ma, 1991, Abbildung 1B). Von dort gelangt die sensorische Information in den Thalamus der kontralateralen Hirnhemisphäre. Die Axone des PrV projizieren dort vor allem in den *ventroposteriomedialen Nucleus* (VPM, Abbildung 2). Im VPM terminieren die trigemino-thalamischen Projektionen somatotopisch in als „*Barreloids*“ bezeichneten Vibrissen-assoziierten Zellansammlungen (Van der Loos, 1976; Waite, 1973). Die Neuronen innerhalb eines „*Barreloids*“ projizieren dann bevorzugt in einen derselben Vibrisse zugeordneten *Barrel* in der Lamina IV des *Barrel*-Kortex (Agmon und Connors, 1991; Chmielowska et al., 1989; Land et al., 1995). Über die Verschaltung im VPM, auch als lemniskaler Verschaltungsweg bekannt, können so Informationen einer Vibrisse den *Barrel*-Kortex mit sehr kurzen Latenzen erreichen (Ahissar et al., 2000; Chiaia et al., 1991; Diamond et al., 1992). Ein Teil der Neuronen des PrV im Hirnstamm innervieren einen weiteren *Nucleus* des kontralateralen Thalamus, den *posteromedialen Nucleus* (POM), dessen Neuronen dann unter anderem ebenfalls in den primären somatosensorischen Kortex projizieren. Dieser paralemniskale Verschaltungsweg über POM zeigt im Gegensatz zum lemniskalen Verschaltungsweg bei längeren Latenzen diffuse thalamokortikale Projektionen (Chiaia et al., 1991; Diamond et al., 1992; Jones und Diamond, 1995). Jüngeren Studien zufolge sind diese parallelen Verschaltungswege des Vibrissensystems für unterschiedliche Bereiche der Verarbeitung sensorischer Information zuständig. Der lemniskale Verschaltungsweg ist mit seiner großen räumlichen Spezifität sehr wahrscheinlich maßgeblich für die Objekterkennung zuständig, während der diffusere paralemniskale Verschaltungsweg für zeitliche Informationsverarbeitung, also der Erfassung von Objektbewegung, wichtig zu sein scheint (Ahissar et al., 2000; Ahissar et al., 2001; Sosnik et al., 2001).

### 1.1.2 Funktionelle Aspekte des Vibrissensystems

Da die sensorischen Informationen der Vibrissen, bevor sie in den *Barrel*-Kortex gelangen, zuerst den Hirnstamm und Thalamus durchlaufen, stellt sich die Frage, welche funktionellen Rollen die einzelnen Stationen im Vibrissensystem übernehmen. *In vivo* Untersuchungen konnten zeigen, dass die Neuronen des PrV im Hirnstamm auf Vibrissenstimulation sehr zuverlässig die Antwortmuster der primär-afferenten Neuronen abbilden. Daher wird angenommen, dass der PrV des Hirnstamms nur als Relaisstation afferenter sensorischer Signale dient (Ahissar et al., 2000). Die Neuronen des VPM und POM im Thalamus stellen hingegen vermutlich bereits eine erste Station der Verarbeitung

sensorischer Informationen dar, da hier die trigeminalen Eingänge bereits spezifische Transformationen erfahren (Ahissar et al., 2000; Diamond et al., 1992; Nicolelis und Chapin, 1994; Sherman und Guillery, 1996). Gleichzeitig wird die neuronale Aktivität gerade im POM, aber auch im VPM durch *Feedback* aus dem *Barrel*-Kortex stark moduliert (Ahissar et al., 2000; Waite und Tracey, 1995). Im *Barrel*-Kortex selber werden bei der Verarbeitung der sensorischen Informationen nicht nur deren physikalische Parameter dekodiert, sondern sie werden auch in einen verhaltensbiologischen Kontext gestellt. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Ratten taktile Reize bei Stimulation einzelner Vibrissen auch dann wahrnehmen oder unterscheiden können, wenn der *Barrel*-Kortex nicht funktionsfähig ist (Hutson und Masterton, 1986). Dieser wird vielmehr dann unbedingt benötigt, wenn die Unterscheidung taktiler Reize mit aktivem Explorieren (Guic-Robles et al., 1989; Hutson und Masterton, 1986) und mit Lernprozessen (Guic-Robles et al., 1992) kombiniert wird.

### **1.1.3 Der *Barrel*-Kortex: Ein Sonderfall somatosensorischer Kortizes?**

Es stellt sich nun die Frage, ob und wie die Erkenntnisse über die anatomischen und physiologischen Grundlagen der Signalverarbeitung im sehr spezialisiert organisierten *Barrel*-Kortex der Nagetiere auch auf andere Spezies übertragbar sind. Es wird vermutet, dass *Barrels*, auch wenn sie nicht im primären somatosensorischen Kortex beispielsweise von Carnivoren oder Primaten als cytoarchitektonisch deutlich wahrnehmbare Strukturen zu finden sind, eine grundlegende und generell bei allen Säugern vorkommende Organisationsform somatosensorischer Kortizes repräsentieren (Woolsey und Van der Loos, 1970). Dieser Theorie zufolge treten *Barrels* als strukturelle Einheit in Nagetieren durch ihr sehr gut ausgebildetes Vibrissensystem, bei gleichzeitig vergleichsweise geringer Zahl von Neuronen in der Lamina IV, lediglich besonders deutlich hervor. Da größere Säugetiere im Vergleich zu den Nagetieren eine sehr viel höhere Zellzahl in Lamina IV aufweisen, ist das grundlegende Strukturmuster vermutlich nur verschleiert. Demnach würde der *Barrel*-Kortex in seiner grundlegenden Organisation also keinen Ausnahmefall somatosensorischer Kortizes darstellen und daher als Modellkortex, auch für den Menschen, geeignet sein.

## 1.2 Signalverarbeitung im *Barrel*-Kortex der Ratte

### 1.2.1 Kolumnäre Organisation des *Barrel*-Kortex

Die kortikale Verarbeitung sensorischer Informationen erfordert, wie eingangs beschrieben, die komplexe Interaktionen von neuronalen Schaltkreisen sowohl innerhalb einer funktionellen Kolumne als auch zwischen den funktionellen Kolumnen. Im *Barrel*-Kortex sind diese Kolumnen, die die 6 kortikalen Laminae durchspannen, nicht nur funktionell, sondern auch strukturell zu identifizieren. Durch die Stimulation einer Vibrisse wird Aktivität nicht nur besonders bei Neuronen innerhalb des zugeordneten *Barrels*, sondern nach gewissen Latenzen auch in den in vertikaler Ausrichtung zum *Barrel* liegenden Neuronen der übrigen Laminae evoziert (Armstrong-James, 1975). Ein *Barrel* in Lamina IV definiert also unmittelbar strukturell die horizontale Ausdehnung der den Kortex vertikal durchspannenden Kolumne. Daher spricht man bei den funktionellen Kolumnen des *Barrel*-Kortex auch von *Barrel*-assoziierten Kolumnen.

### 1.2.2 Zellulärer Aufbau funktioneller Kolumnen im *Barrel*-Kortex

Generell sind die neuronalen Bestandteile kortikaler Kolumnen exzitatorische Prinzipalneuronen und inhibitorische Interneuronen (Jones, 1981; Peters und Jones, 1984), die sich anhand ihrer unterschiedlichen Elektrophysiologie und Morphologie in eine Vielzahl unterschiedlicher Klassen differenzieren lassen. Dabei besitzt jede der kortikalen Laminae einen für sie charakteristischen Bestand an exzitatorischen und inhibitorischen Neuronenklassen.

Die sensorischen Informationen werden im Kortex von den exzitatorischen Neuronen, die als wichtigsten Neurotransmitter L-Glutamat benutzen, verarbeitet und an andere Neuronen weitergeleitet. Elektrophysiologisch findet man bei den exzitatorischen kortikalen Neuronen im Großen und Ganzen zwei unterschiedliche Muster von Aktionspotentialentladungen. Am verbreitetsten und in den Laminae II-VI zu finden sind exzitatorische Neuronen, die aufgrund ihrer intrinsischen Membraneigenschaften bei überschwelliger Depolarisation Sequenzen einzelner Aktionspotentiale feuern, so genannte regelmäßig feuernde oder RS (= *regular spiking*) Zellen (Connors und Gutnick, 1990; Mason und Larkman, 1990; McCormick et al., 1985). Andere Neuronen, die vor allem in den Laminae IV und V zu finden sind und die bei überschwelliger Depolarisation hochfrequente kurze Salven von Aktionspotentialen generieren, sind so genannte

intrinsisch Salven feuernde oder IB (= *intrinsically bursting*) Zellen. Die unterschiedlichen Aktionspotentialentladungsmuster haben dabei eine unterschiedlich effektive Erregung der Zielneuronen zur Folge.

Insgesamt handelt es sich bei den exzitatorischen Neuronen in der Regel um Projektionsneuronen, deren axonale Projektionen auch in benachbarte Kolumnen und andere Areale reichen. Eine Ausnahme hiervon bildet eine morphologische Klasse exzitatorischer Neuronen, die vor allem in der Lamina IV zu finden ist. Hier finden sich bedornete Sternzellen, also exzitatorische Interneuronen mit einem kompakt aufgebauten Dendritenbaum, dessen Dendriten namensgebend mit so genannten Dornen besetzt sind (Harris und Woolsey, 1983; Lund, 1984; Simons und Woolsey, 1984). Ihre axonalen Projektionen bleiben fast ausschließlich auf die eigene Kolumne beschränkt.

Die übrigen exzitatorischen Neuronen, also die Projektionsneuronen, zeigen eine somatodendritische Grundmorphologie, die zur Bezeichnung Pyramidenzellen führte. Sie besitzen alle einen mehr oder weniger ausgeprägten apikalen Dendriten, der, unabhängig von der laminären Lokalisation des Projektionsneurons, relativ zielstrebig die eigene Lamina in Richtung der pialen Oberfläche verlässt. Die wohl bekanntesten und eindrucksvollsten Vertreter dieser Neuronen sind die schon von Ramón y Cajal (Cajal, 1904) beschriebenen großen Pyramidenzellen der Lamina V, die mit ihrem apikalen Dendriten den Kortex vertikal bis zur pialen Oberfläche durchspannen. Pyramidenzellen zeigen jedoch je nach ihrer laminären Lokalisation sowohl sehr unterschiedliche Muster ihrer lokalen Axonkollateralen als auch unterschiedliche Zielregionen, in die ihre Axone projizieren. Pyramidenzellen der supragranulären Laminae II und III besitzen hauptsächlich kommissurale und assoziative Projektionen, also Projektionen in andere kortikale Areale der gleichen Hemisphäre (Wise und Jones, 1976). Bislang konnte im *Barrel*-Kortex noch keine funktionelle oder gar strukturelle Differenzierung zwischen den Laminae II und III festgestellt werden, weshalb angenommen wird, dass diese beiden supragranulären Laminae bei den Nagetieren eine funktionelle Einheit bilden. Wie bereits erwähnt finden sich bei den Pyramidenzellen der infragranulären Laminae vor allem Projektionen in subkortikale Areale (Wise und Jones, 1977). Anders als in den supragranulären Laminae lassen sich infragranulär laminaspezifische Unterschiede in den Zielregionen der Projektionen feststellen. Die großen Pyramidenzellen der Lamina V projizieren außer in andere kortikale Areale, vor allem in nicht-thalamische subkortikale Areale wie dem Striatum oder dem *Colliculus superior* (Wise und Jones, 1977). Im

somatosensorischen Kortex differenziert sich die Lamina V dabei strukturell in eine Lamina Va, die nur einen schmalen Streifen direkt unterhalb der *Barrels* ausmacht und vorwiegend kleinere Pyramidenzellen enthält, und in eine Lamina Vb, in der die großen Pyramidenzellen lokalisiert sind. Anders als die Pyramidenzellen der Lamina Vb finden sich bei den Pyramidenzellen der Lamina VI neben einigen assoziativen Projektionen (Zhang und Deschênes, 1997) vor allem Projektionen in den VPM und den POM des Thalamus (Hoogland et al., 1987; Jensen und Killackey, 1987; Waite und Tracey, 1995).

Inhibitorische Interneuronen, die als Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) benutzen, modulieren die Aktivität und Signalübertragung innerhalb des Kortex. Die Elektrophysiologie inhibitorischer Neuronen ist im Vergleich zu der der exzitatorischen Neuronen sehr heterogen. Das für inhibitorische Neuronen typischste Aktionspotentialentladungsmuster ist dabei das der hoch-frequent feuernenden oder FS (= *fast spiking*) Zellen (Connors und Gutnick, 1990; McCormick et al., 1985). Daneben finden sich aber auch inhibitorische Neuronen vom RS- oder IB-Typ sowie Neuronen, die ein sehr irreguläres Aktionspotentialfeuermuster zeigen. Genauso heterogen wie die Aktionspotentialfeuermuster ist die formenreiche Morphologie der inhibitorischen Neuronen (Gupta et al., 2000). Bislang wurden ungefähr 14 verschiedene morphologische Typen beschrieben (Fairen et al., 1984). Allen kortikalen inhibitorischen Neuronen ist aber gemeinsam, dass ihre Axonkollaterale überwiegend innerhalb der eigenen kortikalen Kolumne verbleiben, sie also vermutlich vor allem lokal die Aktivität von Zielneuronen modulieren. Obwohl inhibitorische Interneuronen mit großer Sicherheit eine überaus wichtige Rolle zum Beispiel bei der Extraktion und Filterung relevanter sensorischer Information (Porter et al., 2001) oder der Synchronisierung exzitatorischer Aktivität spielen (Chagnac-Amitai und Connors, 1989b; Kawaguchi, 2001), ist über die tatsächliche funktionelle Konnektivität zwischen den inhibitorischen und exzitatorischen Neuronenklassen bislang nur wenig bekannt.

### 1.2.3 Intrakolumnäre Verarbeitung sensorischer Signale

Intrakolumnäre Signalverarbeitung, die sich sehr wahrscheinlich mit den physikalischen Eigenschaften eines von der assoziierten Vibrisse aufgenommenen taktilen Reizes beschäftigt (Simons, 1978), basiert neben einer extensiven intralaminären neuronalen Interaktion besonders auf translaminären Verknüpfungen. Hierbei durchlaufen die sensorischen Informationen, zumindest im stark vereinfachten Modell, die unter-

schiedlichen Laminae hauptsächlich in einer bestimmten Reihenfolge (Ferster und Lindstrom, 1985; Staiger et al., 2000). Wie bereits beschrieben, enden die thalamischen Afferenzen im *Barrel*-Kortex bevorzugt innerhalb eines *Barrels* in der Lamina IV (Bernardo und Woolsey, 1987; Jensen und Killackey, 1987). Diese Afferenzen entstammen in dem Fall fast ausschließlich Neuronen eines jeweils zugeordneten *Barreloids* im VPM. Daneben projizieren Neuronen des VPM aber auch in den Grenzbereich zwischen der Lamina V und VI (Chmielowska et al., 1989; Lu und Lin, 1993), während die Neuronen des POM bevorzugt in die Lamina I, die Zwischenräume der *Barrels* in Lamina IV, die so genannten Septen, und in die Lamina Va projizieren (Lu und Lin, 1993).

Trotzdem beginnt intrakolumnäre Signalverarbeitung, wie durch *in vivo* Studien gezeigt werden konnte, im Wesentlichen innerhalb der *Barrels* in der Lamina IV (Armstrong-James et al., 1992; Moore und Nelson, 1998; Petersen und Sakmann, 2001; Abbildung 3). Von dort wird die sensorische Information zuerst in die supragranulären Laminae II und III geleitet. Von den supragranulären Laminae aus gelangt die Information in infragranulären Projektionslaminae Laminae IV und V. Von dort werden die verarbeiteten Signale dann vor allem an andere kortikale und subkortikale Areale übermittelt (Waite und Tracey, 1995). Welche Rolle die zellarme Lamina I in der intrakolumnären Signalverarbeitung spielt, ist bisher noch weitgehend unbekannt (Mountcastle, 1997). Jedenfalls wird sie im Allgemeinen bei Betrachtungen kolumnärer Verarbeitung sensorischer Signale nicht weiter berücksichtigt (Armstrong-James et al., 1992; Waite und Tracey, 1995).

Wie allerdings einleitend erwähnt, handelt es sich hier um ein stark vereinfachtes Modell intrakolumnärer Signalverarbeitung, das nur eine bevorzugte Sequenz der translaminären Informationsausbreitung beschreibt. Informationsübermittlung, die dieser bevorzugten Sequenz folgt, wird allgemein als *Feed-Forward* Übermittlung bezeichnet. Informationsausbreitung findet aber auch entgegen dieser Sequenz statt. Dabei geben Neuronen eine „Rückmeldung“ über ihre Ausgangssignale an Neuronen in den zuvor durchlaufenen, also vorgeschalteten Laminae. Diese Art der Informationsübermittlung, die sowohl exzitatorischer als auch inhibitorischer Natur sein kann, wird dementsprechend als *Feedback* Übermittlung bezeichnet. In welchem Maße die Neuronen der unterschiedlichen Laminae Informationen über *Feed-Forward* oder *Feedback* Übermittlung erhalten, ist

bisher nur wenig bekannt. Fest steht, dass bereits die intrakolumnäre Verarbeitung sensorischer Signale weitaus komplexer ist als bisher angenommen.

### **1.2.4 Transkolumnäre Integration sensorischer Information**

Da jede einzelne Vibrisse nur die taktilen Informationen über einen kleinen begrenzten Bereich liefern kann, ist es für das bewusste Erkennen eines Objektes nötig, dass im Kortex die Informationen aller beteiligten Vibrissen integriert werden. Das heißt, substantielle Signalintegration muss nicht nur innerhalb der funktionellen Kolumne, also vertikal, sondern vor allem auch zwischen den funktionellen Kolumnen über horizontale Verbindungen durchgeführt werden (Abbildung 3). Solche horizontalen, Kolumnen übergreifenden Projektionen konnten insbesondere für die supragranulären (Feldmeyer et al., 2002) und die infragranulären Laminae (Feldmeyer und Sakmann, 2000) nachgewiesen werden. Insbesondere diese intrakortikalen transkolumnären Projektionen werden dafür verantwortlich gemacht, dass die Neuronen rezeptive Felder haben, die mehrere Vibrissen umfassen können (Armstrong-James et al., 1992; Simons, 1978; Simons und Carvell, 1989). Als rezeptives Feld eines Neurons wird der Bereich der sensorischen Oberfläche angesehen, dessen Rezeptoren ihre Erregung an dieses Neuron weitergeben können. Neuronen mit ausgedehnten rezeptiven Feldern können demnach außer durch ihre assoziierte Vibrisse, die so genannte Hauptvibrisse, auch in gewissem Ausmaß von benachbarten Vibrissen aktiviert werden und somit deren sensorische Informationen in die intrakolumnäre Signalverarbeitung mit einbringen (Armstrong-James, 1995; Simons, 1995). Die Neuronen werden dabei durch die jeweilige Hauptvibrisse am stärksten erregt, während die Aktivität nach Stimulation benachbarter Vibrissen nicht nur deutlich schwächer, sondern auch erst nach einer zusätzlichen Latenz von einigen Millisekunden zu registrieren ist (Armstrong-James und Fox, 1987; Moore und Nelson, 1998).

Die Ausdehnung der rezeptiven Felder der Neuronen ist variabel und abhängig von der jeweiligen Neuronenklasse sowie von der entsprechenden Lamina. Die Größe der rezeptiven Felder nimmt dabei der laminären Verarbeitungs-Sequenz folgend zu (Simons, 1978; Simons und Woolsey, 1979). Die kleinsten rezeptiven Felder, die im Allgemeinen nur eine bis wenige Vibrissen umfassen, besitzen Neuronen der Lamina IV (Chapin, 1986; Simons, 1978). Das bedeutet, dass hier vor allem die sensorische Information der jeweiligen Hauptvibrisse verarbeitet wird. Demgegenüber können die rezeptiven Felder der Pyramidenzellen in den supragranulären Schichten eine Vielzahl von Vibrissen umfassen

(Abbildung 3). Die Neuronen der infragranulären Laminae und dort besonders der Lamina V besitzen jedoch die größten rezeptiven Felder. Diese können die gesamte Vibrissenmatrix umfassen (Chapin, 1986), was bedeutet, dass die Neuronen der infragranulären Laminae in die Verarbeitung der sensorischen Informationen der assoziierten Hauptvibrisse auch die Informationen vieler umgebender Vibrissen integrieren (Ebner und Armstrong-James, 1990; Simons und Carvell, 1989). Interessanterweise zeigen die Neuronen der infragranulären Laminae auch die ausgedehntesten intrakortikalen Verbindungen (Chapin et al., 1987; Staiger et al., 1999). Das bedeutet allerdings nicht, dass die Größe der rezeptiven Felder der Neuronen nur durch horizontale Verknüpfungen innerhalb derselben Lamina bestimmt wird. Sowohl anatomische als auch elektro-physiologische Studien deuten vielmehr darauf hin, dass gerade bei den Neuronen der supra- und infragranulären Laminae ein Teil der transkolumnären Verknüpfungen durchaus gleichzeitig translaminär ist (Armstrong-James et al., 1992; Bernardo et al., 1990; Staiger et al., 1999).

### **1.2.5 Plastizität im primären somatosensorischen Kortex**

Während seiner postnatalen Entwicklung, aber auch im ausgereiften Zustand, unterliegt der *Barrel*-Kortex deutlicher Plastizität, bei der sich die neuronalen Schaltkreise mit ihren rezeptiven Feldern entsprechend taktiler Erfahrungen ändern und anpassen (Fox, 1992; Fox, 2002; Wallace und Fox, 1999). Deprivationsexperimente, bei denen Tieren einzelne oder alle Vibrissen entfernt wurden, konnten eindrucksvoll zeigen, dass im *Barrel*-Kortex mit der Zeit deutlich veränderte Aktivitäten, sowohl verstärkter als auch abgeschwächter Natur, beobachtet wurden. Die Tatsache, dass dabei die Antworten im Thalamus keine vergleichbaren Veränderungen erfuhren, zeigt, dass diese plastischen Vorgänge tatsächlich auf intrakortikalen Mechanismen basieren (Glazewski et al., 1998b; Wallace und Fox, 1999). Die intrakortikale Plastizität basiert höchstwahrscheinlich sowohl auf horizontalen als auch auf vertikalen Verschaltungen. Bisher konnten im *Barrel*-Kortex gerade zwischen der Lamina IV und den supragranulären Laminae sowie innerhalb der supragranulären Laminae Verschaltungen nachgewiesen werden, in denen Langzeit-Potenzierung induziert werden kann (Fox, 2002; Glazewski et al., 1998a). Allerdings sind die unterschiedlichen kortikalen Laminae nicht gleichartig an den durch Lernprozesse induzierten Modifikationen im *Barrel*-Kortex beteiligt. Wie Verhaltensstudien zeigen konnten, waren Tiere mit einer selektiven Läsion der supragranulären Laminae nicht in der Lage, bestimmte Aufgaben, die den aktiven Einsatz der Vibrissen erforderten, zu erlernen

(Diamond et al., 1999). Wurde die Läsion der supragranulären Laminae aber nach dem Erlernen der Aufgabe durchgeführt, so waren die Tiere nach wie vor in der Lage die Aufgabe durchzuführen. Die Befähigung zur Ausführung der erlernten Aufgabe geht aber durch die vollständige Ablation aller 6 Laminae des *Barrel*-Kortex verloren (Hutson und Masterton, 1986). Vermutlich erhalten Neuronen in den supragranulären Laminae nach erfolgreichem Abschluss einer Aufgabe eine Rückmeldung von anderen, höheren kortikalen Arealen (Cauller, 1995) und geben diese Information dann gerade an die Laminae IV bis VI weiter. In diesen Laminae werden dann durch das positive *Feedback* synaptische Verbindungen gefördert, die während der Ausführung der Aufgabe aktiv waren. Durch diese Modifikationen können vergleichbare sensorische Eingänge in Lamina IV ein effektiveres Ausgangssignal von der Lamina Vb an beispielsweise den Motorkortex auslösen (Diamond et al., 1999; Izraeli und Porter, 1995).

### **1.3 Eingehende Betrachtung exzitatorischer Neuronen der Laminae IV und Vb**

Viele der vorgestellten Erkenntnisse über die Signalverarbeitung und die Plastizität im somatosensorischen Kortex beruhen auf physiologischen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von Neuronenpopulationen innerhalb eines kortikalen Areals, zum Beispiel einer kortikalen Lamina. Diese Studien können dabei nicht ausreichend zwischen den unterschiedlichen beteiligten Neuronenklassen differenzieren. Demgegenüber beschäftigen sich die Studien der einzelnen Neuronenklassen vorwiegend mit anatomischen und elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner Neuronen sowie ihren lokalen Verknüpfungen. Über die Einbindung spezifischer Neuronenklassen in kortikale Schaltkreise und darüber hinaus mit welchen funktionellen Modulen sie interagieren, ist allerdings bisher nur wenig bekannt. Dabei bietet das detaillierte Wissen über die funktionelle Einbindung der unterschiedlichen Neuronenklassen in die kortikalen Schaltkreise die Möglichkeit, die überaus komplexen Vorgänge der intrakortikalen Signalverarbeitung und ihrer Plastizität besser zu verstehen. Ein Beispiel für kortikale Neuronen, über die zwar bereits viele anatomische und physiologische Details bekannt sind, über deren zelltypspezifische Integration in kortikale Netzwerke aber noch vieles unbekannt oder umstritten ist, sind die exzitatorischen Neuronen der Lamina IV und der wichtigen Projektionslamina Vb.

Die Physiologie und Morphologie der einzelnen Klassen dieser exzitatorischen Neuronen und die bisher bekannte Einbindung in kortikale Netzwerke soll im Folgenden detaillierter betrachtet werden (Abbildung 4).

### 1.3.1 Exzitatorische Neuronen der Lamina IV

Die Rolle der exzitatorischen bedornten Neuronen der Lamina IV in der intrakortikalen Signalverarbeitung wurde vermutlich aufgrund ihrer zum Teil räumlich sehr komprimierten Dendritenbäume und der vergleichsweise kleinen rezeptiven Felder in der Vergangenheit häufig unterbewertet. Obwohl es vermehrt Hinweise auf komplexere Integration bedornter Neuronen der Lamina IV in intrakortikale Signalverarbeitung gibt, hält sich in der Literatur immer noch das Bild der bedornten Neuronen der Lamina IV als einfache Relais und Verstärker für in den Kortex eingehende sensorische Informationen (Feldmeyer et al., 2002). Dabei umfasst die Gruppe der bedornten Neuronen der Lamina IV nicht nur im somatosensorischen Kortex der Ratte (Simons und Woolsey, 1984), sondern auch in anderen sensorischen Kortexen verschiedener Spezies (Jones, 1975; Smith und Populin, 2001; Tarczy-Hornoch et al., 1998; Yabuta et al., 2001) morphologisch sehr unterschiedliche Zellen, die in mindestens zwei größere morphologisch unterscheidbare Klassen differenziert werden können.

Etwa 70% der Neuronen in der Lamina IV werden der Klasse der bereits erwähnten bedornten Sternzellen mit ihrem kompakten, auf das *Barrel* beschränkten Dendritenbaum zugeordnet (Feldmeyer et al., 1999; Lübke et al., 2000; Lund, 1984; Simons und Woolsey, 1984; Woolsey et al., 1975). Ihre Axonkollateralen verbleiben zum großen Teil in der eigenen Kolumne und projizieren außer in die infragranulären Laminae sehr reichhaltig in die eigene Lamina und in die supragranulären Laminae (Hirsch, 1995; Lübke et al., 2000). Die wenigen transkolumnären Axonkollateralen projizieren dabei auch in direkt benachbarte *Barrels* (Lübke et al., 2000). Die übrigen exzitatorischen Neuronen, das entspricht etwa 15 % aller Neuronen in Lamina IV, besitzen einen apikalen Dendriten und werden daher den Pyramidenzellen zugeordnet (Lund, 1984; Simons und Woolsey, 1984). Die Klasse der Pyramidenzellen schließt allem Anschein nach eine Subpopulation von pyramidenartigen Neuronen, die so genannten Sternpyramidenzellen, ein. Sternpyramidenzellen besitzen wie die übrigen Pyramidenzellen einen apikalen Dendriten, verfügen aber über eine andere räumliche Organisation der nicht-apikalen Dendriten (Jones, 1975; Staiger et al., 2002). Generell zeigen die Axonkollateralen gerade der „echten“

Pyramidenzellen im Gegensatz zu den bedornten Sternzellen vermehrt transkolumnäre Projektionen in benachbarte *Barrels* und in die supragranulären Laminae (Staiger et al., 2002).

Die Annahme, dass die bedornten Neuronen innerhalb der *Barrels* als Relais und Verstärker für thalamokortikale Eingänge dienen, basiert vermutlich auf der Tatsache, dass sie ihre stärksten exzitatorischen Eingänge von den thalamischen Afferenzen aus VPM (Bernardo und Woolsey, 1987; Jensen und Killackey, 1987) und von anderen bedornten Neuronen innerhalb ihres *Barrels* erhalten (Feldmeyer und Sakmann, 2000; Lübke et al., 2000; Thomson et al., 2002; Abbildung 4A1). Darüber hinaus ist aber bereits sowohl im visuellen als auch im somatosensorischen Kortex nachgewiesen worden, dass Neuronen der Lamina IV auch einen exzitatorischen Eingang von der Lamina VI erhalten (Ahmed et al., 1994; Anderson et al., 1994; Ferster und Lindstrom, 1985; Staiger et al., 1999). Ein sehr umstrittener Punkt ist außerdem, ob *Barrels* funktionell isolierte Einheiten darstellen (Goldreich et al., 1999; Laaris et al., 2000; Petersen und Sakmann, 2001), oder ob es eine direkte Verschaltung zwischen benachbarten *Barrels* gibt (Armstrong-James et al., 1992; Armstrong-James, 1995). Ebenfalls umstritten ist aufgrund fehlender Studien auf Einzelzell-Niveau, ob es sich bei der für bedornte Neuronen der Lamina IV bekanntermaßen starken inhibitorischen Kontrolle um lokale Inhibition (Salin und Prince, 1996) mit ihrem Ursprung im eigenen *Barrel* oder um laterale Inhibition (Simons und Carvell, 1989) ausgehend von inhibitorischen Interneuronen in benachbarten *Barrels* handelt (Abbildung 4A2).

Ein möglicher Grund für die zum Teil kontroversen Annahmen ist, dass es bisher keine ausreichenden Studien gibt, die bei der Untersuchung der Integration bedornter Neuronen der Lamina IV in intrakortikale Schaltkreise die morphologischen Zellklassen berücksichtigt.

### **1.3.2 Exzitatorische Neuronen der Lamina Vb**

Die Lamina Vb, eine wichtige Projektionslamina sensorischer Kortexes, beherbergt die größten und auffälligsten kortikalen Neuronen, die bereits erwähnten großen exzitatorischen Pyramidenzellen. In der Lamina Vb sind zwei Klassen dieser Pyramidenzellen beschrieben: (i) die intrinsisch Salven feuernenden oder IB-Pyramidenzellen und (ii) die regelmäßig feuernenden oder RS-Pyramidenzellen (Chagnac-Amitai et al., 1990). Die in ihrem Dendritenbaum stark verzweigten IB-Pyramidenzellen

sind in der Lage, hochfrequente Salven von Aktionspotentialen zu feuern, und zeigen extensive horizontale axonale Projektionen in den infragranulären Schichten sowie diverse kortikofugale Projektionen (Kasper et al., 1994). Die dendritisch eher spärlich verzweigten RS-Neuronen zeigen ein regelmäßiges Aktionspotential-Feuermuster und projizieren intensiv in die supragranulären Schichten (Chagnac-Amitai et al., 1990) sowie in ipsi- und kontralaterale kortikale Areale (Wise und Jones, 1976). Eine extensive synaptische Kopplung zwischen Pyramidenzellen innerhalb der Lamina Vb (Markram et al., 1997; Thomson et al., 2002) und zwischen Pyramidenzellen in Lamina II/III und Lamina Vb (Reyes und Sakmann, 1999; Thomson et al., 2002) konnte in gepaarten Ableitungen nachgewiesen werden (Abbildung 4B1). Darüber hinaus erhalten Pyramidenzellen der Lamina Vb inhibitorische Eingänge aus unterschiedlichen Schichten, wobei räumliche Organisation (Nicoll et al., 1996) und Stärke dieser Eingänge (Hefti und Smith, 2000) zelltypspezifische Unterschiede zeigen (Abbildung 4B2). Diese Befunde deuten die Existenz sehr komplexer und Kolumnen durchspannender exzitatorischer und inhibitorischer Eingänge an, die den funktionellen Status der Pyramidenzellen der Lamina Vb modulieren. Doch in welchem Ausmaß die Neuronen der unterschiedlichen Laminae modulatorischen Einfluss auf die Pyramidenzellen der Lamina Vb haben und ob gerade hinsichtlich der exzitatorischen Eingänge zelltypspezifische Unterschiede bestehen, ist bislang ungeklärt.

## 2 Fragestellung

Die zuvor dargestellten Grundzüge der Signalverarbeitung und Plastizität in sensorischen kortikalen Arealen machen deutlich, dass es im Bereich der funktionellen Integration spezifischer Neuronenklassen in neuronale Schaltkreise noch viele offene Fragen und Kontroversen gibt. In der hier vorgelegten Studie wurde daher die funktionelle Konnektivität, in diesem Fall die synaptischen Eingänge, exzitatorischer Neuronen in Schlüsselbereichen der kortikalen Signalverarbeitung näher untersucht. Die folgenden Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

1. Aus welchen kortikalen Laminae, intra- als auch transkolumnär, erhalten identifizierte exzitatorische Neuronen der Laminae IV und Vb exzitatorische oder inhibitorische Eingänge?
2. Zeigen im Hinblick auf die bisherigen Erkenntnisse in der Literatur die exzitatorischen Zellen der Lamina IV „lokale“ und die der Lamina Vb eher „globale“ funktionelle Konnektivität?
3. Ist für alle exzitatorischen Neuronen innerhalb einer Lamina die funktionelle Konnektivität vergleichbar oder existieren zelltypspezifische Unterschiede?

Um detaillierte Informationen über die räumliche Verteilung der synaptischen Eingänge zu erhalten, ist es notwendig, zahlreiche präsynaptische Orte in einem Areal zu stimulieren, das eine ausreichend große Fläche des Kortex abdeckt, und synaptische Eingangskarten für jede einzelne Zelle zu konstruieren (Abbildung 5). Mittels einer Kombination von *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitungen und fokaler Photolyse von *Caged-Glutamat* (Callaway und Katz, 1993; Callaway und Yuste, 2002; Kötter et al., 1998) wurden an zahlreichen Orten lokal präsynaptische Neuronen aktiviert und die räumliche Verteilung und Stärke von resultierenden exzitatorischen und inhibitorischen monosynaptischen Eingängen auf bedornete Neuronen der Lamina IV sowie Pyramidenzellen der Lamina Vb untersucht (Abbildung 5B). Diese Methode bietet im Gegensatz zu elektrischer Stimulation (Abbildung 5A) und gepaarter Ableitung (Abbildung 5C) eine Kombination von hoher Detailgenauigkeit und ausreichender räumlicher Abdeckung im Kortex. Hierdurch wurden detaillierte Karten der laminaspezifischen intra- und transkolumnären funktionellen Konnektivität von elektrophysiologisch charakterisierten und morphologisch rekonstruierten Neuronen erhalten.

Diese Karten zeigten sowohl für die bedornten Neuronen der Lamina IV als auch für die Pyramidenzellen der Lamina Vb eine deutlich zelltypspezifische Einbindung in lokale neuronale Schaltkreise.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Präparation der *in vitro* Hirnschnittpräparate

Als Versuchstiere wurden juvenile männliche Wistar-Ratten (postnatales Alter zwischen 18 und 22 Tage) verwendet. Das Versuchstier wurde in einem luftdichten Behälter mit Enfluran (Ethrane, Abbot, Wiesbaden) betäubt und anschließend dekapitiert. Nach der Öffnung des Schädeldaches und der Freilegung des Gehirns wurde mit einem Skalpell durch zwei koronare Schnitte ein Gewebeblock isoliert, der den primären somatosensorischen Kortex enthielt (Abbildung 6A). Dieser Gewebeblock wurde möglichst schnell aus dem Schädel entfernt und für ca. 2 min in eiskalte, mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) begaste artifizielle Cerebrospinal-Flüssigkeit (ACSF, Tabelle 1) überführt um hypoxische und ischämische Schädigungen zu minimieren.

Der Gewebeblock wurde anschließend mit Gewebekleber (Permabond C2, Eastleigh, UK) auf die Schnittplattform eines Vibratoms (Serie 1000, tpi, St. Louis, MO, USA) geklebt und die gekühlte Schneidekammer mit ACSF aufgefüllt (Abbildung 6B). Aus dem Gewebeblock wurden zwischen 4 und 5 Schnitte mit einer nominellen Dicke von jeweils 300 µm herausgeschnitten. In den ersten Experimenten wurden zum Schneiden Metallklingen (Valet, London, England), später eine Diamant-Klinge (DDK, Wilmington, DE, USA) verwendet, die im mikroskopischen Bild zu einer verbesserten Schnittoberfläche mit weniger zerstörten Zellen führte. Die Hemisphären der einzelnen Schnitte wurden anschließend mit einer Skalpellklinge getrennt und der Hippocampus entfernt (Abbildung 6C). Bis zum Versuchsbeginn, zur Erholung aber für mindestens 1 h, wurden die Schnitte in einer speziell konstruierten Vorratskammer bei 32 °C gelagert (Abbildung 6D).

Für die Experimente wurden die einzelnen Schnitte dann in eine Versuchskammer überführt, in der die Schnitte bei 32°C und bei einer Durchflussrate von etwa 1 ml/min vollständig von Carbogen-begastem ACSF überdeckt waren (*submerged*-Kammer). Für Versuche, bei denen die chemische synaptische Transmission gehemmt werden sollte, wurden die Schnitte vor Experimentbeginn ca. 5 min in niedrig Ca<sup>2+</sup>/hoch Mg<sup>2+</sup>-ACSF (Tabelle 1) inkubiert.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinal-Flüssigkeit (ACSF)**

Standard ACSF								
Chemikalien	NaCl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KCl	Glukose	pH
[mM]	124	1,25	26	1,6	1,8	3	10	7,4
Niedrig Ca <sup>2+</sup> /hoch Mg <sup>2+</sup> -ACSF								
Chemikalien	NaCl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	KCl	Glukose	pH
[mM]	124	1,25	26	0,2	4	3	10	7,4

Durch die Begasung der ACSF wurde außer der Versorgung des Gewebes mit gelöstem Sauerstoff auch der pH-Wert von 7,4 über das Kohlendioxid-Kohlensäure-Gleichgewicht eingestellt. Die Begasung der ACSF wurde während der Präparation in allen verwendeten Gefäßen gewährleistet. Falls nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Chemikalien von der Firma Merk (Darmstadt) bezogen.

### 3.2 Experimenteller Aufbau

Zentraler Bestandteil des Versuchsaufbaus war ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop FS, Carl Zeiss, Göttingen) mit einer fixierten Versuchskammer (Kötter et al., 1998; Abbildung 7). Das gesamte Mikroskop ruhte auf einer motorgesteuerten mobilen Plattform (Infrapatch, Luigs & Neumann, Ratingen), die sich relativ zur Versuchskammer verschieben ließ.

Die Visualisierung des Hirnschnittes und Auswahl des Zielareals im somatosensorischen Kortex wurden in Durchlicht-Mikroskopie unter Verwendung eines x2,5 Objektivs und einer 100 W Halogenlampe durchgeführt. Für die Visualisierung der einzelnen Neuronen und während der Ableitungen wurde ein x40 Wasserimmersions-Objektiv (40x/0,75 W; Olympus, Hamburg) mit 2,2 mm Arbeitsabstand verwendet. Eine kontrastreiche Bilddarstellung der ungefärbten Zellen wurde durch die Kombination von Viertelfeldbeleuchtung und Infrarot-Mikroskopie erreicht. Für die Infrarot-Mikroskopie wurde ein Infrarot-Filter (KMZ 50-2,  $\lambda = 750$  nm, weite 57 nm, maximale Transmission 0,56; Schott, Mainz) zwischen Iris und Kondensator in den Strahlengang eingebracht. Durch die schräge Viertelfeldbeleuchtung (DGC, Luigs & Neumann, Ratingen) des ungefärbten Schnittes wird eine bessere Kontrastverstärkung erreicht.

Das Bild des Hirnschnittes wurde über zwei Adapter mit Klappspiegeln wahlweise direkt auf die Okulare, in eine Digital-Kamera (CoolPix 950, Nikon, Düsseldorf) oder über

eine 4-fach Linse nachvergrößert in eine Infrarot-sensitive CCD-Kamera (C5405-01; Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching) projiziert. Das resultierende Bild der CCD-Kamera wurde mit Kontrastverstärkung auf einem Monitor dargestellt.

Eine gepulste Xenon-Bogenlampe (TILL Photonics, Planegg) lieferte Ultraviolett (UV) -Blitze ( $\lambda = 340\text{-}390$  nm bei  $\sim 0,5$  ms Dauer), die über ein Glasfaserkabel zuerst durch einen stufenlos einstellbaren Graufilter ( $D_r = 0,0\text{-}2,0$ ; Melles Griot, Irvine, USA) geleitet wurden. Durch den Graustufenfilter war eine exakte Kalibrierung der Blitzintensität möglich. Der kalibrierte Lichtblitz wurde dann nach Passieren eines 390 nm Kurzpassfilters in einer variablen Rechteckblende auf ein Feld definierter Größe beschränkt ( $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ ). Ein dichroischer Spiegel (405 nm Langpaß) reflektierte den UV-Blitz durch das Objektiv von oben auf den Hirnschnitt. Mittels der motorisierten Plattform des Mikroskops konnten einzelne Beblitzungsfelder manuell oder computergesteuert und räumlich definiert angesteuert werden.

### 3.3 Durchführung der Experimente

Das *Barrelfield* des somatosensorischen Kortex wurde bei niedriger Vergrößerung visualisiert (Abbildung 8) und die Zielregion, je nach untersuchtem Zelltyp, innerhalb eines *Barrels* des Vibrissenfeldes in Lamina IV oder in Lamina Vb unterhalb eines *Barrels*, ausgewählt. In vertikaler Ausrichtung zur Zielregion wurde an der Grenze zwischen Lamina VI und weißer Substanz eine bipolare Wolfram-Stimulationselektrode (Science Products, Hofheim) platziert, um thalamische Afferenzen elektrisch stimulieren zu können (orthodrome Stimulation; Connors et al., 1988). Einzelne Neuronen wurden dann unter Verwendung des 40x-Objektivs visuell voridentifiziert.

#### 3.3.1 Elektrophysiologische Ableitung

Die visuell identifizierten Neuronen wurden mittels der *Whole-Cell Patch-Clamp* Technik abgeleitet (Abbildung 9A). Die *Patch*-Pipetten mit einem durchschnittlichen Spitzenwiderstand von 4 - 6 M $\Omega$  wurden in einem Narishige PP-830 Elektrodenpuller (Narishige, Tokyo, Japan) aus Borosilikatglas-Kapillaren (1,5 mm a.D., 1,16 mm i.D., Science Products, Hofheim) gezogen. Gefüllt wurden die *Patch*-Pipetten mit einer Elektroden-Lösung, die in Ionenzusammensetzung, pH-Wert und Osmomolarität möglichst gut mit den physiologischen Werten des Zytoplasmas übereinstimmt (Tabelle 2). Für eine spätere histologische Anfärbung der abgeleiteten Neuronen wurde der Pipettenlösung 1%

Biocytin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) beigefügt. Die *Patch*-Elektrode wurde unter Sichtkontrolle am Monitor mit motorisierten Mikromanipulatoren (LN-Mini 25, Luigs & Neumann, Ratingen) positioniert. Nach Etablierung eines stabilen Abdichtwiderstandes zwischen *Patch*-Elektrode und Zelle von  $> 1 \text{ G}\Omega$  in der so genannten *Cell-Attached* Konfiguration, wurde durch leichten Unterdruck die *Whole-Cell* Konfiguration erreicht (Abbildung 9A2-3). Die elektrophysiologischen Ableitungen der Neuronen wurden generell in der Strom-Klemme (*Current-Clamp*) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Einzelelektroden-Verstärkersystems (SEC-05L, npi-elektronics, Tamm) durchgeführt (Abbildung 9B). Die analogen elektrophysiologischen Signale wurden vorverstärkt (DPA 2F, npi-electronics, Tamm), bei 3 kHz gefiltert und von einem ITC-16 Interface (Instrutech, Great Neck, NY, USA) digitalisiert (Abbildung 10). Die Daten wurden von PC-gestützter Software (TIDA 4.1 für Windows, Heka Elektronik, Lambrecht) aufgezeichnet, gespeichert und ausgewertet. Über dieselbe PC-Plattform wurden gleichzeitig sowohl die Strominjektionsprotokolle für das Messverstärkersystem kontrolliert als auch die isolierte Stimulationseinheit (BioLogic, Claix, France) für die orthodrome Stimulation getriggert.

**Tabelle 2: Verwendete Elektrodenlösung**

Chemikalien	Na <sub>2</sub> ATP*	NaGTP*	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KCl	K-Gluconat	K-HEPES	EGTA	pH
[mM]	2	0,5	1	2	13	117	10	11	7,4

Der pH Wert von 7,4 wurde mit KOH eingestellt. Damit die Elektrodenlösung und Zytoplasma isosmotisch waren wurde die Elektrodenlösung mit Saccharose auf 306 mOsm eingestellt. \*Chemikalien der Firma Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim.

### 3.3.2 Untersuchung photolyseinduzierter Aktivität

Für die Stimulation von Neuronen durch fokale photolytische Freisetzung von Glutamat wurden etwa 5 ml Versuchslösung bei kontinuierlicher Begasung rezirkuliert und 1 mM verestertes (=Caged) Glutamat (L-Glutaminsäure,  $\gamma$ -[ $\alpha$ -Carboxy-2-Nitrobenzyl]Ester = ( $\gamma$ -CNB)-Caged L-Glutaminsäure; Molecular Probes, Eugene, USA) zugegeben (Abbildung 11). Caged-Glutamat hat ein relativ breites Absorbtionsspektrum (280-380 nm) mit einem Maximum bei ~360 nm. Die Photostimulation mittels eines UV-Blitzes würde bei einer geschätzten Quantenausbeute von 0,1 und bei voller Blitzintensität theoretisch eine Spitzenkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  an aktivem Glutamat freisetzen (Katz und Dalva, 1994).

Um die Spezifität und Reproduzierbarkeit der Aktivierung synaptischer Eingänge mittels lokaler Photolyse von *Caged*-Glutamat zu bestimmen, waren zahlreiche Vorkontrollen nötig. Mittels dieser Kontrollen sollten unerwünschte, eher unspezifische Effekte der Reizbedingungen und Versuchslösungen untersucht werden. Außerdem wurde durch eine Kalibrierung der Stimulationsstärke die räumliche Auflösung photolyseinduzierter Aktivität bestimmt und gesichert.

### **3.3.2.1 Direkte Auswirkungen der Photostimulation auf neuronale Aktivität**

Die Exposition von Zellen mit energiereichem Licht kann, gewünscht oder ungewünscht, auch ohne die externe Zugabe von photoreaktiven Substanzen zu starken photoreaktiven Effekten führen. Hierbei induziert starke lokale Illumination die Bildung nichtselektiver für Ionen permeabler Poren in der Zellmembran und nachfolgend starke Depolarisation des Neurons sowie das Feuern von Aktionspotentialen (Farber und Grinvald, 1983). Zum einen führt eine starke Photostimulation zu irreversibler Schädigung des Neurons, zum anderen kann auch in Axonen das Feuern von Aktionspotentialen ausgelöst werden.

Um solche, nicht durch die Photolyse von *Caged*-Glutamat vermittelte Photoeffekte auszuschließen, wurden Kontrollstimulationen in ACSF durchgeführt, das kein *Caged*-Glutamat enthielt. Dabei wurden die abgeleiteten Neuronen somatisch sowie in unmittelbarer Nähe des Somas (perisomatisch) photostimuliert. In keinem Fall konnte durch die Photostimulation unter diesen Bedingungen eine Depolarisation der Neuronen oder gar das Feuern von Aktionspotentialen induziert werden (Abbildung 12A1). Es wurde lediglich ein kurzes (~0,4 ms) und in seiner Amplitude sehr kleines Reizartefakt (~0,5 mV) beobachtet. Dieses wurde aber vermutlich technisch bedingt durch den Hochspannungspuls der Blitzlampe ausgelöst. Erst nach der Zugabe von *Caged*-Glutamat löste somatische Photostimulation des abgeleiteten Neurons eine starke, Lichtblitz vermittelte Membrandepolarisation aus (Abbildung 12A2). Es kann also davon ausgegangen werden, dass in dieser Studie die Photostimulation Neuronen ausschließlich indirekt über die lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat depolarisiert bzw. aktiviert. So induzierte Aktivität wird im Folgenden als „photolyseinduzierte Aktivität“ bezeichnet.

### **3.3.2.2 Auswirkungen von *Caged*-Glutamat auf neuronale Aktivität**

Das inaktive *Caged*-Glutamat hat entsprechend einer früheren Studie (Wieboldt et al., 1994) bis zu seiner photolytischen Freisetzung aus dem molekularen Käfig keinerlei

Affinitäten zu Glutamatrezeptoren. Durch Tageslicht induzierte Photolyse oder Autolyse des *Caged*-Glutamats (Katz und Dalva, 1994) könnte aber die Membraneigenschaften der Neuronen im Schnittpräparat beeinflussen. Denkbar wären sowohl eine Desensitivierung von Glutamatrezeptoren als auch eine gesteigerte Spontanaktivität im Präparat. Um diese ungewollten Wechselwirkungen auszuschließen, wurden elektrophysiologische Charakterisierungen der Zellen sowie Langzeit-Ableitungen des Membranpotentials sowohl in normalen ACSF als auch in ACSF durchgeführt, das *Caged*-Glutamat enthielt.

Eine potentielle Desensitivierung von Glutamatrezeptoren konnte über eine Analyse der durch orthodrome Stimulation induzierten synaptischen Eingänge untersucht werden. Hierbei wurde jeweils am Ruhemembranpotential vor und 10 min nach der Applikation des *Caged*-Glutamats so stark orthodrom stimuliert, dass in der Zelle gerade ein überschwelliges EPSP induziert wurde. Weder bei den Neuronen der Lamina IV ( $n = 4$ ) noch der Lamina Vb ( $n = 4$ ) kam es nach der Zugabe von *Caged*-Glutamat zu einer signifikanten Veränderung der benötigten Stimulationsstärke (Abbildung 12B). Eine zu berücksichtigende Desensitivierung der Glutamatrezeptoren unter den gegebenen Versuchsbedingungen kann somit ausgeschlossen werden.

Neuronen in lebenden *in vitro* Schnittpräparaten zeigen wie Neuronen *in vivo* Spontanaktivität. Um zu überprüfen, ob die Zugabe von *Caged*-Glutamat einen modulierenden Einfluss auf die Spontanaktivität hat wurde jeweils vor und 10 min nach der Zugabe von *Caged*-Glutamat für 1 min das Ruhemembranpotential der Zelle aufgezeichnet und die Anzahl der Spontanereignisse bestimmt. Um sowohl die Häufigkeit als auch die Amplitude von Spontanereignissen zu erfassen, wurde am Ruhemembranpotential das Integral aller depolarisierenden Ereignisse in konstanten Zeitintervallen bestimmt. Hyperpolarisierende Spontanereignisse kamen vernachlässigbar selten vor. Wie bei den Kontrollexperimenten zur Desensitivierung von Glutamatrezeptoren konnte auch kein signifikanter Einfluss von *Caged*-Glutamat auf die Spontanaktivität von Neuronen der Lamina IV ( $n = 18$ ) und Lamina Vb ( $n = 11$ ) beobachtet werden (Abbildung 12C).

Ein zu berücksichtigender Einfluss von *Caged*-Glutamat auf Membraneigenschaften, bzw. eine Desensitivierung von Glutamatrezeptoren, konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen somit ausgeschlossen werden.

### **3.3.2.3 Kalibrierung der Photostimulation**

Eine Grundvoraussetzung für die Aussagekraft der verwendeten Untersuchungsmethode war, dass Stimulationsorte, in denen synaptische Eingänge ausgelöst werden konnte, auch tatsächlich Auskunft über die laminäre Lokalisation der jeweilig aktivierten präsynaptischen Somata gaben. Dafür war es wichtig, dass ausschließlich somatische und perisomatische Photostimulation ein Neuron überschwellig depolarisieren und das Feuern von Aktionspotentialen auslösen konnte.

Um dies sicher zu stellen, wurden Kontrollexperimente mit verschiedenen Neuronenklassen in unterschiedlichen kortikalen Laminae bei einer vorher kalibrierten und für die gesamte Studie gültigen Photostimulationsintensität durchgeführt. Bei diesen Kontrollexperimenten wurden in normalen ACSF und am Ruhemembranpotential Felder mit unterschiedlicher Distanz zum abgeleiteten Soma photostimuliert. Die zur fokalen Photolyse von *Caged*-Glutamat benötigten UV-Blitze wurden jeweils auf 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$  große Felder fokussiert. In den getesteten bedornten Neuronen der Lamina IV ( $n = 40$ ) und Pyramidenzellen der Lamina Vb ( $n = 50$ ) konnten durch Photostimulation keine Aktionspotentiale in Feldern ausgelöst werden, die mehr als 100  $\mu\text{m}$  vom abgeleiteten Soma entfernt waren. Neben den bedornten Neuronen der Lamina IV und den Pyramidenzellen der Lamina Vb wurden auch inhibitorische Neuronen der Laminae IV ( $n = 3$ ) und Vb ( $n = 4$ ) sowie exzitatorische Neuronen der Laminae II/III ( $n = 5$ ), Va ( $n = 6$ ) und VI ( $n = 3$ ) getestet. Bei keiner dieser Zellen konnte Photostimulation Aktionspotentiale in Feldern auslösen, die mehr als 100  $\mu\text{m}$  vom Soma entfernt waren. In 2 der 5 Pyramidenzellen der Lamina II/III konnten in keinem der stimulierten Felder Aktionspotentiale ausgelöst werden.

### **3.3.2.4 Kartierung von photolyseinduzierter Aktivität**

Vor Beginn jeder Kartographie wurde unter Sichtkontrolle die Fokusebene an die Tiefe des abgeleiteten Neurons im Hirnschnitt (~50-80  $\mu\text{m}$ ) angeglichen. Mit jedem Blitz-Stimulus wurde simultan das Membranpotential der Zelle aufgezeichnet. Für die topographische Erfassung der photolyseinduzierten Aktivitäten wurde alle 10 s das stimulierte Feld um 50  $\mu\text{m}$  verschoben. Auf diese Weise wurden meanderartig lückenlos bis zu 500 Felder in einem Areal untersucht, das mindestens zwei funktionelle Kolumnen und alle sechs kortikalen Schichten umfasste (Abbildung 8C). Um Kollisionen zwischen der Ableitelektrode und dem Objektiv zu vermeiden, wurden die Kartierungen so

durchgeführt, dass in horizontaler Richtung vom Soma ausgehend nur 2 Felder zur Ableitelektrode hin und 12 Felder von der Ableitelektrode weg stimuliert wurden. Die Erfassung der räumlichen Verteilung photolyseinduzierter direkter Aktivität in den abgeleiteten Zellen wurde bei  $V_{\text{rmp}}$  in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$ -ACSF durchgeführt. Synaptische Eingänge auf die abgeleiteten Zellen wurden in normalem ACSF kartiert. Um hyperpolarisierende inhibitorische Eingänge sichtbar zu machen, wurde hierbei die Zelle in der Strom-Klemme auf ein Membranpotential von  $-60$  mV depolarisiert. Die intrinsischen Membraneigenschaften der Zellen wurden vor und nach den Kartierungen kontrolliert.

### 3.4 Datenerfassung und Analyse

#### 3.4.1 Histologische Aufbereitung und Rekonstruktion

Nach Abschluss der elektrophysiologischen Ableitungen wurden die Hirnschnitte bei kleiner Vergrößerung und mit positionierter Stimulations- und *Patch*-Elektrode in der Badkammer fotografiert, um die Topographie der *Barrels*, der zugeordneten funktionellen Kolumnen und der Laminae zu dokumentieren. Die Schnitte mit den Biocytin gefüllten Zellen wurden nach Abziehen der *Patch*-Elektrode für mindestens 24 h bei  $4^{\circ}$  C in Paraformaldehyd fixiert (4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphat-Puffer). Nach der Fixierung wurden die Schnitte in Phosphatpuffer inkubiert.

Die Prozessierung der Hirnschnitte und die Visualisierung der mit Biocytin gefüllten Zellen wurde weitgehend nach einem von Angulo et al. (1999) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Hierbei wurden die Schnitte nach Blockierung von endogenen Peroxidasen (1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Phosphatpuffer) extensiv mit Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden die Schnitte zunächst für 1 h in einem Gefrierschutzmittel (30% Saccharose in Phosphatpuffer) inkubiert und anschließend in dreimaligem Zyklus über flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Nach mehrmaligem Waschen in Phosphatpuffer wurden die Schnitte über Nacht bei  $4^{\circ}$  C mit Streptavidin gekoppelter Peroxidase (ABC Reagenz, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Nach Vorinkubation (10 min) in 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) wurde mit 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Peroxidasereaktion gestartet. Die Reaktion wurde durch Waschen in Phosphatpuffer gestoppt und die Schnitte in einem Vibratom auf  $\sim 100$   $\mu\text{m}$  Dicke geschnitten. Für die Kontrastierung der *Barrels* wurde nachfolgend eine Färbung für Cytochromoxidase, einem mitochondrialen Enzym, durchgeführt (Petersen und Sakmann,

2000; Wong-Riley et al., 1978). Die Schnitte wurden dafür 4-10 h bei 39 °C in 0,6 mg/ml DAB, 0,5 mg/ml Cytochrom C und 3% Catalase (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) im Wasserbad inkubiert. Die Färbungen wurden dann mit 1% OsO<sub>4</sub> (in Phosphatpuffer) für 1 h intensiviert und die Schnitte in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen einschließlich einer Kontrastierung (45 min in 1% Uranylacetat in 70% Ethanol) dehydriert. Nach Immersion in Propylenoxid wurden die Schnitte als Serie in Durcupan ACM (Fluka, Buchs, Schweiz) eingebettet. Die eingebetteten Schnitte wurden mit einem Mikroskop (Nikon Eclipse 800 Nikon, Ratingen) untersucht und die angefärbten Neuronen über ein angekoppeltes Computersystem (NeuroLucida; MicroBrightfield Europe, Magdeburg) 3-dimensional somatodendritisch rekonstruiert und morphologisch analysiert. Ein Vergleich von Landmarken im histologisch aufbereiteten Hirnschnitt mit Landmarken im lebenden Hirnschnitt ermöglichte eine topographisch korrekte Überlagerung der beiden Fotografien mit der jeweiligen rekonstruierten Zelle unter Verwendung von Standard-Graphik-Software (Corel 10, Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

### 3.4.2 Morphologische Klassifizierung

Vor jeder elektrophysiologischen Ableitung wurden die Neuronen im lichtmikroskopischen Bild anhand der Somaform und abgehender primärer Dendriten soweit möglich voridentifiziert. Während die jeweilige Zellklasse bei den Pyramidenzellen der Lamina Vb hierdurch schon vor Beginn des Experiments relativ zuverlässig bestimmt werden konnte, gab bei den bedornten Neuronen der Lamina IV oft erst die Morphologie der angefärbten Zelle im histologisch aufbereiteten Hirnschnitt Auskunft auf die jeweilige Zellklasse.

Basierend auf den 3-dimensionalen somatodendritischen Rekonstruktionen wurden die Neuronenklassen entsprechend folgender Parameter miteinander verglichen: Somafläche, Anzahl der primären Dendriten, maximaler Durchmesser der primären nicht-apikalen Dendriten, Gesamtlänge aller Dendriten, Gesamtzahl aller dendritischen Enden, Länge des apikalen Dendriten, Anzahl der Enden des apikalen Dendriten und der maximale Durchmesser des apikalen Dendritenstammes. Weiterhin wurden als nicht-numerische Eigenschaften der Neuronen die Form des Somas und die räumliche Organisation der Dendriten verglichen. Die morphologischen Daten wurden hierbei nicht bezüglich der Gewebeschrumpfung im histologisch aufbereiteten Schnitt korrigiert.

### 3.4.3 Elektrophysiologische Charakterisierung der Neuronen

Die Neuronen wurden sowohl anhand ihrer passiven und aktiven intrinsischen Membraneigenschaften als auch anhand ihrer synaptischen Eingänge nach elektrischer orthodromer Stimulation charakterisiert. Alle Membranpotentialwerte wurden für Grenzflächenpotentiale korrigiert. Die Grenzflächenpotentiale wurden nach Barry (1994) durch theoretische, computergestützte Berechnungen ermittelt (JPCalc, P.H. Barry, Wellesley Hills, USA) und betragen unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen sowie der verwendeten Versuchslösungen ungefähr 10 mV. Alle gemessenen Membranpotentialwerte wurden dementsprechend um -10 mV nach unten korrigiert. Als passive intrinsische Membraneigenschaften wurden das Ruhemembranpotential ( $V_{\text{rmp}}$ ), die Membranzeitkonstante ( $\tau_m$ ) und der Membranwiderstand ( $R_m$ ) ermittelt. Für die Bestimmung von  $\tau_m$  und  $R_m$  wurde dabei das Membranpotential bei Applikation von unterschwellig depolarisierenden und hyperpolarisierenden Strompulsen mit einer Dauer von 200 ms ausgewertet. Als aktive intrinsische Membraneigenschaften wurden das Aktionspotentialfeuermuster und die Intervalle zwischen dem ersten und dem zweiten ausgelösten Aktionspotential (*1st Interspike Interval* = 1.ISI) sowie zwischen dem zweiten und dem dritten Aktionspotential (*2nd Interspike Interval* = 2.ISI) bei der Injektion unterschiedlich starker, überschwelliger Strompulse mit einer Dauer von 1s ausgewertet.

Zur Bestimmung der synaptischen Antworten nach orthodromer Stimulation wurden zwei unterschiedliche Stimulationsprotokolle verwendet. Bei beiden Protokollen wurden über die bipolare Stimulationselektrode Spannungspulse mit einer Pulsdauer von 200  $\mu\text{s}$  bei 0,1 Hz eingesetzt. Zunächst wurde am  $V_{\text{rmp}}$  die Stimulationsstärke so lange in Stufen erhöht, bis die ausgelösten exzitatorischen Eingänge den Schwellenwert erreichten und die abgeleitete Zelle ein oder mehrere Aktionspotentiale generierte. Danach wurde bei unterschiedlichen hyper- und depolarisierenden Haltepotentialen im *Current-Clamp* mit einer Spannung, die die zum Erreichen des Schwellenwertes benötigte Spannung um Faktor 2 übertraf, orthodrom stimuliert. Vor jeder orthodromen Stimulation wurde der abgeleiteten Zelle über den Verstärker für 100 ms ein Strompuls appliziert, um die Qualität der *Patch*-Ableitung gerade bei starker Strominjektion zu kontrollieren.

### 3.4.4 Analyse photolyseinduzierter Aktivität

#### 3.4.4.1 Unterscheidung von photolyseinduzierter neuronaler Aktivität und Spontanaktivität

Die in den abgeleiteten Neuronen beobachtete Spontanaktivität erforderte Kriterien, die eine eindeutige Identifikation der durch fokale Photolyse von *Caged*-Glutamat induzierten neuronalen Aktivität ermöglichte. Spontanereignisse bei bedornten Neuronen in Lamina IV waren nicht nur zahlreicher (Anzahl EPSP/s =  $30 \pm 9$ ; n = 18), sondern in ihrer Amplitude auch größer (maximale Amplitude EPSP =  $1,4 \pm 0,4$  mV; n = 18) als bei den Pyramidenzellen der Lamina Vb (Anzahl EPSP/s =  $7 \pm 4$ ; maximale Amplitude EPSP =  $0,3 \pm 0,1$  mV; n = 11; Abbildung 13A). Aufgrund der unterschiedlich starken Spontanaktivität in Neuronen der Lamina IV und Neuronen der Lamina Vb wurden unterschiedliche Kriterien zur Identifikation der photolyseinduzierten Aktivität erstellt.

Wie bereits oben erwähnt, war in bedornten Neuronen der Lamina IV die registrierte Spontanaktivität relativ stark (Feldmeyer et al., 1999). So wurde in den meisten Lamina IV Neuronen eine Vielzahl von einzelnen oder auch summierten spontanen EPSPs mit Einzelamplituden von bis zu 2 mV registriert. Um eine Fehlinterpretation dieser spontanen Aktivität als photolyseinduzierte Aktivität zu vermeiden, wurde für jede Zelle ein individueller Schwellenwert ermittelt, der die maximale Spontanaktivität in einem gegebenen Zeitintervall reflektierte. Hierbei wurde in Kontrollregistrierungen ohne vorausgegangene Photostimulation das Integral aller spontanen depolarisierenden Ereignisse innerhalb eines Zeitfensters von 150 ms ermittelt (Abbildung 13B1). Dieses Zeitfenster entspricht dem Zeitfenster von 150 ms *post Stimulus*, das auch für alle nachfolgenden Analysen der photolyseinduzierten Aktivität verwendet wurde (Abbildung 13B2). Für jede Zelle wurde das maximale Integral aus 20 solcher Kontrollregistrierungen bestimmt und als Schwellenwert für nicht photolyseinduzierte Aktivität definiert (Abbildung 13C). Die Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen wie während der Photostimulationsversuche durchgeführt, das heißt bei gleichem Membranpotential und in ACSF mit *Caged*-Glutamat.

In Pyramidenzellen der Lamina Vb wurden spontane EPSPs nicht nur relativ selten registriert, sie waren auch in ihren Amplituden in der überwiegenden Mehrheit kleiner als 0,2 mV (Abbildung 13A). Aus diesem Grund war es in Lamina Vb Pyramidenzellen für die Identifikation photolyseinduzierter Aktivität ausreichend, alle Ereignisse mit

Amplituden unter 0,2 mV als nicht photolyseinduzierte Aktivität zu definieren und von einer weiteren Analyse auszuschließen.

Wie bereits erwähnt, war hyperpolarisierende, also inhibitorische Spontanaktivität äußerst selten, daher konnten sich die Betrachtungen auf depolarisierende, exzitatorische Ereignisse beschränken.

#### **3.4.4.2 Auswertung der topographischen Karten**

Es wurden topographische Karten photolyseinduzierter Aktivität sowohl für Experimente in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$ -ACSF als auch in normalem ACSF erstellt. Für die Analyse photolyseinduzierter Aktivität wurde für jeden Stimulationsort, bzw. bei der korrelierenden Membranpotentialregistrierung, ein Zeitfenster von 150 ms *post Stimulus* betrachtet und ausgewertet.

Die in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$ -ACSF photolyseinduzierte Aktivität wurde hierbei bezüglich der (i) Amplitude, (ii) Latenz zwischen Stimulus und Beginn der Aktivität und (iii) der Integralwerte der induzierten Depolarisationen analysiert und graphisch dargestellt. Außerdem wurden Stimulationsorte, in denen Aktionspotentiale generiert wurden, erfasst.

Für topographische Karten der in normalem ACSF durchgeführten Experimente wurde zwischen photolyseinduzierter direkter Aktivität, also Depolarisationen, die durch die Aktivierung von nicht notwendigerweise synaptischen Glutamatrezeptoren in der Membran des abgeleiteten Neurons ausgelöst werden, und photolyseinduzierter synaptisch vermittelter Aktivität unterschieden. Diese Unterscheidung konnte aufgrund der unterschiedlichen Latenzen zwischen Stimulus und Beginn der Aktivität durchgeführt werden. Photolyseinduzierte synaptisch vermittelte Aktivität wurde bezüglich (i) der Latenz zwischen Stimulus und Beginn der Aktivität, (ii) der maximalen Amplitude exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSPs), (iii) des Gesamtintegrals aller EPSPs innerhalb des Zeitfensters von 150 ms und (iv) dem Auftreten von inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSPs) analysiert. Die Bestimmung der Integralwerte umfasste dabei alle depolarisierenden Ereignisse innerhalb des analysierten Zeitfensters von 150 ms *post Stimulus* und gab Auskunft über die Stärke der ausgelösten exzitatorischen Aktivität. Alle Integralwerte exzitatorischer synaptischer Aktivität wurden um den für jede Zelle bestimmten Schwellenwert für nicht photolyseinduzierte Aktivität

nach unten korrigiert. Wurden durch Photostimulation sowohl direkte als auch synaptische Aktivität ausgelöst, dann wurde bei der Bestimmung des Integralwertes für exzitatorische synaptische Aktivität die direkte Aktivität ausgeschlossen.

In Kontrollexperimenten, in denen einzelne perisomatische Felder repetitiv überschwellig stimuliert wurden, wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Parametern auch die Latenz zwischen Stimulus und Aktionspotential-Schwelle erfasst.

Die analysierten Aktivitätsparameter wurden in Falschfarbenwerte transformiert (Origin 6.0; Microcal Software Inc, Northampton, USA). Die daraus konstruierten Karten wurden anschließend den jeweiligen nativen Hirnschnittfotografien überlagert. Als Landmarken zur korrekten Überlagerung dienten dafür die Position der *Patch*-Elektroden spitze, bzw. des abgeleiteten Somas, und die während des Experimentes für stimulierte Felder notierten morphologischen Auffälligkeiten im Hirnschnitt, wie Kapillaren oder die piale Schnittoberfläche.

Für die quantitative Analyse dieser Karten, also der Erfassung der räumlichen Verteilung synaptischer Eingänge auf den untersuchten Neuronen, wurde für jede Lamina, getrennt für intra- und transkolumnäre Bereiche, der durchschnittliche Prozentsatz der Felder bestimmt, in denen Photostimulation exzitatorische oder inhibitorische Eingänge auslösen konnte. Alle Registrierungen ohne detektierbare photolyseinduzierte Aktivität wurden von der Quantifizierung ausgenommen. Weiterhin wurden Registrierungen ausgenommen, in denen die EPSPs von starker direkter Aktivität oder Aktionspotential-generierung so stark überlagert wurden, dass eine Bestimmung des Integrals nicht mehr möglich war. In den meisten Karten betraf dies nur 1 bis 2 Registrierungen im perisomatischen Bereich.

Die statistischen Analysen wurden mittels *repeated measures* ANOVA mit *post hoc* paarweisen Vergleichen (korrigiert für Bonferroni) und ungepaarten *2-tailed Student's T-Test* durchgeführt (SPSS 9, SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung exzitatorischer Neuronen in Lamina IV und V

#### 4.1.1 Bedornte Neuronen der Lamina IV

Wie einleitend bereits beschrieben, konnten die bedornten Neuronen der Lamina IV morphologisch in 2 Hauptzellklassen unterteilt werden: (i) die bedornten Sternzellen (Feldmeyer et al., 1999; Lund, 1984; Simons und Woolsey, 1984; Woolsey et al., 1975) und (ii) die Pyramidenzellen (Lund, 1984; Simons und Woolsey, 1984). Letztere Zellklasse konnte weiter in Sternpyramidenzellen und „echte“ Pyramidenzellen differenziert werden (Jones, 1975; Staiger et al., 2002). Alle abgeleiteten Neuronen waren innerhalb eines *Barrels* lokalisiert; Zellen in den Septen zwischen den *Barrels* in Lamina IV wurden in dieser Studie nicht untersucht. Die Anzahl der abgeleiteten Neuronen einer Klasse war nicht repräsentativ für die relative Häufigkeit in Lamina IV, da in einer fortgeschrittenen Phase der Studie gezielt nur Sternpyramiden- und „echte“ Pyramidenzellen abgeleitet wurden. Nur Zellen mit einem stabilen Ruhemembranpotential ( $V_{\text{rmp}}$ ) negativer als -60 mV wurden in die Analyse aufgenommen.

##### 4.1.1.1 Morphologie bedornter Neuronen in Lamina IV

Die unterschiedlichen Klassen bedornter Neuronen der Lamina IV wurden durch ihre spezifischen morphologischen Eigenschaften in der 3-dimensionalen somatodendritischen NeuroLucida-Rekonstruktion definiert. Eine Zusammenfassung der spezifischen morphologischen Eigenschaften der bedornten Neuronen ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

**Tabelle 3: Morphologische Eigenschaften von bedornten Neuronen in Lamina IV**

	Bedornete Sternzelle (n = 17)	Sternpyramidenzelle (n = 5)	„Echte“ Pyramidenzelle (n = 6)
Soma Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	172 $\pm$ 35	185 $\pm$ 64	155 $\pm$ 41
Anzahl primärer Dendriten	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
Anzahl dendritischer Endigungen	23 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3	23 $\pm$ 6
Gesamtlänge aller Dendriten [ $\mu\text{m}$ ]	1992 $\pm$ 371	2634 $\pm$ 710	2369 $\pm$ 808
Maximaler Durchmesser nicht-apikaler primärer Dendriten [ $\mu\text{m}$ ]	2,6 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,8
Räumliche Organisation nicht-apikaler primärer Dendriten	eher sphärisch, auf <i>Barrel</i> beschränkt	eher sphärisch, auf <i>Barrel</i> beschränkt	polarisiert, nicht auf <i>Barrel</i> beschränkt
Gesamtlänge apikaler Dendrit [ $\mu\text{m}$ ]	-	845 $\pm$ 197	977 $\pm$ 505
Anzahl Endigungen apikaler Dendrit	-	5 $\pm$ 2	8 $\pm$ 3
Maximaler Durchmesser apikaler Dendrit [ $\mu\text{m}$ ]	-	2,3 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3

Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die Werte für die Anzahl primärer Dendriten sowie die Gesamtlänge aller Dendriten schließt, wenn vorhanden, den apikalen Dendriten mit ein.

#### 4.1.1.1 Morphologie bedornter Sternzellen

Bedornete Sternzellen besaßen von allen in dieser Studie untersuchten Neuronen die räumlich kleinste Ausdehnung der Dendritenbäume. Die strikte räumliche Beschränkung des Dendritenbaumes auf die Dimensionen eines *Barrels* in Lamina IV und das Fehlen eines apikalen Dendriten waren die morphologischen Hauptmerkmale der bedornten Sternzellen (Abbildung 14A). Das rundliche Soma der bedornten Sternzellen war mit einer durchschnittlichen Fläche von  $172 \pm 35 \mu\text{m}^2$  (n = 17) relativ klein. Aus dem Soma traten zwischen 2 und 9 primäre Dendriten aus, die an ihrer Basis einen Durchmesser von  $2,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$  hatten und sich früh in mehrere Dendriten höherer Ordnung verzweigten. Der resultierende Dendritenbaum war mit durchschnittlich  $23 \pm 4$  Endigungen und einer Gesamtlänge von  $1992 \pm 371 \mu\text{m}$  reich verzweigt. Je nach Lage des Somas innerhalb des *Barrels* war der Dendritenbaum entweder sphärisch und weitgehend symmetrisch um das Soma angeordnet, oder, bei Somata im Randbereich des *Barrels*, asymmetrisch orientiert.

#### 4.1.1.1.2 Morphologie der Pyramidenzellen

Sternpyramidenzellen und „echte“ Pyramidenzellen waren in den meisten ihrer somatodendritischen Eigenschaften vergleichbar. Morphologisches Hauptmerkmal aller Pyramidenzellen war ein apikaler Dendrit, der das *Barrel* in Richtung der supragranulären Schichten verließ (Abbildung 14B). Die rundlichen bis pyramidalen Somata der Pyramidenzellen waren wie die der bedornten Sternzellen relativ klein (Somafläche Sternpyramidenzellen:  $185 \pm 64 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 5$ ; „echte“ Pyramidenzellen:  $155 \pm 41 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 6$ ). Aus dem oberen Pol des Soma trat ein an seiner Basis relativ dünner (Sternpyramidenzellen:  $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ; „echte“ Pyramidenzellen:  $2,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) und mit maximal 12 Endigungen nur wenig verzweigter apikaler Dendrit aus. Der apikale Dendrit konnte mit Längen von  $250 \mu\text{m}$  bis  $1750 \mu\text{m}$  besonders bei „echten“ Pyramidenzellen sehr unterschiedlich entwickelt sein (Gesamtlänge apikaler Dendrit Sternpyramidenzellen:  $845 \pm 197 \mu\text{m}$ ; „echte“ Pyramidenzellen:  $977 \pm 505 \mu\text{m}$ ). Während bei einigen Zellen der apikale Dendrit bereits in Lamina III endete, erreichte er in anderen die piale Oberfläche, aber stets ohne ein terminales Dendritenbüschel zu formen. Außer dem apikalen Dendriten traten aus dem Soma der Pyramidenzellen zwischen 2 und 5 nicht-apikale, primäre Dendriten aus. Diese nicht-apikalen Dendriten, die hinsichtlich ihres maximalen Durchmesser mit den primären Dendriten der bedornten Sternzellen vergleichbar waren (Sternpyramidenzellen:  $2,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ; „echte“ Pyramidenzellen:  $2,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ), verzweigten sich früh in mehrere Dendriten höherer Ordnung.

Die räumliche Organisation der nicht-apikalen Dendriten stellte hierbei den maßgeblichen Unterschied zwischen den somatodendritischen Eigenschaften von Sternpyramidenzellen und „echten“ Pyramidenzellen dar. Bei den Sternpyramidenzellen waren die nicht-apikalen Dendriten mehr oder weniger sphärisch um das Soma angeordnet und blieben auf das *Barrel* beschränkt. Bei den „echten“ Pyramidenzellen hingegen waren die nicht-apikalen Dendriten polarisiert angeordnet und formten eine „Schürze“ von basalen Dendriten, die auch aus dem eigenen *Barrel* herausragten. Insgesamt gesehen waren jedoch, apikale Dendriten mit eingeschlossen, Gesamtzahl der dendritischen Endigungen (Sternpyramidenzellen:  $23 \pm 3$ ; „echte“ Pyramidenzellen  $23 \pm 6$ ) als auch Gesamtlänge aller Dendriten (Sternpyramidenzellen:  $2634 \pm 710 \mu\text{m}$ ; „echte“ Pyramidenzellen:  $2369 \pm 808 \mu\text{m}$ ;) bei beiden Typen von Pyramidenzellen wiederum vergleichbar. Demnach fanden sich bei Sternpyramidenzellen und „echten“ Pyramidenzellen in den numerischen somatodendritischen Eigenschaften keine signifikanten Unterschiede.

#### **4.1.1.2 Elektrophysiologie bedornter Neuronen in Lamina IV**

Für die Charakterisierung der passiven intrinsischen Membraneigenschaften der abgeleiteten Neuronen wurden das Ruhemembranpotential ( $V_{\text{rmp}}$ ), der Membranwiderstand ( $R_m$ ) sowie die Membranzeitkonstante ( $\tau_m$ ) analysiert. Eine Zusammenfassung dieser Membraneigenschaften ist Tabelle 4 zu entnehmen. Hinsichtlich der passiven intrinsischen Membraneigenschaften zeigten sich zwischen bedornten Sternzellen, Sternpyramidenzellen und „echten“ Pyramidenzellen der Lamina IV keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt hatten bedornte Neuronen der Lamina IV ein durchschnittliches Ruhemembranpotential von  $-75,6 \pm 4,1$  mV, einen Membranwiderstand von  $186 \pm 63$  M $\Omega$  und eine Membranzeitkonstante von  $17,3 \pm 5,5$  ms ( $n = 47$ ). Die Analyse der aktiven intrinsischen Membraneigenschaften ergab jedoch bei den bedornten Neuronen der Lamina IV zwei unterschiedliche Aktionspotential-Antwortmuster.

**Tabelle 4: Intrinsische elektrophysiologische Eigenschaften von bedornten Neuronen in Lamina IV**

	Bedornzte Sternzelle (n = 29)	Sternpyramidenzelle (n = 8)	„Echte“ Pyramidenzelle (n = 10)	Gesamt (n = 47)	
Passive intrinsische Eigenschaften					
$V_{mp}$ [mV]	$-76,4 \pm 4,0$	$-72,5 \pm 2,4$	$-75,9 \pm 4,5$	$-75,6 \pm 4,1$	
$R_m$ [M $\Omega$ ]	$194 \pm 65$	$175 \pm 75$	$170 \pm 50$	$186 \pm 63$	
$\tau_m$ [ms]	$17,2 \pm 5,7$	$18,7 \pm 6,4$	$16,6 \pm 4,4$	$17,3 \pm 5,5$	
Aktive intrinsische Eigenschaften					
AP Feuermuster	13 RS / 16 IB	5 RS / 3 IB	3 RS / 7 IB	21 RS / 26 IB	
Schwache Stimulation	RS 1.ISI [ms]	$75,2 \pm 35,3^{**}$	$79,6 \pm 31,9^{**}$	$74,0 \pm 39,0^{**}$	$76,2 \pm 33,0^{**}$
	2.ISI [ms]	$100,7 \pm 34,5$	$117,7 \pm 58,7$	$74,0 \pm 19,8$	$100,5 \pm 38,1$
	IB 1.ISI [ms]	$8,3 \pm 1,4$	$8,9 \pm 1,4$	$7,6 \pm 1,4$	$8,2 \pm 1,4$
	2.ISI [ms]	$113,9 \pm 75,5$	$72,5 \pm 29,0$	$42,2 \pm 35$	$86,3 \pm 67,5$
Starke Stimulation	RS 1.ISI [ms]	$20,8 \pm 12,4^{**}$	$27,4 \pm 2,3^{**}$	$24,0 \pm 7,0^{**}$	$22,9 \pm 10,1^{**}$
	2.ISI [ms]	$50,8 \pm 10,8^{**}$	$53,6 \pm 14,4^{**}$	$43,3 \pm 6,0^{**}$	$50,4 \pm 11,2^{**}$
	IB 1.ISI [ms]	$6,7 \pm 0,8$	$7,0 \pm 0,2$	$6,8 \pm 1,2$	$6,8 \pm 0,9$
	2.ISI [ms]	$13,0 \pm 4,2$	$15,0 \pm 2,8$	$16,0 \pm 13,0$	$14,1 \pm 7,4$

Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Als passive intrinsische Eigenschaften sind in der Tabelle Ruhemembranpotential ( $V_{mp}$ ), Membranwiderstand ( $R_m$ ) und Membranzeitkonstante ( $t_m$ ) für die einzelnen Zelltypen sowie für die Gesamtheit bedornter Neuronen in Lamina IV dargestellt. Als aktive intrinsische Eigenschaften sind das Aktionspotential (AP)-Feuermuster bei depolarisierender Strominjektion und das Zeitintervall zwischen dem ersten und zweiten Aktionspotential (1.ISI), bzw. dem zweiten und dritten Aktionspotential (2.ISI) bei Injektion gerade überschwellig (schwache Stimulation) und deutlich überschwellig depolarisierender Strompulse (starke Stimulation) dargestellt. Die Sternchen markieren innerhalb der Neuronenklassen und in der Gesamtpopulation bedornter Neuronen signifikante Unterschiede zwischen den beiden AP-Feuermustern bei vergleichbaren Stimulationsbedingungen (\*\* =  $p < 0,01$ ).

Für die Charakterisierung der aktiven intrinsischen Eigenschaften der bedornten Neuronen wurde das Aktionspotential-Antwortmuster der Zellen während der Injektion von depolarisierenden Strompulsen untersucht (Tabelle 4). Innerhalb der morphologischen Klassen waren die Aktionspotential-Antwortmuster heterogen. In Übereinstimmung mit früheren Studien (Chagnac-Amitai und Connors, 1989b; Feldmeyer et al., 1999) fanden sich sowohl bei bedornten Sternzellen, bei Sternpyramidenzellen als auch bei „echten“ Pyramidenzellen regelmäßig feuernde (*regular spiking* = RS) Zellen (n = 21). Bei diesen RS-Pyramidenzellen löste die Injektion eines überschwellig depolarisierenden Strompulses eine regelmäßige Sequenz von Einzelaktionspotentialen aus (Abbildung 15). In etwa 50 %

der RS-Pyramidenzellen folgte den einzelnen Aktionspotentialen ein schwaches depolarisierendes Nachpotential (Abbildung 15A). Gerade überschwellige Depolarisation löste während des Reizes (1 s) 2 bis 6 einzelne Aktionspotentiale aus. Das Intervall zwischen dem ersten und dem zweiten Aktionspotential (*1st Interspike Interval* = 1.ISI) lag hierbei bei durchschnittlich  $76,2 \pm 33,0$  ms ( $n = 21$ ), das Intervall zwischen dem zweiten und dem dritten Aktionspotential (2.ISI) bei  $100,5 \pm 38,1$  ms. Bei stärkerer Depolarisation erhöhte sich die Anzahl der ausgelösten Aktionspotentiale. Das 1.ISI verkürzte sich hierbei zwar auf durchschnittlich  $22,9 \pm 10,1$  ms, war aber niemals kürzer als 10 ms, während das 2.ISI durchschnittlich noch  $50,4 \pm 11,2$  ms dauerte. In 5 der 21 RS-Pyramidenzellen stellte sich nach einer initialen Frequenzadaptation eine relativ konstante Aktionspotential-Feuerrate ein (Abbildung 15B1). In den übrigen 10 RS-Pyramidenzellen dauerte die Frequenzadaptation für die Dauer des depolarisierenden Strompulses an (Abbildung 15B2).

Die übrigen 26 untersuchten bedornten Neuronen in Lamina IV zeigten das Feuermuster intrinsisch Aktionspotentialsalven feuernder (*intrinsically bursting* = IB) Zellen (Chagnac-Amitai und Connors, 1989b; Connors und Gutnick, 1990; Abbildung 16). Bei diesen IB-Pyramidenzellen löste die Injektion eines depolarisierenden Strompulses initial eine hochfrequente Salve von Aktionspotentialen aus. Depolarisationen, die gerade den Schwellenwert überschritten, lösten jeweils eine Salve von 2 bis 3 Aktionspotentialen aus, die auf einem ausgeprägten depolarisierenden Nachpotential aufsattelten (Abbildung 16A). Das durchschnittliche 1.ISI war unter vergleichbaren Bedingungen signifikant kürzer als bei RS-Pyramidenzellen und betrug hierbei  $8,2 \pm 1,4$  ms ( $p < 0,01$ ;  $n = 26$ ). Das 2.ISI zeigte mit  $86,3 \pm 67,5$  ms eine hohe Variabilität. Grund hierfür war, dass, wie bereits beschrieben, die initiale hochfrequente Aktionspotentialsalve bei schwacher Depolarisation oftmals aus nur 2 Aktionspotentialen bestand. Stärkere Depolarisationen lösten jeweils eine Salve von 3 bis 4 Aktionspotentialen aus. Das durchschnittliche 1.ISI verkürzte sich hierbei auf  $6,8 \pm 0,9$  ms, das 2.ISI auf  $14,1 \pm 7,4$  ms. Sowohl das 1.ISI als auch das 2.ISI waren damit signifikant kürzer als bei RS-Pyramidenzellen bei vergleichbarer Stimulationsstärke ( $p < 0,01$ ). Das Feuern von repetitiven Aktionspotentialsalven konnte in keiner der IB-Pyramidenzellen beobachtet werden. Die der initialen Salve folgenden Sequenzen von Einzelaktionspotentialen zeigten in 8 der 26 Zellen kaum eine Frequenzadaptation (Abbildung 16B1), während bei den übrigen IB-Pyramidenzellen zum Teil sehr starke Frequenzadaptation auftrat (Abbildung 16B2).

Neben den intrinsischen Eigenschaften der bedornten Neuronen wurden auch die synaptischen Eingänge nach elektrischer, orthodromer Stimulation ausgewertet (Tabelle 5). Hierbei wurde die Stimulation entweder (i) am Ruhemembranpotential bei variabler Stimulationsstärke oder (ii) bei unterschiedlichen Haltepotentialen (von  $-90$  bis  $-50$  mV) bei starker aber konstanter orthodromer Stimulation durchgeführt. Wie die passiven intrinsischen Eigenschaften, waren die Antworten auf orthodrome Stimulation bei bedornten Sternzellen, Sternpyramidenzellen und „echten“ Pyramidenzellen vergleichbar. Schwache orthodrome Stimulation löste in allen bedornten Neuronen mit einer kurzen Latenz von  $1,8 \pm 0,6$  ms ( $n = 26$ ) ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) aus. Eine Verstärkung der orthodromen Stimulation führte bei relativ konstanten Latenzen zu größeren EPSP Amplituden, die schließlich den Schwellenwert zur Aktionspotentialgenerierung erreichten. Entsprechend den aktiven intrinsischen Membraneigenschaften löste die Stimulation ein einzelnes Aktionspotential (Abbildung 15C-D) oder eine Salve von 2 bis 3 Aktionspotentialen aus (Abbildung 16C-D). In fast allen bedornten Neuronen (25 von 26) folgte bei starker orthodromer Stimulation dem initialen EPSP ein schnelles inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) mit einer Latenz von  $7,1 \pm 2,3$  ms *post Stimulus* und mit einem Umkehrpotential von  $-71,7 \pm 1,7$  mV (Abbildung 15D, 16D). In 12 der 26 bedornten Neuronen folgte dem schnellen IPSP mit einer Latenz von  $87,3 \pm 14,1$  ms *post Stimulus* noch ein langsames IPSP mit einem Umkehrpotential von  $-85,3 \pm 3,8$  mV. Gemäß früherer Befunde (Hefti und Smith, 2000) ist das schnelle IPSP mit seinem etwas positiveren Umkehrpotential vermutlich GABA<sub>A</sub>, das langsame IPSP mit seinem negativeren Umkehrpotential GABA<sub>B</sub> vermittelt.

Insgesamt zeigten die unterschiedlichen Klassen exzitatorischer bedornter Neuronen der Lamina IV keine signifikante Korrelation zwischen ihren morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften (Connors et al., 1982).

**Tabelle 5: Synaptische Eingänge auf bedornte Neuronen in Lamina IV nach orthodromer Stimulation**

	Bedornte Sternzelle (n = 18)	Sternpyramidenzelle (n = 4)	„Echte“ Pyramidenzelle (n = 4)	Gesamt (n = 26)
Induziertes EPSP	18 Zellen	4 Zellen	4 Zellen	26 Zellen
Induziertes schnelles IPSP	18 Zellen	4 Zellen	3 Zellen	25 Zellen
Induziertes langsames IPSP	7 Zellen	4 Zellen	2 Zellen	12 Zellen
Latenz EPSP [ms]	1,7 ± 0,6	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,5
Latenz schnelles IPSP [ms]	7,6 ± 2,2	5,1 ± 1,3	6,1 ± 2,5	7,1 ± 2,3
Latenz langsames IPSP [ms]	94,0 ± 16,3	80,3 ± 3,2	77,5 ± 3,5	87,3 ±
V <sub>UMK</sub> schnelles IPSP [mV]	-71,6 ± 1,9	-71,5 ± 0,5	-72,0 ± 1,0	-71,7 ± 1,7
V <sub>UMK</sub> langsames IPSP [mV]	-84,1 ± 3,6	-87,0 ± 5,3	-87,0 ± 1,4	-85,3 ± 3,8

Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Latenzen sind das Zeitintervall zwischen Stimulus und Aktivitätsbeginn. V<sub>UMK</sub> = Umkehrpotential.

## 4.1.2 Pyramidenzellen der Lamina Vb

Im Gegensatz zu den bedornten Neuronen der Lamina IV korrelierten bei exzitatorischen Neuronen der Lamina Vb Morphologie und die aktiven elektrophysiologischen Eigenschaften. Wie in vorhergehenden Studien bereits gezeigt wurde, können Pyramidenzellen der Lamina Vb in IB-Pyramidenzellen und RS-Pyramidenzellen unterteilt werden (Amitai, 1994; Chagnac-Amitai et al., 1990; Connors et al., 1982; Hefti und Smith, 2000; Larkman und Mason, 1990; Mason und Larkman, 1990; Williams und Stuart, 1999). Es wurden insgesamt 55 Pyramidenzellen in der Lamina Vb untersucht. Anhand ihrer morphologischen und elektrophysiologischen Charakteristika wurden 27 der 55 Pyramidenzellen als IB-Pyramidenzellen identifiziert, während die übrigen 28 Neuronen der Klasse der RS-Pyramidenzellen zugeordnet wurden. Nur Zellen mit einem stabilen Ruhemembranpotential negativer als -60 mV wurden in die Analyse aufgenommen.

### 4.1.2.1 Morphologie der Pyramidenzellen der Lamina Vb

Die Pyramidenzellen in der Lamina Vb gehören zu den Neuronen mit den größten Dendritenbäumen im Kortex. Alle somatodendritisch komplett erhaltenen und rekonstruierten Pyramidenzellen wiesen einen apikalen Dendriten auf, der die Lamina I

erreichte ( $n = 12$ ). Bedingt durch Variationen der Schnittebenen (siehe Material und Methoden) trat der apikale Dendrit bei weiteren 23 Lamina Vb Pyramidenzellen bereits in tieferen Laminae aus der Schnittoberfläche aus. Diese Zellen wurden in die weitere quantitative morphologische Auswertung nicht mit eingeschlossen. Die vollständig erhaltenen Zellen wurden 3-dimensional somatodendritisch rekonstruiert und morphometrisch ausgewertet. Eine Zusammenfassung der quantitativen morphologischen Daten der rekonstruierten RS- als auch der IB-Pyramidenzellen ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

**Tabelle 6: Morphologische Eigenschaften von Pyramidenzellen in Lamina Vb**

	RS-Pyramidenzelle ( $n = 5$ )	IB-Pyramidenzelle ( $n = 7$ )
Soma Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	$249 \pm 76$ *	$378 \pm 123$
Gesamtlänge apikaler Dendrit [ $\mu\text{m}$ ]	$2153 \pm 680$ **	$6231 \pm 3320$
Anzahl Endigungen apikaler Dendrit	$25 \pm 10$ *	$49 \pm 28$
Maximaler Durchmesser apikaler Dendrit [ $\mu\text{m}$ ]	$4,1 \pm 1,4$ *	$6,3 \pm 1,7$
Anzahl basaler Dendriten	$6 \pm 1$	$7 \pm 2$
Anzahl Endigungen der basalen Dendriten	$22 \pm 5$	$35 \pm 16$
Gesamtlänge basaler Dendriten [ $\mu\text{m}$ ]	$2531 \pm 811$	$3199 \pm 1210$

Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den zwei Zelltypen (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

#### 4.1.2.1.1 Morphologie der RS-Pyramidenzellen

In Übereinstimmung mit früheren morphologischen Studien (Chagnac-Amitai et al., 1990; Larkman und Mason, 1990) zeigten alle rekonstruierten Pyramidenzellen der Lamina V, die elektrophysiologisch den RS-Pyramidenzellen zugeordnet werden konnten, ähnliche morphologische Eigenschaften. RS-Pyramidenzellen hatten ein mit einer Fläche von  $249 \pm 76 \mu\text{m}^2$  ( $n = 5$ ) relativ kleines ovoides Soma, aus dem ein an seiner Basis relativ dünner apikaler Dendrit austrat ( $4,1 \pm 1,4 \mu\text{m}$ , Abbildung 17A). Der Hauptstamm des apikalen Dendriten gab im Allgemeinen nur vergleichbar wenige schräge kollaterale Äste ab und bildete nur ein kleines terminales Dendritenbüschel. Daraus resultierend waren sowohl die Anzahl der Endigungen ( $25 \pm 10$ ) als auch die Gesamtlänge des apikalen Dendriten ( $2153 \pm 680 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zu den unten beschriebenen IB-Pyramidenzellen relativ gering. Aus dem Soma traten zwischen 5 bis 6 weitere, sich früh verzweigende nicht-apikale primäre Dendriten aus. Mit  $22 \pm 5$  Endigungen und einer Gesamtlänge von  $2531 \pm 811 \mu\text{m}$

waren diese stark verzweigt und bildeten eine polarisierte „Schürze“ von basalen Dendriten.

#### *4.1.2.1.2 Morphologie der IB-Pyramidenzellen*

Wie RS-Pyramidenzellen zeigten alle rekonstruierten Lamina Vb Pyramidenzellen, die elektrophysiologisch den IB-Pyramidenzellen zugeordnet wurden, vergleichbare morphologische Eigenschaften. Bereits im lichtmikroskopischen Bild des lebenden Schnittpräparates waren die, mit einer durchschnittlichen Fläche von  $378 \pm 123 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) im Vergleich zu RS-Pyramidenzellsomata signifikant größeren, pyramidalen Somata der IB-Pyramidenzellen gut zu identifizieren. Aus dem oberen Pol des Soma trat der an seiner Basis mit bis zu  $8,5 \mu\text{m}$  im Vergleich zu RS-Pyramidenzellen ebenfalls signifikant dickere apikale Dendrit aus ( $6,3 \pm 1,7 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ , Abbildung 17B). Vom Hauptstamm des apikalen Dendriten zweigten bereits früh zahlreiche schräge Seitenäste ab. In den Laminae IV oder II/III begann sich der Hauptstamm in ein ausgeprägtes terminales Büschel zu verzweigen. Auch in seinen räumlichen Dimensionen war der apikale Dendrit bei IB-Pyramidenzellen signifikant größer als bei RS-Pyramidenzellen. Mit bis zu 96 dendritischen Endigungen ( $49 \pm 28$ ;  $p < 0,05$ ) konnte die Gesamtlänge des apikalen Dendriten einschließlich seiner Seitenäste  $10800 \mu\text{m}$  erreichen ( $6231 \pm 3320 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ). Außer dem apikalen Dendrit traten zwischen 5 und 11 nicht-apikale primäre Dendriten aus dem Soma aus, die sich früh in zahlreiche Dendriten höherer Ordnung verzweigten. Diese Dendriten bildeten eine „Schürze“ von basalen Dendriten, deren räumliche Ausdehnung, Anzahl der Endigungen ( $35 \pm 16$ ) und Gesamtlänge ( $3199 \pm 1210 \mu\text{m}$ ) mit den basalen Dendriten bei RS-Pyramidenzellen vergleichbar war.

#### **4.1.2.2 Elektrophysiologie der Pyramidenzellen der Lamina Vb**

Entsprechend früherer Befunde (Chagnac-Amitai et al., 1990; Hefti und Smith, 2000; Mason und Larkman, 1990) zeigen Pyramidenzellen der Lamina Vb zwei unterschiedliche Klassen elektrophysiologischen Verhaltens. Eine Zusammenfassung der aktiven und passiven intrinsischen Membraneigenschaften sowie das Antwortverhalten auf orthodrome Stimulation ist Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7: Elektrophysiologische Eigenschaften von Pyramidenzellen in Lamina Vb**

	RS-Pyramidenzellen (n = 30)	IB-Pyramidenzellen (n = 29)
Passive intrinsische Eigenschaften		
$V_{\text{mp}}$ [mV]	$-72,4 \pm 4,9$	$-71,8 \pm 4,0$
$R_m$ [M $\Omega$ ]	$157 \pm 67$	$141 \pm 76$
$\tau_m$ [ms]	$16,6 \pm 4,6$	$16,6 \pm 4,2$
Aktive intrinsische Eigenschaften		
1.ISI bei schwacher Stimulation [ms]	$122,7 \pm 67,3^{**}$	$10,8 \pm 18,1$
2.ISI bei schwacher Stimulation [ms]	$164,5 \pm 88,9$	$159,1 \pm 78,9$
1.ISI bei starker Stimulation [ms]	$31,1 \pm 21,1^{**}$	$6,7 \pm 1,3$
2.ISI bei starker Stimulation [ms]	$66,7 \pm 34,5^{**}$	$35,2 \pm 31,9$
	RS-Pyramidenzellen (n = 19)	IB-Pyramidenzellen (n = 27)
Antwortverhalten nach orthodromer Stimulation		
Induziertes EPSP	19 Zellen	27 Zellen
Induziertes schnelles IPSP	16 Zellen	3 Zellen
Induziertes langsames IPSP	12 Zellen	3 Zellen
Latenz EPSP [ms]	$3,1 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,9$
Latenz schnelles IPSP [ms]	$15,8 \pm 4,3$	$13,5 \pm 3,1$
Latenz langsames IPSP [ms]	$126,2 \pm 60$	$112,8 \pm 20,8$
$V_{\text{UMK}}$ schnelles IPSP [mV]	$-72,1 \pm 1,3$	$-73,3 \pm 1,5$
$V_{\text{UMK}}$ langsames IPSP [mV]	$-81,1 \pm 5,8$	$-87,0 \pm 4,1$

Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den zwei Zelltypen (\*\* =  $p < 0,01$ ). Als passive intrinsische Eigenschaften sind in der Tabelle Ruhemembranpotential ( $V_{\text{mp}}$ ), Membranwiderstand ( $R_m$ ) und Membranzeitkonstante ( $\tau_m$ ) für die zwei Zelltypen dargestellt. Als aktive intrinsische Eigenschaften ist das Zeitintervall zwischen dem ersten und zweiten Aktionspotential (1.ISI), bzw. dem zweiten und dritten Aktionspotential (2.ISI) bei Injektion gerade überschwellig (schwache Stimulation) und deutlich überschwellig depolarisierender Strompulse (starke Stimulation) dargestellt.

#### 4.1.2.2.1 Elektrophysiologie der RS-Pyramidenzellen

RS-Pyramidenzellen hatten ein durchschnittliches Ruhemembranpotential von  $-72,4 \pm 4,9$  mV bei einem Membranwiderstand von  $157 \pm 67$  M $\Omega$  und einer Membranzeitkonstante von  $16,6 \pm 4,6$  ms ( $n = 30$ ). RS-Pyramidenzellen antworteten entsprechend früherer Studien (Chagnac-Amitai et al., 1990; Mason und Larkman, 1990; Schwindt et al., 1997) auf die Injektion von überschwellig depolarisierenden Strompulsen mit der Generierung

regelmäßiger Sequenzen einzelner Aktionspotentiale (Abbildung 18). Gerade überschwellige Depolarisation löste während des Reizes (1 s) 2 bis 5 einzelne Aktionspotentiale aus (Abbildung 18A). Sowohl das 1.ISI als auch das 2.ISI waren mit  $122 \pm 67$  ms, bzw.  $164,5 \pm 88,9$  ms bei dieser gerade überschwelligen Depolarisation sehr lang. In 18 der 30 RS-Pyramidenzellen folgte dem Aktionspotential ein kleines depolarisierendes Nachpotential. Bei stark depolarisierenden Strompulsen stieg die Frequenz der ausgelösten Aktionspotentiale. Dabei verkürzte sich das 1.ISI bei einer Erhöhung der Anzahl ausgelöster Aktionspotentiale, blieb aber stets länger als 9 ms ( $21,8 \pm 14,3$  ms). Das 2.ISI verkürzte sich hingegen nur auf  $66,7 \pm 34,5$  ms.

In 13 der 30 RS-Pyramidenzellen stellte sich nach einer initialen Frequenzadaptation eine mehr oder weniger konstante Aktionspotential-Feuerrate ein (Abbildung 18B1). Ein Aktionspotential-Antwortmuster mit derart konstanten Feuereigenschaften wurden in früheren Lamina Vb Pyramidenzell-Studien als RS<sub>1</sub>-Typ Zellen bezeichnet (Hefti und Smith, 2000). In den übrigen 17 Zellen setzte sich die Adaptation der Feuerrate für die Dauer des depolarisierenden Strompulses fort (Abbildung 18B2). Aktionspotential-Feuermuster mit anhaltender Frequenzadaptation waren mit dem so genannten RS<sub>2</sub>-Typ derselben Studie vergleichbar. Das Feuern hochfrequenter Aktionspotentialsalven wurde in RS-Pyramidenzellen niemals registriert.

Außer den intrinsischen Membraneigenschaften zeigten auch die Antworten auf orthodrome synaptische Stimulation zelltypspezifische Unterschiede. Schwache orthodrome Stimulation induzierte in RS-Pyramidenzellen nach  $3,1 \pm 0,9$  ms ( $n = 19$ ) ein initiales EPSP. Steigerung der Stimulationsstärke führte zu größeren EPSP Amplituden, so dass bei Erreichen des Schwellenpotentials entsprechend den aktiven intrinsischen Membraneigenschaften der Zellen auch ein einzelnes Aktionspotential ausgelöst wurde (Abbildung 18C). In fast allen RS-Pyramidenzellen (16 von 19) folgte bei starker orthodromer Stimulation dem initialen EPSP mit einer Latenz von  $15,8 \pm 4,3$  ms *post Stimulus* und einem Umkehrpotential von  $-72,1 \pm 1,3$  mV ein ausgeprägtes schnelles IPSP (Abbildung 18D). In 12 dieser RS-Pyramidenzellen folgte dem schnellen IPSP mit einer Latenz von  $126,2 \pm 60$  ms *post Stimulus* und einem Umkehrpotential von  $-81,1 \pm 5,8$  mV auch ein langsames IPSP.

#### 4.1.2.2.2 *Elektrophysiologie der IB-Pyramidenzellen*

IB-Pyramidenzellen waren hinsichtlich ihrer passiven intrinsischen Membraneigenschaften mit den RS-Pyramidenzellen vergleichbar. IB-Pyramidenzellen hatten ein durchschnittliches Ruhemembranpotential von  $-71,8 \pm 4,0$  mV bei einem Membranwiderstand von  $141 \pm 76$  M $\Omega$  und einer Membranzeitkonstante von  $16,6 \pm 4,2$  ms ( $n = 29$ ). Charakteristisch für die aktiven intrinsischen Membraneigenschaften von IB-Pyramidenzellen war die Fähigkeit, Salven von Aktionspotentialen zu feuern. Hierbei antworteten IB-Pyramidenzellen im Einklang mit früheren Studien (Chagnac-Amitai et al., 1990; Mason und Larkman, 1990; Schwindt et al., 1997) auf die Injektion eines gerade überschwellig depolarisierenden Strompulses mit einer initialen, hochfrequenten Salve von zwei bis drei Aktionspotentialen (Abbildung 19A). Die dem ersten Aktionspotential folgenden Aktionspotentiale einer Salve sattelten auf einem ausgeprägten depolarisierenden Nachpotential. Die Aktionspotentialamplituden nahmen während der Salve typischerweise ab, während sich die Zeitintervalle zwischen den Aktionspotentialspitzen verlängerten. Bei schwacher depolarisierender Strominjektion umfasste die initiale Aktionspotentialsalve 2 bis 3 Aktionspotentiale. Das 1.ISI betrug im Durchschnitt nur  $10,8 \pm 18,1$  ms und war somit deutlich und signifikant kürzer als bei RS-Pyramidenzellen unter vergleichbaren Stimulationsbedingungen ( $p < 0,01$ ). Das 2.ISI war, wie zuvor für Salven feuernde Neuronen der Lamina IV beschrieben, unter diesen Stimulationsbedingungen mit  $159 \pm 79$  ms deutlich länger.

Bei stärkerer depolarisierender Strominjektion waren sowohl das 1.ISI als auch das 2.ISI signifikant kürzer als bei den RS-Pyramidenzellen (1.ISI:  $6,7 \pm 1,3$  ms,  $p < 0,01$ ; 2.ISI:  $35,2 \pm 31,9$  ms,  $p < 0,01$ ). Der Grund für die höhere Variabilität des 2.ISI lag darin, dass nur in 20 IB-Pyramidenzellen die Injektion von zunehmend stärker depolarisierenden Strompulsen zu einer Erhöhung der Anzahl der Aktionspotentiale auf 3 bis 6 während der initialen Salve führte (Abbildung 19B1). In den übrigen 10 IB-Pyramidenzellen induzierten sowohl gerade überschwellige als auch stärker depolarisierende Strompulse reproduzierbar hochfrequente Dubletten von Aktionspotentialen (Abbildung 19B2). Diese Dubletten feuernden Zellen wurden aufgrund ihrer eigentümlichen Feuereigenschaft bereits in früheren Studien als eine Untergruppe der IB-Pyramidenzellen beschrieben, so genannte schwache *Buster*-Neuronen (Schwindt et al., 1997). Diese Zellen unterschieden sich aber außer in ihrem Antwortverhalten auf depolarisierende Strominjektion nicht weiter von den übrigen IB-Pyramidenzellen und wurden daher in dieser Studie nicht gesondert betrachtet. Auf die initiale Aktionspotentialsalve folgten in 10 der 29 IB-Pyramidenzellen

repetitiv weitere Aktionspotentialsalven. Die übrigen Neuronen feuerten nach der initialen Salve Sequenzen einzelner Aktionspotentiale, die zum Teil deutliche Frequenzadaptation zeigten ( $n = 11$ ).

Schwache orthodrome Stimulation löste mit einer Latenz von  $2,6 \pm 0,9$  ms ein initiales EPSP aus ( $n = 27$ ). Bei gesteigerter Stimulationsstärke und Erreichen des Schwellenpotentials löste das EPSP, entsprechend den aktiven intrinsischen Membraneigenschaften, Salven oder Dubletten von Aktionspotentialen aus (Abbildung 19C). Anders als in RS-Pyramidenzellen repolarisierten die meisten IB-Pyramidenzellen (24 von 27) auch bei starker orthodrome Stimulation nach dem initialen EPSP wieder auf das Ruhe- bzw. das entsprechende Haltepotential (Abbildung 19D). In nur 3 IB-Pyramidenzellen löste orthodrome Stimulation auch ein mehr oder weniger deutliches schnelles IPSP aus. Die Latenz von  $13,5 \pm 3,1$  ms und das Umkehrpotential von  $-73,3 \pm 1,5$  mV war mit dem schnellen IPSP der RS-Pyramidenzellen vergleichbar. Diesem schnellen IPSP folgte mit einer Latenz von  $112,8 \pm 20,8$  ms *post Stimulus* und einem Umkehrpotential von  $-87,0 \pm 4,1$  mV auch ein langsames IPSP. IB-Pyramidenzellen erhielten demnach, zumindest in Folge orthodrome Stimulation, deutlich seltener inhibitorische synaptische Eingänge als RS-Pyramidenzellen.

Insgesamt unterscheiden sich in Lamina Vb die beiden Zellklassen exzitatorischer Neurone signifikant sowohl in ihrer somatodendritischen Morphologie als auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften.

## 4.2 Eigenschaften photolyseinduzierter neuronaler Aktivität

### 4.2.1 Direkte photolyseinduzierte neuronale Aktivität

Lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat kann zwei Arten von Aktivität in den abgeleiteten Neuronen induzieren. Auf der einen Seite wird in den Neuronen so genannte direkte Aktivität induziert. Hierbei bindet das photolytisch freigesetzte Glutamat direkt an Glutamatrezeptoren in der Membran des abgeleiteten Neurons. Auf der anderen Seite kann die lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat synaptisch vermittelte Aktivität im abgeleiteten Neuron auslösen. Diese beruht auf der überschwelliger Erregung synaptisch verknüpfter, also präsynaptischer Neuronen und resultiert in postsynaptischen Potentialen im abgeleiteten Neuron.

Um direkte, durch lokale photolytische Freisetzung von aktivem Glutamat induzierte Aktivität in einzelnen Neuronen zu untersuchen, wurden zunächst Kontrollexperimente durchgeführt, in denen die synaptische Übertragung zwischen den Zellen unterdrückt war. Hierfür wurden die Experimente in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF durchgeführt. Nach 30-minütiger Superfusion mit niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF war die chemische synaptische Übertragung so weit unterdrückt, dass selbst starke elektrische orthodrome Stimulation keine EPSPs in der abgeleiteten Zelle induzieren konnte.

#### **4.2.1.1 Eigenschaften direkter Aktivität**

Von insgesamt 3 bedornten Zellen der Lamina IV und 8 Pyramidenzellen der Lamina Vb wurden topographische Karten photolyseinduzierter direkter Aktivität in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF erstellt. Durchgeführt wurden diese Experimente am  $V_{\text{rmp}}$ . Für diese Kartierungen wurden im Allgemeinen 250 Felder in einem Areal stimuliert, das vertikal von der oberen Lamina VI bis zur pialen Oberfläche reichte und horizontal großzügig den jeweiligen Dendritenbaum des abgeleiteten Neurons abdeckte. Die photolyseinduzierte Aktivität wurde entweder entsprechend ihrer Amplitude oder der Latenz bis zum Beginn der Aktivität in farbkodierte Karten konvertiert.

Bei unterdrückter synaptischer Übertragung konnte nur in den Feldern durch Photostimulation Aktivität im abgeleiteten Neuron ausgelöst werden, die dessen Soma oder dendritische Extensionen enthielten (Abbildung 20A,B). In Feldern, die ausschließlich Teile des Axons der abgeleiteten Zelle enthielten, konnte hingegen in keinem Fall direkte Aktivität induziert werden.

Die direkte, durch lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat induzierte Aktivität bestand aus transienten, monophasischen Depolarisationen (Abbildung 20C). Wurde direkt an der Ableitelektrode stimuliert, so setzte die Depolarisation fast unmittelbar ein. Die Depolarisationen der photolyseinduzierten direkten Aktivität unterschieden sich jedoch deutlich von normalen EPSPs. In Übereinstimmung mit früheren Studien erreichte die Konzentration des photolytisch freigesetzten Glutamats, bzw. die dadurch induzierte Depolarisation, erst nach etwa 20 bis 30 ms ihren Spitzenwert (Katz und Dalva, 1994). Hierdurch waren bei allen untersuchten Zellen die Anstiegs- aber auch die Abfallzeiten der durch lokale Photolyse direkt induzierten Depolarisationen mit bis zu 80 ms auffällig lang.

Wie bereits erwähnt, setzten die direkt induzierten Depolarisationen fast unmittelbar nach der Photostimulation ein. Während die Latenzen zwischen Stimulus und Beginn der Aktivität für Photostimulationen im Bereich des Somas, also nahe der Ableitelektrode, unter 1 ms lagen, nahmen sie mit zunehmender Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungsort zu (Abbildung 21). Bei bedornten Sternzellen der Lamina IV mit ihrem kompakten Dendritenbaum blieben die Latenzen für direkte Aktivität stets unter 4 ms ( $n = 3$ ). Bei den großen Pyramidenzellen der Lamina Vb traten die längsten Latenzen bei Photostimulation von distalen Bereichen des apikalen Dendriten nahe der pialen Oberfläche auf. Aber auch hier lagen die längsten Latenzen unter 9 ms ( $n = 6$ ). Die Zunahme der Latenzen zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungsort. Eine lineare Regression der Daten ergab entlang der Dendriten eine durchschnittliche elektrotonische Ausbreitungsgeschwindigkeit direkter Aktivität von 0,15 m/s bei den bedornten Sternzellen der Lamina IV und 0,19 m/s für die großen Pyramidenzellen der Lamina Vb.

Auch die Amplituden der direkten Aktivität zeigten eine Abhängigkeit von der Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungsort. Die Amplituden der direkt induzierten Depolarisationen waren am größten bei Photostimulation von somatischen oder sehr somanahen (perisomatischen) Feldern (bis ca. 100  $\mu\text{m}$  entfernt), die initiale Teile des Dendritenbaums der abgeleiteten Zelle enthielten (Abbildung 22A,B). Mit zunehmender Entfernung des Stimulationsortes vom Soma, besonders aber innerhalb der ersten 150  $\mu\text{m}$ , nahm die Amplitude der direkt induzierten Depolarisation stark ab (Abbildung 22C). Nur Depolarisationen nach somatischer und perisomatischer Photostimulation waren mit Amplituden von 15 bis 20 mV überschwellig und lösten Aktionspotentiale aus (Abbildung 22C). Entsprechend den aktiven intrinsischen Eigenschaften der Neuronen löste die Depolarisation jeweils ein einzelnes Aktionspotential (RS Zellen) oder eine hochfrequente Salve von Aktionspotentialen (IB Zellen) aus. Je nach Amplitude der induzierten Depolarisation konnten der initialen Aktionspotentialgenerierung auch kurze Sequenzen weiterer Aktionspotentiale folgen (Dantzker und Callaway, 2000). Die Latenzen zwischen Photostimulus und Aktionspotentialauslösung waren, resultierend aus den langen Anstiegszeiten der induzierten Depolarisation, ebenfalls auffällig lang. Bei bedornten Neuronen der Lamina IV wurden Aktionspotentiale nach 10 bis 40 ms, bei Pyramidenzellen der Lamina Vb nach 15 bis 50 ms ausgelöst.

Wie in *Material und Methoden* erwähnt, wurde für die topographische Erfassung photolyseinduzierter neuronaler Aktivität die Fokusebene der Photostimulationen der Tiefe des abgeleiteten Neurons im Gewebe angeglichen. Grund hierfür war, dass die Amplitude der induzierten Depolarisation auch von der Distanz zwischen Fokusebene und stimulierten Soma bzw. Dendrit abhängig war. Lag die Fokusebene mehr als 50  $\mu\text{m}$  über oder unter dem Soma, so waren somatische als auch perisomatische Photostimulation oft nicht mehr überschwellig. Im Bereich der Dendriten führte eine entsprechende Distanz zur Fokusebene zu stark verminderten Amplituden oder mitunter zum völligen Ausbleiben von photolyseinduzierten Depolarisationen. Da Dendriten in ihrem Verlauf den relativen Abstand zur Gewebeoberfläche und somit auch zur Fokusebene ändern können, könnte dies Felder erklären, in denen, trotz der dort vorkommenden dendritischen Extensionen der abgeleiteten Zelle, Photostimulation keine direkte Aktivität induzierte.

#### **4.2.1.2 Reproduzierbarkeit photolyseinduzierter direkter Aktivität**

Durch repetitive Photostimulation einzelner ausgewählter Felder sollte die Reproduzierbarkeit der photolyseinduzierten direkten Aktivität und die davon abhängige Zuverlässigkeit der Aktionspotentialauslösung in den stimulierten Neuronen untersucht werden. Diese Kontrollexperimente wurden an 4 bedornten Neuronen der Lamina IV und 9 Pyramidenzellen der Lamina Vb durchgeführt. Dabei stimmten die Eigenschaften photolyseinduzierter direkter Aktivität bei den exzitatorischen Neuronen beider Laminae überein.

Hierbei wurden sowohl perisomatische als auch mehr distale Felder, die den apikalen Dendriten des abgeleiteten Neurons enthielten, 20-mal repetitiv in Intervallen von 10 s stimuliert. Verglichen wurde die Latenz bis zum Beginn der Depolarisation, die Amplitude, das Integral der Depolarisation und, bei perisomatischer Stimulation, die Latenz bis zur Aktionspotentialauslösung. Der Integralwert der induzierten direkten Aktivität beruht auf der Gesamtfläche zwischen Ruhemembranpotential und Depolarisation und berücksichtigt neben der Amplitude auch Anstiegs- und Abfallzeit der Depolarisation. Die induzierten Depolarisationen einer Stimulationssequenz waren in ihrem Verlauf sehr stereotyp und Aktionspotentiale wurden bei perisomatischer Stimulation äußerst zuverlässig ausgelöst (Abbildung 23). Weder die Latenz, noch das Integral der Depolarisationen zeigten während der 20 Stimulationen signifikante Veränderungen (Abbildung 24). Nur die Amplitude und die Latenz bis zur

Aktionspotentialauslösung waren relativ variabel. Die Latenz bis zur Aktionspotentialauslösung verkürzte sich während der Stimulationssequenz zumindest tendenziell.

## 4.2.2 Synaptisch vermittelte photolyseinduzierte Aktivität

Bei insgesamt 24 bedornten Neuronen der Lamina IV (14 bedornte Sternzellen, 3 Sternpyramidenzellen und 7 „echte“ Pyramidenzellen) und 15 Pyramidenzellen der Lamina Vb (7 IB-Pyramidenzellen und 8 RS-Pyramidenzellen) wurde die intrakortikale funktionelle Konnektivität untersucht, das heißt, es wurden vollständige topographische Karten photolyseinduzierter Aktivität in normalem ACSF erstellt. Dabei wurde jeweils ein Areal untersucht, das alle kortikalen Schichten und mindestens zwei *Barrel* assoziierte funktionelle Kolumnen umfasste. Hierbei wurden zwischen 450 und 550 einzelne Felder in Sequenz stimuliert. Um die Amplituden photolyseinduzierter inhibitorischer Eingänge zu vergrößern und somit besser erkennbar zu machen, wurden die Kartierungen bei einem depolarisierten Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Teilweise kartierte Zellen (Lamina IV: 2 bedornte Sternzellen, 3 Sternpyramidenzellen; Lamina V: 11 IB-Pyramidenzellen, 12 RS-Pyramidenzellen) wurden für die komplementäre Verifizierung der Ergebnisse der vollständig kartierten Zellen verwendet.

### 4.2.2.1 Separation von synaptischer und direkter Aktivität

Anders als in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF kann lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat in normalem ACSF, also bei funktionierender chemischer synaptischer Übertragung, außer direkter Aktivität auch zwei Arten von synaptisch vermittelter Aktivität in den abgeleiteten Neuronen induzieren. Je nachdem ob präsynaptische exzitatorische oder inhibitorische Neuronen stimuliert wurden, wurden im abgeleiteten Neuron EPSPs oder IPSPs ausgelöst. Um nun topographische Karten photolyseinduzierter synaptischer Eingänge und somit der funktionellen Konnektivität erstellen zu können, war es zunächst nötig ein Kriterium zu ermitteln, das eine eindeutige Identifizierung der photolyseinduzierten synaptischen Aktivität erlaubte.

Der Vergleich von in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF mit in normalem ACSF erstellten Karten zeigte, dass sich die photolyseinduzierte synaptische Aktivität eindeutig anhand ihrer Latenz von der direkten Aktivität unterscheiden ließ.

Besonders deutlich konnte dies bei Neuronen gezeigt werden, bei denen topographische Karten photolyseinduzierter Aktivität unter beiden Bedingungen erstellt wurden ( $n = 3$  Pyramidenzellen der Lamina Vb). Die nun folgenden Betrachtungen beziehen sich zunächst auf diese Pyramidenzellen der Lamina V. In niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF hatte, wie bereits beschrieben, photolyseinduzierte direkte Aktivität kurze Latenzen bis zum Aktivitätsbeginn ( $< 9$  ms) und war räumlich auf den Dendritenbaum der abgeleiteten Zelle beschränkt (Abbildung 25A). In normalen ACSF induzierte Photostimulation sowohl in Feldern innerhalb als auch in Feldern außerhalb des Dendritenbaums Aktivität im abgeleiteten Neuron (Abbildung 25B). Aktivität mit kurzen Latenzen ( $< 9$  ms) konnte dabei ausschließlich im Bereich des Dendritenbaums induziert werden und war somit direkter Aktivität gleich zu setzen. Aktivität, die durch Photostimulation von Feldern außerhalb des Dendritenbaums, also durch Aktivierung präsynaptischer Neuronen induziert wurde, hatte stets deutlich längere Latenzen ( $> 10$  ms).

Die anhand dieser direkten Vergleiche ermittelten Befunde konnten durch Analysen der Messspuren in den übrigen Einzelkarten sowohl bei den Pyramidenzellen der Lamina V als auch bei den bedornten Sternzellen der Lamina IV bestätigt werden. Dabei konnten für eine eindeutige Unterscheidung direkter Aktivität und synaptisch vermittelter Aktivität zwei Grenzwerte bestimmt werden, die jeweils für alle exzitatorischen Neuronen einer Lamina gültig waren.

Bei den bedornten Neuronen der Lamina IV lag der Grenzwert für die Unterscheidung zwischen direkter und synaptisch vermittelter Aktivität bei 4 ms. Demnach war bei diesen Neuronen die gesamte photolyseinduzierte Aktivität mit Latenzen  $< 4$  ms eindeutig als direkte, nicht synaptisch vermittelte Aktivität zu identifizieren (Abbildung 25C). Demgegenüber hatte synaptisch vermittelte photolyseinduzierte Aktivität stets Latenzen  $> 5$  ms. Bei den Pyramidenzellen der Lamina V war photolyseinduzierte Aktivität mit Latenzen  $< 8$  ms stets direkte Aktivität; synaptisch vermittelte photolyseinduzierte Aktivität hatte Latenzen  $> 9$  ms (Abbildung 25D). Im Folgenden sollen die Eigenschaften der photolyseinduzierten synaptisch vermittelten Aktivitäten charakterisiert werden.

In Feldern, in denen sowohl synaptisch verknüpfte Neuronen als auch dendritische Extensionen der abgeleiteten Zelle lokalisiert waren, induzierte Photostimulation zuerst direkte Aktivität, der dann mit entsprechender Latenz synaptische Aktivität folgte. Durch den bereit beschriebenen monophasischen und glatten Verlauf der direkten Aktivität und

dem recht deutlichen Latenzunterschied konnte die synaptisch vermittelte Aktivität trotzdem eindeutig identifiziert und in den meisten Fällen auch quantitativ analysiert werden.

#### **4.2.2.2 Aktionspotentialauslösung in normalem ACSF**

Bevor im Folgenden die Eigenschaften photolyseinduzierter synaptisch vermittelter Aktivität beschrieben werden, ist es wichtig die Eigenschaften der Aktionspotentialauslösung unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen, also in normalem ACSF, zu bestimmen.

Wie in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF löste auch in normalem ACSF nur somatische oder perisomatische Photostimulation Aktionspotentiale aus. Bei perisomatischer Photostimulation wurden durch zeitliche Summation von direkter und synaptisch vermittelter Aktivität in einigen Fällen allerdings zusätzliche Aktionspotentiale ausgelöst. Um die Reproduzierbarkeit der Aktionspotentialauslösung zu überprüfen, wurden perisomatische Felder in normalen ACSF 20-fach repetitiv am  $V_{\text{rmp}}$  photostimuliert. Dabei zeigte sich, dass die Auslösung der Aktionspotentiale sowohl bei bedornten Sternzellen der Lamina IV als auch bei Pyramidenzellen der Lamina V, auch unter diesen Bedingungen sehr zuverlässig war (Abbildung 26 A,B). Wie in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF waren aber auch hier die Latenzen bis zur Aktionspotentialspitze sehr variabel (Abbildung 26 C,D). Es kann davon ausgegangen werden, dass diese bei abgeleiteten Neuronen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der zuverlässigen photolyseinduzierten Auslösung von Aktionspotentialen bei variablen Latenzen auch auf die stimulierten, aber nicht abgeleiteten präsynaptischen Neuronen übertragbar sind.

#### **4.2.2.3 Eigenschaften photolyseinduzierter synaptischer Aktivität**

Die durch Photostimulation präsynaptischer Neuronen ausgelösten exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge waren in ihren grundlegenden Eigenschaften bei allen untersuchten Neuronen beider Laminae vergleichbar. Daher sind die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sowohl für bedornte Neuronen der Lamina IV als auch für Pyramidenzellen der Lamina V gültig und werden nicht laminaspezifisch aufgeführt.

#### 4.2.2.3.1 *Eigenschaften photolyseinduzierter exzitatorischer Aktivität*

Die durch Photostimulation präsynaptischer exzitatorischer Neuronen ausgelösten exzitatorischen synaptischen Eingänge konnten sich aus einem oder einer Vielzahl einzelner EPSPs zusammensetzen (Abbildung 27). Die multiplen EPSPs basieren dabei höchstwahrscheinlich entweder auf mehreren simultan aktivierten präsynaptischen Neuronen oder auf der Aktivierung von präsynaptischen IB-Pyramidenzellen (Thomson, 1997).

Um die Eigenschaften und Reproduzierbarkeit photolyseinduzierter exzitatorischer synaptisch vermittelter Eingänge zu charakterisieren, wurden Felder repetitiv stimuliert, die außerhalb des Dendritenbaums der abgeleiteten Zelle lagen und in denen lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat ein bis zwei einzelne EPSPs induzierte. 20-fache repetitive Photostimulation eines solchen Feldes in Intervallen von 10 s induzierte im abgeleiteten Neuron EPSPs mit einer Fehlerrate von 5 bis 40 % (Abbildung 27A, n = 5). Die Amplitude und das Integral einzelner EPSPs änderten sich während der Stimulationssequenz nicht signifikant, allerdings waren die Latenzen bis zum Beginn der EPSPs sehr variabel (Abbildung 27C), höchstwahrscheinlich basierend auf variablen Latenzen der Aktionspotentialauslösung in den photostimulierten präsynaptischen Neuronen. Die variablen Latenzen der einzelnen EPSPs führten bei der repetitiven Auslösung multipler EPSPs zu deutlichen Variabilitäten in der Amplitude der summierten exzitatorischen Aktivität (Abbildung 27B). Da die Bestimmung der Integrale jedoch die gesamte Fläche aller depolarisierenden Ereignisse berücksichtigt, waren die Integralwerte auch bei multiplen EPSPs während der Stimulationssequenzen vergleichsweise stabil (Abbildung 27D). Die Bestimmung der Integrale konnte daher in späteren Analysen als ein Parameter für die Stärke exzitatorischer Eingänge auf die jeweils untersuchten Neuronen genutzt werden.

Die Identifizierung der einzelnen EPSPs in Clusteranalysen (Daten nicht gezeigt) zeigte weiterhin, dass sich durch die hohe Variabilität der Latenzen auch die Abfolgen der induzierten EPSPs ändern konnten. Insgesamt konnte auch in den topographischen Karten keine Abhängigkeit zwischen der Latenz und der Distanz zwischen Soma und stimulierten Feld beobachtet werden. Daher gaben die Latenzen exzitatorischer Eingänge, anders als bei direkter Aktivität, bei der die Latenz die Entfernung zwischen Stimulations- und Ableitungsort andeutet, keine Auskunft über die Lokalisation der jeweils aktivierten Synapsen auf dem abgeleiteten Neuron.

#### **4.2.2.4 Photolyseinduzierte inhibitorische Eingänge**

Photostimulation von präsynaptischen inhibitorischen Interneuronen löste IPSPs in Form von Hyperpolarisationen aus, die üblicherweise bis zu 100 ms lang andauerten (Abbildung 28A) und häufig von ebenfalls induzierter direkter Aktivität oder induzierten EPSPs überlagert waren (Abbildung 28B).

Repetitive Photostimulation solcher Felder induzierte die IPSPs zuverlässig und ohne Fehlerrate ( $n = 6$ ). Im Gegensatz zu photolyseinduzierten EPSPs waren bei repetitiver Photostimulation sowohl Amplituden als auch Integralwerte der IPSPs sehr variabel (Abbildung 28D). Zusammen mit der häufigen Überlagerung von IPSPs und EPSP war die Bestimmung der Integrale für zuverlässige Analysen nicht geeignet. Einzig die Latenzen zwischen Photostimuli und Beginn der IPSPs erwiesen sich während der repetitiven Stimulation als relativ stabil (Abbildung 28C). Sowohl in den hier beschriebenen Kontrollexperimenten als auch in den topographischen Karten hatten die Latenzen aller induzierter IPSPs mit etwa 10 ms relativ vergleichbare Werte. Somit konnten auch für die inhibitorischen Eingänge die Latenzen nicht zur Bestimmung der Distanz zwischen Soma und aktivierter Synapsen genutzt werden.

### **4.3 Topographie synaptischer Eingänge**

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen topographischen Karten zeigen die räumliche Verteilung von präsynaptischen Neuronen im untersuchten kortikalen Areal, die synaptische Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV und Pyramidenzellen der Lamina Vb lieferten. Die Karten geben also die funktionelle Konnektivität der untersuchten Neuronen wieder und wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet. Für die Erfassung der räumlichen Verteilung synaptischer Eingänge auf den untersuchten Neuronen wurde für jede Lamina, getrennt für intra- und transkolumnär, der durchschnittliche Prozentsatz der Felder bestimmt, in denen Photostimulation exzitatorische oder inhibitorische Eingänge auslösen konnte. Die Integrationsleistung einzelner Neuronen in intrakolumnäre Netzwerke gibt darüber Auskunft, welche Rolle eine Neuronenklasse bei der Verarbeitung sensorischer Informationen der jeweiligen Hauptvibrisse spielen könnte. Transkolumnäre Verbindungen geben hingegen Auskunft, welche Möglichkeiten die Neuronen zur „globaleren“ Informationsintegration haben. Daher werden die Ergebnisse zur intra- und transkolumnären funktionellen Konnektivität zunächst getrennt voneinander vorgestellt.

### 4.3.1 Synaptische Eingänge auf bedornte Neuronen der Lamina IV

Die funktionelle Konnektivität der bedornten Sternzellen unterschied sich deutlich von der der Sternpyramidenzellen und der „echten“ Pyramidenzellen. Da sich die beiden letzteren in ihrer funktionellen Konnektivität hingegen nicht signifikant voneinander unterschieden und sich auch in ihrer Morphologie und Elektrophysiologie stark ähnelten, wurden Sternpyramidenzellen und „echte“ Pyramidenzellen im Folgenden zur Klasse der Pyramidenzellen zusammengefasst.

Bei den daraus resultierenden zwei morphologischen Klassen der bedornten Neuronen der Lamina IV, also bei den bedornten Sternzellen und den Pyramidenzellen (inklusive der Sternpyramidenzellen), zeigte die räumliche Verteilung der synaptischen Eingänge signifikante zelltypspezifische Unterschiede ( $p < 0,01$ ; bedornte Sternzellen:  $n = 14$ ; Pyramidenzellen:  $n = 10$ ).

#### 4.3.1.1 Intrakolumnäre synaptische Eingänge auf bedornte Neuronen der Lamina IV

Bedornte Sternzellen ( $n = 14$ ) erhielten exzitatorische und inhibitorische Eingänge fast ausschließlich von Feldern innerhalb ihres *Barrels* (Abbildung 29A). Fast 80% aller photolyseinduzierten exzitatorischen Eingänge ( $77,1 \pm 15,6\%$ ) und etwa 70% aller inhibitorischen Eingänge ( $71,1 \pm 22,2\%$ ) wurden in Feldern innerhalb des jeweiligen *Barrels* ausgelöst. Dort löste Photostimulation in durchschnittlich  $49,9 \pm 16,2\%$  der Felder exzitatorische Eingänge auf bedornte Sternzellen aus (Abbildung 30A). In den nicht granulären Laminae der eigenen Kolumne konnten nur in durchschnittlich  $3,9 \pm 2,9\%$  der Felder exzitatorische Eingänge ausgelöst werden, wobei bei drei der bedornten Sternzellen außerhalb des *Barrels* überhaupt keine synaptischen Eingänge ausgelöst werden konnten. Am seltensten lieferten dabei Felder der supragranulären Laminae ( $1,6 \pm 3,1\%$ ) und der Lamina Vb ( $3,1 \pm 6,7\%$ ) exzitatorische Eingänge von wo nur 6 bzw. 5 der 14 bedornten Sternzellen synaptische Eingänge erhielten. Die einzigen nicht-granulären Laminae, bei denen ein größerer Prozentsatz von Feldern nach Photostimulation exzitatorische Eingänge lieferte, waren Lamina Va ( $9,5 \pm 10,6\%$ ) und Lamina VI ( $5,6 \pm 5,7\%$ ) Von hier erhielten immerhin 9 der 14 Neuronen exzitatorische Eingänge.

Die meisten exzitatorischen Eingänge auf bedornte Sternzellen, die von Feldern innerhalb des *Barrels* stammten, bestanden aus einer Vielzahl einzelner großer EPSPs

(Abbildung 29C1) und konnten eine Stärke von bis zu 0,8 mV·s erreichen ( $0,17 \pm 0,21$  mV·s; Abbildung 30B). Diese starken exzitatorischen Eingänge deuten auf extensive und starke Kopplung der bedornten Sternzellen mit anderen exzitatorischen Neuronen ihres *Barrels* hin. Die exzitatorischen Eingänge aus anderen Laminae waren im Vergleich zu den Eingängen aus dem eigenen *Barrel* signifikant schwächer ( $0,04 \pm 0,03$  mV·s;  $p < 0,01$ ).

Bedornte Sternzellen erhielten neben den exzitatorischen Eingängen auch inhibitorische Eingänge. Diese inhibitorischen Eingänge stammten, wie bereits erwähnt, vorwiegend von Feldern innerhalb des *Barrels*. Dort lieferten  $19,9 \pm 18,0\%$  der Felder inhibitorische Eingänge (Abbildung 30C). Allerdings war im *Barrel* der Prozentsatz der Felder sehr variabel. Einige bedornte Sternzellen erhielten von über 50% der Felder innerhalb des eigenen *Barrels* inhibitorische Eingänge ( $n = 2$ ), während andere von weniger als 10% der Felder inhibitorische Eingänge erhielten ( $n = 5$ ). Weitere intrakolumnäre Quellen inhibitorischer synaptischer Eingänge auf bedornte Sternzellen waren vor allem die untere Lamina III ( $3,5 \pm 3,4\%$ ) und die Lamina Va ( $5,4 \pm 5,9\%$ ).

Wie bereits erwähnt, zeigen Pyramidenzellen der Lamina IV ( $n = 10$ ) gegenüber den bedornten Sternzellen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer funktionellen Konnektivität (Abbildung 29B). Während inhibitorische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina IV, wie bei den bedornten Sternzellen, zum großen Teil aus dem eigenen *Barrel* stammten ( $61,0 \pm 19,6\%$ ), erhielten alle Pyramidenzellen auch zahlreiche synaptische Eingänge aus Feldern außerhalb ihres *Barrels*. Infolgedessen war bei Pyramidenzellen der Anteil der exzitatorischen Eingänge, die aus dem eigenen *Barrel* stammten, signifikant geringer als bei den bedornten Sternzellen ( $47,9 \pm 12,9\%$ ,  $p < 0,01$ ).

Trotz der zahlreichen Eingänge aus den nicht-granulären Laminae war das eigene *Barrel* die Hauptquelle exzitatorischer Eingänge auf Lamina IV Pyramidenzellen. Die Tatsache, dass innerhalb des *Barrels* in durchschnittlich  $66,0 \pm 15,1\%$  der Felder exzitatorische synaptische Eingänge ausgelöst werden konnten, deutet auch für Lamina IV Pyramidenzellen auf eine starke und ausgedehnte Kopplung mit anderen exzitatorischen Neuronen ihres *Barrels* hin (Abbildung 30A). In den nicht-granulären Laminae der eigenen Kolumne lieferten  $19,4 \pm 11,7\%$  der Felder exzitatorische Eingänge, signifikant mehr als bei den bedornten Sternzellen der Lamina IV ( $p < 0,01$ ). Dort konnten besonders in Lamina Va ( $28,6 \pm 21,7\%$ ), Vb ( $24,8 \pm 14,3\%$ ,  $p < 0,01$ ) und VI ( $17,9 \pm 11,6\%$ ,  $p < 0,01$ )

exzitatorische Eingänge auf Lamina IV Pyramidenzellen ausgelöst werden. Auch die exzitatorischen Eingänge aus den nicht granulären Laminae bestanden zumindest teilweise aus mehreren EPSPs (Abbildung 29C2), waren im Durchschnitt aber deutlich schwächer als die exzitatorischen Eingänge aus dem eigenen *Barrel* (Abbildung 30B). Insgesamt konnten hinsichtlich der Stärke der exzitatorischen Eingänge auf Lamina IV Pyramidenzellen innerhalb der eigenen Kolumne keine signifikanten Unterschiede zu den bedornten Sternzellen gefunden werden.

Wie bedornte Sternzellen erhielten auch Pyramidenzellen der Lamina IV inhibitorischer Eingänge. Innerhalb des eigenen *Barrels* konnten in durchschnittlich  $20,0 \pm 10,4\%$  der Felder inhibitorische Eingänge ausgelöst werden. Extragranulär lieferten innerhalb der Kolumne vor allem Felder der unteren Lamina III ( $5,6 \pm 6,0\%$ ) und der Lamina Va ( $9,7 \pm 8,5\%$ ) inhibitorische Eingänge (Abbildung 30C). Insgesamt waren bedornte Sternzellen und Pyramidenzellen hinsichtlich ihrer inhibitorischen synaptischen Eingänge aber nicht signifikant verschieden.

#### **4.3.1.2 Transkolumnäre synaptische Eingänge auf bedornte Neuronen der Lamina IV**

Viele der untersuchten bedornten Neuronen der Lamina IV, das traf insbesondere auf die bedornten Sternzellen zu, erhielten überhaupt keine transkolumnären synaptischen Eingänge, während die restlichen Neuronen oftmals sehr deutliche, vor allem exzitatorische Eingänge aus der benachbarten Kolumne erhielten.

Transkolumnäre synaptische Eingänge auf bedornte Sternzellen der Lamina IV wurden dabei generell nur bei sehr wenigen Neuronen beobachtet (Abbildung 31A). Nur 2 von insgesamt 14 kartierten bedornten Sternzellen erhielten exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge nach Photostimulation aus Feldern der benachbarten Kolumne. Im Gegensatz dazu erhielten 6 der 10 kartierten Pyramidenzellen zahlreiche exzitatorische Eingänge aus der benachbarten Kolumne. Dort waren die Prozentsätze der Felder, in denen exzitatorische Eingänge ausgelöst werden konnten, in allen Laminae signifikant höher als bei bedornten Sternzellen (II/III:  $p < 0,01$ ; IV:  $p < 0,05$ ; Va:  $p < 0,05$ ; Vb:  $p < 0,05$ ; VI:  $p < 0,05$ ; Abbildung 30A). Ursprung der exzitatorischen transkolumnären Eingänge war in beiden morphologischen Klassen besonders das benachbarte *Barrel*. Dort lieferten sowohl bei bedornten Sternzellen als auch bei Pyramidenzellen bis zu 20% der Felder exzitatorische synaptische Eingänge. Die Stärke der transkolumnären

exzitatorischen Eingänge war bei beiden Zelltypen vergleichbar. Die exzitatorischen Eingänge aus dem benachbarten *Barrel* bestanden normalerweise aus multiplen EPSPs (Abbildung 31C), wobei die durchschnittliche Stärke dieser exzitatorischen Eingänge nicht die Stärke der exzitatorischen Eingänge aus dem eigenen *Barrel* erreichte ( $0,07 \pm 0,06$  mV·s; Abbildung 30B).

Inhibitorische synaptische Eingänge wurden in der benachbarten Kolumne ebenfalls nur bei einigen Zellen ausgelöst. Insgesamt stammten diese inhibitorischen Eingänge aber fast ausschließlich aus Feldern des benachbarten *Barrel*. Von dort erhielten 3 bedornte Sternzellen und 4 Pyramidenzellen aus 2% bis 8% der stimulierten Felder inhibitorische Eingänge (Abbildung 30C).

Bedornte Neuronen der Lamina IV, die transkolumnäre Eingänge erhielten, zeigten innerhalb ihres *Barrels* keine bevorzugte Lokalisation. Die räumlichen Dimensionen der proximalen Dendriten dieser Neuronen waren mit den Neuronen, die keine transkolumnären Eingänge erhielten, vergleichbar. Das deutet an, dass eine unterschiedliche dendritische Geometrie nicht der Grund für die beobachteten Interaktionen mit benachbarten *Barrels* sein konnte.

#### **4.3.1.3 Korrelieren funktionelle Konnektivität und Aktionspotential-Feuermuster?**

Gemäß den hier gewonnenen Daten existiert bei bedornten Neuronen der Lamina IV keine Korrelation zwischen der funktionellen Konnektivität und dem Aktionspotential-Feuermuster. Weder innerhalb der morphologischen Klassen, noch Zellklassen übergreifend zeigten IB und RS-Zellen eine signifikant unterschiedliche funktionelle Konnektivität.

#### **4.3.2 Synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb**

Im Vergleich zu bedornten Neuronen der Lamina IV war bei den morphologisch viel größeren Lamina Vb Pyramidenzellen die funktionelle Konnektivität deutlich ausgedehnter. Auch bei den Pyramidenzellen der Lamina Vb zeigte die räumliche Verteilung der synaptischen Eingänge signifikante zelltypspezifische Unterschiede ( $p < 0,05$ ; RS-Zellen:  $n = 8$ ; IB-Zellen:  $n = 7$ ). Die typische räumliche Verteilung und Stärke

der synaptischen Eingänge auf RS- und IB-Pyramidenzellen ist in Abbildung 32 dargestellt.

#### **4.3.2.1 Intrakolumnäre synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb**

Innerhalb ihrer Kolumne erhielten RS- und IB-Pyramidenzellen sowohl aus den supragranulären, der granulären als auch aus den infragranulären Laminae exzitatorische Eingänge. Innerhalb der einzelnen infragranulären Laminae waren bei beiden Zelltypen die Felder, in denen exzitatorische Eingänge ausgelöst werden konnten, relativ homogen über die jeweilige Lamina verteilt. Im Gegensatz dazu wurden in Lamina II/III exzitatorische Eingänge vorwiegend in Feldern ausgelöst, die nahe dem apikalen Dendrit der abgeleiteten Zelle lokalisiert waren, während in Lamina IV exzitatorische Eingänge häufig in *Clustern* von Feldern innerhalb der *Barrels* ausgelöst wurden.

Die wichtigsten Quellen intrakolumnärer exzitatorischer Eingänge waren bei RS-Pyramidenzellen die Laminae Va und Vb (Abbildung 32A). Dort konnte Photostimulation in  $59,5 \pm 15,1$  %, bzw.  $55,1 \pm 13,0$  % der Felder exzitatorische Eingänge auslösen (Abbildung 33A). Daneben stammten zahlreiche exzitatorische Eingänge auch aus der Lamina IV ( $48,3 \pm 21,5$ %) während Photostimulation in den supragranulären Laminae II/III nur in  $26,3 \pm 13,5$ % und in der Lamina VI in  $37,2 \pm 17,5$ % der Felder exzitatorische Eingänge auslöste.

Auch bei den IB-Pyramidenzellen löste Photostimulation in den Laminae Va und Vb in über der Hälfte der Felder exzitatorische Eingänge aus (Va:  $52,7 \pm 20,7$  %; Vb:  $58,0 \pm 11,4$  %; Abbildung 32B/33A). Die Hauptquelle exzitatorischen Eingänge auf IB-Pyramidenzellen war jedoch die Lamina VI. Dort war der Prozentsatz der Felder, in denen Photostimulation exzitatorische Eingänge auslösen konnte, mit  $89,1 \pm 9,5$  % deutlich höher als bei RS-Pyramidenzellen ( $p < 0,01$ ). In den Laminae II/III und IV löste Photostimulation in  $24,4 \pm 19,4$ %, bzw. in  $38,6 \pm 20,7$ % der Felder exzitatorische Eingänge aus.

Wie bei den bedornten Neuronen der Lamina IV bestanden die photolyseinduzierten exzitatorischen Eingänge oft aus mehreren EPSPs. Die meisten exzitatorischen Eingänge (69%) hatten Integralwerte im Bereich von 0,01 bis 0,05 mV·s. Sowohl bei RS- als auch bei IB-Pyramidenzellen wurden diese Integralwerte von den relativ schwachen exzitatorischen Eingängen aus den Laminae II/III normalerweise nicht überschritten

(Abbildung 32C1). In den Laminae IV, Va, Vb und VI der eigenen Kolumne konnten hingegen so genannte "Hot Spots" besonders starker exzitatorischer Eingänge beobachtet werden. In diesen Feldern umfassten die Integrale eine Vielzahl von EPSPs und konnten Werte von 0,1 - 1 mV·s erreichen. Besonders in Lamina IV konnten „Hot Spots“ innerhalb der *Barrels* in Clustern von Feldern gefunden werden, die direkt neben Feldern lagen, in denen keine oder nur sehr schwache exzitatorische Eingänge ausgelöst wurden (Abbildung 32C2). Die „Hot Spots“ trugen bei der Bestimmung der durchschnittlichen Stärke exzitatorischer Eingänge zu den teilweise starken Standardabweichungen bei (Abbildung 33B). Bei RS-Pyramidenzellen waren die exzitatorischen Eingänge aus Lamina Vb mit durchschnittlich  $0,21 \pm 0,15$  mV·s am stärksten. Bei IB-Pyramidenzellen waren hingegen die exzitatorischen Eingänge aus Lamina VI mit durchschnittlich  $0,09 \pm 0,07$  mV·s am stärksten. Innerhalb der einzelnen Laminae zeigte die statistische Analyse jedoch eine sehr hohe Variabilität der Integralwerte. Daher konnte für die Stärke exzitatorischer Eingänge kein signifikanter Unterschied zwischen RS- und IB-Pyramidenzellen gefunden werden, obwohl die Eingänge bei RS-Pyramidenzellen zumindest tendenziell stärker waren als bei den IB-Pyramidenzellen.

Intrakolumnäre inhibitorische Eingänge auf Lamina Vb Pyramidenzellen stammten aus den Laminae II bis VI (Abbildung 33C). Hierbei erhielten RS-Pyramidenzellen vor allem von Feldern der Lamina II/III ( $8,7 \pm 4,4\%$ ), Va ( $10,1 \pm 7,6\%$ ) und Vb ( $9,7 \pm 7,3\%$ ) inhibitorische Eingänge. Je nach Zelle konnten dabei in Lamina II/III bis zu 17 %, in Va und Vb bis zu 25 % bzw. 20 % der Felder inhibitorische Eingänge liefern. In Lamina II/III stammten die inhibitorischen Eingänge oft aus Feldern, die entlang des apikalen Dendriten der RS-Pyramidenzellen lokalisiert waren. Inhibitorische Eingänge aus der Lamina IV wurden nur bei 5 der 8 RS-Pyramidenzellen, aus der Lamina VI sogar nur bei 2 RS-Pyramidenzellen ausgelöst. IB-Pyramidenzellen erhielten generell nur wenige inhibitorische Eingänge. So war der Prozentsatz aller Felder innerhalb einer Kolumne, in denen Photostimulation inhibitorische Eingänge auslösen konnte, bei IB-Pyramidenzellen insgesamt signifikant geringer als bei RS-Pyramidenzellen ( $p < 0,01$ ). In 4 der 7 IB-Pyramidenzellen konnten durch Photostimulation überhaupt keine inhibitorischen Eingänge ausgelöst werden, bei den übrigen Zellen entstammten die Eingänge vor allem der Lamina Va und Vb. Allerdings konnten selbst dort in höchstens 7 % bzw. 3 % der Felder inhibitorische Eingänge ausgelöst werden. Somit konnten bei IB-Pyramidenzellen intrakolumnär sowohl in den Laminae II/III ( $p < 0,01$ ), IV ( $p < 0,05$ ), Va ( $p < 0,05$ ) als

auch in Vb ( $p < 0,05$ ) signifikant seltener inhibitorische Eingänge ausgelöst werden als in RS-Pyramidenzellen.

#### **4.3.2.2 Transkolumnäre synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb**

Beide Pyramidentypen erhielten aus allen kortikalen Laminae der benachbarten Kolumne weitreichende exzitatorische Eingänge (Abbildung 32/33) wobei insgesamt der Prozentsatz der Felder, in denen exzitatorische Eingänge ausgelöst werden konnten, transkolumnär signifikant geringer war als intrakolumnär ( $p = 0,01$ ). Dabei waren die laminaspezifischen Häufigkeiten dieser Felder im Vergleich zur eigenen Kolumne deutlich variabler.

Bei den RS-Pyramidenzellen lieferten insgesamt  $13,7 \pm 5,7\%$  aller Felder der benachbarten Kolumne exzitatorische synaptische Eingänge (Abbildung 33A). RS-Pyramidenzellen erhielten dabei transkolumnäre exzitatorische Eingänge hauptsächlich aus Feldern der benachbarten Lamina Vb ( $23,9 \pm 20,6\%$ ). Weitere exzitatorische Eingänge stammten vor allem aus *Clustern* von Feldern in Lamina IV ( $17,3 \pm 11,3\%$ ) sowie aus den Laminae Va ( $11,7 \pm 10,5\%$ ) und VI ( $18,7 \pm 12,7\%$ ). In den supragranulären Laminae II/III konnten hingegen nur relativ selten exzitatorische Eingänge ausgelöst werden ( $3,7 \pm 3,6\%$ ).

Bei den IB-Pyramidenzellen war mit insgesamt  $31,9 \pm 4,9\%$  der Anteil transkolumnärer Felder, die exzitatorische Eingänge lieferten, signifikant größer als bei RS-Pyramidenzellen ( $p < 0,01$ ). Wie intrakolumnär war bei diesen Neuronen auch transkolumnär die Hauptquelle exzitatorischer Eingänge die Lamina VI. Mit  $60,5 \pm 12,9\%$  war der Prozentsatz der Felder, in denen exzitatorische Eingänge ausgelöst werden konnten, dort deutlich höher als bei den RS-Pyramidenzellen ( $p < 0,01$ ). Darüber hinaus waren auch die exzitatorischen Eingänge aus den supragranulären Laminae bei IB-Pyramidenzellen signifikant häufiger ( $16,8 \pm 10,2\%$ ;  $p < 0,05$ ). Durch eine relativ hohe Variabilität waren bei den IB-Pyramidenzellen exzitatorische Eingänge aus den Laminae IV ( $29,5 \pm 10,0\%$ ), Va ( $22,7 \pm 18,7\%$ ) und Vb ( $33,5 \pm 8,8\%$ ) nur tendenziell häufiger auszulösen als bei den RS-Pyramidenzellen.

Insgesamt war die Stärke exzitatorischer Eingänge aus der benachbarten Kolumne signifikant geringer als bei exzitatorischen Eingängen aus der eigenen Kolumne ( $p < 0,01$ ).

Bei den RS-Pyramidenzellen entstammten die stärksten transkolumnären exzitatorischen Eingänge von einzelnen „Hot Spots“ der Lamina IV ( $0,14 \pm 0,24$  mV·s). Bei den IB-Pyramidenzellen waren hingegen, wie intrakolumnär, die exzitatorischen Eingänge aus der Lamina VI durchschnittlich am stärksten ( $0,06 \pm 0,05$  mV·s). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellklassen hinsichtlich der Stärke transkolumnärer exzitatorischer Eingänge konnten nicht gefunden werden.

Inhibitorische Eingänge konnten in der benachbarten Kolumne bei den Lamina Vb Pyramidenzellen insgesamt deutlich seltener ausgelöst werden als in der eigenen Kolumne ( $p < 0,05$ ). Während 2 der RS-Pyramidenzellen keine transkolumnären inhibitorischen Eingänge erhielten, war die Hauptquelle bei den übrigen RS-Pyramidenzellen die Lamina Vb ( $3,6 \pm 3,9\%$ ). Nur bei einer der RS-Pyramidenzellen wurden auch in Lamina Va zahlreiche inhibitorische Eingänge ausgelöst. Bei den IB-Pyramidenzellen erhielt nur eines der Neuronen überhaupt transkolumnäre inhibitorische Eingänge, die dann aus den Laminae Va (7,1%) und Vb (1,6%) stammten. Trotzdem waren die Unterschiede zwischen RS- und IB-Pyramidenzellen aufgrund der sehr hohen Variabilität der Anzahl transkolumnärer inhibitorischer Eingänge nicht signifikant.

Besonders deutlich wurden die zelltypspezifischen Unterschiede der funktionellen Konnektivität der Lamina Vb Pyramidenzellen, wenn das Gesamtverhältnis der exzitatorischen Eingänge zu den inhibitorischen Eingängen betrachtet wurde. Während bei den RS-Pyramidenzellen  $14,8 \pm 4,0\%$  aller Felder, in denen synaptische Aktivität induziert werden konnte, inhibitorische synaptischen Eingänge lieferten, waren es bei den IB-Pyramidenzellen nur weniger als 1% der Felder ( $0,8 \pm 1,1\%$ ,  $p < 0,01$ ).

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro Whole-Cell* Ableitungen, lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat und 3-dimensionale morphologische Zellrekonstruktion kombiniert, um die intrakortikalen synaptischen Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV und auf Pyramidenzellen der Lamina Vb im *Barrel-Kortex* der Ratte zu untersuchen. In der Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl in der wichtigsten Ziellamina thalamokortikaler Afferenzen, Lamina IV, und der wichtigen Projektionslamina für andere kortikale und subkortikale Zielareale, Lamina V, die funktionelle Konnektivität exzitatorischer Neuronen mit ihrer spezifischen Morphologie korreliert. Dabei zeigen die verschiedenen Typen von exzitatorischen Neuronen in der Lamina IV und der Lamina Vb eine deutlich voneinander unterscheidbare, zelltypspezifische funktionelle Konnektivität, die als schematisches Modell in Abbildung 34 zusammengefasst wird.

Während synaptische Eingänge auf bedornete Sternzellen der Lamina IV vorwiegend aus dem eigenen *Barrel* stammten, erhielten Pyramidenzellen der Lamina IV zusätzlich exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge aus den supra- und infragranulären Laminae der eigenen Kolumne sowie aus dem benachbarten *Barrel* (Abbildung 34A/B). Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass bedornete Sternzellen und Pyramidenzellen der Lamina IV im *Barrel-Kortex* der Ratte deutlich unterschiedliche funktionelle Eingänge bekommen. Das bedeutet auch, dass die somatodendritische Morphologie kortikaler Neuronen mit ihrer spezifischen Rolle in der intrakortikalen Verarbeitung sensorischer Signale korreliert.

In diesem Zusammenhang wird eine starke lokale Komponente der Informationsverarbeitung in Lamina IV vermutlich durch bedornete Sternzellen vermittelt, während die Pyramidenzellen der Lamina IV in globalere Prozesse eingebunden sind. Die Ergebnisse deuten an, dass Signalverarbeitung in Lamina IV neben der bereits beschriebenen Weitersendung exzitatorischer und inhibitorischer Eingänge (Miller et al., 2001) auch die *Feedback*-Modulation, also die Rückübermittlung von Informationen aus nachgeschalteten Modulen, und horizontale Integration von Signalen aus benachbarten Modulen umfasst (Harris et al., 2001).

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren außerdem, dass die exzitatorischen Projektionsneuronen der Lamina V, also die RS- und die IB-Pyramidenzellen, eine Vielzahl sowohl translaminärer als auch transkolumnärer Verbindungen besitzen

(Abbildung 34C/D). Die für diese bereits beschriebene, weitreichende funktionelle Konnektivität (Nicoll et al., 1996; Thomson et al., 2002), konnte hier erstmals lamina- und zelltypspezifisch quantitativ analysiert werden. Bemerkenswert waren dabei bisher nicht beschriebene deutliche exzitatorische Eingänge aus den Laminae IV und VI. Letztere waren bei IB-Pyramidenzellen sowohl intra- als auch transkolumnär weitaus stärker als bei RS-Pyramidenzellen. Weiterhin konnten besonders bei den RS-Pyramidenzellen die komplexen und extensiven laminären Ursprünge inhibitorischer Eingänge offen gelegt werden.

Bei den Lamina Vb Pyramidenzellen als Projektionsneuronen steht intrakortikal, anders als bei den bedornten Neuronen der Lamina IV, die Integration sensorischer Information aus vorgeschalteten Modulen im Vordergrund. Dabei scheinen RS-Pyramidenzellen vor allem an der vertikalen Integration von Signalen beteiligt zu sein, während bei den IB-Pyramidenzellen neben der vertikalen auch eine ausgedehnte horizontale, Kolumnen übergreifende Integration sensorischer Information möglich ist.

Interessanterweise konnte eine Korrelation zwischen der spezifischen Morphologie eines Neurons und seiner Rolle in kortikaler Signalverarbeitung kürzlich auch im primären visuellen Kortex des Makaken gezeigt werden (Yabuta et al., 2001). Diese Befunde deuten an, dass zelltypspezifische parallele Verarbeitungswege möglicherweise eine generelle Eigenschaft kortikaler Schaltkreisorganisation sind. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen die These, dass kolumnäre Schaltkreise einen allgemeinen strukturellen Aufbau besitzen (Mountcastle, 1997).

## 5.1 Methodische Betrachtungen

In früheren Studien mit extrazellulären Ableitungen in kortikalen Hirnschnittpräparaten der Ratte konnte gezeigt werden, dass durch lokale Photolyse von ( $\gamma$ -CNB)-*caged* L-Glutaminsäure über mehrere Stunden hinweg stabile Antworten ausgelöst werden können (Kötter et al., 1998). In der vorliegenden Studie wurden an exzitatorischen Neuronen der Lamina IV und Vb eine Reihe von wichtigen Kontrollexperimenten durchgeführt, um die Methode auch für Einzelzell-Analysen zu etablieren.

Im Einklang mit früheren Befunden konnte gezeigt werden, dass eine mehrstündige Ableitung von Neuronen bei gleichzeitiger Dauerexposition in *Caged*-Glutamat und multipler Photostimulation möglich ist (Callaway und Katz, 1993; Katz und Dalva, 1994),

ohne dass die untersuchten Zellen in ihren intrinsischen oder extrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften stark beeinflusst oder gar irreversibel geschädigt werden.

Um trotz der in den Neuronen auftretenden Spontanaktivität zuverlässig photolyseinduzierte Aktivität identifizieren zu können, wurden für die untersuchten Neuronenpopulationen zwei unterschiedliche Kriterien definiert. Die bei exzitatorischen Neuronen der Lamina IV bereits früher beschriebene starke Spontanaktivität (Feldmeyer et al., 1999) erforderte die Bestimmung zellspezifischer Schwellenwerte neuronaler Aktivität. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass eventuell schwache photolyseinduzierte Aktivität durch Unterschreiten dieses Schwellenwertes von einer späteren Analyse ausgeschlossen wird. Die optische Kontrolle der einzelnen Membranpotentialregistrierungen zeigte aber insgesamt nur sehr wenige Grenzfälle, da die photolyseinduzierte Aktivität im Allgemeinen deutlich größere Integralwerte erreichte als die Spontanaktivität. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit einer objektiven Auswertung der einzelnen Registrierungen selbst bei ausgeprägter Spontanaktivität. Bei den Lamina Vb Pyramidenzellen war aufgrund der geringen Spontanaktivität ein einfacheres Auswerteverfahren möglich, bei dem depolarisierende Aktivität mit Amplituden unter 0,2 mV von der Analyse ausgeschlossen wurde.

Durch die Reduzierung der UV-Blitz-Intensität und der Größe der jeweils stimulierten Felder konnte eine zuverlässige Auslösung von Aktionspotentialen in einem Areal gewährleistet werden, das auf perisomatische Felder beschränkt war, die maximal 50 - 100  $\mu\text{m}$  vom jeweiligen Soma entfernt lagen. Um sicher zu stellen, dass dies auch für Neuronen in den übrigen kortikalen Laminae Gültigkeit hatte, wurden auch dort entsprechende Kontrollexperimente an unterschiedlichen Neuronenklassen durchgeführt. Dadurch konnte eine laminaspezifische räumliche Auflösung der topographischen Karten sichergestellt werden, was heißt, dass die Lokalisation der Felder, in denen synaptische Eingänge ausgelöst werden konnten, auch tatsächlich Auskunft über die Lokalisation der aktivierten präsynaptischen Neuronen gab. Zugleich wurde sichergestellt, dass die photolyseinduzierten synaptischen Eingänge monosynaptisch vermittelt waren (Katz und Dalva, 1994). Oligosynaptische Eingänge würden erfordern, dass Neuronen nach Stimulation weiter entfernt liegender Felder allein durch die photolyseinduzierten EPSPs überschwellig erregt werden können. Am Ruhemembranpotential wurden jedoch in den abgeleiteten Neuronen niemals Aktionspotentiale ausgelöst, wenn weiter entfernt liegende

Felder stimuliert wurden, bzw. die photolyseinduzierte Aktivität ausschließlich aus induzierten EPSPs bestand.

Weiterhin wurde ein Kriterium definiert, um eindeutig zwischen (i) synaptischen Eingängen, also postsynaptischen Ereignissen, die auf überschwelliger Aktivierung präsynaptischer Neuronen basieren, und (ii) direkter Aktivität, die auf der unmittelbaren Bindung des freigesetzten Glutamats an Glutamatrezeptoren in der Membran der abgeleiteten Zelle basierte, zu unterscheiden. Kontrollexperimente, die bei derselben Zelle sowohl in normalen ACSF als auch bei unterdrückter synaptischer Übertragung durchgeführt wurden, erlaubten den direkten Vergleich der räumlichen Verteilung der unterschiedlichen Typen von photolyseinduzierter Aktivität. Die Latenzen bis zum Beginn photolyseinduzierter Aktivität waren bei synaptischer Aktivität stets länger als bei direkter Aktivität. Grund hierfür waren die langen und sehr variablen Latenzen bis zur Aktionspotential-Generierung in den präsynaptischen Neuronen nach Photostimulation (Katz und Dalva, 1994; Molnar und Nadler, 1999).

Des Weiteren wurden in den präsynaptischen Neuronen durch Photostimulation höchstwahrscheinlich oft mehr als ein Aktionspotential ausgelöst (Molnar und Nadler, 1999). Daher können exzitatorische Eingänge bestehend aus mehreren EPSPs durchaus durch die Aktivierung genau eines präsynaptischen Neurons ausgelöst werden. Die Anzahl photolyseinduzierter EPSPs gab also nicht unbedingt auch Auskunft über die Anzahl aktivierter präsynaptischer Neuronen. Es ist daher möglich die laminaspezifische räumliche Verteilung von konnektivierten Neuronen zu interpretieren, nicht aber ihre absolute Anzahl oder die zeitlichen Eigenschaften ihrer Eingänge. Das angewandte Stimulationsverfahren und die Datenanalyse erlauben also die Erstellung detaillierter topographischer Karten, die die Lokalisation von Neuronen wiedergeben, die intrakortikale synaptische Eingänge auf identifizierte exzitatorische Neuronen der Laminae IV und Vb liefern. In diesen Karten stellte sich die Analyse der räumlichen Verteilung der Felder mit detektierbaren PSPs als sensitiver für zelltypspezifische Unterschiede heraus als die Analyse der EPSP Integrale. Letztere zeigte aufgrund einer großen Wertestreuung schon bei der einzelnen Zelle eine weitaus größere Variabilität. Diese Variabilität der synaptischen Transmission resultierte wahrscheinlich zumindest teilweise aus der Verstärkung und/oder Depression schnell aufeinander folgender synaptischer Eingänge (Thomson, 1997).

Der Umstand, dass die Untersuchungen an *in vitro* Hirnschnittpräparaten durchgeführt wurden, bringt zwangsläufig den Verlust eines Teils der kortikalen Verschaltungen mit sich. Da aber, wie frühere Studien zeigen konnten, in Hirnschnittpräparaten selbst längere Projektionen noch in großer Zahl erhalten bleiben (Burkhalter, 1989; Staiger et al., 1999), wird das generelle Ziel dieser Studie, nämlich die Beschreibung lokaler kolumnärer und transkolumnärer Verschaltungen, aller Wahrscheinlichkeit nach nicht wesentlich beeinträchtigt.

## **5.2 Zelltypspezifische Eigenschaften bedornter Neuronen in Lamina IV**

### **5.2.1 Strukturelle und elektrophysiologische Eigenschaften von bedornten Neuronen der Lamina IV**

Die exzitatorischen Neuronen der Lamina IV sensorischer Kortex umfassen mindestens zwei morphologisch voneinander unterscheidbare Zellklassen; die bedornten Sternzellen und die Pyramidenzellen. Eine Koexistenz von bedornten Sternzellen und Pyramidenzellen in der Lamina IV ist im primären somatosensorischen Kortex verschiedener Spezies, einschließlich der Primaten sowie in anderen sensorischen Kortex erwiesen (Jones, 1975; Tarczy-Hornoch et al., 1998; Yabuta et al., 2001). Die Nomenklatur, die morphologischen Eigenschaften sowie die Anzahl der Zellklassen sind aber bislang in der Literatur sehr uneinheitlich beschrieben. Allgemein etabliert ist die Definition der Zellklasse der bedornten Sternzellen, die als nicht-pyramidale, multipolare Neuronen typischerweise einen sehr kompakten Dendritenbaum und keinen apikalen Dendriten besitzen (Elston et al., 1997; Jones, 1975; Lübke et al., 2000; Lund, 1984; Simons und Woolsey, 1984; Woolsey et al., 1975). Im Einklang mit der Literatur zeigt die in dieser Studie durchgeführte morphometrische Analyse, dass der Dendritenbaum bedornter Sternzellen im *Barrel*-Kortex strikt auf das eigene *Barrel* beschränkt bleibt (Feldmeyer et al., 1999; Lübke et al., 2000; Simons und Woolsey, 1984; Woolsey et al., 1975). Die übrigen bedornten Neuronen der Lamina IV besitzen einen apikalen Dendriten, der die Lamina IV in Richtung der supragranulären Laminae verlässt. In den meisten Studien werden diese exzitatorischen Neuronen zur Klasse der Pyramidenzellen zusammengefasst, wobei die Bezeichnungen „modifizierte Pyramidenzellen“ (Elston et al., 1997; White, 1978), „Sternpyramidenzellen“ (Feldmeyer et al., 1999; Simons und Woolsey, 1984) und

„Pyramidenzellen“ (Tarczy-Hornoch et al., 1998; Yabuta et al., 2001) anscheinend synonym für eine Gruppe morphologisch unterscheidbarer bedornter Neuronen verwendet werden. Im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigten sowohl eine ältere (Jones, 1975) als auch eine erst kürzlich vorgestellte Studie (Staiger et al., 2002), dass sich somatodendritisch im Detail „echte“ Pyramidenzellen von Sternpyramidenzellen anhand der räumlichen Organisation der nicht-apikalen Dendriten unterscheiden lassen. Da aber, wie in dieser Studie beobachtet wurde, sich Sternpyramidenzellen und „echte“ Pyramidenzellen nicht in ihrer intrakortikalen funktionellen Konnektivität unterscheiden, liegen die funktionellen Unterschiede der beiden Zellklassen vermutlich eher in den hier nicht betrachteten unterschiedlichen axonalen Projektionsmustern. Daher werden in den folgenden Interpretationen der funktionellen Konnektivität die Sternpyramidenzellen und „echte“ Pyramidenzellen wieder zur Gruppe der Pyramidenzellen der Lamina IV zusammengefasst.

Neben der uneinheitlichen Beschreibung der morphologischen Eigenschaften werden auch die aktiven elektrophysiologischen Eigenschaften der bedornten Sternzellen unterschiedlich dargestellt. So werden in vielen Studien sensorischer Kortexe, so auch des *Barrel*-Kortex, in Lamina IV ausschließlich bedornte Neuronen vom RS-Typ beschrieben (Feldmeyer et al., 1999; Hirsch, 1995; Petersen und Sakmann, 2000). Im Gegensatz dazu beschreiben, in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen, andere Studien neben den bedornten Neuronen vom RS-Typ auch zahlreiche Neuronen vom IB-Typ (Chagnac-Amitai und Connors, 1989b; Connors und Gutnick, 1990). Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Salven feuernden (IB) bedornten Neuronen in einigen Studien ist die hier gemachte Beobachtung, dass der IB-Typ nur bei sehr gesunden Zellen beobachtet wurde und, dass die Fähigkeit Salven zu feuern nach längerer Ableitung häufig verloren ging. Das Fehlen von bedornten Neuronen vom IB-Typ basiert demnach eventuell auf einem ableitungsbedingten Verlust der Vitalität, zum Beispiel in Folge einer veränderten intrazellulären Ionenhomöostase der Zellen.

### **5.2.2 Funktionelle Konnektivität bedornter Neuronen der Lamina IV**

Bedornte Neuronen der Lamina IV im *Barrel*-Kortex von Nagetieren sind das wichtigste Ziel thalamokortikaler Afferenzen, die Neuronen im *ventroposteromedialen Nucleus* (VPM) entstammen (Benshalom und White, 1986; Staiger et al., 1996) und zum lemniskalen Verschaltungsweg gehören (Lu und Lin, 1993). Es wird vermutet, dass über

diesen Verschaltungsweg sensorische Information über die Struktur eines ertasteten Objektes in den jeweiligen *Barrel* in Lamina IV geleitet wird (Ahissar et al., 2000; Diamond, 2000). Ob bereits die einzelnen *Barrels* in Lamina IV über exzitatorische und inhibitorische Verschaltungen direkt miteinander verbunden sind (Armstrong-James et al., 1991; Fox, 1994) und damit schon bei der Integration sensorischer Information zwischen den Kolumnen beteiligt sind, oder ob sie als eine Reihe unabhängiger, paralleler Verarbeitungseinheiten afferenter Informationen funktionieren (Goldreich et al., 1999; Kim und Ebner, 1999), wird sehr kontrovers diskutiert. Frühere extrazelluläre *Tracing*-Studien im *Barrel*-Kortex von Nagetieren zeigten nur eine verhältnismäßig schwache direkte Interkonnektivität benachbarter *Barrels* und deuteten somit an, dass die *Barrels* in Lamina IV weitgehend frei von transkolumnären horizontalen Interaktionen sind (Kim und Ebner, 1999). Im Gegensatz dazu zeigten *in vivo* Studien, dass die erweiterten rezeptiven Felder von Neuronen in den *Barrels* der Lamina IV vorwiegend intrakortikal, vermutlich durch direkte Interkonnektivität zwischen benachbarten *Barrels*, generiert wurden (Armstrong-James et al., 1991; Fox, 2002).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bedornete Neuronen der Lamina IV in Abhängigkeit von ihrer somatodendritischen Morphologie als lokale oder globale Verarbeitungseinheiten funktionieren können. Bedornete Sternzellen integrieren dabei vorwiegend Informationen aus ihrem eigenen *Barrel*, können also als lokale Verarbeitungseinheiten funktionieren. Da alle Lamina IV Pyramidenzellen darüber hinaus auch aus den anderen Laminae der eigenen Kolumne und über 50 % der untersuchten Pyramidenzellen sogar aus dem benachbarten *Barrel* Eingänge erhielten, können sie sowohl an translaminären als auch in transkolumnären, integrativen Schaltkreisen beteiligt sein.

Unterstützt werden diese Interpretationen durch frühere experimentelle Studien: etwa 85% der exzitatorischen synaptischen Eingänge auf bedornete Sternzellen in Lamina IV stammen von intrakortikalen Quellen (Benshalom und White, 1986), vorwiegend von anderen bedorneten Neuronen im gleichen *Barrel* (Feldmeyer et al., 1999). Das deutet an, dass in der Signalverarbeitung innerhalb eines *Barrels* ein lokales Netzwerk von bedorneten Sternzellen eingebunden ist, um vorrangig die Informationen einer einzelnen Vibrisse zu verarbeiten (Petersen und Sakmann, 2001). Die axonalen Projektionen der bedorneten Sternzellen in Lamina IV sensorischer Kortex sind räumlich relativ eng und scheinen weitgehend auf eine einzelne kortikale Kolumne beschränkt zu sein (Harris und Woolsey,

1983; Lübke et al., 2000). Im *Barrel*-Kortex der Ratte sind die axonalen Verbindungen innerhalb eines *Barrels* mit den kurzen zu überbrückenden Distanzen sehr zuverlässig und einzelne EPSPs können unter Umständen ausreichen um Aktionspotentiale auszulösen (Feldmeyer et al., 1999). Die hier gemachten Beobachtungen stimmen gut mit diesen früheren Befunden überein. Fast 80% aller intrakolumnären exzitatorischen Eingänge auf bedornete Sternzellen stammten von benachbarten Neuronen innerhalb des eigenen *Barrels*. Diese lokalen Verbindungen repräsentieren die stärksten bei diesen Zellen beobachteten synaptischen Eingänge. Somit könnten bedornete Sternzellen eine sehr wichtige Komponente von Schaltkreisen sein, die die physikalischen Parameter sensorischer Stimuli extrahieren, die von einzelnen *Sets* peripherer Rezeptoren kodiert werden.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass bedornete Sternzellen trotz ihrer fast ausschließlich lokalen Konnektivität, wie auch die Pyramidenzellen der Lamina IV, deutliche exzitatorische und inhibitorische Eingänge aus der Lamina Va erhielten. Die Neuronen der Lamina Va sind selbst Ziel thalamischer Afferenzen, die aber, anders als bei den thalamischen Afferenzen in die Lamina IV, von Neuronen im medialen Teil des *medioposterioren Nucleus* (POm) stammen und Teil des paralemniskalen Verschaltungsweges sind (Lu und Lin, 1993). Die hier gefundene monosynaptische exzitatorische und inhibitorische Konnektivität zwischen der Lamina Va und der Lamina IV könnte darauf hinweisen, dass bedornete Neuronen der Lamina IV bereits sensorische Information der beiden parallelen sensorischen Verschaltungswege, also sowohl räumliche (lemniskaler Verschaltungsweg, Ahissar et al., 2000; Diamond, 2000) und zeitliche Parameter (paralemniskaler Verschaltungsweg; siehe Kapitel 1.1.1), integrieren können. Bisher wurde eine derartige Integration beider Verschaltungswege frühestens auf der Ebene der supragranulären Laminae vermutet (Ahissar et al., 2001).

Pyramidenzellen erhalten im Vergleich zu den bedorneten Sternzellen deutlich mehr translaminäre und transkolumnäre synaptische Eingänge. Morphologisch korrelieren die vergleichsweise vielen extragranulären Eingänge der Pyramidenzellen mit einem durch ihren apikalen Dendriten eher gestreckten und vertikal polarisierten Dendritenbaum. Möglicherweise erhalten die Pyramidenzellen ihre translaminären und transkolumnären Eingänge vor allem über synaptische Kontakte am apikalen Dendriten. Bisher wurde als extragranuläre kortikale Quelle exzitatorischer Eingänge in die Lamina IV nur die Lamina VI beschrieben. Exzitatorische Lamina VI nach Lamina IV Projektionen über rückläufige Kollaterale sind sowohl im visuellen Kortex aber auch im somatosensorischen Kortex ein

sehr wichtiger intrakortikaler Eingang in die Lamina IV (Ahmed et al., 1994; Anderson et al., 1994; Ferster und Lindstrom, 1985; Staiger et al., 1999), der dort neben inhibitorischen auch exzitatorische Neuronen innerviert (Ahmed et al., 1994; Anderson et al., 1994; Tarczy-Hornoch et al., 1999). Dabei können die bedornten Neuronen der Lamina IV von exzitatorischen Neuronen der nachgeschalteten Lamina VI *Feedback* über bereits weiterverarbeitete Signale erhalten. Über diese *Feedback*-Schleife, für deren synaptische Eingänge eine variablere Dynamik als für die synaptischen Verbindungen innerhalb des *Barrels* beschrieben wurde (Stratford et al., 1996; Tarczy-Hornoch et al., 1999), können *in vivo* möglicherweise die temporalen Eigenschaften bedornter Neuronen der Lamina IV Kontext abhängig moduliert werden (Tarczy-Hornoch et al., 1999). Es ist zu vermuten, dass die hier gezeigten zusätzlichen synaptischen Eingänge, die die Lamina IV Pyramidenzellen aus den Laminae II/III und Vb erhalten, ebenfalls zu *Feedback*-Schleifen gehören. Die Eingänge von Neuronen des benachbarten *Barrels* erhalten Pyramidenzellen der Lamina IV vermutlich sowohl über direkte axonale Projektionen in das eigene *Barrel* (Staiger et al., 2002) als auch über axonale Kollateralen, die in die supragranulären Laminae aufsteigen. Nach Thomson und Deuchars (1994) können synaptische Verbindungen selbst zwischen nahe beieinander liegenden Neuronen die distalen Bereiche der apikalen Dendriten involvieren. Erst kürzlich konnten Lübke et al. (Lübke et al., 2000) im *Barrel*-Kortex der Ratte zeigen, dass sich bei (Stern-) Pyramidenzellen die axonalen Projektionen in die supragranulären Laminae in Büscheln auffächern und einige dieser Kollateralen auch benachbarte kortikale Kolumnen innervieren. Postsynaptische Ziele dieser Lamina IV nach II/III Projektionen sind Dendriten mit geringem Durchmesser oder Dornen (Lübke et al., 2000), die zu Pyramidenzellen der Lamina IV gehören könnten. Pyramidenzellen der Lamina IV könnten folglich eine wichtige Komponente von Schaltkreisen darstellen, die lokale Signalverarbeitung durch die Integration von horizontaler und *Feedback*-Information moduliert. Dadurch wird in die lokale Signalverarbeitung im *Barrel* Information über sensorische Signale benachbarter Rezeptoren und über bereits weiterverarbeitete Signale in nachgeschalteten Laminae eingebracht.

Der Aufbau inhibitorischer synaptischer Schaltkreise in Lamina IV ist bislang noch nicht gut charakterisiert. Gemäß den hier vorgestellten Ergebnissen stammte ein relativ geringer Anteil (10 %) aller inhibitorischen Eingänge auf bedornte Neuronen der Lamina IV aus der benachbarten Kolumne und dort vor allem aus dem benachbarten *Barrel* (vergleiche Salin und Prince, 1996). Diese transkolumnären Eingänge könnten Teil der so

genannten „*cross-whisker-inhibition*“ sein, die nach wechselseitiger Stimulation benachbarter Vibrissen beobachtet werden kann (Simons und Carvell, 1989). Der Großteil der inhibitorischen synaptischen Eingänge entstammte jedoch der eigenen Kolumne (Salin und Prince, 1996) und diese Eingänge formen vermutlich die rezeptiven Felder der exzitatorischen Neuronen oder synchronisieren die Aktivität neuronaler Ensembles innerhalb der *Barrel* assoziierten Kolumne. Unter *in vivo* Bedingungen werden im *Barrel* die stärksten IPSPs stets nach Stimulation der jeweiligen Hauptvibrisse beobachtet (Moore und Nelson, 1998). Diese Beobachtung steht in gutem Einklang mit der auffällig deutlichen Inhibition innerhalb des *Barrels*, die in dieser Studie gezeigt wurde. Morphologische (Kisvárdy et al., 1985) sowie elektrophysiologische Studien am visuellen Kortex der Katze (Tarczy-Hornoch et al., 1998) zeigten, dass diese lokalen inhibitorischen synaptischen Eingänge hauptsächlich von kleinen Korbzellen in der Lamina IV stammen. Im *Barrel*-Kortex der Ratte erhalten praktisch alle GABAerge Neuronen der Lamina IV starke thalamokortikale Eingänge und projizieren lokal innerhalb des eigenen *Barrels*, wodurch sie so genannte „*Feedforward*-Inhibition“ generieren (Keller und White, 1987; Porter et al., 2001).

## 5.3 Analyse von Pyramidenzellen der Lamina Vb

### 5.3.1 Eigenschaften von Pyramidenzellen der Lamina Vb

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen wurde bei Pyramidenzellen der Lamina Vb eine signifikante Korrelation zwischen Morphologie und den intrinsischen Feuereigenschaften gefunden. RS-Pyramidenzellen hatten ein vergleichsweise kleines Soma, einen dünnen apikalen Stamm und einen nur spärlich verzweigten apikalen Dendriten und antworteten typischerweise auf überschwellige Strompulse mit der Generierung einzelner Aktionspotentiale. IB-Pyramidenzellen mit einem deutlich größeren Soma, einem dickeren apikalen Stamm und einem reich verzweigten apikalen Dendriten antworteten initial auf überschwellige Strompulse mit einer hochfrequenten Salve von Aktionspotentialen (Chagnac-Amitai et al., 1990; Larkman und Mason, 1990) oder zumindest mit einer Dublette von Aktionspotentialen (Schwindt et al., 1997).

### 5.3.2 Funktionelle Konnektivität von Pyramidenzellen der Lamina Vb

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen bedornten Neuronen der Lamina IV zeigen die topographischen Karten funktioneller Konnektivität von Pyramidenzellen der Lamina Vb weitaus ausgedehntere exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge. Die Neuronen, die diese Eingänge lieferten, konnten sowohl in allen zellführenden kortikalen Laminae der eigenen als auch der benachbarten Kolumne lokalisiert sein.

Allerdings stammten die inhibitorischen synaptischen Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb vorwiegend aus der eigenen Kolumne. Die ausgeprägten inhibitorischen Eingänge auf RS-Pyramidenzellen stammten vor allem von Interneuronen in den Laminae II/III und V (Nicoll et al., 1996). Transkolumnäre inhibitorische Eingänge lieferten vorwiegend inhibitorische Neuronen der benachbarten Lamina V (Salin und Prince, 1996). Inhibitorische Interneuronen der Lamina IV lieferten, im Einklang mit ihren räumlich sehr begrenzten axonalen Verzweigungen, nur relativ selten synaptische Eingänge (Harris und Woolsey, 1983). Die im Vergleich dazu nur schwache synaptische Inhibition der IB-Pyramidenzellen (Hefti und Smith, 2000), die vorwiegend von relativ nahe zum abgeleiteten Neuron lokalisierten Interneuronen stammte, steht in Übereinstimmung mit früheren elektrophysiologischen Untersuchungen (Chagnac-Amitai und Connors, 1989a). Diese Daten zeigen deutlich, dass RS-Pyramidenzellen unter stärkerer inhibitorischer Kontrolle stehen als IB-Pyramidenzellen. Aufgrund der ausgedehnten exzitatorischen und der geringen inhibitorischen Kontrolle sollten IB-Pyramidenzellen in der Lage sein, ihre Aktivität zuverlässig in einem größeren neuronalen Netzwerk zu verteilen.

Die supragranulären Laminae II/III sollten gemäß früherer Befunde (Reyes und Sakmann, 1999) für Pyramidenzellen der Lamina Vb eigentlich die wichtigste Quelle extralaminärer exzitatorischer Eingänge sein. In unseren Untersuchungen waren jedoch exzitatorischen Eingänge aus Lamina II/III relativ schwach und nur räumlich begrenzt nahe dem apikalen Dendriten induzierbar. Grund für diese Diskrepanz ist vermutlich, dass insbesondere exzitatorische Eingänge aus den supragranulären Laminae bei der hier verwendeten Methode unterrepräsentiert sind. Die Kontrollexperimente an Pyramidenzellen in den Laminae II/III zeigten, dass die angewandte Stimulationsintensität in einigen Fällen zu schwach war, um in diesen Neuronen Aktionspotentiale zu auszulösen. Ein möglicher Grund hierfür könnten die intrinsischen Membraneigenschaften der Lamina II/III Pyramidenzellen sein. Diese haben, zum Beispiel im Vergleich zu den Pyramidenzellen der Lamina Vb, niedrigere Ruhemembranpotentiale und benötigen daher höhere

Depolarisationsamplituden um den Schwellenwert zu erreichen (Mason und Larkman, 1990).

Es wurde andererseits erwartet, dass Pyramidenzellen der Lamina Vb nur wenig exzitatorische Eingänge aus der Lamina IV erhalten. Zum einen wurden in anatomischen Studien nur relativ wenige Projektionen von Lamina IV nach V nachwiesen (Callaway und Wisner, 1996), zum anderen gehen physiologische Studien von einer sequenziellen intrakortikale Signalverschaltung aus, die von Lamina IV über Lamina II/III schließlich zur Lamina V führt (Armstrong-James et al., 1992). Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse für beide Zelltypen starke Eingänge aus den *Barrels* in Lamina IV, sowohl intra- als auch transkolumnär. Ein derartig starker direkter exzitatorischer Einfluss der Lamina IV auf die Lamina V, wie hier auf der Einzelzell-Ebene, wurde auf der Zellpopulations-Ebene in einer aktuellen Studie zur funktionellen Konnektivität im *Barrel*-Kortex der Ratte beschrieben (Staiger et al., 2000). Hier wurde gezeigt, dass, zusätzlich zu dem oben genannten oligosynaptischen Verschaltungsweg über die Lamina II/III, auch ein starker monosynaptischer Eingang existiert. Die clusterartige räumliche Verteilung dieser Eingänge deutet darauf hin, dass diese vermutlich von miteinander gekoppelten Populationen bedornter Neuronen in der Lamina IV geliefert werden (Feldmeyer et al., 1999). Die synaptischen Kontakte zwischen den bedornten Neuronen der Lamina IV und den Pyramidenzellen der Lamina Vb sind vermutlich innerhalb oder nahe der granulären Lamina lokalisiert (Lübke et al., 2000). Das Auftreten synaptischer Kontakte zwischen Axonen der bedornten Neuronen in Lamina IV und den die granulären und supragranulären Laminae durchspannenden apikalen Dendriten der Pyramidenzellen der Lamina Vb erklärt möglicherweise die Diskrepanz zwischen anatomisch eher spärlichen, aber funktionell effektiven Verbindungen von Lamina IV nach V.

Die vorherrschende Quelle exzitatorischer Eingänge auf Lamina Vb Pyramidenzellen waren aber Neuronen, die in den infragranulären Laminae selbst lokalisiert waren. RS- sowie IB-Pyramidenzellen erhielten hierbei extensiv Eingänge aus der gesamten Lamina V, sowohl intra- als auch transkolumnär. Dieses steht im Einklang mit früheren Befunden, die eine ausgeprägte intralaminäre synaptische Kopplung zwischen den Lamina Vb Pyramidenzellen zeigen (Markram et al., 1997; Nicoll und Blakemore, 1990). Daneben entstammten, besonders für IB-Pyramidenzellen, sehr starke und weitreichende exzitatorische Eingänge der Lamina VI. Diese exzitatorischen Eingänge erhielten die Lamina Vb Pyramidenzellen vermutlich durch aufsteigende Kollateralen von bedornten

Neuronen der Lamina VI (Zhang und Deschênes, 1997). Während die RS-Pyramidenzellen nur moderaten exzitatorische Eingang aus Lamina VI erhielten, war dieser bei IB-Pyramidenzellen gegenüber allen anderen Laminae, intra- wie transkolumnär, dominierend. Diese Befunde deuten auf eine starke, aber zelltypspezifische Interaktion zwischen den zwei wichtigsten kortikalen Ausgangs-Laminae Vb und VI (Deschenes et al., 1998, siehe Kapitel 1.2.2) hin.

## 5.4 Funktionelle Bedeutung

### 5.4.1 Lokale und globale Signalverarbeitung in der Lamina IV

Die synaptische Stärke intrakortikaler Verschaltungen kann schnelle, erfahrungsabhängige Modifikationen durchlaufen. Im *Barrel*-Kortex adulter Ratten induzieren veränderte sensorische Erfahrungen („*whisker pairing*“ (Diamond et al., 1993) oder „*single whisker rearing*“ (Fox, 1994)) bei den Neuronen der Lamina IV massive Veränderungen in den Eigenschaften ihrer rezeptiven Felder. Diese Modifikationen sind zu einem großen Teil von intrakortikalen Verschaltungen innerhalb und zwischen den *Barrels* abhängig (Armstrong-James, 1995; Fox, 2002) und basieren höchstwahrscheinlich auf den Mechanismen der Langzeit-Potenzierung und Langzeit-Depression (Feldman, 2000; Fox, 2002). Da, gemäß der hier gezeigten Daten, in Lamina IV hauptsächlich die Pyramidenzellen synaptische Eingänge aus dem benachbarten *Barrel* erhalten, basieren die erfahrungsabhängigen Veränderungen der Interkonnektivität zweier *Barrels* vermutlich hauptsächlich auf Veränderungen der Effizienz der synaptischen Eingänge auf die Pyramidenzellen der Lamina IV. Für Interkonnektivität zwischen den *Barrels* konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der erfahrungsabhängigen und läsions-induzierten Reorganisation auf kortikaler Ebene spielt (Armstrong-James et al., 1991; Armstrong-James et al., 1994; Finnerty et al., 1999; Fox, 2002). Unterschwellige Eingänge, die aus der benachbarten *Barrel* assoziierten Kolumne stammen, tragen vermutlich zur Plastizität rezeptiver Felder und der Reorganisation kortikaler Karten bei (Moore et al., 1999; Moore und Nelson, 1998). In jedem Fall bieten die hier gezeigten transkolumnären Verknüpfungen bereits auf einer sehr frühen Ebene der intrakortikalen Signalverarbeitung eine Basis für einen Informationsaustausch über eingehende sensorische Informationen benachbarter Vibrissen.

Die hier vorgeschlagenen parallelen Schaltkreise lokaler sensorischer Signalverarbeitung und globaler Integration von horizontalen und *Feedback*-Informationen können Mechanismen repräsentieren, die sensorische Kortizes dazu befähigen, zur Speicherung verhaltensrelevanter Erfahrungen beizutragen (Harris et al., 2001). Inwieweit in Lamina IV diese Schaltkreise miteinander interagieren oder in welchem Verhaltenskontext sie rekrutiert werden, bleibt in weitergehenden Studien zu klären.

### 5.4.2 Filterung und Synchronisation von Signalen in Lamina Vb

Die hier gezeigte, sehr ausgedehnte funktionelle Konnektivität der Pyramidenzellen der Lamina Vb ermöglicht ihnen, Informationen aus allen kortikalen Laminae zu integrieren und sowohl an intrakortikale als auch subkortikale Areale zu leiten.

RS-Pyramidenzellen stehen unter komplexer exzitatorischer und inhibitorischer Kontrolle. Trotz zahlreicher Eingänge aus der benachbarten Kolumne lag der Schwerpunkt ihrer funktionellen Konnektivität in der eigenen Kolumne, aus deren Laminae sie exzitatorische und inhibitorische Signale integrieren können. Zusammen mit dem *Feedback* von Informationen in die supragranulären Laminae (Chagnac-Amitai et al., 1990) könnten diese Neuronen bei der Filterung von sensorischer Information eine Rolle spielen, bei der die physikalischen Eigenschaften taktiler Information von der jeweiligen Hauptvibrisse dekodiert werden (Simons, 1978).

Die extensiven intra- und transkolumnären exzitatorischen Eingänge von Neuronen aller Laminae, verbunden mit nur schwacher inhibitorischer Kontrolle, statten IB-Pyramidenzellen mit anderen Möglichkeiten der Informationsverarbeitung aus. Unter physiologischen Bedingungen können IB-Pyramidenzellen effektiv Eingänge von mehreren kortikalen Kolumnen integrieren. *Ensembles* dieser Zellen könnten möglicherweise als kortikale Schrittmacher funktionieren und ausgedehnte synchrone Aktivität mit charakteristischen rhythmischen Eigenschaften vermitteln (Chagnac-Amitai und Connors, 1989b; Flint und Connors, 1996; Silva et al., 1991). Derartige Rhythmen, die bereits im *Barrel*-Kortex nachgewiesen werden konnten (Barth und Di, 1991), werden als wichtiges Mittel bei der Integration der verschiedenen Eigenschaften eines wahrgenommenen sensorischen Reizes im Kortex angesehen (Singer, 1993). Hinsichtlich der in dieser Studie erhaltenen Befunde könnten IB-Pyramidenzellen nicht nur kortikale Schaltkreise synchronisieren, sondern auch effektiv die kortikalen Ausgänge zu subkortikalen und zu *Feedback*-Schaltkreisen verstärken (Ahissar et al., 2000).

Letztendlich können die starken und weitreichenden intrakortikalen Interaktionen von IB-Pyramidenzellen, ihre schwache inhibitorische Kontrolle sowie die Eigenschaft Salven von Aktionspotentialen zu feuern, die Initiierung und die Weiterleitung epileptiformer Entladungen begünstigen. Daher spielen IB-Pyramidenzellen der Lamina Vb möglicherweise nicht nur unter physiologischen, sondern auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine kritische Rolle bei der Synchronisierung kortikaler Module (Connors und Amitai, 1993).

## 6 Zusammenfassung

Sensorische Informationen, die über verschiedene Verschaltungszentren zum Kortex gelangen, werden in den Laminae und in den funktionellen Kolumnen des Kortex verarbeitet. Die vielfältigen Interaktionen dieser Strukturen bestimmen, welche Signale weiterverarbeitet oder unterdrückt werden. Für ein umfassendes Verständnis der laminären Interaktionen innerhalb einer Kolumne und der Signalverarbeitung zwischen Kolumnen wird jedoch zunächst ein umfassendes Verständnis der funktionellen Konnektivität der beteiligten Neuronenpopulationen benötigt. Ein wichtiges Modellsystem für die Untersuchung sensorischer Reizverarbeitung im Vertebratenhirn ist der primäre somatosensorische Kortex der Ratte. Dort finden sich in der Lamina IV strukturelle Einheiten, so genannte *Barrels*, die topographisch korrekte Repräsentationen der mit einzelnen Vibrissen vergesellschafteten Mechanorezeptoren sind. Die Neuronen innerhalb eines *Barrels* stellen den wichtigsten Anfangspunkt intrakortikaler Signalverarbeitung dar. Von dort durchläuft sensorische Information die verschiedenen Laminae des Kortex um von Neuronen der Projektionslaminae V und VI in andere Bereiche des Gehirns geleitet zu werden.

In der hier vorliegenden Studie wurde die zelltypspezifische funktionelle Konnektivität exzitatorischer Neuronen innerhalb der *Barrels* in Lamina IV und der wichtigsten Projektionslamina V untersucht. Die Experimente wurden an koronaren *in vitro* Hirnschnitt-Präparaten des primären somatosensorischen Kortex junger Wistar-Ratten (P 18-22) durchgeführt. Durch die Kombination von *in vitro* Whole-Cell Patch-Clamp Ableitungen und lokaler Photolyse von verestertem (*Caged*-) Glutamat konnten detaillierte topographische Karten intrakortikaler Felder erstellt werden, die exzitatorische oder inhibitorische Eingänge auf die visuell identifizierten Neuronen der Lamina IV und Vb lieferten.

Die exzitatorischen Neuronen beider Laminae ließen sich morphologisch, die Lamina Vb Neuronen auch elektrophysiologisch, in jeweils zwei Hauptklassen unterteilen: die bedornten Sternzellen und Pyramidenzellen der Lamina IV sowie die regelmäßig feuernenden (*regular spiking* = RS) Pyramidenzellen und intrinsisch Salven feuernenden (*intrinsically burst firing* = IB) Pyramidenzellen der Lamina Vb. Eine quantitative Analyse der räumlichen Verteilung und Stärke synaptischer Eingänge auf exzitatorische Neuronen beider Laminae zeigten auffällige zelltypspezifische Unterschiede.

Die bedornten Sternzellen in Lamina IV erhielten hauptsächlich von Neuronen innerhalb ihres eigenen *Barrels* monosynaptische exzitatorische und inhibitorische Eingänge. Im Gegensatz dazu erhielten Pyramidenzellen der Lamina IV zusätzlich auch

exzitatorische Eingänge von Neuronen außerhalb ihres *Barrels*. Diese Eingänge stammten vor allem von Neuronen der infragranulären Laminae der eigenen Kolumne, aber auch von Neuronen im benachbarten *Barrel*. Auch die exzitatorischen Pyramidenzellen der Lamina Vb zeigten zelltypspezifische Unterschiede in ihrer funktionellen Konnektivität. RS-Pyramidenzellen erhielten zahlreiche exzitatorische wie inhibitorische Eingänge aus allen Laminae ihrer Kolumne und vergleichsweise wenige Eingänge von Neuronen der benachbarten Kolumne. IB-Pyramidenzellen erhielten dagegen auch weit reichende transkolumnäre exzitatorische Eingänge, während inhibitorische Eingänge nur äußerst selten nachgewiesen werden konnten.

In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Stimulation durch die lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat eine zuverlässige Methode zur Kartierung synaptischer Eingänge auf einzelne abgeleitete Neuronen darstellt. Die Methode bietet dabei gute funktionelle Aussagekraft (i.e. Stärke von exzitatorischen Eingängen) und hohe räumliche Auflösung in einem großen kortikalen Areal. Dafür wurden über zahlreiche Kontrollexperimente Kriterien erstellt, die eine reproduzierbare Identifizierung und Analyse der photolyseinduzierten neuronalen Aktivitäten zulassen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in wichtigen Schlüssel-Laminae des somatosensorischen Kortex funktionelle Konnektivität und Zellmorphologie korrelieren. Bedornete Sternzellen der Lamina IV sind aufgrund ihrer vorrangig lokalen Verknüpfungen vermutlich bei der frühen Verarbeitung sensorischer Information als lokale Verarbeitungseinheiten wichtig. Pyramidenzellen der Lamina IV können darüber hinaus modulatorische Informationen sowohl aus nicht-granulären Laminae ihrer Kolumne als auch der Nachbar-kolumne integrieren, funktionieren also vermutlich eher als globale Verarbeitungseinheiten. Als Projektionsneuronen zeigen Pyramidenzellen der Lamina Vb eine räumlich sehr ausgedehnte funktionelle Konnektivität. RS-Pyramidenzellen der Lamina Vb können vermutlich besonders innerhalb ihrer eigenen funktionellen Kolumne aufgrund starker exzitatorischer und inhibitorischer Modulation effizient sensorische Information integrieren und filtern. IB-Pyramidenzellen der Lamina Vb hingegen können wegen ihrer ausgedehnten exzitatorischen Konnektivität und der nur vergleichsweise geringen Inhibition vermutlich effektiv sensorische Information mehrerer Kolumnen integrieren und synchronisieren.

## 7 Literatur

Agmon, A. und Connors, B.W. (1991). Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience* 41, 365-379.

Ahissar, E., Sosnik, R., Bagdasarian, K., Haidarliu, S. (2001). Temporal frequency of whisker movement. ii. laminar organization of cortical representations. *J. Neurophysiol.* 86, 354-367.

Ahissar, E., Sosnik, R., Haidarliu, S. (2000). Transformation from temporal to rate coding in a somatosensory thalamocortical pathway. *Nature* 406, 302-306.

Ahmed, B., Anderson, J.C., Douglas, R.J., Martin, K.A., Nelson, J.C. (1994). Polyneuronal innervation of spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 341, 39-49.

Amitai, Y. (1994). Membrane potential oscillations underlying firing patterns in neocortical neurons. *Neuroscience* 63, 151-161.

Anderson, J.C., Douglas, R.J., Martin, K.A., Nelson, J.C. (1994). Synaptic output of physiologically identified spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 341, 16-24.

Angulo, M.C., Staiger, J.F., Rossier, J., Audinat, E. (1999). Developmental synaptic changes increase the range of integrative capabilities of an identified excitatory neocortical connection. *J. Neurosci.* 19, 1566-1576.

Armstrong-James, M. (1975). The functional status and columnar organization of single cells responding to cutaneous stimulation in neonatal rat somatosensory cortex S1. *J. Physiol. (Lond.)* 246, 501-538.

Armstrong-James, M. (1995). The nature and plasticity of sensory processing within adult rat barrel cortex. In *Cerebral Cortex*, E. G. Jones and I. T. Diamond, eds. (New York: Plenum Press), 333-373.

Armstrong-James, M., Callahan, C.A., Friedman, M.A. (1991). Thalamo-cortical processing of vibrissal information in the rat. I. Intracortical origins of surround but not

centre-receptive fields of layer IV neurones in the rat S1 barrel field cortex. *J. Comp. Neurol.* 303, 193-210.

Armstrong-James, M., Diamond, M.E., Ebner, F.F. (1994). An innocuous bias in whisker use in adult rats modifies receptive fields of barrel cortex neurons. *J. Neurosci.* 14, 6978-6991.

Armstrong-James, M. und Fox, K. (1987). Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex. *J. Comp. Neurol.* 263, 265-281.

Armstrong-James, M., Fox, K., Das-Gupta, A. (1992). Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa. *J. Neurophysiol.* 68, 1345-1358.

Barry, P.H. (1994). JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J. Neurosci. Methods* 51, 107-116.

Barth, D.S. und Di, S. (1991). Laminar excitability cycles in neocortex. *J. Neurophysiol.* 65, 891-898.

Benshalom, G. und White, E.L. (1986). Quantification of thalamocortical synapses with spiny stellate neurons in layer IV of mouse somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 253, 303-314.

Bernardo, K.L., McCasland, J.S., Woolsey, T.A., Strominger, R.N. (1990). Local intra- and interlaminar connections in mouse barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 291, 231-255.

Bernardo, K.L. und Woolsey, T.A. (1987). Axonal trajectories between mouse somatosensory thalamus and cortex. *J. Comp. Neurol.* 258, 542-564.

Brecht, M., Preilowski, B., Merzenich, M.M. (1997). Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav. Brain Res.* 84, 81-97.

Burkhalter, A. (1989). Intrinsic connections of rat primary visual cortex: laminar organization of axonal projections. *J. Comp. Neurol.* 279, 171-186.

Cajal, R. (1904). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados.* (Madrid: Moya).

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

Callaway, E.M. und Wiser, A.K. (1996). Contributions of individual layer 2-5 spiny neurons to local circuits in macaque primary visual cortex. *Vis. Neurosci.* *13*, 907-922.

Callaway, E.M. und Yuste, R. (2002). Stimulating neurons with light. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 587.

Carvell, G.E. und Simons, D.J. (1990). Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J. Neurosci.* *10*, 2638-2648.

Cauler, L. (1995). Layer I of primary sensory neocortex: where top-down converges upon bottom-up. *Behav. Brain Res.* *71*, 163-170.

Chagnac-Amitai, Y. und Connors, B.W. (1989a). Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J. Neurophysiol.* *61*, 747-758.

Chagnac-Amitai, Y. und Connors, B.W. (1989b). Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J. Neurophysiol.* *62*, 1149-1162.

Chagnac-Amitai, Y., Luhmann, H.J., Prince, D.A. (1990). Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *J. Comp. Neurol.* *296*, 598-613.

Chapin, J.K. (1986). Laminar differences in sizes, shapes, and response profiles of cutaneous receptive fields in the rat SI cortex. *Exp. Brain Res.* *62*, 549-559.

Chapin, J.K., Sadeq, M., Guise, J.L. (1987). Corticocortical connections within the primary somatosensory cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* *263*, 326-346.

Chiaia, N.L., Rhoades, R.W., Fish, S.E., Killackey, H.P. (1991). Thalamic processing of vibrissal information in the rat: II. Morphological and functional properties of medial ventral posterior nucleus and posterior nucleus neurons. *J. Comp. Neurol.* *314*, 217-236.

Chmielowska, J., Carvell, G.E., Simons, D.J. (1989). Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat SmI barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* *285*, 325-338.

Connors, B.W. und Amitai, Y. (1993). Generation of epileptiform discharge by local circuits of neocortex. In *Epilepsy: Models, mechanism and concepts*, Schwarzkroin, ed. (Cambridge: Univ. Press), 388-423.

Connors, B.W. und Gutnick, M.J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* *13*, 99-104.

Connors, B.W., Gutnick, M.J., Prince, D.A. (1982). Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* *48*, 1302-1320.

Connors, B.W., Malenka, R.C., Silva, L.R. (1988). Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABAA and GABAB receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *J. Physiol. (Lond.)* *406*, 443-468.

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

Deschenes, M., Veinante, P., Zhang, Z.W. (1998). The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res. Rev.* *28*, 286-308.

Diamond, M.E. (2000). Neurobiology. Parallel sensing. *Nature* *406*, 245, 247.

Diamond, M.E., Armstrong-James, M., Ebner, F.F. (1992). Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus. *J. Comp. Neurol.* *318*, 462-476.

Diamond, M.E., Armstrong-James, M., Ebner, F.F. (1993). Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 2082-2086.

Diamond, M.E., Petersen, R.S., Harris, J.A. (1999). Learning through maps: functional significance of topographic organization in primary sensory cortex. *J. Neurobiol.* *41*, 64-68.

Ebner, F.F. und Armstrong-James, M.A. (1990). Intracortical processes regulating the integration of sensory information. *Prog. Brain Res.* *86*, 129-141.

Elston, G.N., Pow, D.V., Calford, M.B. (1997). Neuronal composition and morphology in layer IV of two vibrissal barrel subfields of rat cortex. *Cereb. Cortex* *7*, 422-431.

- Fairen, A., DeFelipe, J., Redigior, J. (1984). Nonpyramidal neurons. In Cellular components of the cerebral cortex, A. Peters and E. G. Jones, eds. (New York: Plenum Press), 201-253.
- Farber, I.C. und Grinvald, A. (1983). Identification of presynaptic neurons by laser photostimulation. *Science* 222, 1025-1027.
- Feldman, D.E. (2000). Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27, 45-56.
- Feldmeyer, D., Egger, V., Lübke, J., Sakmann, B. (1999). Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 521 Pt 1, 169-190.
- Feldmeyer, D., Lübke, J., Silver, R.A., Sakmann, B. (2002). Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column. *J. Physiol. (Lond.)* 538, 803-822.
- Feldmeyer, D. und Sakmann, B. (2000). Synaptic efficacy and reliability of excitatory connections between the principal neurones of the input (layer 4) and output layer (layer 5) of the neocortex. *J. Physiol. (Lond.)* 525 Pt 1, 31-39.
- Ferster, D. und Lindstrom, S. (1985). Augmenting responses evoked in area 17 of the cat by intracortical axon collaterals of cortico-geniculate cells. *J. Physiol. (Lond.)* 367, 217-232.
- Finnerty, G.T., Roberts, L.S., Connors, B.W. (1999). Sensory experience modifies the short-term dynamics of neocortical synapses. *Nature* 400, 367-371.
- Flint, A.C. und Connors, B.W. (1996). Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *J. Neurophysiol.* 75, 951-956.
- Fox, K. (1992). A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J. Neurosci.* 12, 1826-1838.
- Fox, K. (1994). The cortical component of experience-dependent synaptic plasticity in the rat barrel cortex. *J. Neurosci.* 14, 7665-7679.

- Fox, K. (2002). Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience* *111*, 799-814.
- Glassman, R.B. (1994). Behavioral specializations of SI and SII cortex: a comparative examination of the neural logic of touch in rats, cats, and other mammals. *Exp. Neurol.* *125*, 134-141.
- Glazewski, S., Herman, C., McKenna, M., Chapman, P.F., Fox, K. (1998a). Long-term potentiation in vivo in layers II/III of rat barrel cortex. *Neuropharmacology* *37*, 581-592.
- Glazewski, S., McKenna, M., Jacquin, M., Fox, K. (1998b). Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2107-2116.
- Goldreich, D., Kyriazi, H.T., Simons, D.J. (1999). Functional independence of layer IV barrels in rodent somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* *82*, 1311-1316.
- Guic-Robles, E., Jenkins, W.M., Bravo, H. (1992). Vibrissal roughness discrimination is barrelcortex-dependent. *Behav. Brain Res.* *48*, 145-152.
- Guic-Robles, E., Valdivieso, C., Guajardo, G. (1989). Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system. *Behav. Brain Res.* *31*, 285-289.
- Gupta, A., Wang, Y., Markram, H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* *287*, 273-278.
- Harris, J.A., Petersen, R.S., Diamond, M.E. (2001). The cortical distribution of sensory memories. *Neuron* *30*, 315-318.
- Harris, R.M. und Woolsey, T.A. (1983). Computer-assisted analyses of barrel neuron axons and their putative synaptic contacts. *J. Comp. Neurol.* *220*, 63-79.
- Hefti, B.J. und Smith, P.H. (2000). Anatomy, physiology, and synaptic responses of rat layer V auditory cortical cells and effects of intracellular GABA(A) blockade. *J. Neurophysiol.* *83*, 2626-2638.
- Hirsch, J.A. (1995). Synaptic integration in layer IV of the ferret striate cortex. *J. Physiol. (Lond.)* *483 (Pt 1)*, 183-199.

Hoogland, P.V., Welker, E., Van der, L.H. (1987). Organization of the projections from barrel cortex to thalamus in mice studied with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin and HRP. *Exp. Brain Res.* 68, 73-87.

Hubel, D.H., Wiesel, T.N., Stryker, M.P. (1977). Orientation columns in macaque monkey visual cortex demonstrated by the 2-deoxyglucose autoradiographic technique. *Nature* 269, 328-330.

Hutson, K.A. und Masterton, R.B. (1986). The sensory contribution of a single vibrissa's cortical barrel. *J. Neurophysiol.* 56, 1196-1223.

Izraeli, R. und Porter, L.L. (1995). Vibrissal motor cortex in the rat: connections with the barrel field. *Exp. Brain Res.* 104, 41-54.

Jensen, K.F. und Killackey, H.P. (1987). Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. I. The normal morphology of specific thalamocortical afferents. *J. Neurosci.* 7, 3529-3543.

Jones, E.G. (1975). Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 160, 205-267.

Jones, E.G. (1981). Anatomy of cerebral cortex: columnar input-output organization. In *The organization of the cerebral cortex*, F. O. Schmitt, F. G. Worden, and S. G. Dennis, eds. (Cambridge: MIT Press), 199-235.

Jones, E.G. und Diamond, I.T. (1995). *The barrel cortex of rodents.* (New York: Plenum Press).

Kaas, J.H. (1997). Topographic maps are fundamental to sensory processing. *Brain Res. Bull.* 44, 107-112.

Kasper, E.M., Larkman, A.U., Lübke, J., Blakemore, C. (1994). Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *J. Comp. Neurol.* 339, 459-474.

Katz, L.C. und Dalva, M.B. (1994). Scanning laser photostimulation: a new approach for analyzing brain circuits. *J. Neurosci. Methods* 54, 205-218.

- Kawaguchi, Y. (2001). Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. *J. Neurosci.* *21*, 7261-7272.
- Keller, A. und White, E.L. (1987). Synaptic organization of GABAergic neurons in the mouse SmI cortex. *J. Comp. Neurol.* *262*, 1-12.
- Kim, U. und Ebner, F.F. (1999). Barrels and septa: separate circuits in rat barrels field cortex. *J. Comp. Neurol.* *408*, 489-505.
- Kisvárdy, Z.F., Martin, K.A., Whitteridge, D., Somogyi, P. (1985). Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J. Comp. Neurol.* *241*, 111-137.
- Kötter, R., Staiger, J.F., Zilles, K., Luhmann, H.J. (1998). Analysing functional connectivity in brain slices by a combination of infrared video microscopy, flash photolysis of caged compounds and scanning methods. *Neuroscience* *86*, 265-277.
- Laaris, N., Carlson, G.C., Keller, A. (2000). Thalamic-evoked synaptic interactions in barrel cortex revealed by optical imaging. *J. Neurosci.* *20*, 1529-1537.
- Land, P.W., Buffer, S.A., Jr., Yaskosky, J.D. (1995). Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J. Comp. Neurol.* *355*, 573-588.
- Larkman, A. und Mason, A. (1990). Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J. Neurosci.* *10*, 1407-1414.
- Lu, S.M. und Lin, R.C. (1993). Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens. Mot. Res.* *10*, 1-16.
- Lübke, J., Egger, V., Sakmann, B., Feldmeyer, D. (2000). Columnar Organization of Dendrites and Axons of Single and Synaptically Coupled Excitatory Spiny Neurons in Layer 4 of the Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci.* *20*, 5300-5311.
- Lund, J.S. (1984). Spiny stellate neurons. In *Cerebral Cortex*. Vol. 1, A. Peters and E. G. Jones, eds. (New York: Plenum Press), 255-308.

- Ma, P.M. (1991). The barrelettes--architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J. Comp. Neurol.* *309*, 161-199.
- Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M., Roth, A., Sakmann, B. (1997). Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J. Physiol. (Lond.)* *500*, 409-440.
- Mason, A. und Larkman, A. (1990). Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J. Neurosci.* *10*, 1415-1428.
- McCormick, D.A., Connors, B.W., Lighthall, J.W., Prince, D.A. (1985). Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* *54*, 782-806.
- Miller, K.D., Pinto, D.J., Simons, D.J. (2001). Processing in layer 4 of the neocortical circuit: new insights from visual and somatosensory cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 488-497.
- Molnar, P. und Nadler, J.V. (1999). Mossy fiber-granule cell synapses in the normal and epileptic rat dentate gyrus studied with minimal laser photostimulation. *J. Neurophysiol.* *82*, 1883-1894.
- Moore, C.I. und Nelson, S.B. (1998). Spatio-temporal subthreshold receptive fields in the vibrissa representation of rat primary somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* *80*, 2882-2892.
- Moore, C.I., Nelson, S.B., Sur, M. (1999). Dynamics of neuronal processing in rat somatosensory cortex. *Trends Neurosci.* *22*, 513-520.
- Mountcastle, V.B. (1957). Modularity and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* *20*, 408-434.
- Mountcastle, V.B. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain* *120 (Pt 4)*, 701-722.

- Nicolelis, M.A. und Chapin, J.K. (1994). Spatiotemporal structure of somatosensory responses of many-neuron ensembles in the rat ventral posterior medial nucleus of the thalamus. *J. Neurosci.* *14*, 3511-3532.
- Nicoll, A. und Blakemore, C. (1990). Dual intracellular impalement in vitro reveals excitatory synaptic connections between pyramidal neurons in rat visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)* *430*, 15P.
- Nicoll, A., Kim, H.G., Connors, B.W. (1996). Laminar origins of inhibitory synaptic inputs to pyramidal neurons of the rat neocortex. *J. Physiol. (Lond.)* *497*, 109-117.
- Paxinos, G. und Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* (San Diego: Academic Press).
- Peters, A. und Jones, E.G. (1984). Classification of cortical neurons. In *Cellular components of the cerebral cortex*, A. Peters and E. G. Jones, eds. (New York: Plenum Press), 107-121.
- Petersen, C.C. und Sakmann, B. (2000). The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex. *J. Neurosci.* *20*, 7579-7586.
- Petersen, C.C. und Sakmann, B. (2001). Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging. *J. Neurosci.* *21*, 8435-8446.
- Porter, J.T., Johnson, C.K., Agmon, A. (2001). Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* *21*, 2699-2710.
- Reyes, A. und Sakmann, B. (1999). Developmental switch in the short-term modification of unitary EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J. Neurosci.* *19*, 3827-3835.
- Rice, F.L., Kinnman, E., Aldskogius, H., Johansson, O., Arvidsson, J. (1993). The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP 9.5 immunofluorescence. *J. Comp. Neurol.* *337*, 366-385.
- Riddle, D.R. und Purves, D. (1995). Individual variation and lateral asymmetry of the rat primary somatosensory cortex. *J. Neurosci.* *15*, 4184-4195.

- Salin, P.A. und Prince, D.A. (1996). Electrophysiological mapping of GABAA receptor-mediated inhibition in adult rat somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* 75, 1589-1600.
- Schwindt, P.C., O'Brien, J.A., Crill, W.E. (1997). Quantitative analysis of firing properties of pyramidal neurons from layer 5 of rat sensorimotor cortex. *J. Neurophysiol.* 77, 2484-2498.
- Sherman, S.M. und Guillery, R.W. (1996). Functional organization of thalamocortical relays. *J. Neurophysiol.* 76, 1367-1395.
- Silva, L.R., Amitai, Y., Connors, B.W. (1991). Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251, 432-435.
- Simons, D.J. (1978). Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex. *J. Neurophysiol.* 41, 798-820.
- Simons, D.J. (1995). Neuronal integration in the somatosensory whisker/barrel cortex. In *Cerebral Cortex. The barrel cortex of rodents*, E. G. Jones and I. T. Diamond, eds. (New York: Plenum Press), 263-297.
- Simons, D.J. und Carvell, G.E. (1989). Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J. Neurophysiol.* 61, 311-330.
- Simons, D.J. und Woolsey, T.A. (1979). Functional organization in mouse barrel cortex. *Brain Res.* 165, 327-332.
- Simons, D.J. und Woolsey, T.A. (1984). Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat SmI cortex. *J. Comp. Neurol.* 230, 119-132.
- Singer, W. (1993). Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu. Rev. Physiol* 55, 349-374.
- Smith, P.H. und Populin, L.C. (2001). Fundamental differences between the thalamocortical recipient layers of the cat auditory and visual cortices. *J. Comp. Neurol.* 436, 508-519.
- Sosnik, R., Haidarliu, S., Ahissar, E. (2001). Temporal frequency of whisker movement. i. representations in brain stem and thalamus. *J. Neurophysiol.* 86, 339-353.

Staiger, J.F., Flaggmeyer, I., Zilles, K., Luhmann, H.J. (2002). Bedornte Neurone der Lamina granularis (IV) des primären somatosensorischen Kortex der Ratte lassen sich in Sternzellen, Sternpyramidenzellen und Pyramidenzellen untergliedern. *Annals of Anatomy* 184, 276.

Staiger, J.F., Kötter, R., Zilles, K., Luhmann, H.J. (1999). Connectivity in the somatosensory cortex of the adolescent rat: an in vitro biocytin study. *Anat. Embryol.* 199, 357-365.

Staiger, J.F., Kötter, R., Zilles, K., Luhmann, H.J. (2000). Laminar characteristics of functional connectivity in rat barrel cortex revealed by stimulation with caged-glutamate. *Neurosci. Res.* 37, 49-58.

Staiger, J.F., Zilles, K., Freund, T.F. (1996). Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2273-2285.

Stratford, K.J., Tarczy-Hornoch, K., Martin, K.A., Bannister, N.J., Jack, J.J. (1996). Excitatory synaptic inputs to spiny stellate cells in cat visual cortex. *Nature* 382, 258-261.

Swanson, L.W. (1998). *Brain maps: Structure of the rat brain.* (Amsterdam: Elsevier).

Tarczy-Hornoch, K., Martin, K.A., Jack, J.J., Stratford, K.J. (1998). Synaptic interactions between smooth and spiny neurones in layer 4 of cat visual cortex in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 508 (Pt 2), 351-363.

Tarczy-Hornoch, K., Martin, K.A., Stratford, K.J., Jack, J.J. (1999). Intracortical excitation of spiny neurons in layer 4 of cat striate cortex in vitro. *Cereb. Cortex* 9, 833-843.

Thomson, A.M. (1997). Activity-dependent properties of synaptic transmission at two classes of connections made by rat neocortical pyramidal axons in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 502 (Pt 1), 131-147.

Thomson, A.M. und Deuchars, J. (1994). Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex. *Trends Neurosci.* 17, 119-126.

Thomson, A.M., West, D.C., Wang, Y., Bannister, A.P. (2002). Synaptic connections and small circuits involving excitatory and inhibitory neurons in layers 2-5 of adult rat and cat

neocortex: triple intracellular recordings and biocytin labelling in vitro. *Cereb. Cortex* 12, 936-953.

Van der Loos, H. (1976). Neuronal circuitry and its development. *Prog. Brain Res.* 45, 259-278.

Vincent, S.B. (1912). The function of the vibrissae in the behavior of the white rat. *Behavior Monographs* 1, 1-81.

Waite, P.M.E. (1973). Somatotopic organization of vibrissal responses in the ventro-basal complex of the rat thalamus. *J. Physiol. (Lond.)* 228, 527-540.

Waite, P.M.E. und Tracey, D.J. (1995). Trigeminal sensory system. In *The Rat Nervous System*, G. Paxinos, ed. (Sydney: Academic Press), 705-724.

Wallace, H. und Fox, K. (1999). Local cortical interactions determine the form of cortical plasticity. *J. Neurobiol.* 41, 58-63.

Welker, C. (1971). Microelectrode delineation of fine grain somatotopic organization of (SmI) cerebral neocortex in albino rat. *Brain Res.* 26, 259-275.

Welker, C. (1976). Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 166, 173-189.

Welker, C. und Woolsey, T.A. (1974). Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J. Comp. Neurol.* 158, 437-453.

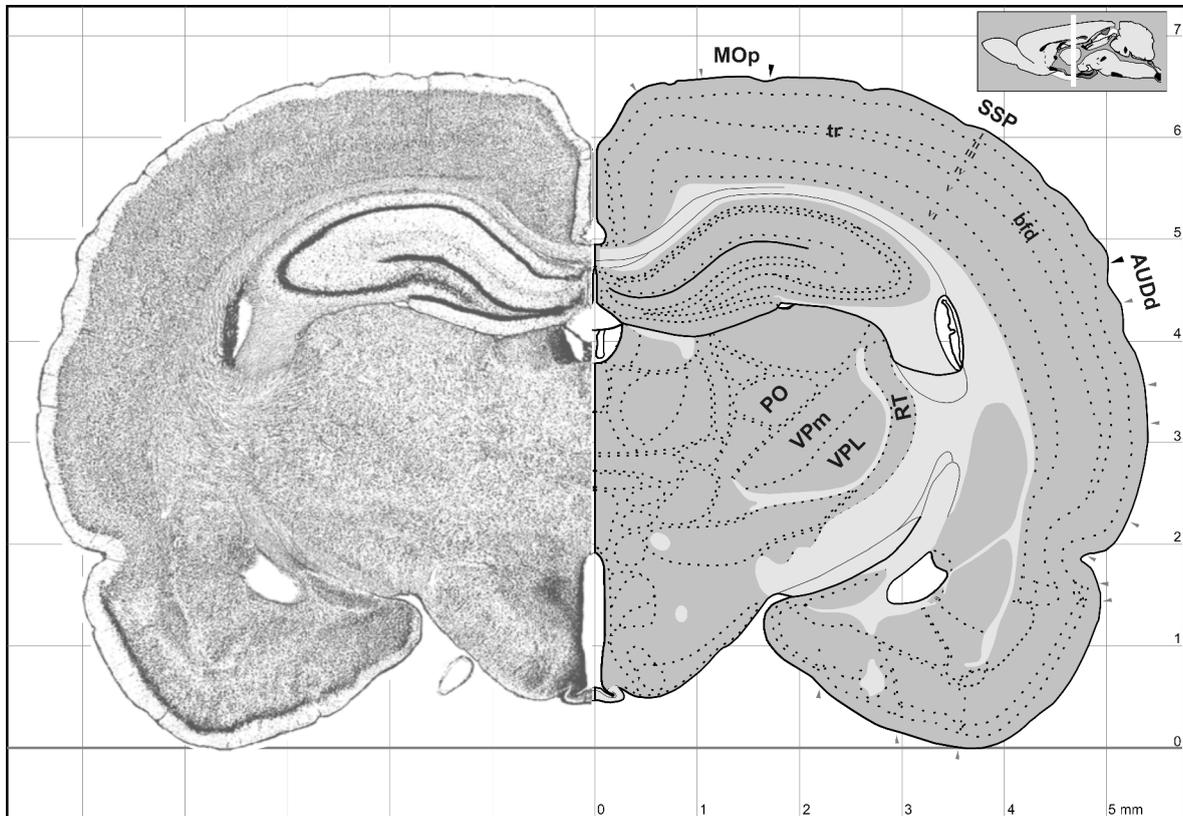
White, E.L. (1978). Identified neurons in mouse Sml cortex which are postsynaptic to thalamocortical axon terminals: a combined Golgi-electron microscopic and degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 181, 627-661.

Wieboldt, R., Gee, K.R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B.K., Hess, G.P. (1994). Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8752-8756.

Williams, S.R. und Stuart, G.J. (1999). Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 521 Pt 2, 467-482.

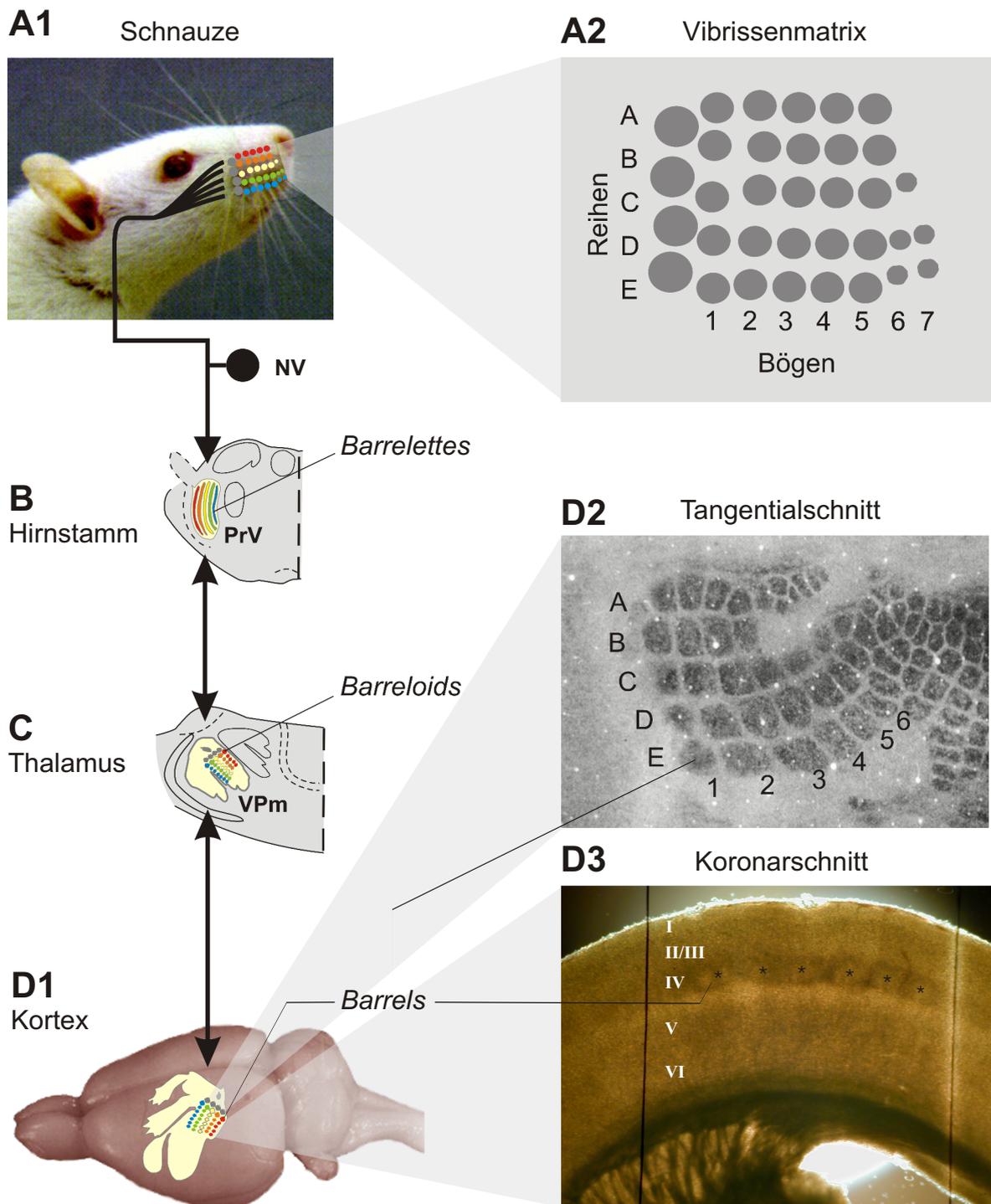
- Wise, S.P. und Jones, E.G. (1976). The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J. Comp. Neurol.* *168*, 313-343.
- Wise, S.P. und Jones, E.G. (1977). Cells of origin and terminal distribution of descending projections of the rat somatic sensory cortex. *J. Comp. Neurol.* *175*, 129-157.
- Wong-Riley, M.T., Merzenich, M.M., Leake, P.A. (1978). Changes in endogenous enzymatic reactivity to DAB induced by neuronal inactivity. *Brain Res.* *141*, 185-192.
- Wong-Riley, M.T. und Welt, C. (1980). Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *77*, 2333-2337.
- Woolsey, T.A., Dierker, M.L., Wann, D.F. (1975). Mouse SmI cortex: qualitative and quantitative classification of golgi- impregnated barrel neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *72*, 2165-2169.
- Woolsey, T.A. und Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* *17*, 205-242.
- Yabuta, N.H., Sawatari, A., Callaway, E.M. (2001). Two functional channels from primary visual cortex to dorsal visual cortical areas. *Science* *292*, 297-300.
- Zhang, Z.W. und Deschênes, M. (1997). Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling study. *J. Neurosci.* *17*, 6365-6379.

## 8 Abbildungen



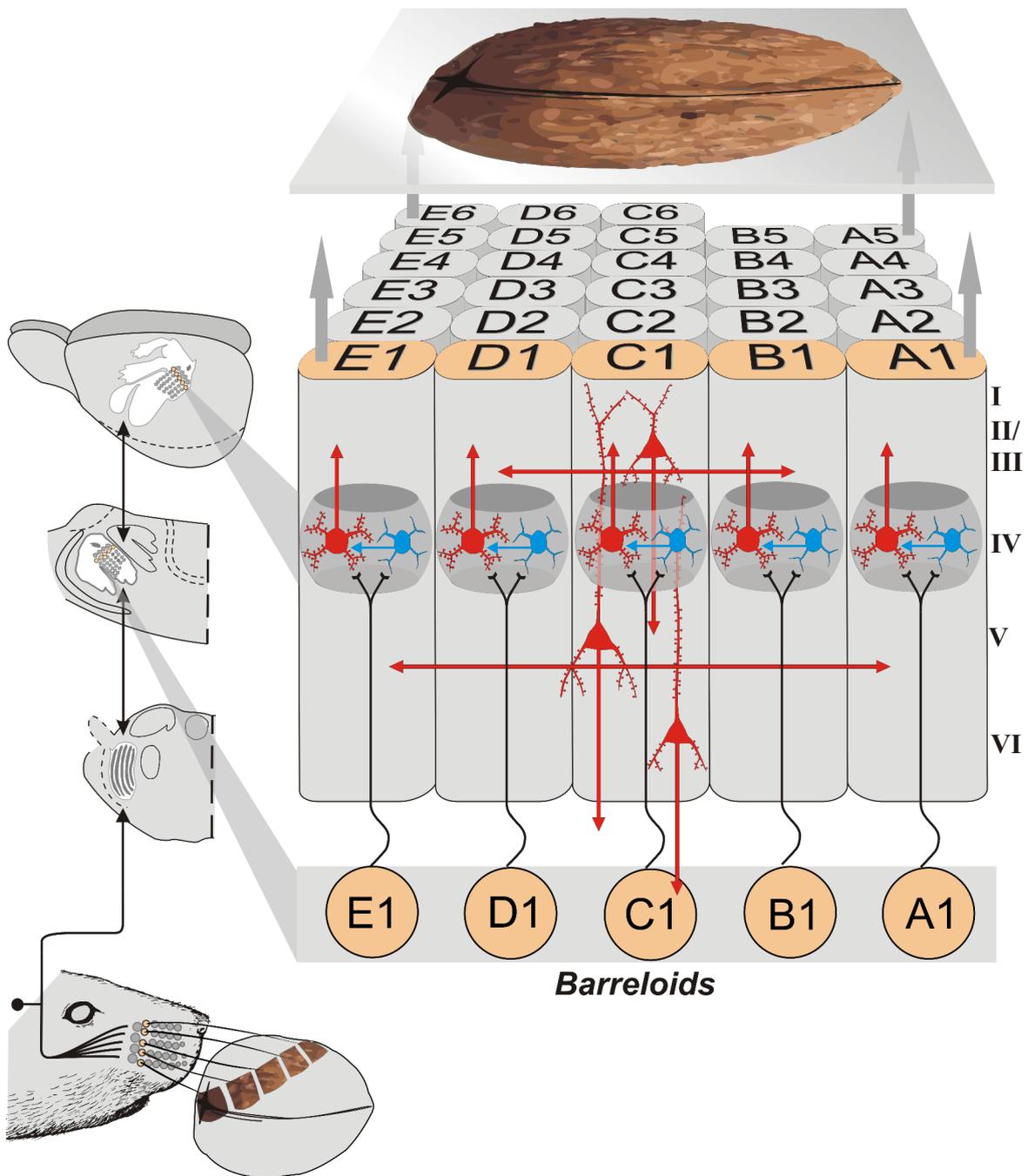
**Abbildung 1: Koronarschnitt durch das Gehirn der Ratte.**

Koronarschnitt Nr. 30 aus dem stereotaktischen Atlas von Swanson (1998). *Linke Hirnhemisphäre:* Nissl gefärbtes Präparat. *Rechte Hirnhemisphäre:* Schematische Darstellung der Abgrenzungen der Kortexareale, Kerne, Faserbahnen und Liquorräume. Die römischen Zahlen (*I-VI*) verdeutlichen die Unterteilung des Kortex in 6 Laminae. Die Beschriftung zeigt weiterhin die in dem Hirnschnitt enthaltenen Bereiche, die dem trigeminalen somatosensorischen System zugeordnet werden. *bfd* - Barrefield; *PO* - Nucleus posterior thalami; *RT* - Nucleus reticularis thalami; *SSp* - primärer somatosensorischer Kortex; *tr* - Rumpfrepräsentation (*trunk*); *VPL* - Nucleus ventralis posterolateralis; *Vpm* - Nucleus ventralis posteromedialis. Direkt an den *SSP* angrenzend finden sich der primäre motorische Kortex (*MOp*) und der dorsale auditive Kortex (*AUDd*). *Inset:* Mediansagittal-Ansicht des Rattengehirns. Die *weiße Linie* zeigt die rostro-kaudale Lage des dargestellten Hirnschnittes an.



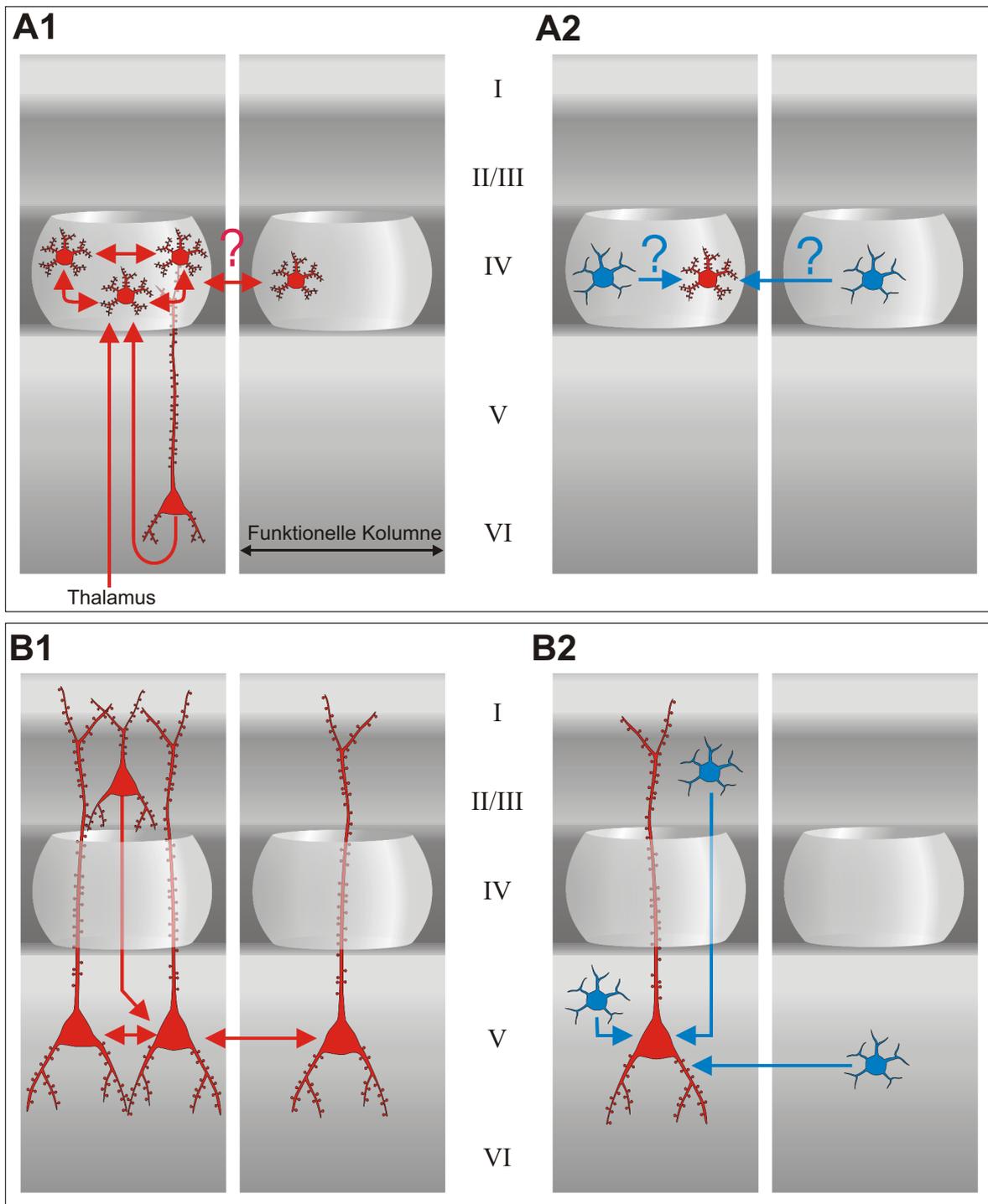
**Abbildung 2: Verschaltungsweg des Vibrissensystems bei der Ratte.**

Sensorische Information jeder einzelnen Vibrisse auf der Schnauze (**A1**) wird über den *Nervus trigeminus* (NV) in Substrukturen (*Barrelettes*) im *Nucleus principalis nervi trigemini* (*PrV*) des Hirnstamms geleitet (**B**). Von den *Barrelettes* gelangen die Signale über die so genannten *Barreloids* im ventroposteriomedialen Nucleus (*VPm*) des Thalamus (**C**) in die *Barrels* der kontralateralen Seite des primären somatosensorischen Kortex (**D1**). Die Topographie der Vibrissenmatrix bleibt hierbei im Thalamus und als Teil des so genannten "Rattunculus" im Kortex erhalten (*hellgelb unterlegte Fläche*). (**A2**) Schematische Darstellung der Vibrissenmatrix auf der Schnauze; (**D2**) Für Cytochromoxidase gefärbter Tangentialschnitt durch Lamina IV des somatosensorischen Kortex (*Barrel-Field*). Die *Barrels* des posteromedialen *Barrel-Field* (Vibrissenfeld) sind entsprechend der Nomenklatur ihrer zugeordneten Vibrissen beschriftet. (**D3**) Bereits im lebenden und ungefärbten Koronarschnitt sind die *Barrels* in Lamina IV zu erkennen. Die *Sternchen* markieren die 5 in diesem Schnitt lokalisierten großen *Barrels* des Vibrissenfeldes.



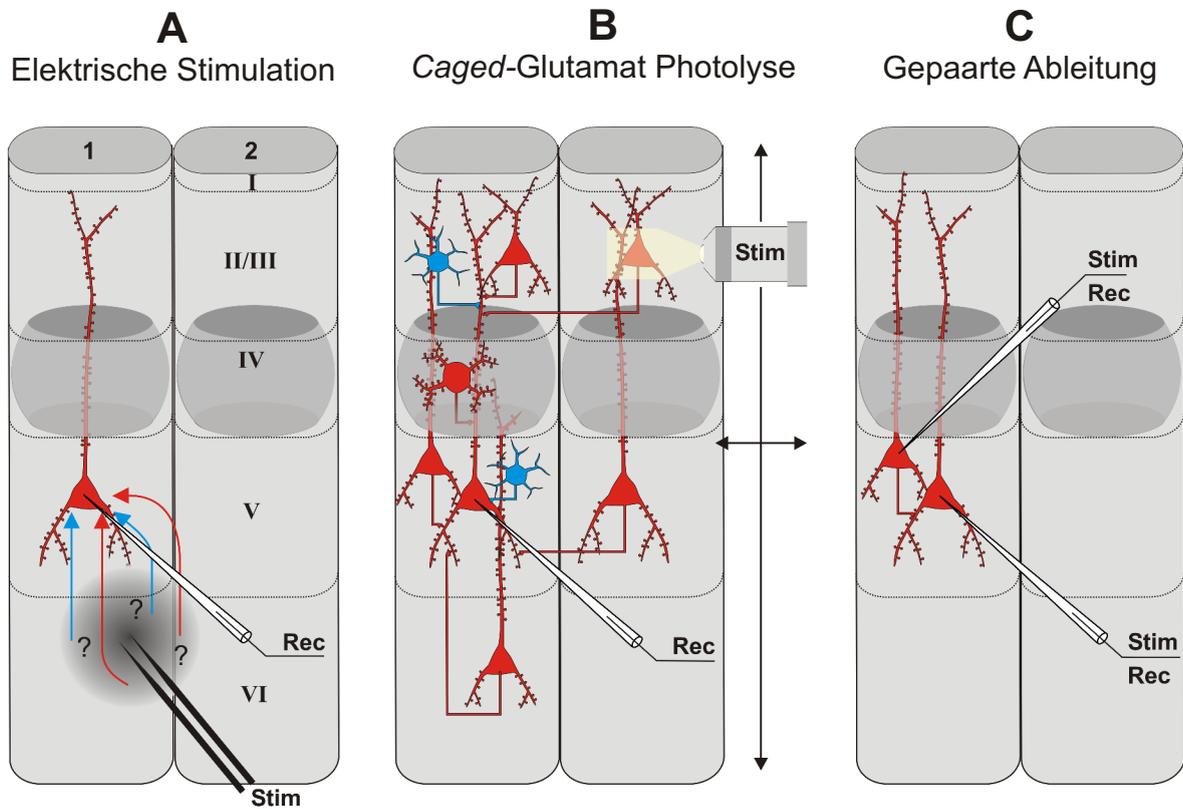
**Abbildung 3: Modell für intrakortikale Signalverarbeitung.**

Stark vereinfachte Darstellung der Signalverarbeitung des lemniskalen Verschaltungsweges im somatosensorischen Kortex. Die Informationen einer einzelnen Vibrisse sind nicht ausreichend, um ein Zielobjekt (*Walnuss*) vollständig zu explorieren und zu erkennen. Hierfür müssen im Kortex die Informationen vieler Vibrissen integriert werden. Sensorische Informationen jeweils einzelner Vibrissen gelangen nach Passieren des Hirnstamms von den thalamischen *Barreloids* hauptsächlich in die kortikale Lamina IV. Ziel der thalamischen Afferenzen sind dort bedornte exzitatorische (rot) und glatte inhibitorische Neuronen (blau) innerhalb eines *Barrels*. Die Informationen werden vom *Barrel* ausgehend, nach Verarbeitung durch Neuronen in den supragranulären Laminae II/III, an die Projektionsneuronen in den infragranulären Laminae V und VI geleitet. Die Neuronen der supra- und besonders der infragranulären Laminae können hierbei die sensorische Information mehrerer Kolonnen integrieren. Die Projektionsneuronen der Lamina V und VI senden dann die verarbeiteten Signale unter anderem an entferntere kortikale sowie subkortikale Areale. Die Beschriftungen der *Barreloids* im Thalamus und der Kolonnen im Kortex entsprechen der Anordnung der Vibrissen auf der Schnauze (*sandfarbig*: erster Bogen in der Vibrissenmatrix und die assoziierten Repräsentationen/Kolonnen).



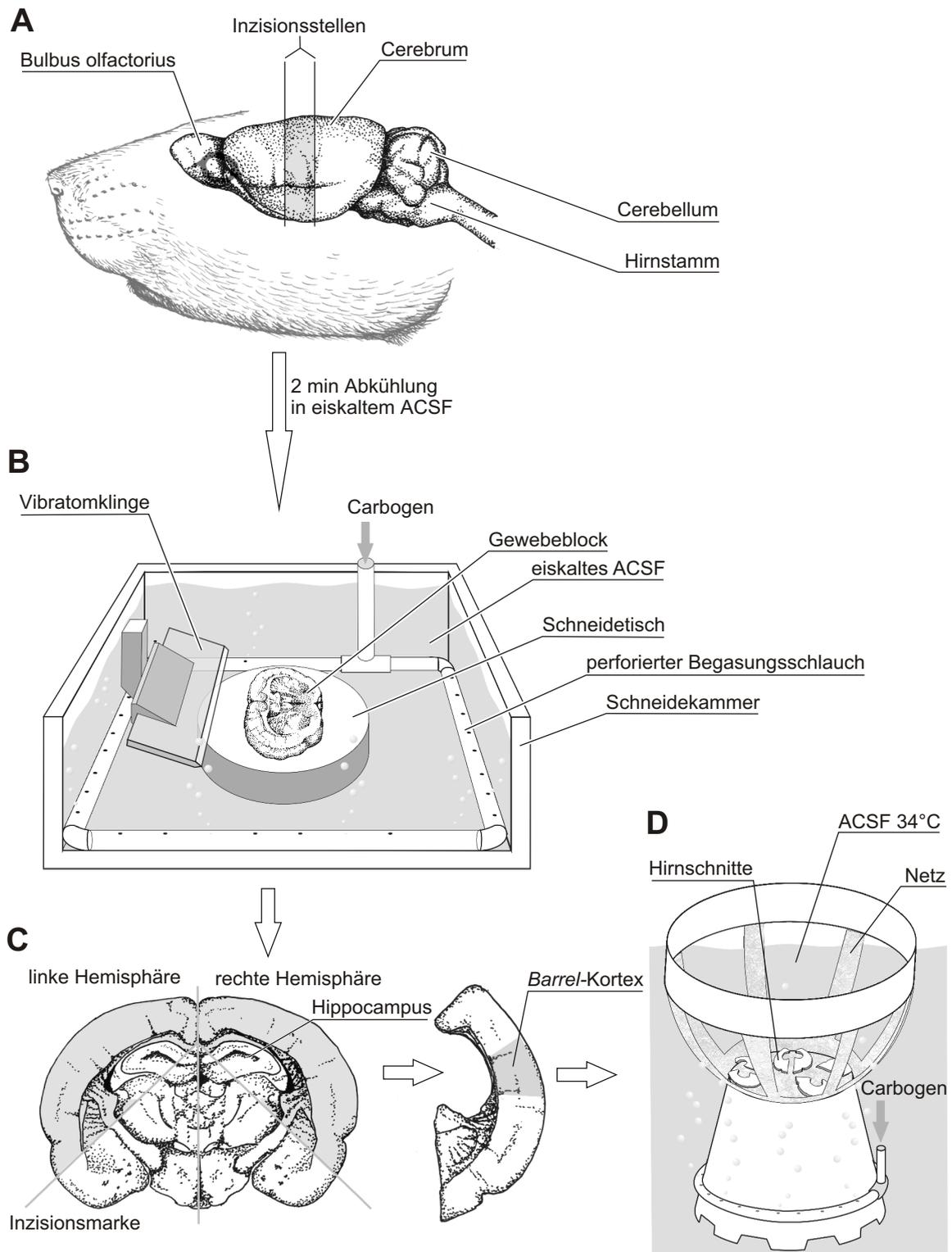
**Abbildung 4: Aus der Literatur zusammengestellte Modelle zur funktionellen Konnektivität exzitatorischer Neuronen in Lamina IV und Vb.**

Stark vereinfachte Modelle der funktionellen Konnektivität von bedornten Neuronen der Lamina IV (A) und Pyramidenzellen der Lamina Vb (B) gemäß bisheriger Befunde aus *in vivo* und *in vitro* Einzelzell-Studien des somatosensorischen Kortex der Ratte. Bisher beschriebene exzitatorische synaptische Eingänge (rot) auf bedornte Neuronen der Lamina IV (A1). Die Existenz exzitatorischer monosynaptischer Verbindungen zwischen benachbarten *Barrels* ist umstritten. Als Ursprünge inhibitorischer Kontrolle (A2) werden sowohl Interneuronen (blau) desselben als auch des benachbarten *Barrels* diskutiert. Bisher beschriebene exzitatorische (B1) und inhibitorische Eingänge (B2) auf Pyramidenzellen der Lamina Vb.



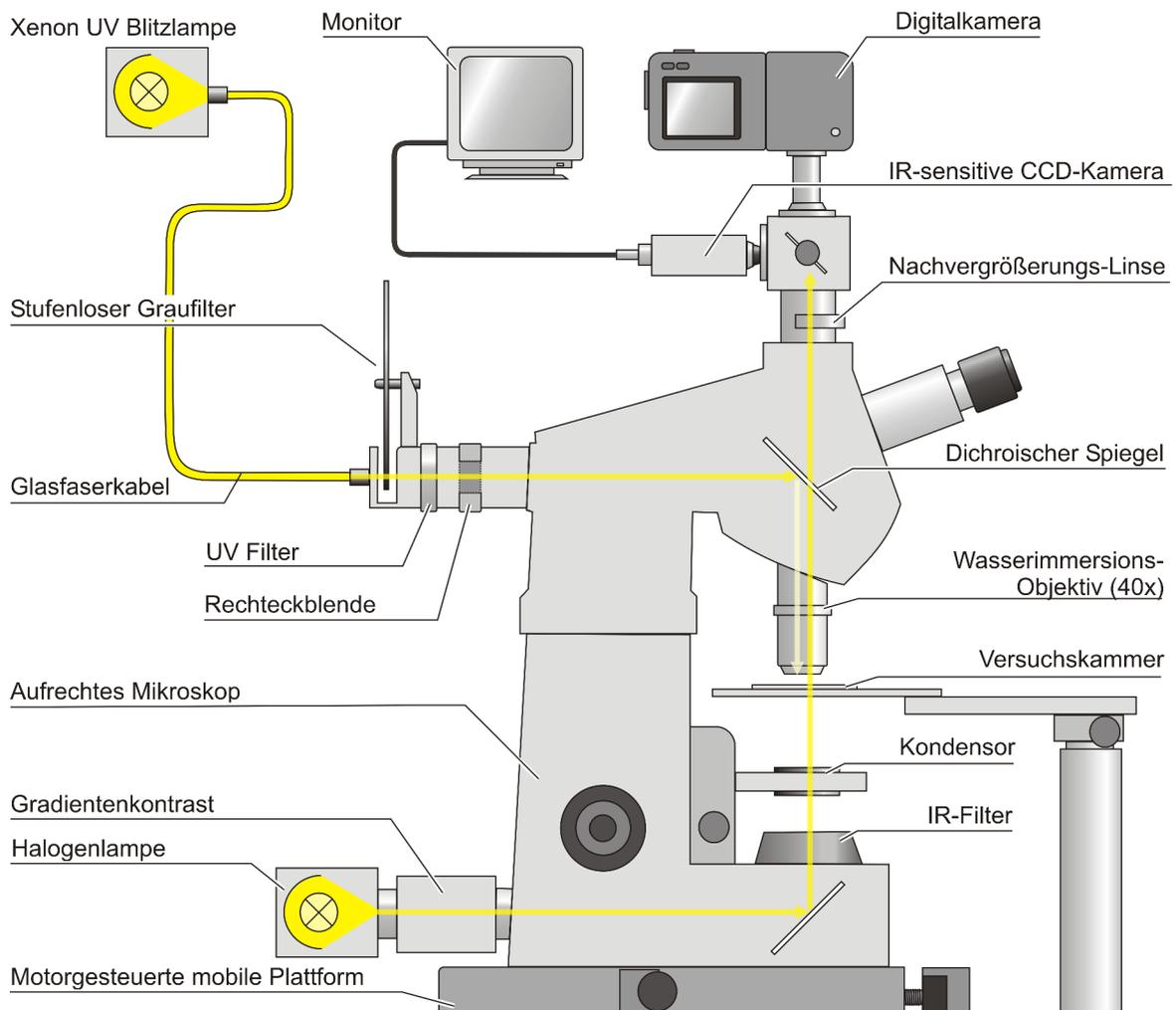
**Abbildung 5: Methoden zur Untersuchung der synaptischen Eingänge auf einzelne abgeleitete Neuronen.**

Schematische Darstellungen jeweils zweier funktioneller Kolumnen (1,2) und der 6 Laminae (I-VI) im Barrel-Kortex. **(A)** Die Stimulation (Stim) durch eine elektrische Stimulationselektrode führt zur Aktivierung vieler präsynaptischer Zellen und somit zu exzitatorischen (roter Pfeil) und inhibitorischen Eingängen (blauer Pfeil) aus einem diffusen Areal. Dieses Areal kann sowohl über die Grenze einer funktionellen Kolumne als auch einer Lamina herausreichen. Während der Ableitung (Rec) der postsynaptischen Zelle (rote Pyramidenzelle) kann der Stimulationsort nicht gewechselt werden. **(B)** Im Gegensatz dazu ermöglicht die Stimulation durch einen fokussierten Lichtblitz (Stim) die Aktivierung weniger exzitatorischer (rote Zellen) und inhibitorischer präsynaptischer Zellen (blaue Zellen) in definierten Arealen. Während der Ableitung der postsynaptischen Zelle kann gezielt eine Vielzahl von Arealen in allen Laminae und in mehreren funktionellen Kolumnen nacheinander stimuliert werden. **(C)** Bei der gepaarten Ableitung ermöglicht die kontrollierte Stimulation einer abgeleiteten präsynaptischen Zelle die genaue Untersuchung ihrer synaptischen Eingänge auf eine gleichzeitig abgeleitete postsynaptische Zelle. Ein Wechsel des Stimulationsortes während der Ableitung und die Untersuchung entfernterer präsynaptischer Zellen ist allerdings nicht möglich. Der Großteil der synaptischen Eingänge auf ein abgeleitetes Neuron wird nicht erfasst.



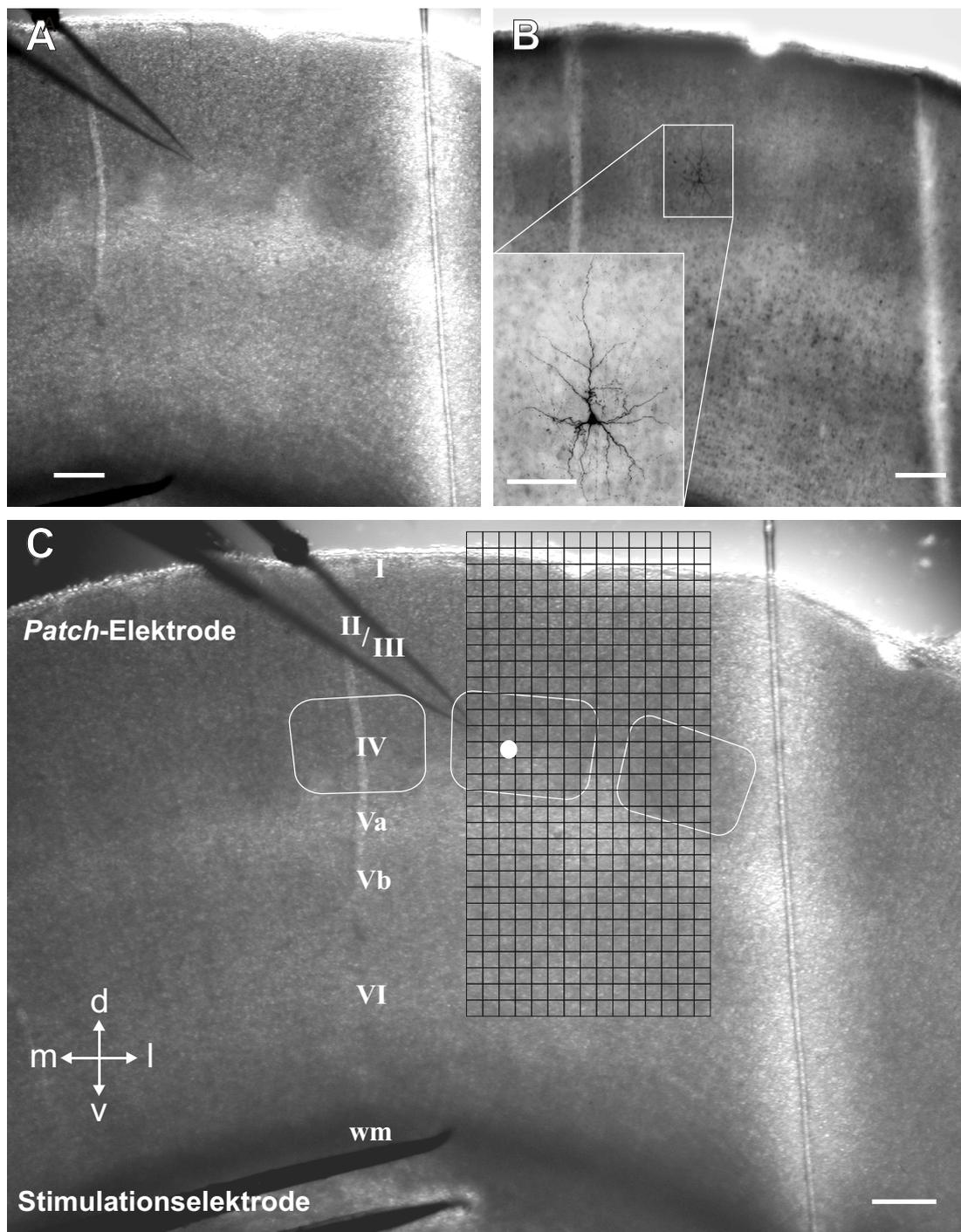
**Abbildung 6: Präparation und Aufbewahrung der in vitro Hirnschnittpräparate.**

(A) Nach Dekapitation der betäubten Ratte wird dem Schädel ein Hirngewebeblock entnommen, der den somatosensorischen Kortex enthält. (B) Nach Herunterkühlung wird der Gewebeblock mit Gewebekleber auf dem Schneidetisch eines Vibratoms fixiert. Dort werden 300 µm dicke koronare Hirnschnitte (C) angefertigt und nachfolgend die beiden Hemisphären getrennt sowie der Hippocampus entfernt. (D) Die Hirnschnittpräparate werden bis zum Versuchsbeginn, mindestens aber für eine Stunde, in die temperierte und begaste Aufbewahrungskammer (D) überführt.



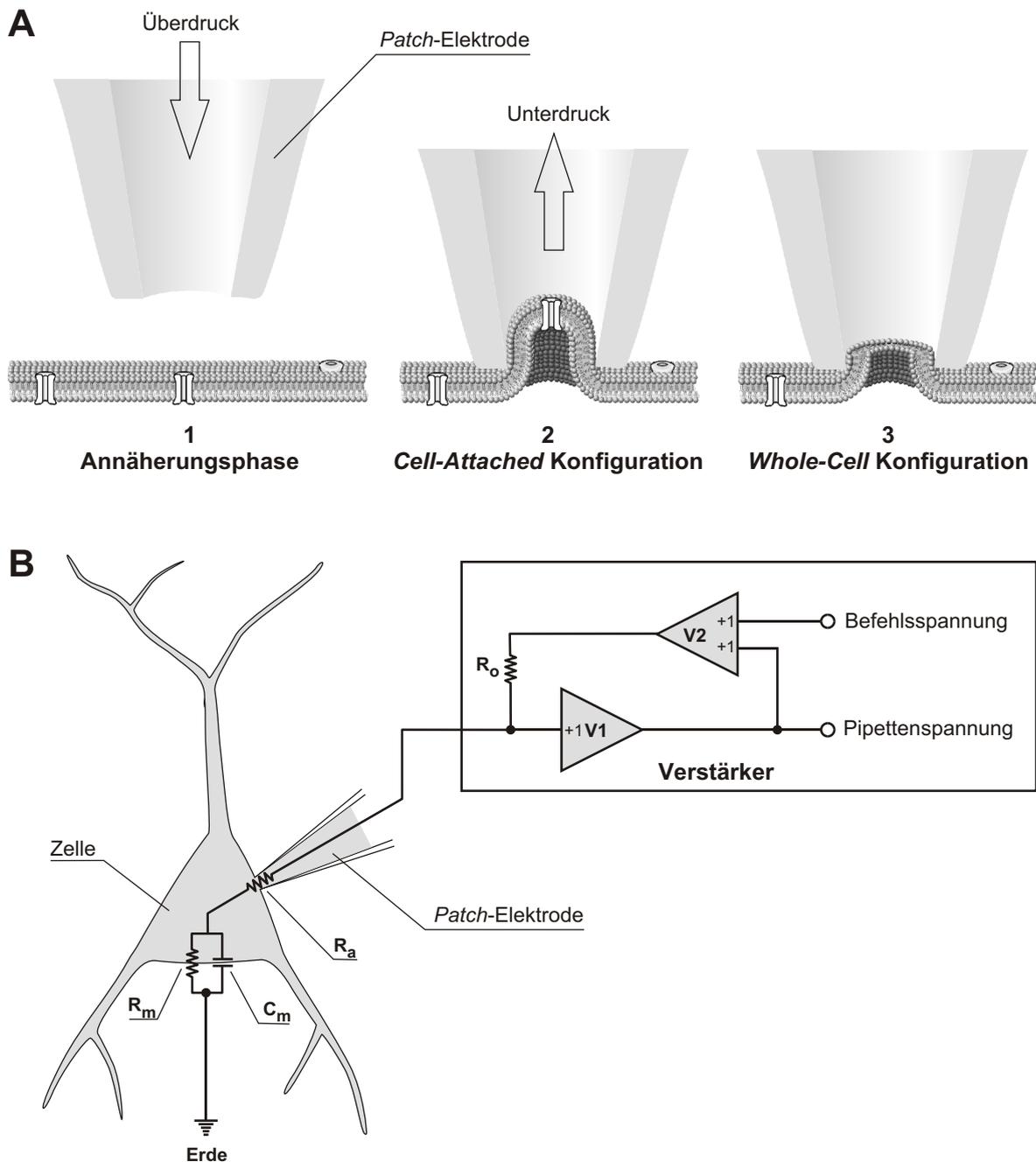
**Abbildung 7: Aufbau der optischen Komponenten.**

Schematische Darstellung der Kombination von Infrarot-Video-Mikroskopie und der UV-Blitz-Photolyse von *Caged*-Glutamat bei automatisierter Positionssteuerung. In *Gelb* dargestellt sind die optischen Wege der Durchlicht-Betrachtungen und der UV-Blitz Applikation. *UV* - Ultraviolett; *IR* - Infrarot; *CCD* - Charged-Coupled-Device.



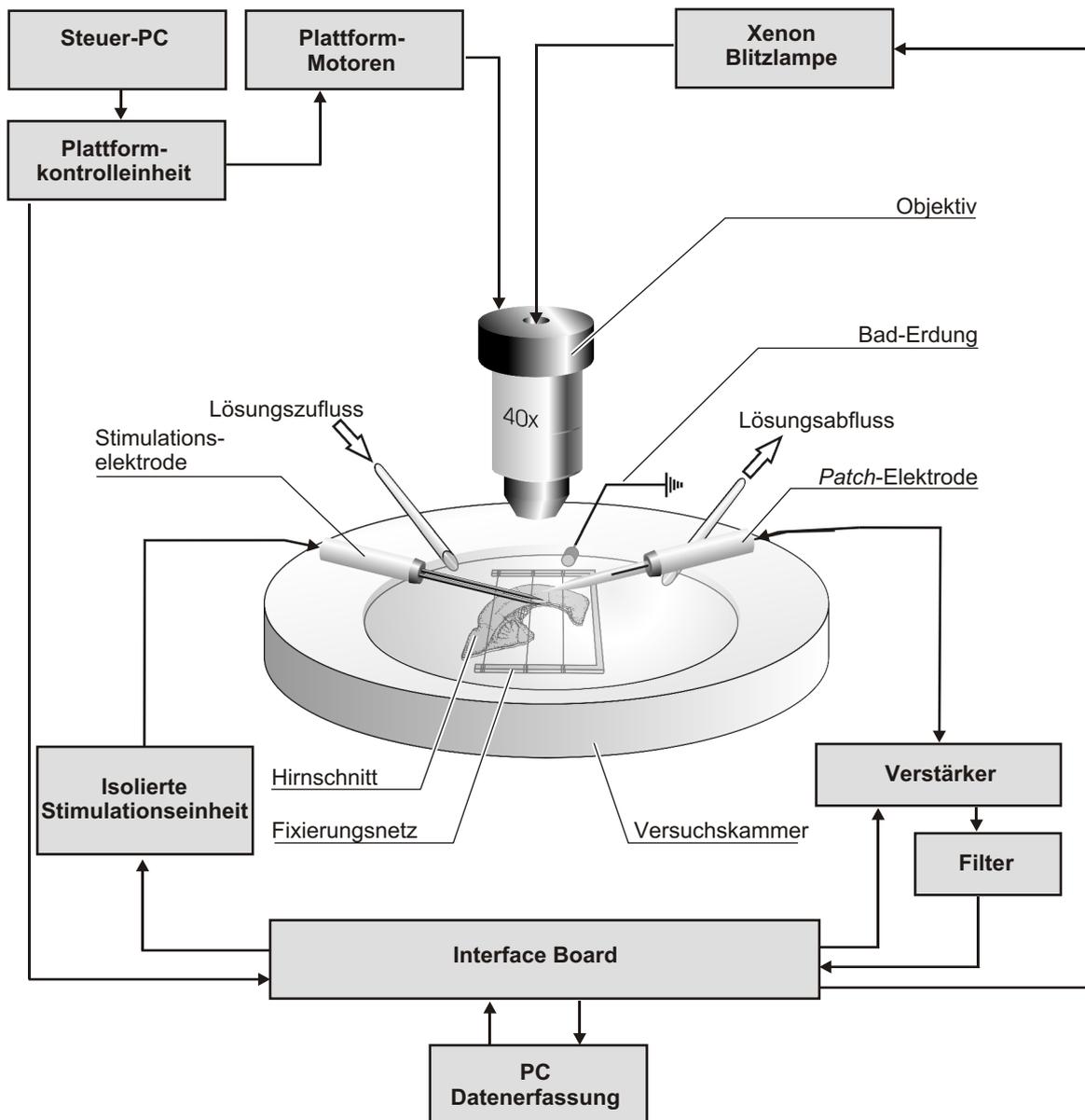
**Abbildung 8: Elektrophysiologische Ableitung und *Caged*-Glutamat Photolyse im somatosensorischen Kortex der Ratte.**

Fotografie eines koronaren Hirnschnittes des somatosensorischen Kortex der Ratte, aufgenommen direkt nach einem Experiment mit positionierten Elektroden (A, C) und nach histologischer Aufarbeitung (B). *Barrelfield* in Lamina IV bei niedriger Vergrößerung (A) im lebenden, ungefärbten Hirnschnittpräparat und (B) nach Färbung mit Biocytin und für Cytochromoxidase C. Das *Inset* zeigt in vergrößerter Darstellung das zuvor abgeleitete Neuron in Lamina IV. (C) Ausmaße der durch lokale Photolyse von *Caged*-Glutamat stimulierten Region (*Gitter*) und Position der abgeleiteten Zelle (*weißer Punkt*). Die Region umfasst 450 Stimulationsorte mit einer Größe von je  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  und deckt mindestens 2 *Barrel*-assoziierte funktionelle Kolumnen sowie alle kortikalen Laminae ab. Die *weißen Rahmen* zeigen die relevanten *Barrels*, *römische Zahlen* die kortikalen Laminae. *d* - dorsal; *v* - ventral; *m* - medial; *l* - lateral. *Skalierbalken*:  $200\ \mu\text{m}$ ; *Inset*:  $100\ \mu\text{m}$ .



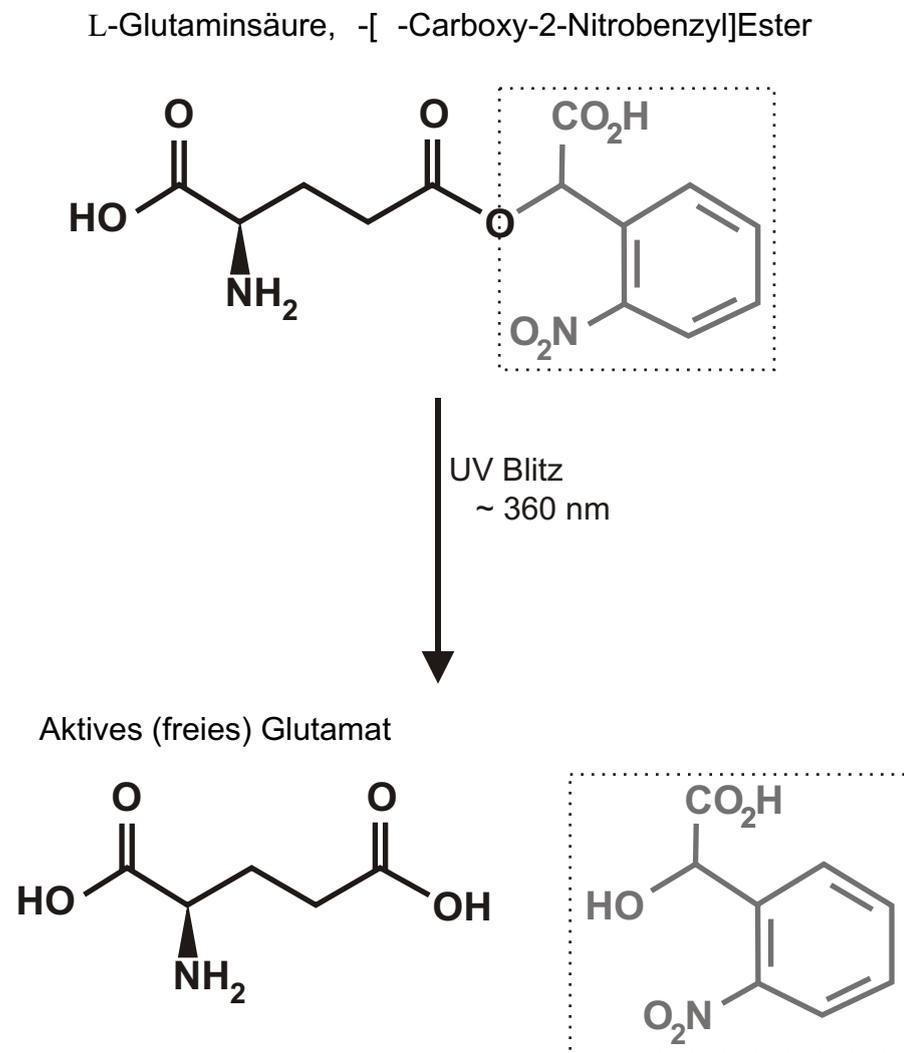
**Abbildung 9: Whole-Cell Patch-Clamp Ableitungen im Current-Clamp Modus.**

(A) Etablierung der *Whole-Cell* Ableitung. In der Annäherungsphase (A1) wird mittels Überdrucks fortlaufend Elektrodenlösung aus der *Patch-Elektrode* gespült. Dadurch kann die Elektrodenspitze der Oberfläche eines Somas angenähert werden, ohne vorher durch Gewebematerial kontaminiert zu werden. Bei Kontakt mit der Zelloberfläche des Somas wird dann durch schwachen Unterdruck mit der Zeit ein Abdichtwiderstand zwischen Elektrodenspitze und Zellmembran im Gigaohm-Bereich etabliert und die so genannte *Cell-Attached* Konfiguration erreicht (A2). Dabei wird ein Membranfleck unter der Elektrodenspitze von der Umgebung isoliert. Kurzzeitiger erhöhter Unterdruck zerreißt die Zellmembran ausschließlich unter der Elektrodenspitze und führt so zur *Whole-Cell* Konfiguration (A3). Dabei steht die Elektrodenlösung in direktem Kontakt und Lösungsaustausch mit dem Zellinneren. (B) Stark vereinfachtes Ersatzschaltbild der *Whole-Cell Patch-Clamp* Ableitung in *Current-Clamp* mit einem Einzelelektroden-Verstärkersystem.  $C_m$  - Membrankapazität;  $R_m$  - Membranwiderstand;  $R_a$  - Serienwiderstand (*Access Resistance*);  $V1/V2$  - Operationsverstärker;  $R_o$  - Ausgangswiderstand.



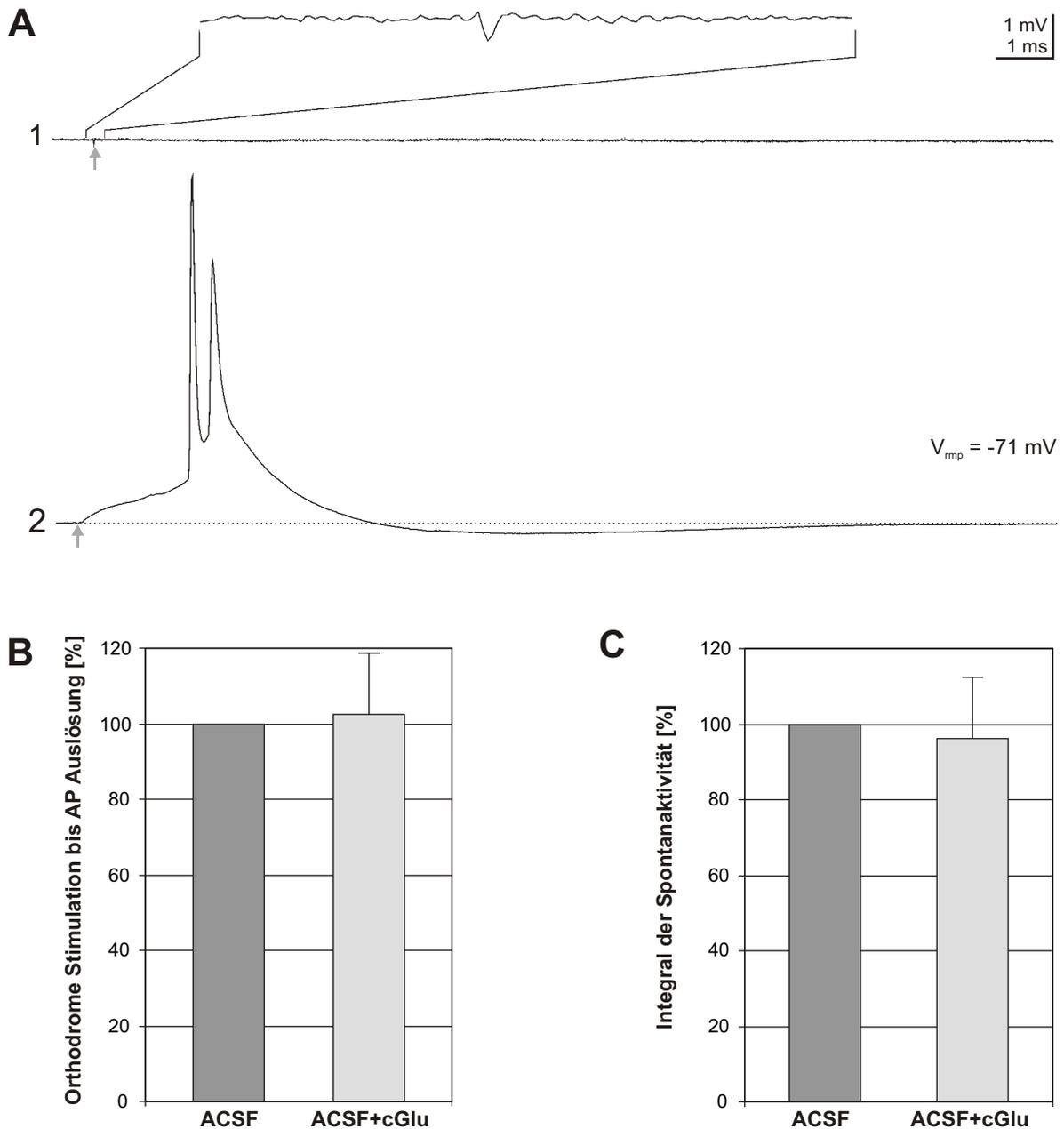
**Abbildung 10: Ableitbedingungen und Stimulationssteuerung.**

Schematische Darstellung der Versuchskammer und der technischen Zusammenhänge zwischen elektrophysiologischer Einzelzelleitung im Hirnschnittpräparat, elektrischer Stimulation und computergesteuerter UV-Stimulation.



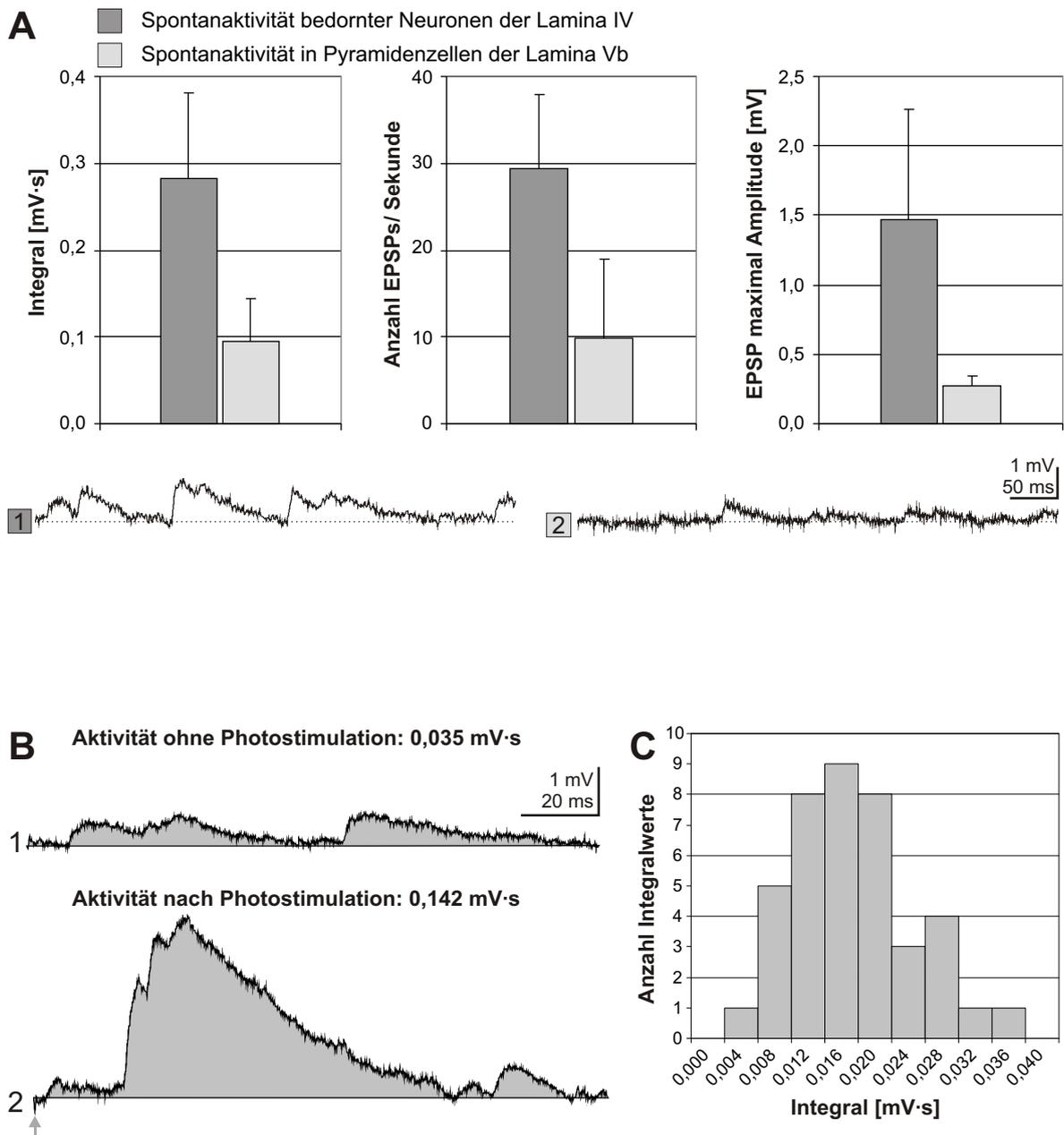
**Abbildung 11: Photolyse von *Caged*-Glutamat.**

Für die lokale Stimulation kortikaler Neuronen wurde ein zunächst inaktiver Neurotransmitter eingesetzt. Das verwendete *Caged*-Glutamat (L-Glutaminsäure, -[ -Carboxy-2-Nitrobenzyl] Ester) ist über eine photoreaktive Esterbindung mit einer Seitengruppe (*Kasten*) verbunden, die einen molekularen Käfig für das Glutamat bildet. Mittels eines UV Blitzes (~360 nm) kann die Esterbindung im Bereich von  $\mu\text{s}$  photolytisch gespalten und aktives Glutamat freigesetzt werden.



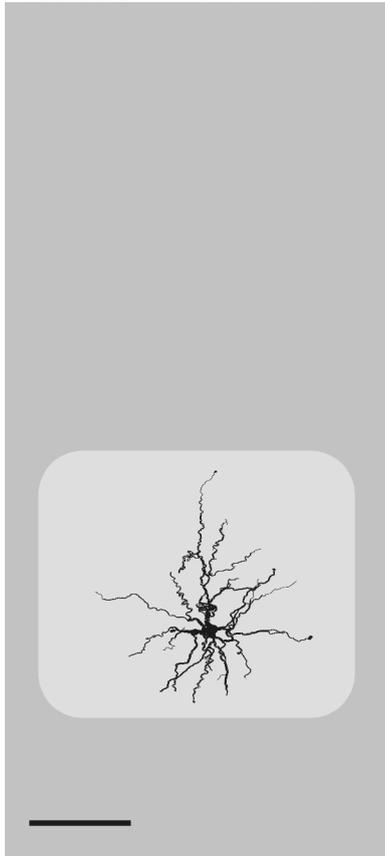
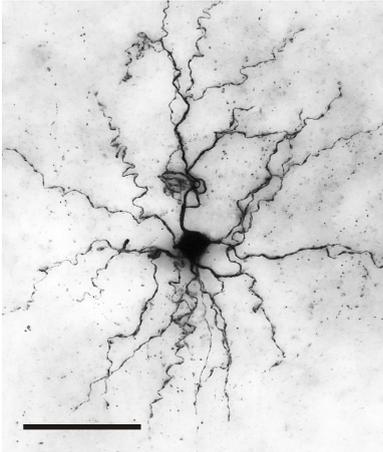
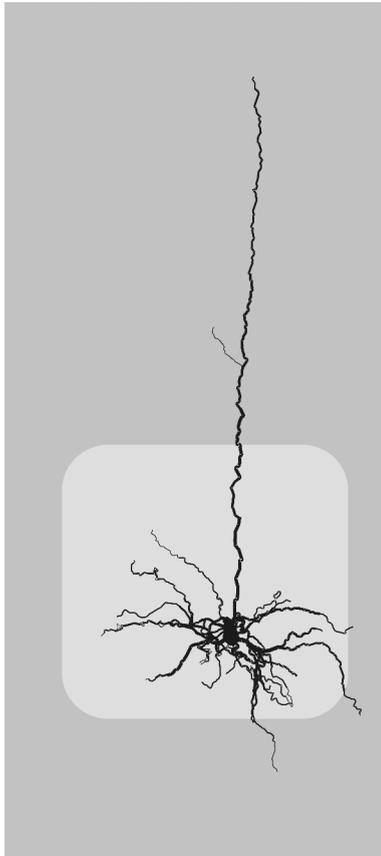
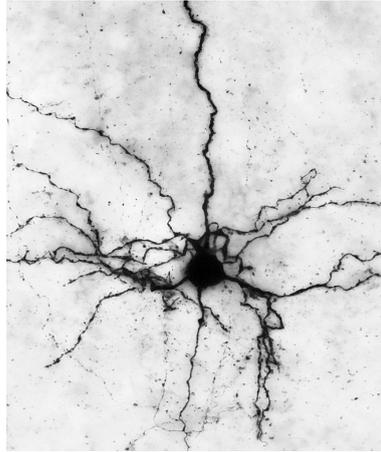
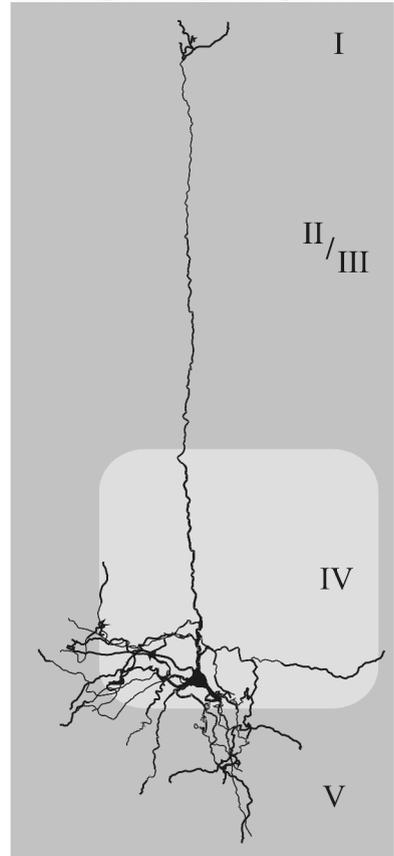
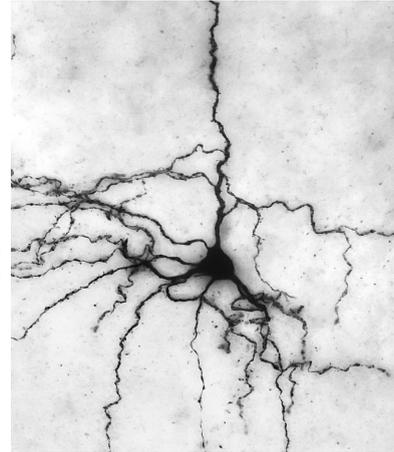
**Abbildung 12: Direkte Auswirkungen von Photostimulation und Caged-Glutamat auf neuronale Membraneigenschaften.**

(A) Registrierungen des Membranpotentials bei direkter Photostimulation des abgeleiteten Somas vor (A1) und nach (A2) Zugabe von Caged-Glutamat. (A1) Die Auslösung des UV-Blitzes führt ohne Caged-Glutamat ausschließlich zu einem sehr kurzen, gerätebedingten Reizartefakt. (A2) Erst in Anwesenheit von Caged-Glutamat induziert der UV-Blitz deutliche Veränderungen des Membranpotentials der abgeleiteten Zelle. (B, C) Die Zugabe von Caged-Glutamat hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die orthodrom ausgelösten synaptischen Eingänge und die Spontanaktivität der untersuchten Zellen. (B) Relativer Vergleich der zur Auslösung von Aktionspotentialen benötigten orthodromen Stimulationsstärke ( $n = 8$ ) vor und nach Zugabe von Caged-Glutamat. (C) Relativer Vergleich der Spontanaktivität vor und nach Zugabe von Caged-Glutamat ( $n = 29$ ). Ermittelt wurden jeweils die Gesamtintegralwerte aller spontanen EPSPs in einem Zeitfenster von 3 s. ACSF - Artifizielle Cerebrospinal Flüssigkeit; cGlu - Caged-Glutamat; AP - Aktionspotential.

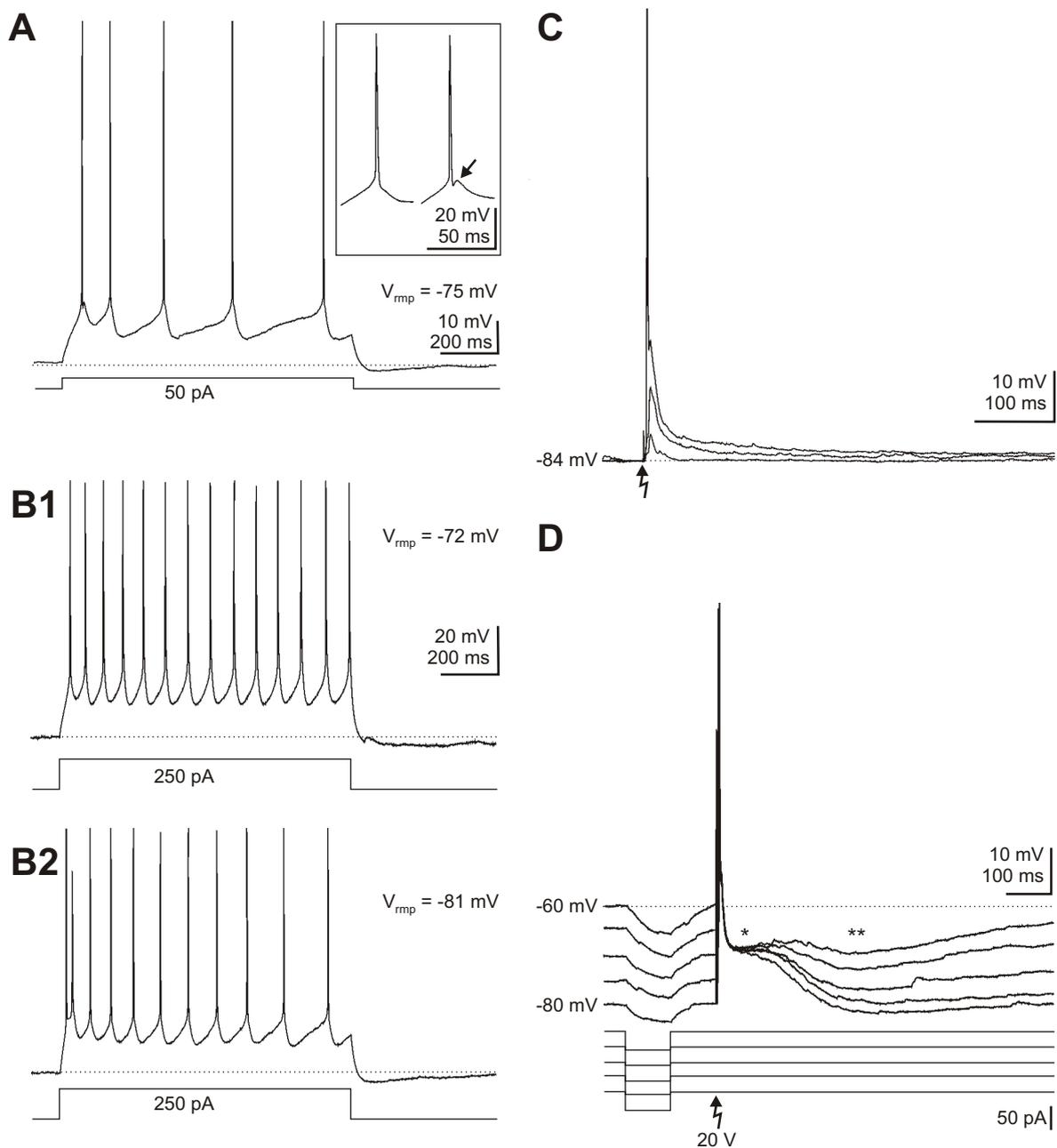


**Abbildung 13: Unterscheidung Spontanaktivität und Photolyse induzierte Aktivität.**

(A) Vergleich der Spontanaktivität in bedornten Neuronen der Lamina IV ( $n = 18$ ) und in Pyramidenzellen der Lamina Vb ( $n = 10$ ). Die Histogramme zeigen jeweils das durchschnittliche Gesamtintegral, die Anzahl und die maximale Amplitude aller EPSPs in einem Zeitfenster von einer Sekunde. Registrierbeispiele der Spontanaktivität eines bedornten Neuron der Lamina IV (A1) und einer Pyramidenzelle der Lamina Vb (A2). (B, C) Bestimmung des zellspezifischen Schwellenwertes für nicht-photolyseinduzierte Aktivität bei bedornten Neuronen der Lamina IV. (B) Registrierbeispiele und Integralbestimmung (grau unterlegte Fläche) der Aktivität eines bedornten Neurons in Lamina IV ohne vorhergehende Photostimulation (B1) und nach Photostimulation (Pfeil) mit photolyseinduzierter Aktivität (B2) in einem Zeitfenster von 150 ms. (C) Histogrammbeispiel zur Bestimmung des zellspezifischen Schwellenwertes. Gezeigt ist die Verteilung der Integralwerte für Spontanaktivität ermittelt anhand von 40 Kontrollregistrierungen für ein Zeitfenster von jeweils 150 ms. Der Schwellenwert für nicht-photolyseinduzierte Aktivität liegt hier bei 0,04 mV·s.

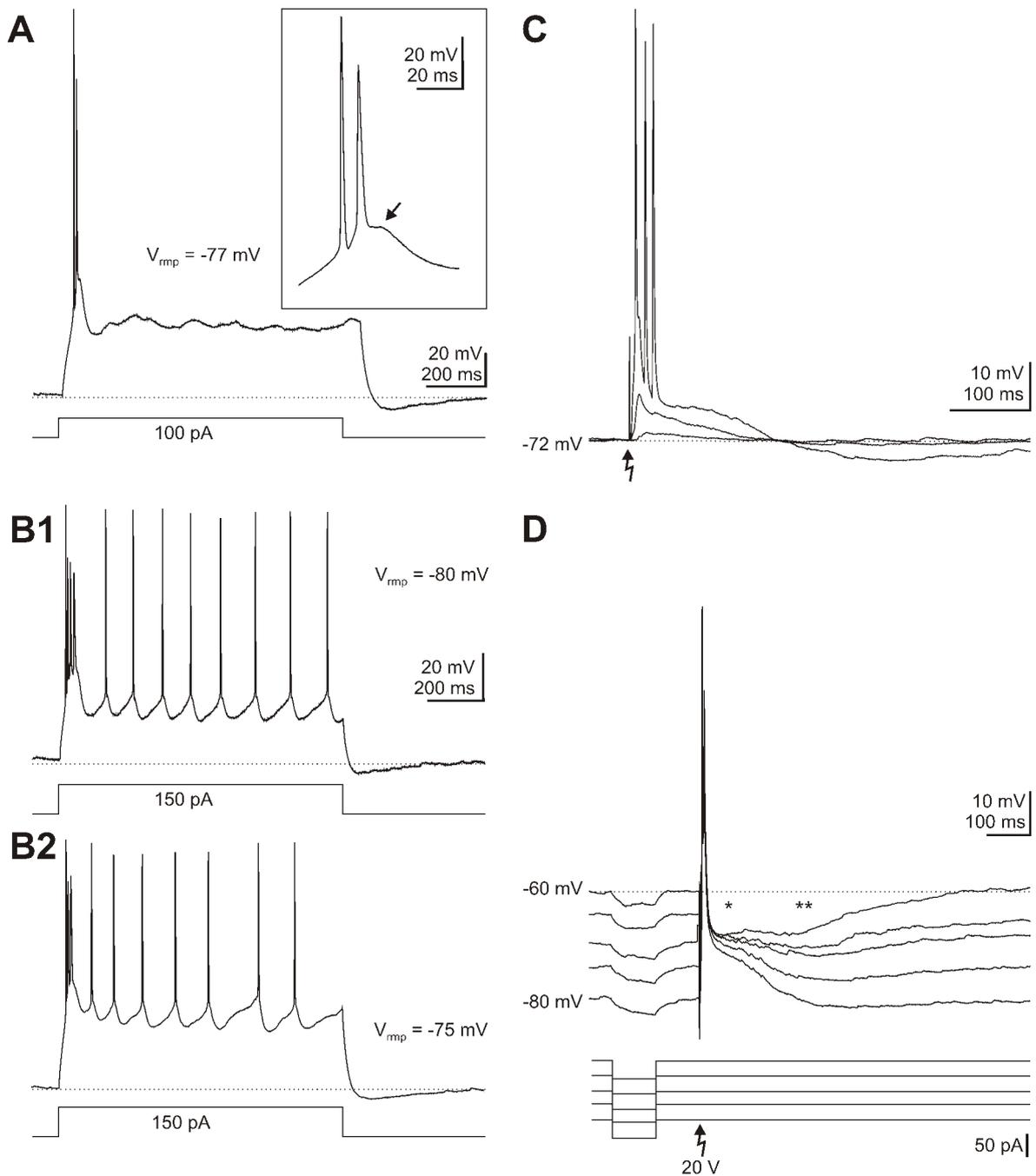
**A** Bedornzte Sternzelle**B** Sternpyramidenzelle**C** „Echte“ Pyramidenzelle**Abbildung 14: Morphologie bedornter Neuronen in Lamina IV.**

Die Kolumnen zeigen jeweils oben die lichtmikroskopische Fotografie der mit Biocytin gefüllten Zellen und darunter die zugehörige somatodendritische Rekonstruktion. Die römischen Zahlen deuten die kortikalen Laminae an. Die hellgrau hinterlegten Felder illustrieren die Dimensionen des jeweils relevanten *Barrels* in Lamina IV. (A) Morphologie einer bedornzte Sternzelle; die sphärisch organisierten Dendriten bleiben innerhalb der Grenzen eines *Barrels* (dunkelgrau hinterlegtes Feld). (B) Morphologie einer Sternpyramidenzelle; sie besitzt einen apikalen Dendriten, der den *Barrel* in Richtung der supragranulären Laminae verlässt. Die nicht apikalen primären Dendriten sind mehr oder weniger sphärisch um das Soma organisiert. (C) Morphologie einer „echten“ Pyramidenzelle; sie besitzt wie eine Sternpyramidenzelle einen apikalen Dendriten, der den *Barrel* in Richtung der supragranulären Laminae verlässt. Die nicht apikalen primären Dendriten sind polarisiert organisiert und formen eine „Schürze“ basaler Dendriten. Skalierbalken Fotos: 50  $\mu\text{m}$ ; Rekonstruktionen: 100  $\mu\text{m}$ .



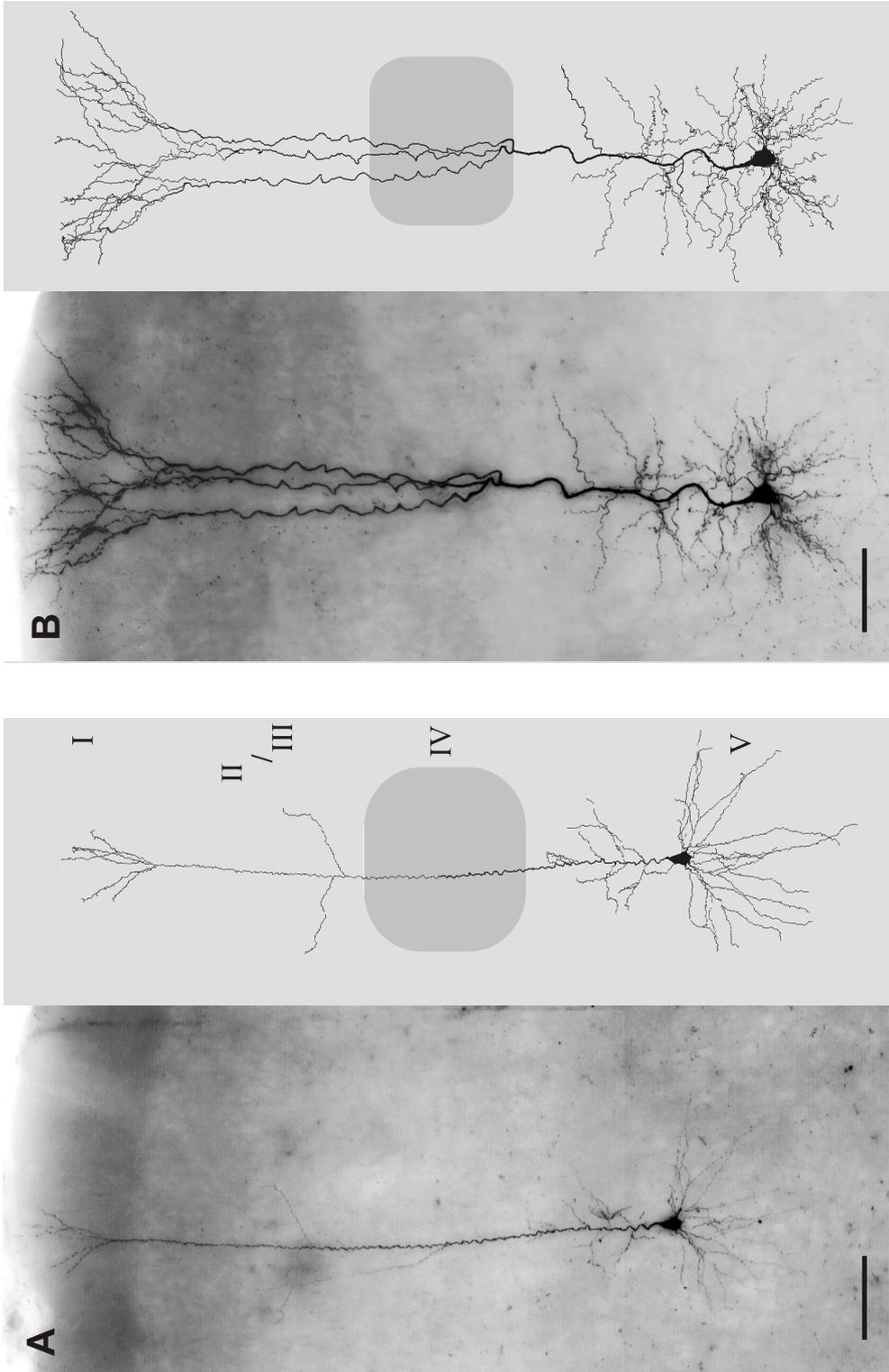
**Abbildung 15: Elektrophysiologische Eigenschaften von regelmäßig feuern den bedornten Neuronen in Lamina IV.**

*Current-Clamp*-Registrierungen bei Injektion depolarisierender Strompulse (A, B) und nach orthodromer elektrischer Stimulation (C, D). (A) Schwache überschwellige Strominjektion am Ruhemembranpotential. *Vergrößerter Ausschnitt*: In einigen regelmäßig feuern den bedornten Neuronen folgten den Aktionspotentialen kleine depolarisierende Nachpotentiale (*Pfeil*). (B) Starke überschwellige Strominjektion. (B1) Zelle ohne Aktionspotential-Frequenzadaptation. (B2) Zelle mit Frequenzadaptation; dem initialen Aktionspotential folgt nach einem Intervall von 11 ms ein weiteres Aktionspotential, das auf dem kleinen depolarisierenden Nachpotential des initialen Aktionspotential aufsetzte. (C) Orthodrome Stimulation (*Pfeil*) am Ruhemembranpotential bei verschiedenen Stimulationsstärken. (D) Starke, überschwellige orthodrome Stimulation (*Pfeil*) bei unterschiedlichen Haltepotentialen. \* - schnelles IPSP; \*\* - langsames IPSP.



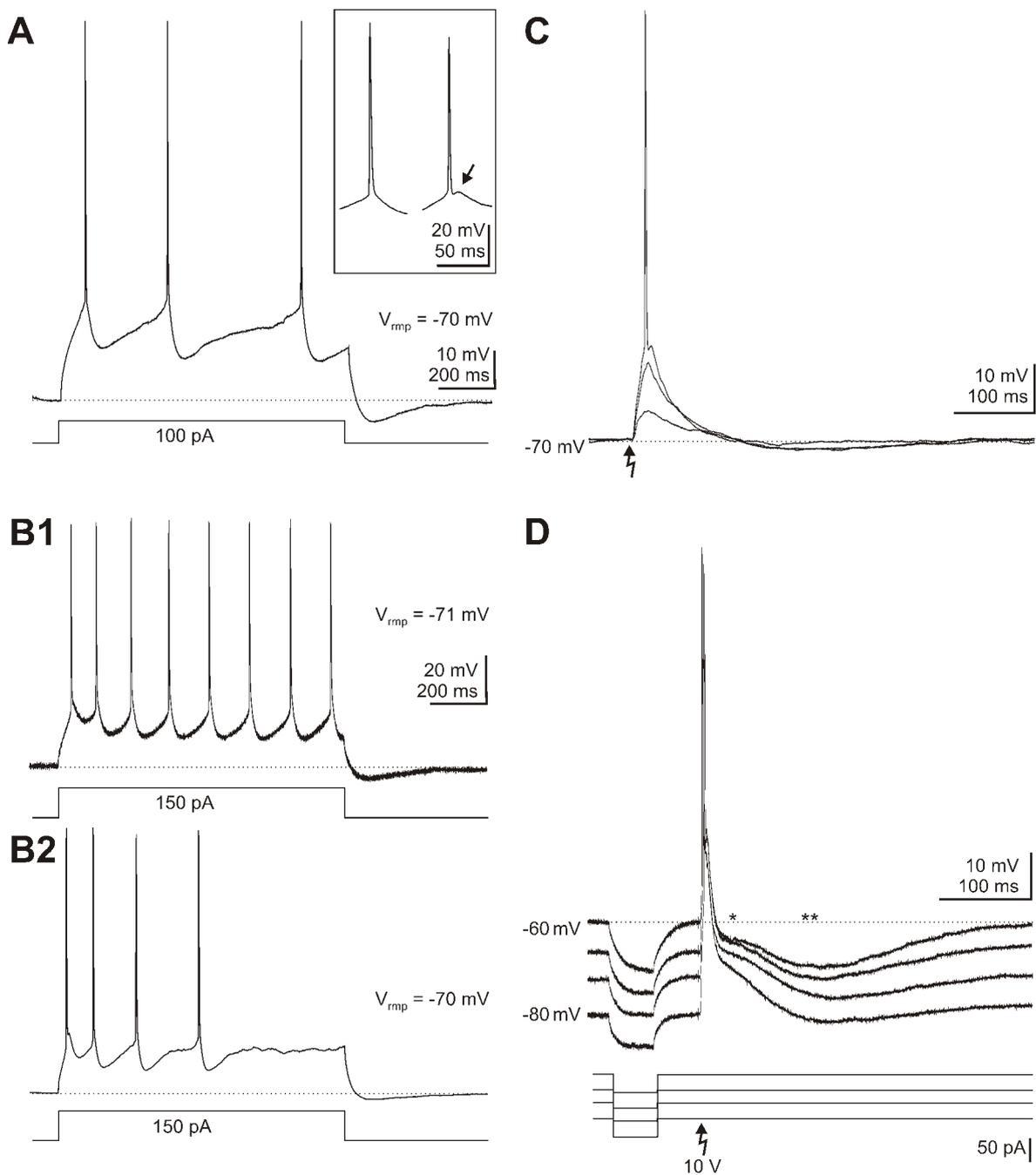
**Abbildung 16: Elektrophysiologische Eigenschaften von intrinsisch Salven feuernden bedornten Neuronen in Lamina IV.**

*Current-Clamp*-Registrierungen bei Injektion depolarisierender Strompulse (**A**, **B**) und nach orthodromer elektrischer Stimulation (**C**, **D**). (**A**) Schwache überschwellige Strominjektion am Ruhemembranpotential. *Vergrößerter Ausschnitt*: Dem initialen Aktionspotential folgt ein deutliches, depolarisierendes Nachpotential (*Pfeil*), auf dem ein weiteres Aktionspotential aufsattelt. (**B**) Starke überschwellige Strominjektion löst eine initiale hochfrequente Salve von 3-4 Aktionspotentialen aus. (**B1**) Zelle ohne Frequenzadaptation. (**B2**) Zelle mit Frequenzadaptation. (**C**) Orthodrome Stimulation (*Pfeil*) am Ruhemembranpotential bei verschiedenen Stimulationsstärken. (**D**) Starke, überschwellige orthodrome Stimulation (*Pfeil*) bei unterschiedlichen Haltepotentialen. \* - schnelles IPSP; \*\* - langsames IPSP.



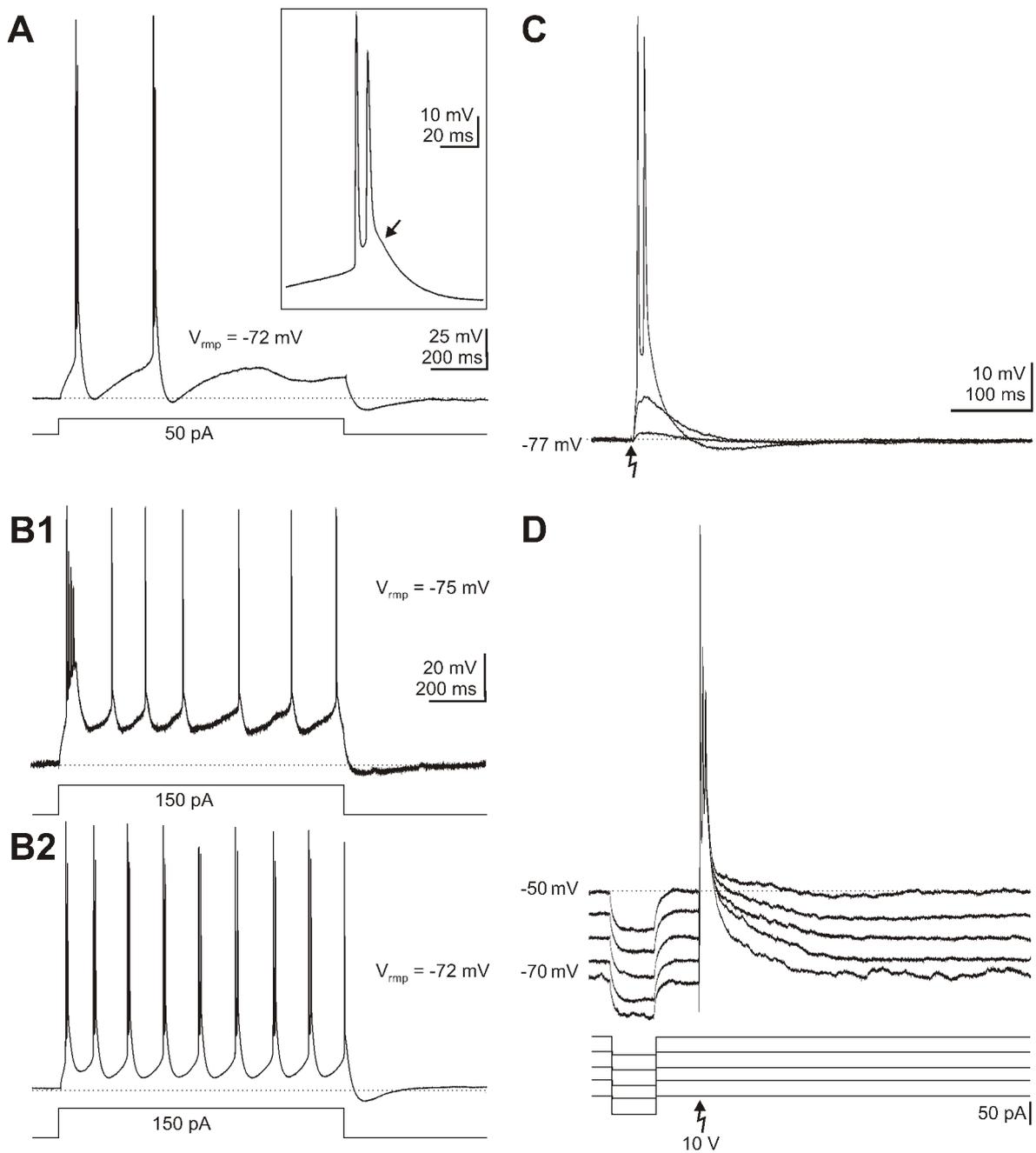
**Abbildung 17: Morphologie und Elektrophysiologie von Pyramidenzellen in Lamina Vb.**

(A) Morphologie einer regelmäßig feuermnden Pyramidenzelle; aus einem relativ kleinen ovoiden Soma tritt neben den basalen Dendriten ein dünner, wenig verzweigter apikaler Dendrit aus. (B) Morphologie einer intrinsisch Salven feuermnden Pyramidenzelle; aus einem großen pyramidalen Soma tritt neben den basalen Dendriten ein dicker, reich verzweigter apikaler Dendrit aus, der in den supragranulären Laminae ein ausgeprägtes terminales Büschel bildet. Skalierbalken: 100 µm.



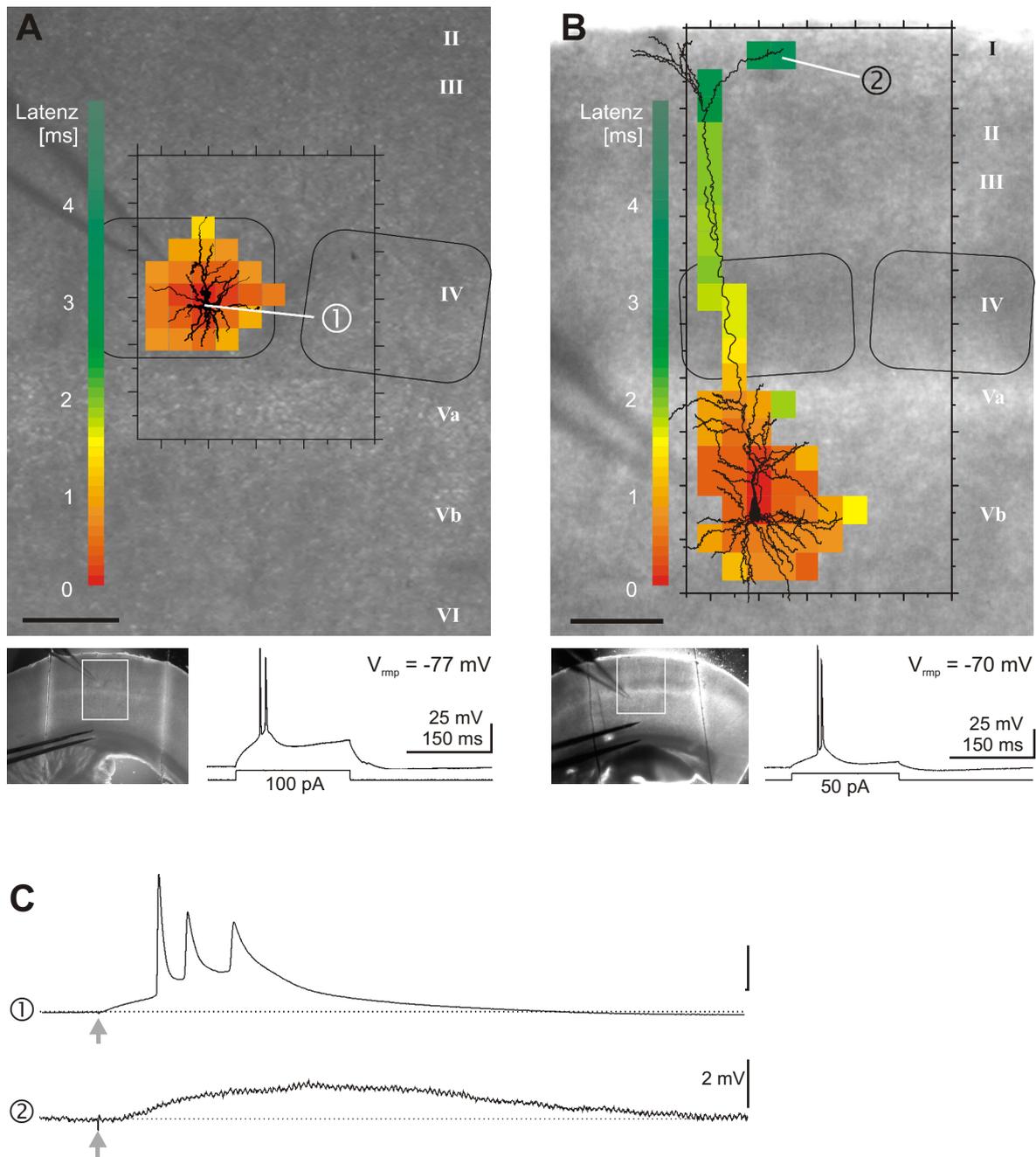
**Abbildung 18: Elektrophysiologische Eigenschaften von regelmäßig feuernenden (RS) Pyramidenzellen in Lamina Vb.**

*Current-Clamp*-Registrierungen bei Injektion depolarisierender Strompulse (**A**, **B**) und nach orthodromer elektrischer Stimulation (**C**, **D**). (**A**) Schwache überschwellige Strominjektion am Ruhemembranpotential. *Vergrößerter Ausschnitt*: In einigen regelmäßig feuernenden bedornten Neuronen folgten den Aktionspotentialen kleine depolarisierende Nachpotentiale (*Pfeil*). (**B**) Starke überschwellige Strominjektion. (**B1**) Zelle ohne Frequenzadaptation. (**B2**) Zelle mit Frequenzadaptation. (**C**) Orthodrome Stimulation (*Pfeil*) am Ruhemembranpotential bei verschiedenen Stimulationsstärken. (**D**) Starke, überschwellige orthodrome Stimulation (*Pfeil*) bei unterschiedlichen Haltepotentialen. \* - schnelles IPSP; \*\* - langsames IPSP.



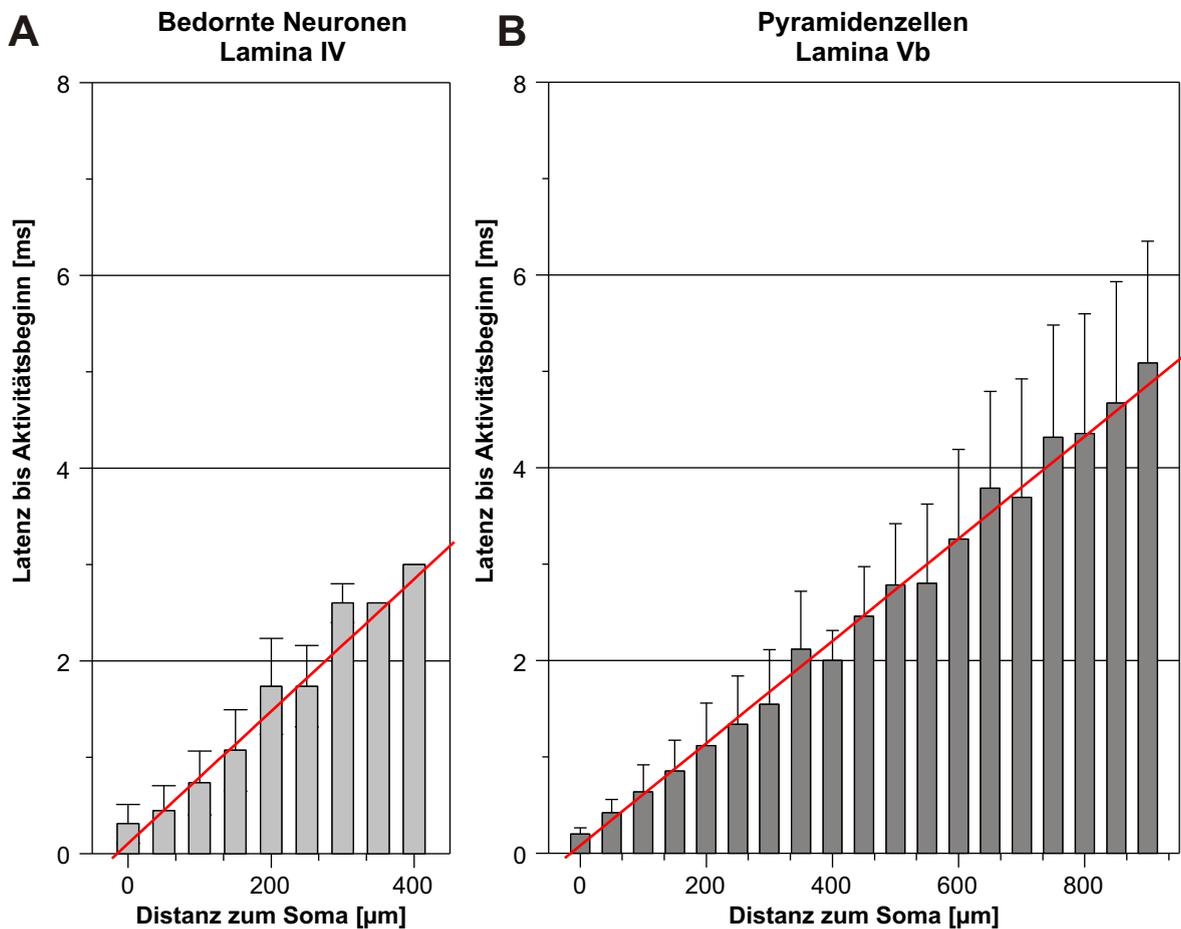
**Abbildung 19: Elektrophysiologische Eigenschaften von intrinsisch Salven feuernden (IB) Pyramidenzellen in Lamina Vb.**

*Current-Clamp*-Registrierungen bei Injektion depolarisierender Strompulse (A, B) und nach orthodromer elektrischer Stimulation (C, D). (A) Schwache überschwellige Strominjektion am Ruhemembranpotential. *Vergrößerter Ausschnitt*: Dem initialen Aktionspotential folgt ein deutliches depolarisierendes Nachpotential (*Pfeil*), auf dem ein weiteres Aktionspotential aufsattelt. (B) Starke überschwellige Strominjektion löst eine initiale hochfrequente Salve von 2 bis 4 Aktionspotentialen aus. (B1) IB-Pyramidenzelle feuert eine initiale Salve bestehend aus 4 Aktionspotentialen gefolgt von Einzelaktionspotentialen. (B2) IB-Pyramidenzelle feuert repetitiv Dubletten von Aktionspotentialen. (C) Orthodrome Stimulation (*Pfeil*) am Ruhemembranpotential bei verschiedenen Stimulationsstärken. (D) Starke, überschwellige orthodrome Stimulation (*Pfeil*) bei unterschiedlichen Haltepotentialen. \* - schnelles IPSP; \*\* - langsames IPSP.



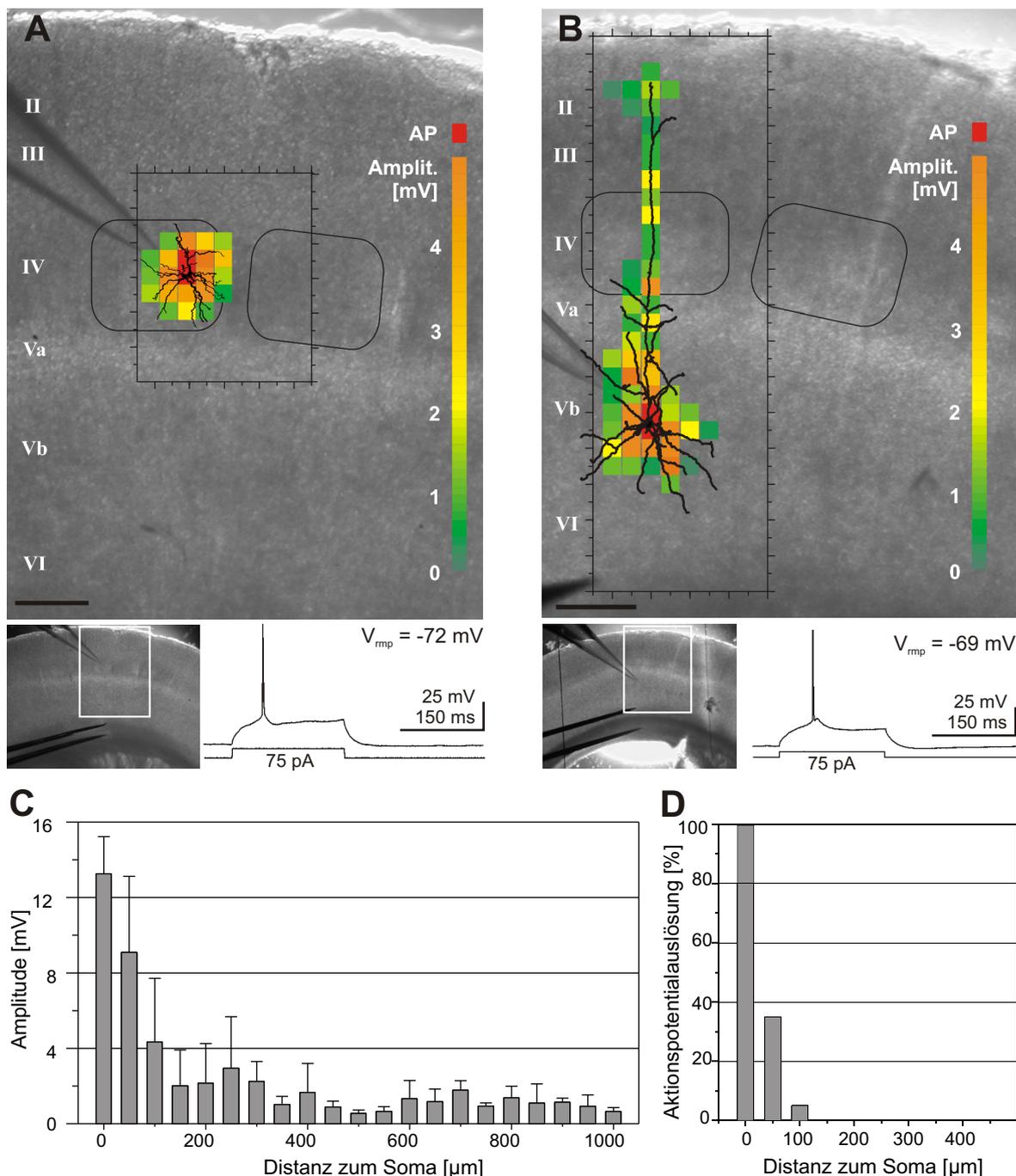
### Abbildung 20: Latenzen direkter photolyseinduzierter Aktivität.

Topographische Karte der Latenzen photolyseinduzierter Aktivität bei einer bedornten Sternzelle der Lamina IV (**A**) und einer IB-Pyramidenzelle der Lamina Vb (**B**) in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF. Für die Karten wurden die Fotografie des Nativbildes, die somatodendritische Rekonstruktion des abgeleiteten Neurons und die topographische Karte induzierter Aktivität überlagert. Die *skalierten Rahmen* zeigen die Dimensionen des jeweilig untersuchten Areals, *abgerundete Rahmen* markieren die relevanten *Barrels* in Lamina IV. Stimulierte Felder ohne induzierte Aktivität sind transparent. Farbige Felder zeigen entsprechend der Farbskala die Latenzen zwischen Photostimulus und Aktivitätsbeginn. Unter den Karten sind Position des vergrößert dargestellten Bereichs im Foto des nativen Hirnschnittes (*weißer Rahmen*),  $V_{mp}$  und Aktionspotentialfeuermuster der jeweils abgeleiteten Zelle nach depolarisierender Strominjektion dargestellt. (**C**) Registrierungen des Membranpotentials nach Photostimulation (*Pfeil*) von Feldern, deren Positionen in topographischen Karten angezeigt sind (*arabische Zahlen 1-2*). In niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF wird Aktivität nur in Feldern mit dendritischen Extensionen der abgeleiteten Zelle induziert. Perisomatische Stimulation (**C1**) induzierte überschwellige Depolarisationen mit sehr kurzen Latenzen ( $\sim 0,2 \text{ ms}$ ), während nach Stimulation entfernter dendritischer Bereiche (**C2**) Aktivität nach längerer Latenz registriert wurde. *Skalierbalken*:  $200 \mu\text{m}$



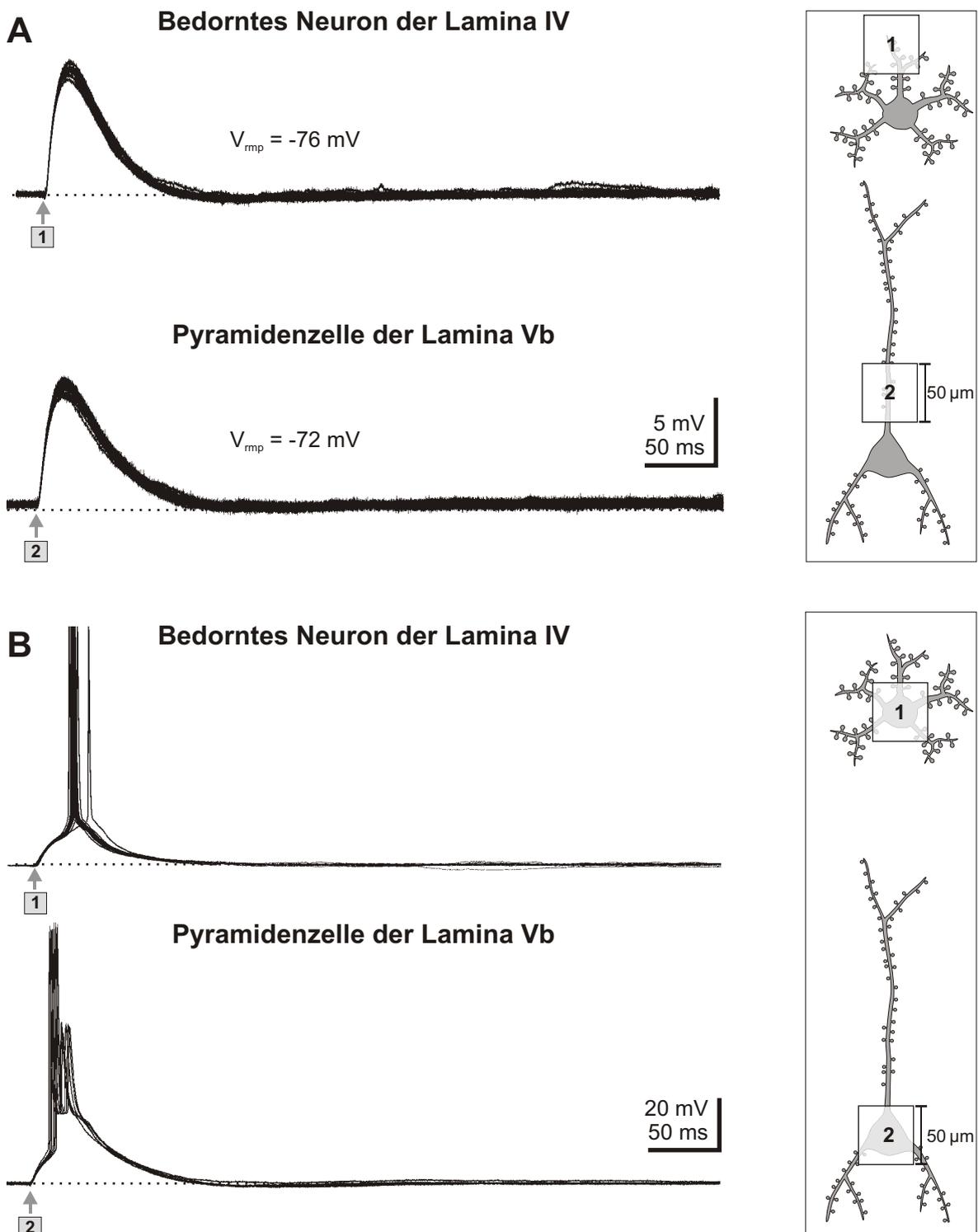
**Abbildung 21: Ausbreitungsgeschwindigkeit direkter photolyseinduzierter Aktivität.**

Latenzen zwischen Photostimulus und Aktivitätsbeginn in Abhängigkeit von der Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungsort (Soma) bei bedorneten Neuronen der Lamina IV (**A**) und Pyramidenzellen der Lamina Vb (**B**) in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF. Sowohl bei bedorneten Neuronen der Lamina IV (**A**, bedornete Sternzellen:  $n = 3$ , Pyramidenzelle:  $n = 1$ ) als auch bei den Pyramidenzellen der Lamina Vb (**B**, RS-Pyramidenzellen:  $n = 3$ , IB-Pyramidenzellen:  $n = 3$ ) nahm mit zunehmender Distanz zum Soma die Latenz bis zum Aktivitätsbeginn linear zu. Der lineare Fit (*rote Linie*) ergab für bedornete Neuronen der Lamina IV eine durchschnittliche elektrotonische Ausbreitungsgeschwindigkeit direkter photolyseinduzierter Aktivität von 0,15 m/s ( $r = 0,778$ ), für Pyramidenzelle der Lamina Vb eine von 0,19 m/s ( $r = 0,901$ ).



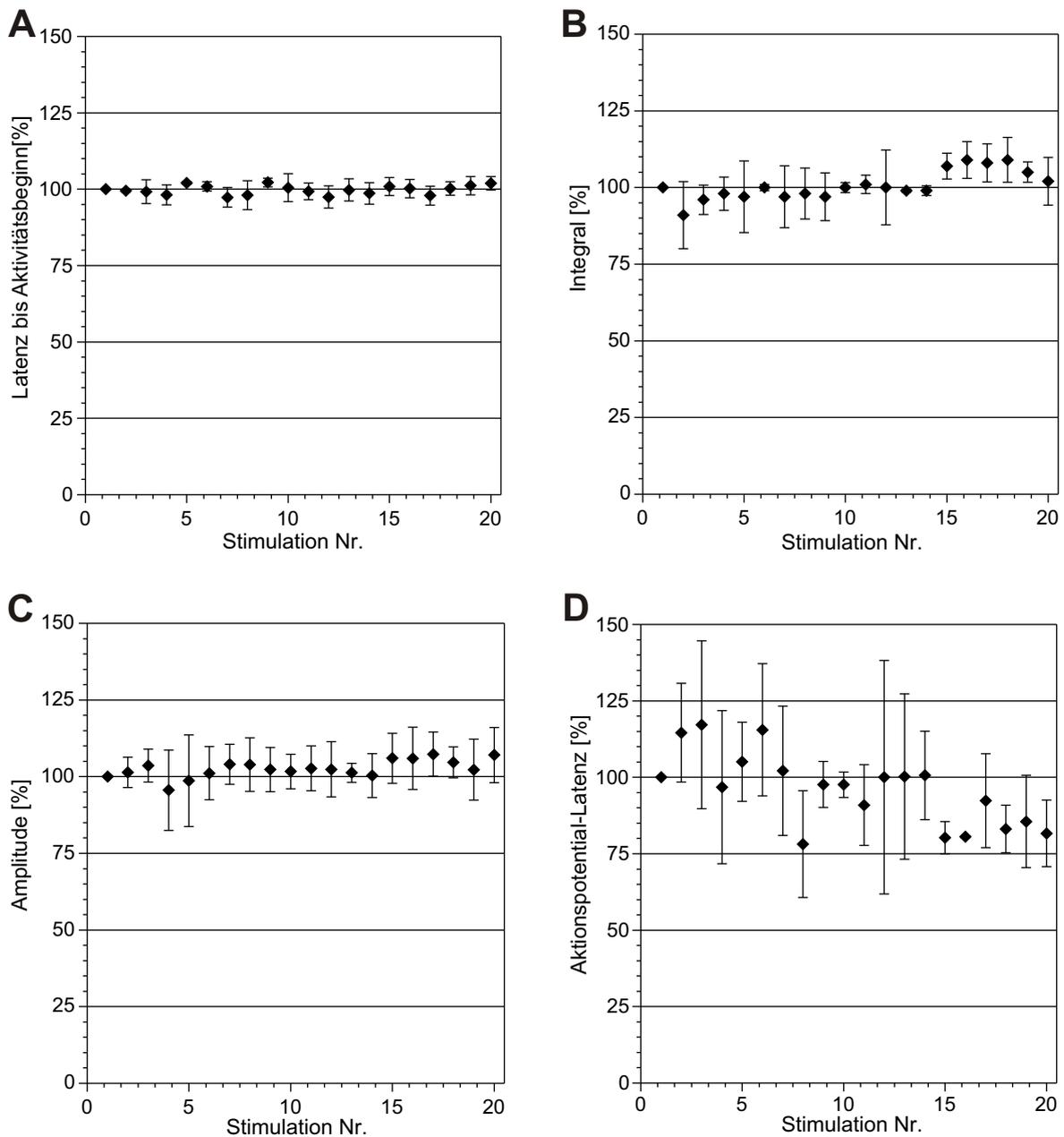
### Abbildung 22: Amplituden direkter photolyseinduzierter Aktivität.

Topographische Karte der Amplituden photolyseinduzierter Depolarisationen und Aktionspotential-Auslösung bei einer bedorneten Sternzelle der Lamina IV (A) und IB-Pyramidenzelle der Lamina Vb (B) in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF. Unter den Karten sind Position des vergrößert dargestellten Bereichs im Foto des nativen Hirnschnittes (*weißer Rahmen*),  $V_{rmp}$  und Aktionspotentialfeuermuster der jeweils abgeleiteten Zelle nach depolarisierender Strominjektion dargestellt. Sowohl bei dem bedorneten Neuron der Lamina IV als auch bei der Pyramidenzelle der Lamina Vb sind die Amplituden photolyseinduzierter Depolarisationen nahe dem abgeleiteten Soma am größten. Nur direkte somatische oder perisomatische Stimulation löste Aktionspotentiale aus (*rote Felder*). (C, D) Amplituden induzierter Aktivität und Aktionspotentialauslösung in Abhängigkeit von der Distanz zwischen Stimulationsort und Soma bei 4 bedorneten Neuronen der Lamina IV und 6 Pyramidenzellen der Lamina Vb in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF. (C) Innerhalb der ersten 100  $\mu\text{m}$  nahmen die durchschnittlichen Amplituden photolyseinduzierter Depolarisationen stark ab. Die Durchschnittswerte ab einer Distanz von  $> 400 \mu\text{m}$  basieren auf Aktivität, die bei der Stimulation des apikalen Dendriten Pyramidenzellen der Lamina Vb ermittelt wurden. (D) Aktionspotentiale wurden nur bis zu einer Distanz von 100  $\mu\text{m}$  ausgelöst. *Skalierbalken*: 200  $\mu\text{m}$ .



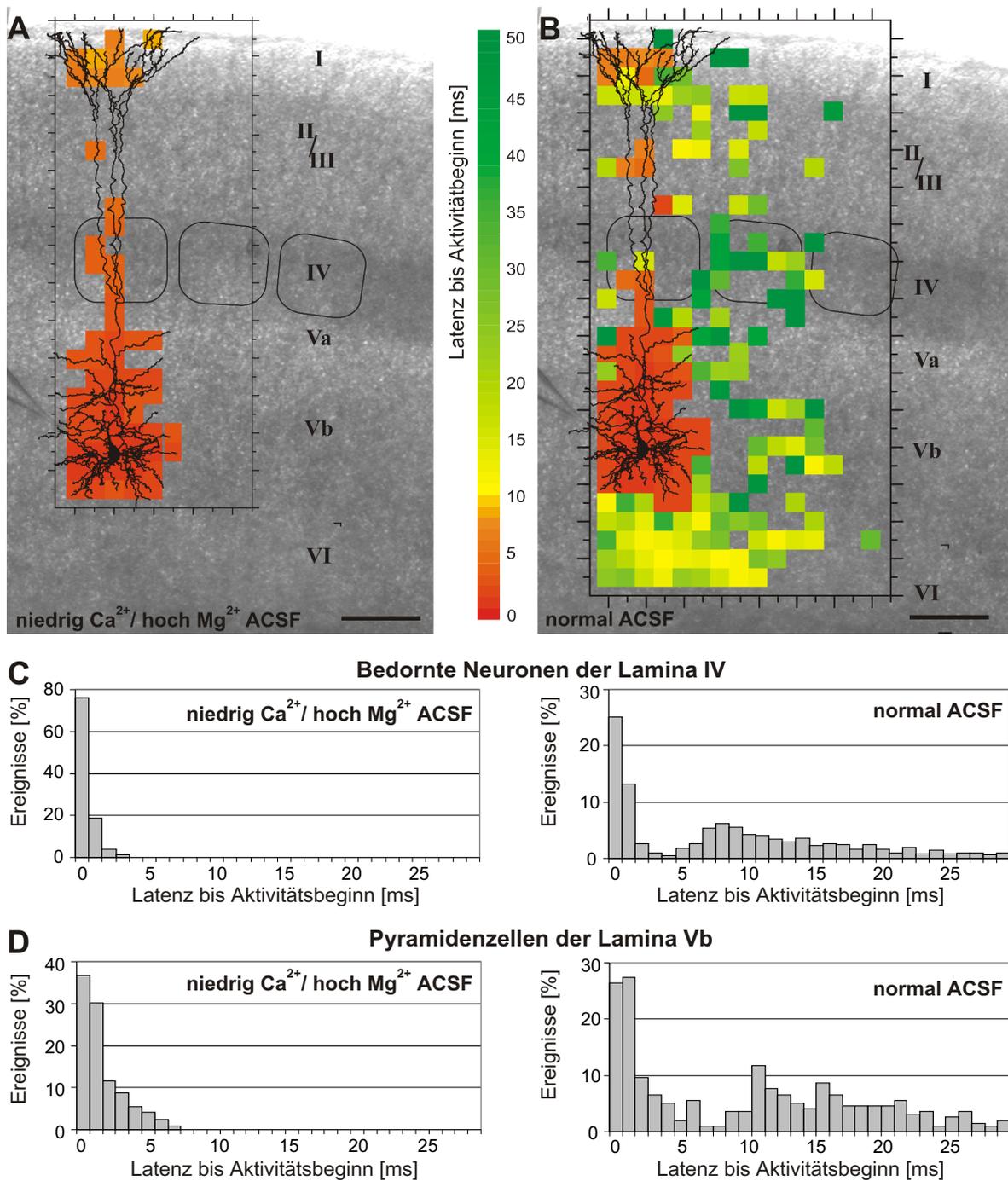
**Abbildung 23: Reproduzierbarkeit direkter photolyseinduzierter Aktivität.**

Bei einer bedornten Sternzelle der Lamina IV (**A1, B1**) und einer IB-Pyramidenzelle der Lamina Vb (**A2, B2**) wurde jeweils ein proximaler Bereich des Dendritenbaums (**A**) und das Soma (**B**) repetitiv in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF am  $V_{\text{mp}}$  stimuliert. Jeweils 20 Membranpotentialregistrierungen einer Stimulationssequenz (10 s Intervalle) sind überlagert dargestellt. Die *Insets* zeigen schematische Darstellungen der abgeleiteten Neuronen und die relative Position der stimulierten Felder. (**A**) Photostimulation der proximalen Dendriten induziert bei beiden Neuronen zuverlässig und reproduzierbar Depolarisationen des Membranpotentials. (**B**) Photostimulation des Somas löst bei der bedornten Sternzelle zuverlässig ein einzelnes, bei der IB-Pyramidenzelle eine Salve von Aktionspotentialen aus.

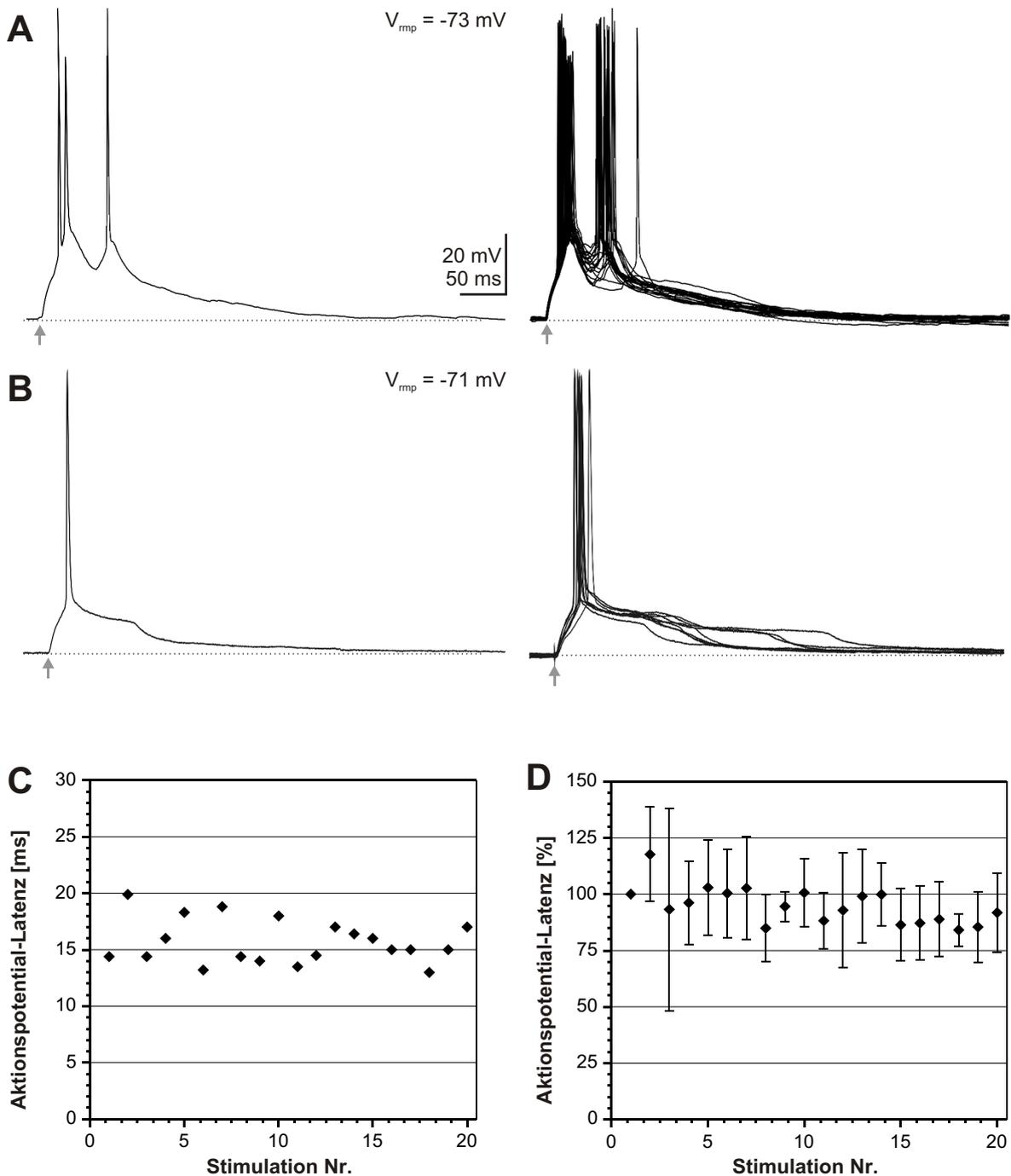


**Abbildung 24: Eigenschaften repetitiv induzierter direkter Aktivität.**

Die Histogramme zeigen die Veränderungen der Eigenschaften direkter Aktivität während einer Sequenz von 20 repetitiven Photostimulationen in Intervallen von 10 Sekunden in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF (**A-C**: 6 bedornte Neuronen der Lamina IV, 6 Pyramidenzellen der Lamina Vb; **D**: 2 bedornte Neuronen der Lamina IV, 4 Pyramidenzellen der Lamina Vb). Die Daten wurden auf die jeweils erste Photostimulation einer Stimulationssequenz normalisiert und sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung wiedergegeben. (**A**) Latenz zwischen Photostimulus und Beginn direkter Aktivität. (**B**) Integralwerte der photolyseinduzierten Membrandepolarisationen. (**C**) Amplituden der photolyseinduzierten Membrandepolarisationen. (**D**) Latenz zwischen Photostimulus und Aktionspotentialspitze (Aktionspotential-Latenz) bei repetitiver überschwelliger Photostimulation.

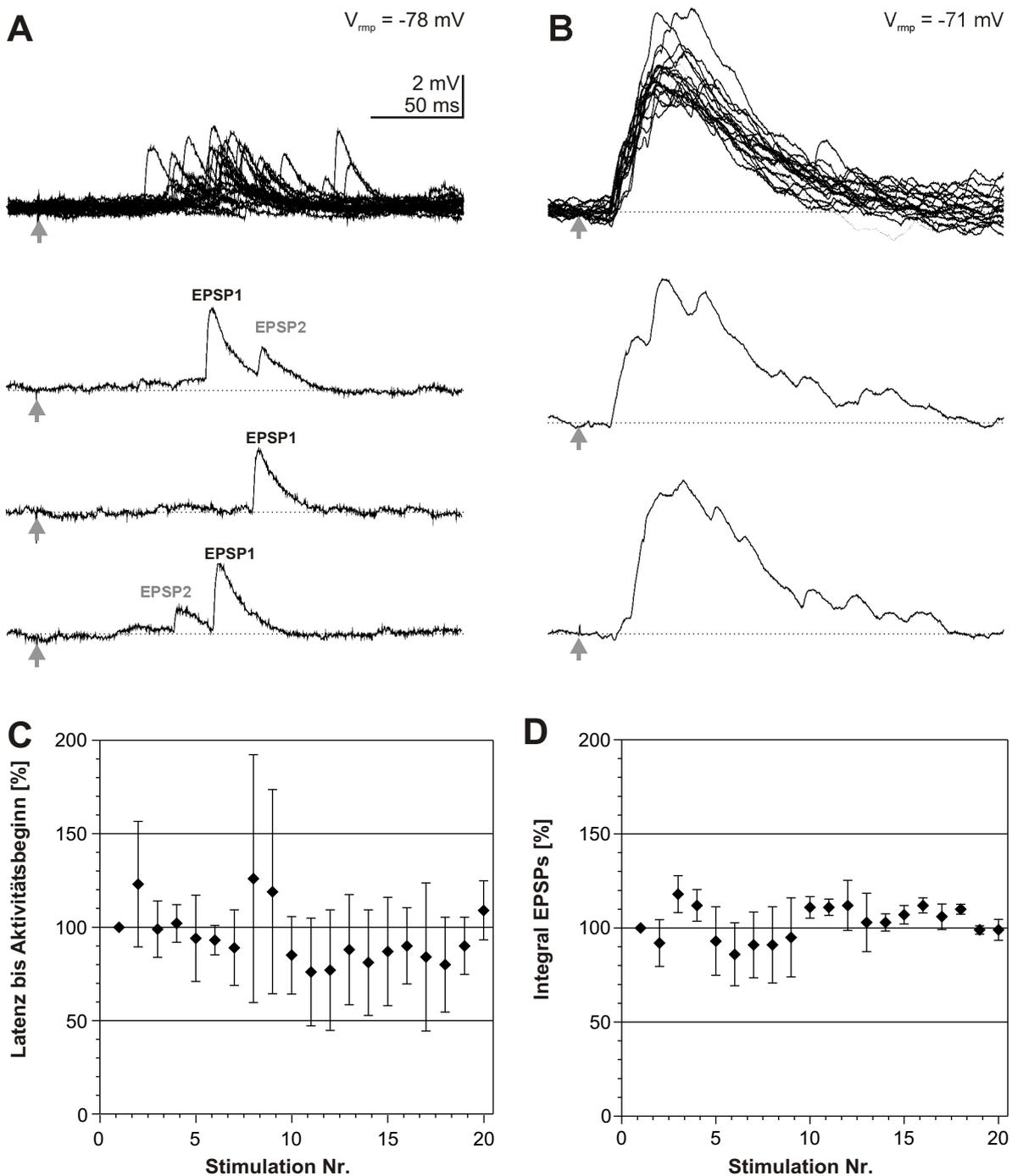


**Abbildung 25: Photolyseinduzierte Aktivität in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF und normalem ACSF.** Topographische Karten photolyseinduzierter Aktivität erstellt bei unterdrückter synaptischer Übertragung (**A**) und in normalem ACSF (**B**) am Beispiel einer IB-Pyramidenzelle der Lamina Vb. (**A**) Topographische Karte der Latenzen photolyseinduzierter direkter Aktivität in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF bei  $V_{\text{mp}} = -79$  mV. Die gesamte induzierte Aktivität zeigte Latenzen  $< 8$  ms. (**B**) Topographische Karte der Latenzen bis zum Beginn photolyseinduzierter Aktivität in normalem ACSF bei  $V_h = -70$  mV. Die direkte Aktivität mit Latenzen  $< 8$  ms entstammte ausschließlich Feldern im Bereich des Dendritenbaums der abgeleiteten Zelle. Aktivität von Feldern außerhalb des Dendritenbaums, also synaptisch vermittelte Aktivität, zeigte deutlich längere Latenzen bis zum Aktivitätsbeginn. (**C**, **D**) Verteilungshistogramme der Latenzen photolyseinduzierter Aktivität in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF und normalem ACSF basierend auf topographischen Karten von 3 bedornten Neuronen der Lamina IV (**C**) und 6 Pyramidenzellen der Lamina V (**D**). Direkte Aktivität hatte in niedrig  $\text{Ca}^{2+}$ /hoch  $\text{Mg}^{2+}$  ACSF und normalem ACSF bei bedornten Neuronen der Lamina IV Latenzen  $< 4$  ms, bei Pyramidenzellen  $< 8$  ms. Synaptisch vermittelte Aktivität in normalem ACSF hatte stets Latenzen  $> 5$  ms für bedornte Neurone der Lamina IV und  $> 9$  ms für Pyramidenzellen der Lamina V. *Skalierbalken: 200  $\mu\text{m}$*



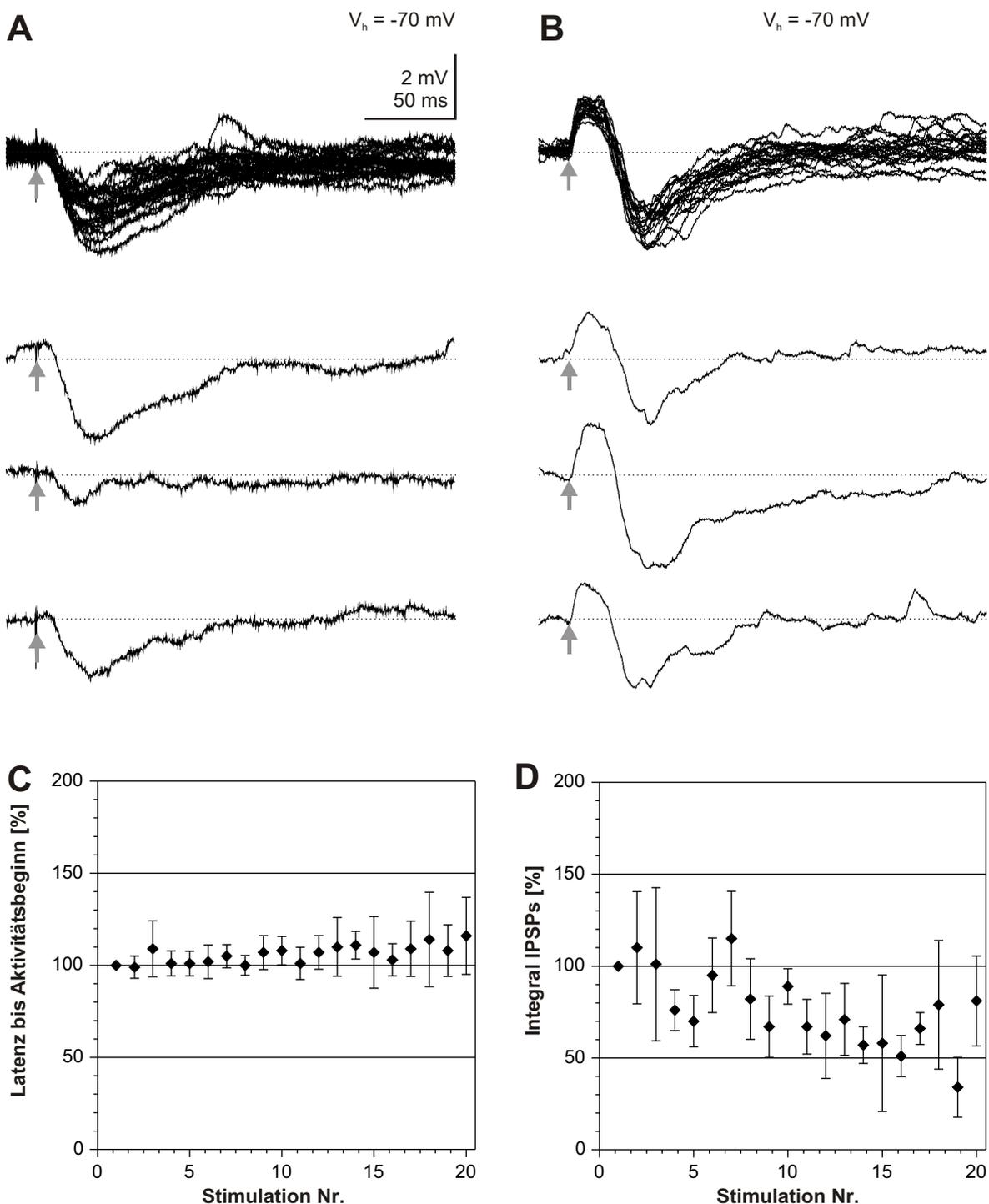
**Abbildung 26: Reproduzierbarkeit der Auslösung von Aktionspotentialen in normalem ACSF.**

**A, B)** Registrierungen des Membranpotentials bei repetitiver somanaher Photostimulation einer Salven feuernden Pyramidenzelle der Lamina IV (**A**) und einer RS-Pyramidenzelle der Lamina Vb (**B**) in normalen ACSF bei  $V_{mp}$ . Bei beiden Neuronen wurde jeweils ein somanahe Feld 20-fach alle 10 Sekunden stimuliert. *Linke Spalte:* repräsentative Einzelregistrierung des Membranpotentials nach Photostimulation (*Pfeil*). *Rechte Spalte:* einander überlagerte Antworten einer Stimulationssequenz. Entsprechend den aktiven intrinsischen Membraneigenschaften des stimulierten Neurons löst somanahe Photostimulation zuverlässig eine Salve von Aktionspotentialen (**A**) oder ein einzelnes Aktionspotential (**B**) aus. (**C, D**) Veränderung der Aktionspotential-Latenz bei repetitiver Photostimulation. (**C**) Einzelexperiment; die Daten basieren auf der in **A** dargestellten Stimulationssequenz. Die Latenz bis zum ersten ausgelösten Aktionspotential variiert zwischen 13 und 20 ms. (**D**) Durchschnittliche Veränderungen der Aktionspotential-Latenz (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für 4 bedornte Neuronen der Lamina IV und 4 Pyramidenzellen der Lamina Vb). Die Werte wurden auf die jeweils erste Antwort einer Stimulationssequenz normalisiert. Besonders während der ersten fünf Photostimulationen waren die Aktionspotential-Latenzen sehr variabel.



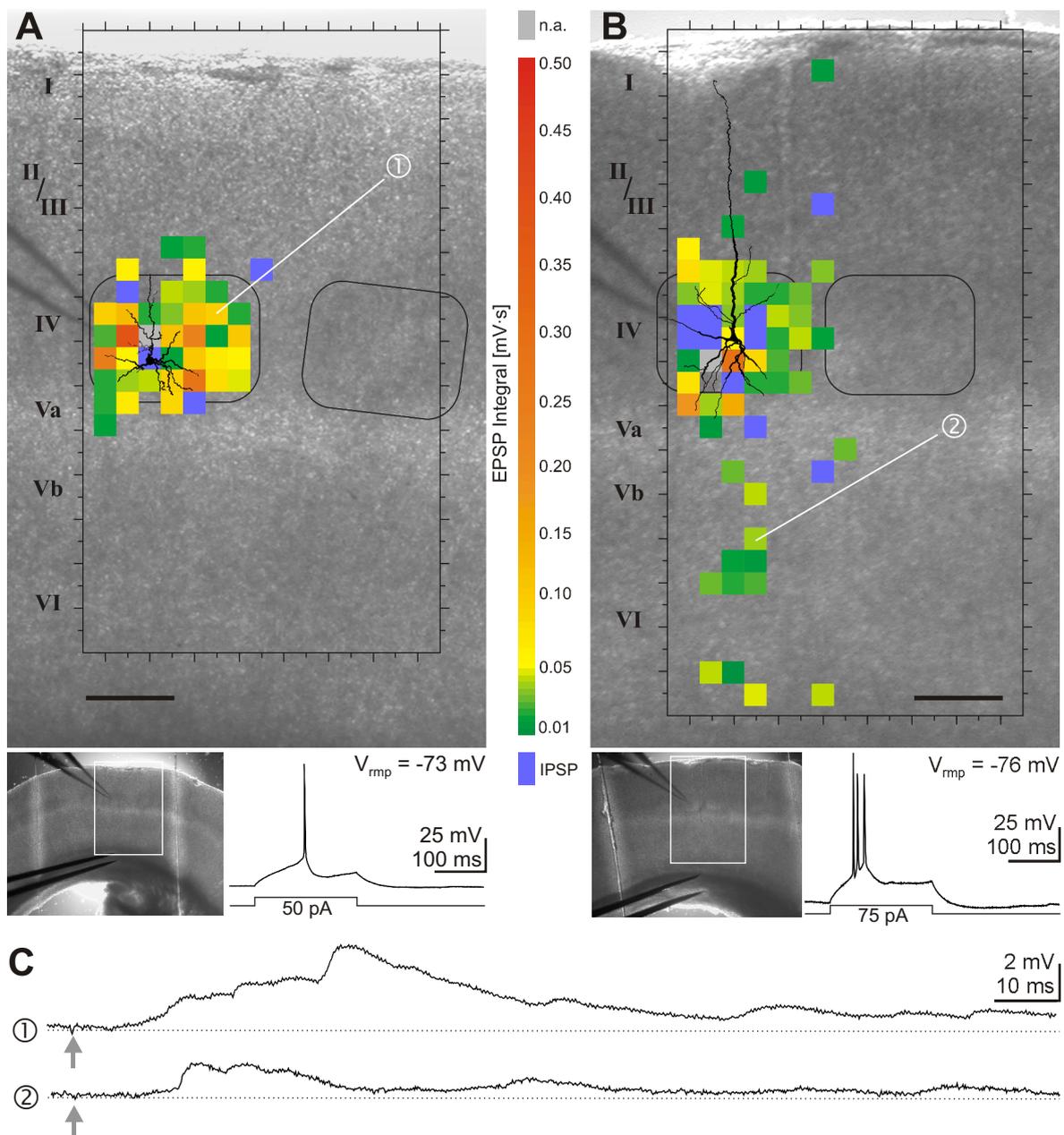
### Abbildung 27: Reproduzierbarkeit photolyseinduzierter exzitatorischer Eingänge.

(A, B) Repetitive Auslösung exzitatorischer Eingänge bestehend aus zwei (A) und multiplen EPSPs (B) in normalem ACSF bei  $V_{mp}$  (20-fach, 10 s Intervalle). Die oberen Registrierungen zeigen jeweils 20 einander überlagerte Registrierungen einer Stimulationssequenz, in der die Photostimulation (Pfeil) zuverlässig exzitatorische Eingänge auslöste. Darunter sind für jede Stimulationssequenz ausgewählte Registrierungen einzeln dargestellt. (A) Repetitive Photostimulation, die 2 einzelne, unterscheidbare EPSPs mit einer Fehlerrate von 17 % für EPSP1 und 33 % für EPSP2 auslöste. Während der Stimulationssequenz konnte sich die Abfolge der beiden ausgelösten EPSP auch umkehren. (B) Repetitive Photostimulation, die multiple EPSPs auslöste. Die einzelnen EPSPs waren aufgrund zeitlicher Summation nicht mehr zu separieren. (C, D) Durchschnittliche Veränderung der Latenz bis zum Aktivitätsbeginn (C) und der Integralwerte photolyseinduzierter exzitatorischer Aktivität (D). Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 5$  Stimulationssequenzen). Die Werte wurden auf die jeweils erste Antwort einer Stimulationssequenz normalisiert. (C) Innerhalb der Stimulationssequenzen waren die Latenzen bis zum Aktivitätsbeginn hoch variabel. (D) Die Integrale exzitatorischer Aktivität waren während repetitiver Stimulation vergleichsweise weniger variabel. Integralwerte umfassen jeweils alle exzitatorische photolyse-öinduzierte Aktivität in einem Zeitfenster von 150 ms *post Stimulus*.



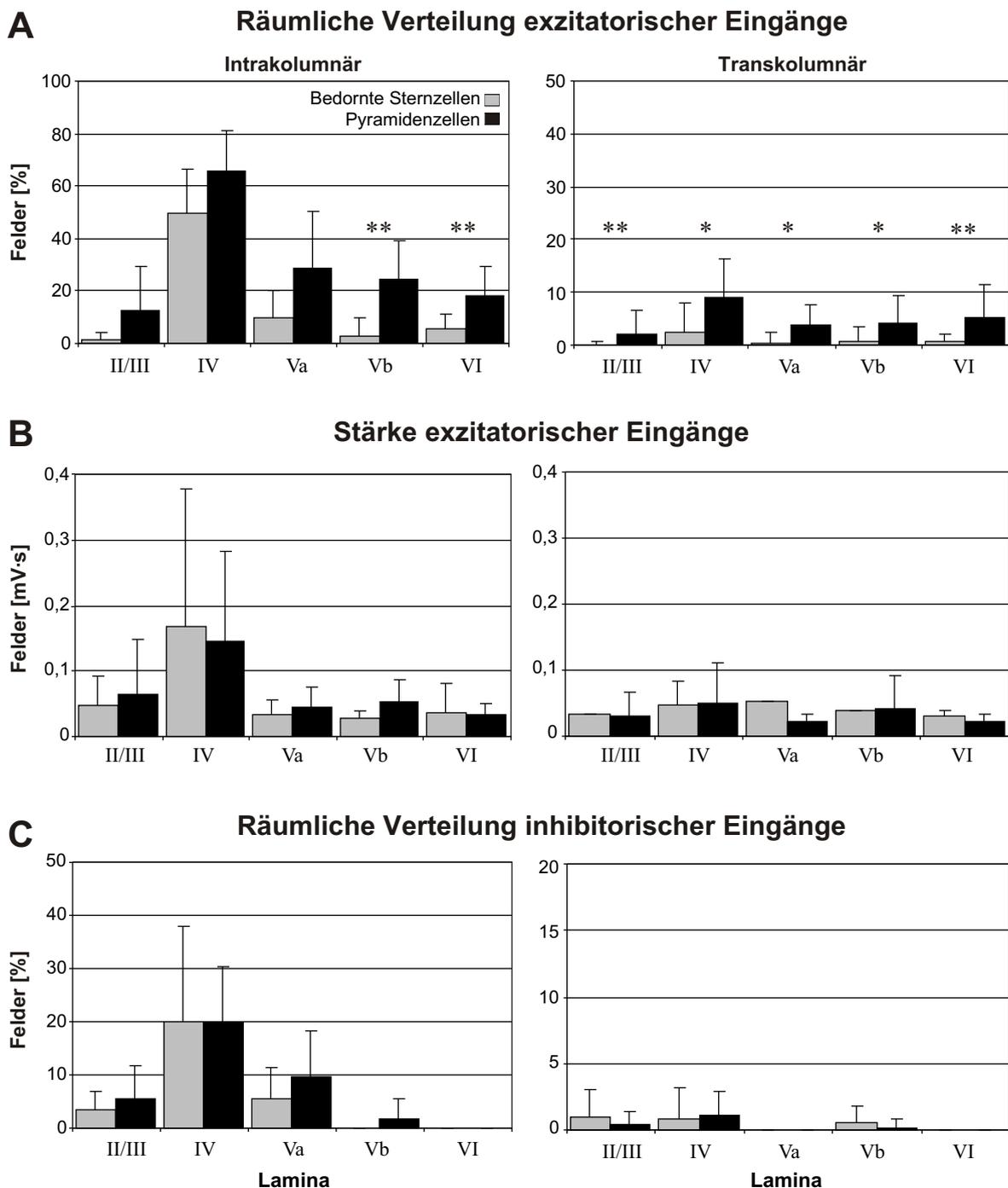
**Abbildung 28: Reproduzierbarkeit photolyseinduzierter inhibitorischer Eingänge.**

(A, B) Repetitive Auslösung inhibitorischer Eingänge in normalem ACSF bei  $V_h = -70$  mV (20-fach, 10 s Intervalle). Die oberen Registrierungen zeigen jeweils 20 einander überlagerte Registrierungen einer Stimulationssequenz, in der die Photostimulation (*Pfeil*) zuverlässig inhibitorische Eingänge auslöste. Darunter sind für jede Stimulationssequenz ausgewählte Registrierungen einzeln dargestellt. (A) Repetitive Photostimulation löste zuverlässig ein IPSP mit variablen Amplituden aus. (B) Repetitive Photostimulation löste initial direkte Aktivität und mit einer Latenz von  $\sim 15$  ms zuverlässig ein IPSP aus. (C, D) Durchschnittliche Veränderung der Latenz bis zum Aktivitätsbeginn (C) und der Integralwerte photolyseinduzierter inhibitorischer Aktivität (D). Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 5$  Stimulationssequenzen). Die Werte wurden auf die jeweils erste Antwort einer Stimulationssequenz normalisiert. (C) Innerhalb der Stimulationssequenzen waren die Latenzen bis zum Beginn der IPSPs relativ stabil. (D) Die Integrale der IPSPs waren während repetitiver Stimulation sehr variabel und nahmen tendenziell ab.



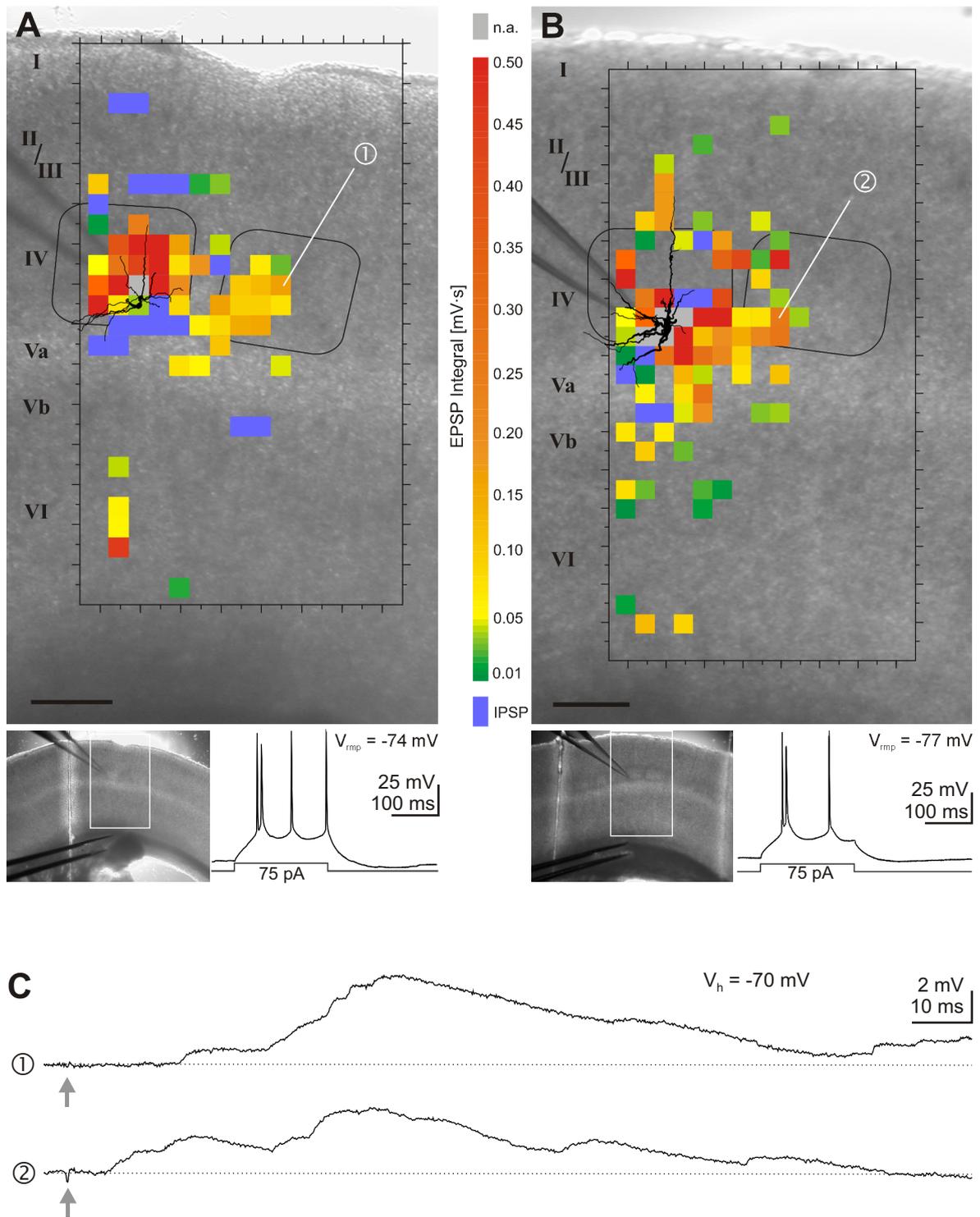
### Abbildung 29: Funktionelle Konnektivität bedornter Neuronen der Lamina IV.

Topographische Karten der synaptischen Eingänge auf eine bedornte Sternzelle (A) und eine Pyramidenzelle (B) der Lamina IV. Die Karten illustrieren in *Grün bis Rot* die Stärke registrierter EPSPs (Integralwerte exzitatorischer Aktivität in einem Zeitfenster von 150 ms *post Stimulus*) und in *Blau* die Ursprünge von IPSPs. Es ist zu beachten, dass aus Gründen der Übersichtlichkeit Felder, in denen Photostimulation EPSPs als auch IPSPs auslösten, hier nur für IPSPs farbkodiert sind. Graue Felder wurden aufgrund starker zeitlicher Überlagerung von direkter Aktivität, Aktionspotential-Auslösung und synaptischen Eingängen von der Analyse ausgeschlossen. Unter den Karten sind jeweils Position des vergrößert dargestellten Bereichs im Foto des nativen Hirnschnittes (*weißer Rahmen*),  $V_{mp}$  und Aktionspotentialfeuertmuster der jeweils abgeleiteten Zelle nach depolarisierender Strominjektion dargestellt. Die arabischen Zahlen 1-2 in den Karten markieren die Position der Felder, die mit den in (C) gezeigten Registrierungen korrelieren. (A) Die topographische Karte mit der nahezu auf das eigene *Barrel* begrenzten funktionellen Konnektivität ist repräsentativ für 80 % der untersuchten bedornten Sternzellen. (B) Alle Pyramidenzellen der Lamina IV erhielten auch synaptische Eingänge von außerhalb ihres eigenen Barrels. Bei ~50% der Pyramidenzellen war die funktionelle Konnektivität, wie hier gezeigt, auf die eigenen Kolumne beschränkt. (C) Registrierungen Photolyse induzierter exzitatorischer Aktivität bei  $V_h = -70$  mV. Exzitatorische Aktivität nach Photostimulation eines Feldes innerhalb des eigenen Barrels (1) bestand aus einer Vielzahl von EPSPs (C1), nach Photostimulation eines Feldes außerhalb des Barrels (2) aus wenigen EPSPs (C2). *Skalierbalken*: 200  $\mu$ m.



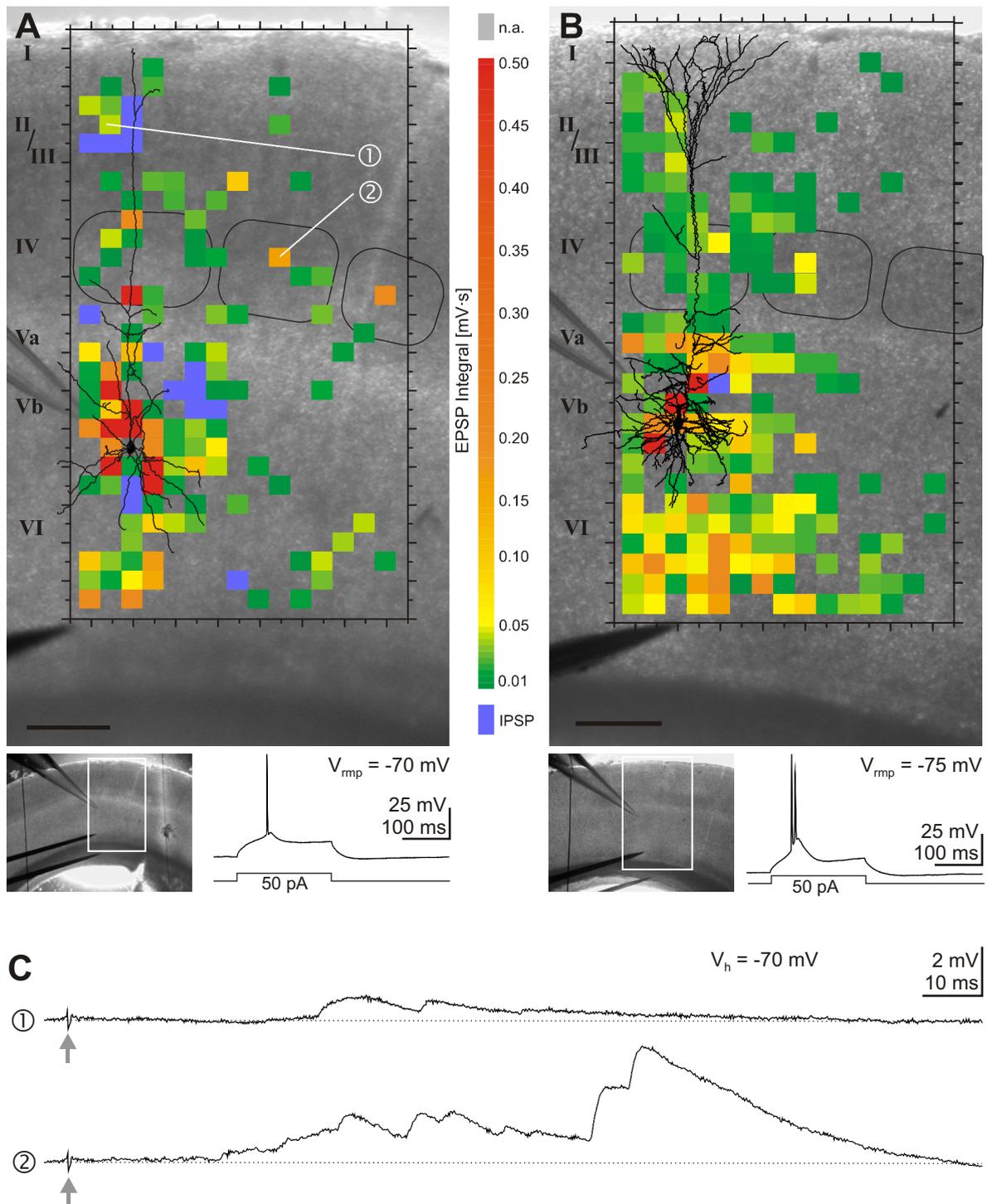
**Abbildung 30: Quantitative Analyse synaptischer Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV.**

Die Diagramme zeigen die räumliche Verteilung exzitatorischer Eingänge (A), deren Stärke (B) und die räumliche Verteilung inhibitorischer Eingänge (C) auf bedornete Sternzellen (*graue Balken*,  $n = 14$ ) und Pyramidenzellen (*schwarze Balken*,  $n = 10$ ) der Lamina IV. Diagramme in der *linken Spalte* repräsentieren intrakolumnäre, die in der *rechten Spalte* transkolumnäre synaptische Eingänge. (A) Prozentsätze der Felder innerhalb einer Lamina und Kolumne, in denen Photostimulation exzitatorische synaptische Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV auslöste. (B) Durchschnittliche Integralwerte photolyseinduzierter exzitatorischer Aktivität ermittelt in einem jeweiligen Zeitfenster von 150 ms *post Stimulus*. (C) Prozentsätze der Felder innerhalb einer Lamina und Kolumne, in denen Photostimulation inhibitorische synaptische Eingänge auf bedornete Neuronen der Lamina IV auslöste. Es ist zu beachten, dass die Skalierung für transkolumnäre Eingänge in (A) und (C) vergrößert wurde. Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. *Sternchen* markieren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellklassen (\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ).



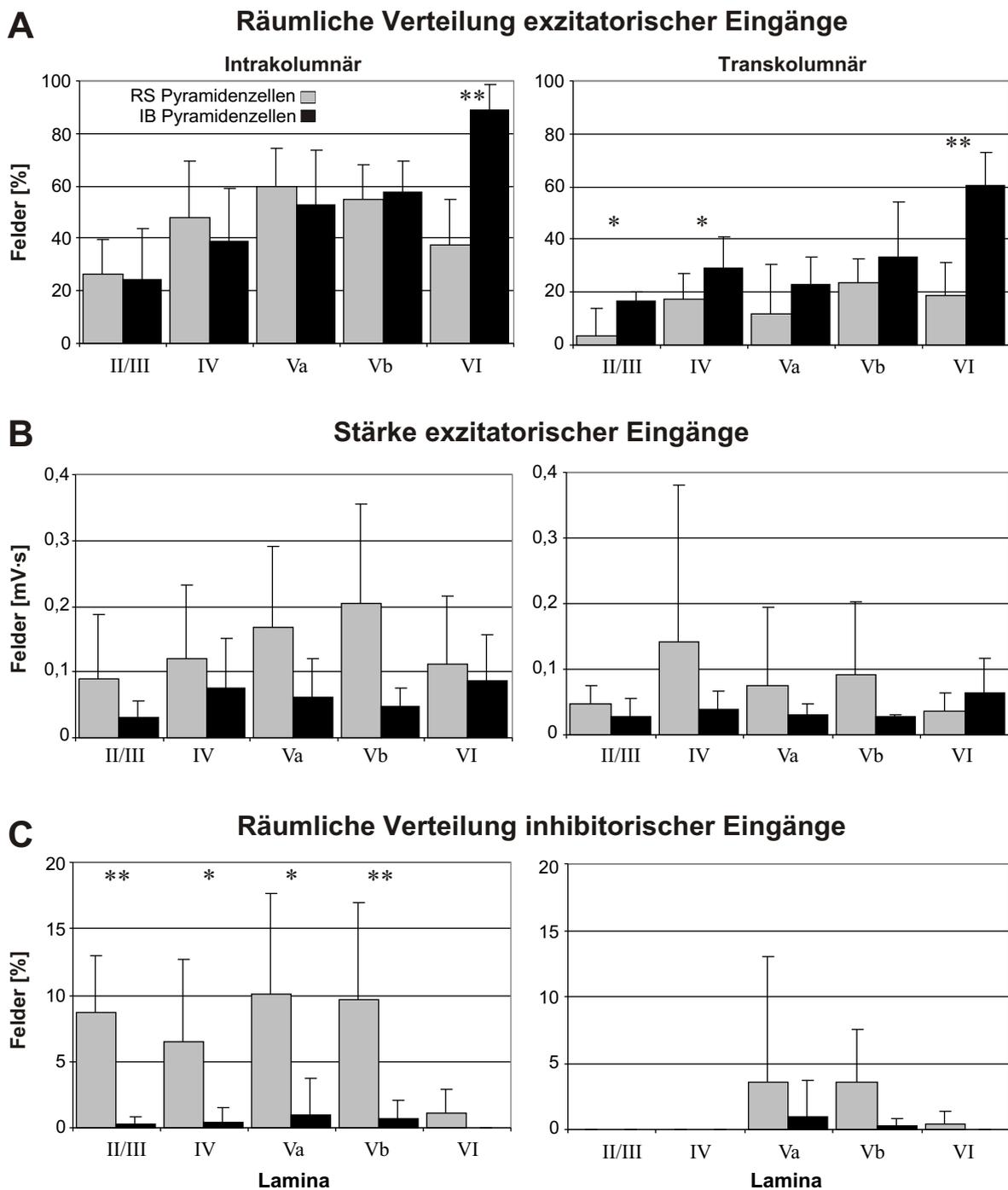
**Abbildung 31: Bedornte Neuronen der Lamina IV mit transkolumnären synaptischen Eingängen.**

Topographische Karten der funktionellen Konnektivität einer bedornten Sternzelle (A) und einer Pyramidenzelle (B) der Lamina IV, die direkte synaptische Eingänge aus der benachbarten Kolumne erhalten. Unter den Karten sind jeweils Position des vergrößert dargestellten Bereichs im Foto des nativen Hirnschnittes (*weißer Rahmen*),  $V_{mp}$  und Aktionspotentialfeuermuster der jeweils abgeleiteten Zelle nach depolarisierender Strominjektion dargestellt. Die arabischen Zahlen 1-2 in den Karten markieren die Position der Felder, die mit den in (C) gezeigten Registrierungen korrelieren. (C) Registrierungen photolyseinduzierter exzitatorischer Aktivität bei  $V_h = -70$  mV. Exzitatorische Aktivität nach Photostimulation eines Feldes innerhalb des benachbarten *Barrels* (1-2) bestand oft aus einer Vielzahl einzelner EPSPs. Skalierbalken: 200  $\mu$ m.

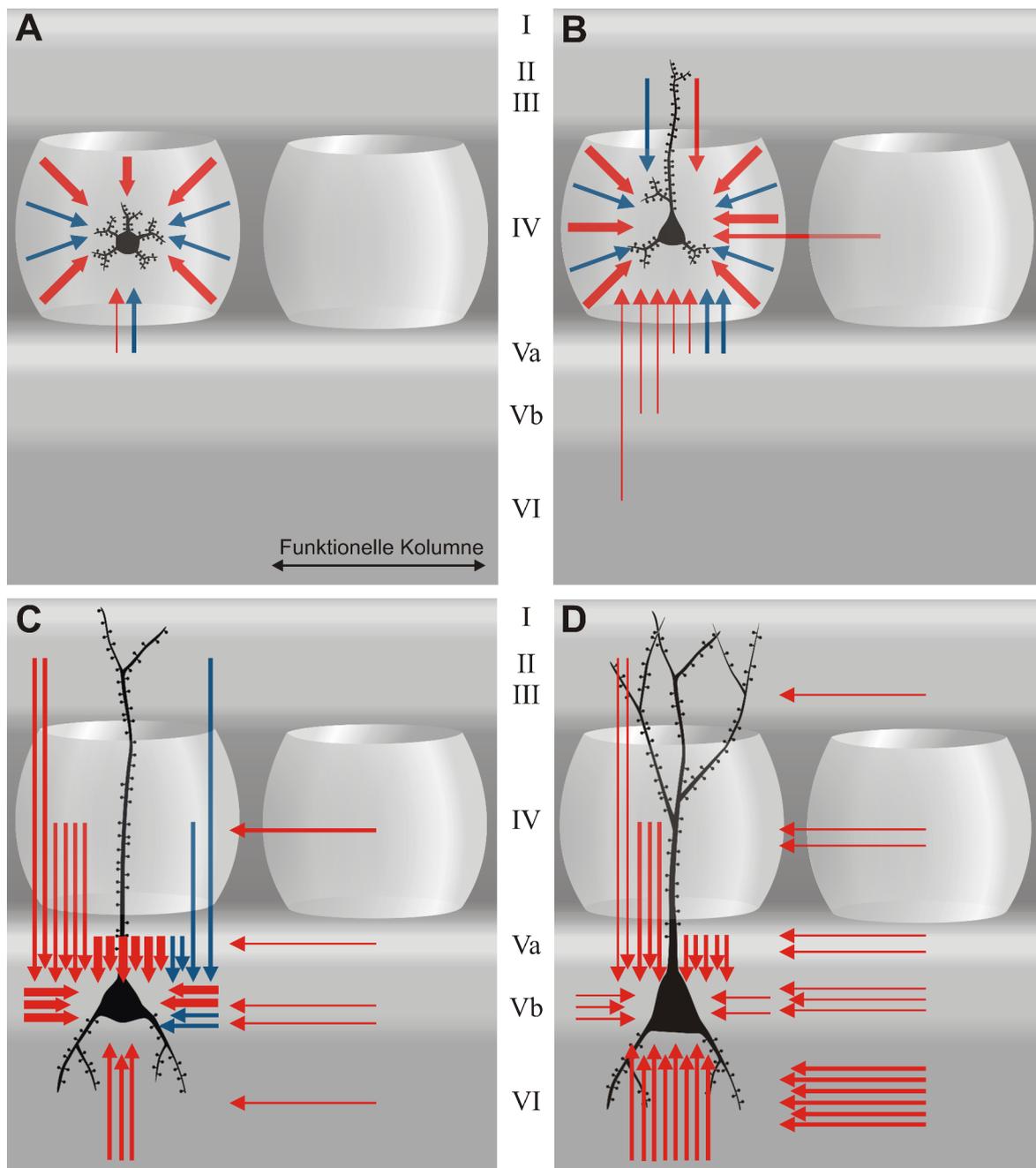


**Abbildung 32: Funktionelle Konnektivität von Pyramidenzellen der Lamina Vb.**

Repräsentative topographische Karten der exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Eingänge auf eine RS-Pyramidenzelle (**A**) und eine IB-Pyramidenzelle (**B**) der Lamina Vb. Unter den Karten sind Position des vergrößert dargestellten Bereichs im Foto des nativen Hirnschnittes (*weißer Rahmen*),  $V_{mp}$  und Aktionspotentialfeuermuster der jeweils abgeleiteten Zelle nach depolarisierender Strominjektion dargestellt. Die arabischen Zahlen 1-2 in den Karten markieren die Position der Felder, die mit den in (**C**) gezeigten Registrierungen Korrelieren. (**C**) Registrierungen photolyseinduzierter exzitatorischer Aktivität bei  $V_h = -70$  mV. (**C1**) Registrierung exzitatorischer Aktivität nach Photostimulation eines Feldes der supragranulären Laminae innerhalb der eigenen Kolumne. (**C2**) Starke exzitatorische Aktivität nach Photostimulation eines sogenannten "Hot-Spots" innerhalb eines Barrels der benachbarten Kolumne. Skalierbalken: 200  $\mu$ m.



**Abbildung 33: Quantitative Analyse synaptischer Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb.** Die Diagramme zeigen die räumliche Verteilung exzitatorischer Eingänge (A), deren Stärke (B) und die räumliche Verteilung inhibitorischer Eingänge (C) auf RS- (graue Balken,  $n = 8$ ) und IB-Pyramidenzellen (schwarze Balken,  $n = 7$ ) der Lamina Vb. Diagramme in der linken Spalte repräsentieren intrakolumnäre, die in der rechten Spalte transkolumnäre synaptische Eingänge. (A) Prozentsätze der Felder innerhalb einer Lamina und Kolumne, in denen Photostimulation exzitatorische synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb auslöste. (B) Durchschnittliche Integralwerte photolyseinduzierter exzitatorischer Aktivität ermittelt in einem jeweiligen Zeitfenster von 150 ms *post Stimulus*. (C) Prozentsätze der Felder innerhalb einer Lamina und Kolumne, in denen Photostimulation inhibitorische synaptische Eingänge auf Pyramidenzellen der Lamina Vb auslöste. Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellklassen (\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 34: Modelle funktioneller Konnektivität exzitatorischer Neuronen in Lamina IV und Vb des Barrel-Kortex der Ratte.**

Schematische Darstellung deutlicher exzitatorischer und inhibitorischer Eingänge auf bedornete Neurone der Lamina IV (**A**, **B**) und der Pyramidenzellen der Lamina Vb (**C**, **D**). Exzitatorische Eingänge sind durch *rote Pfeile*, inhibitorische Eingänge durch *blaue Pfeile* repräsentiert. Die Häufigkeit synaptischer Eingänge innerhalb einer Lamina wird durch die Anzahl der Pfeile dargestellt (exzitatorische Eingänge: pro *Pfeil* = in 10 % der stimulierten Felder wurden EPSPs ausgelöst; inhibitorische Eingänge: pro *Pfeil* = in 5 % der stimulierten Felder wurden IPSPs ausgelöst). Die durchschnittliche Stärke exzitatorischer Eingänge innerhalb einer Lamina wird durch die Dicke der roten Pfeile repräsentiert (*dünnere Pfeile*: Stärke  $< 0,05 \text{ mV}\cdot\text{s}$ ; *mittlere Pfeile*: Stärke  $0,05 - 0,1 \text{ mV}\cdot\text{s}$ ; *dickere Pfeile*: Stärke  $> 0,1 \text{ mV}\cdot\text{s}$ ). Während bedornete Sternzellen der Lamina IV (**A**) vorwiegend lokale synaptische Eingänge erhalten, wurden Pyramidenzellen der Lamina IV (**B**) zusätzlich von Neuronen der nicht-granulären Laminae der eigenen Kolumne sowie von Neuronen innerhalb des benachbarten *Barrels* innerviert. Die funktionelle Konnektivität der Pyramidenzellen der Lamina Vb war sehr ausgedehnt und umfasste stets alle kortikalen Laminae. Dabei zeigten gegenüber den RS-Pyramidenzellen (**C**) die IB-Pyramidenzellen (**D**) eine noch deutlichere Kolumnen überspannende exzitatorische funktionelle Konnektivität bei gleichzeitig stark verminderter inhibitorischer Kontrolle.

## Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Heiko J. Luhmann, meinem Betreuer Herrn Dr. Jochen F. Staiger sowie Herrn Dr. Rolf Kötter. Sie stellten mir nicht nur einen Arbeitsplatz zur Verfügung, sondern unterstützten mich auch in allen Phasen meiner Doktorarbeit durch ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, ihr Vertrauen und die gewährten wissenschaftlichen Freiräume.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Karl Zilles für seine freundliche Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schloe möchte ich für seine kritischen und hilfreichen Anmerkungen sowie seine Unterstützung danken.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinem Kollegen Herrn Dr. Werner Kilb für seine Diskussionsbereitschaft, seine hilfreichen Ratschläge und für die kritischen Anmerkungen zu dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Ileana Hanganu und Herrn Dr. Ritchie Brown für ihre Unterstützung und große Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neurophysiologie und des C. & O. Vogt Instituts für Hirnforschung danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Frau Dorothee und bei meinen Eltern für ihre Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Diese Arbeit wurde unterstützt von der „Gesellschaft der Freunde und Förderer der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ und der Gertrud Reemtsma Stiftung.

---