

**Untersuchung epileptogener Mechanismen in einem Mausmodell  
der limbischen Enzephalitis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Philipp Spindler  
aus Siegburg  
2016

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Remy
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Albert Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.10.2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Epileptologie  
Direktor: Prof. Dr. med. C.E. Elger  
und dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Pierluigi Nicotera

Gewidmet meinen Eltern und meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>11</b>
2.1 Limbische Enzephalitis	11
2.2 Anatomie des Hippokampus	12
2.3 Intrinsischer Schaltkreis des Hippokampus	14
2.4 Funktionen des Hippokampus	18
2.5 Lokale Feldpotentiale als Taktgeber hippokampaler Mechanismen	19
2.5.1 Theta-Oszillationen	20
2.5.2 Gamma-Oszillationen	20
2.5.3 Sharp-Wave-Ripples	21
<b>3. Methoden und Material</b>	<b>22</b>
3.1 Methoden	22
3.1.1 Versuchsaufbau	22
3.1.2 Stereotaktische Injektion	23
3.1.2.1 Virale Vektoren	25
3.1.2.1a AAV-Syn-OVA-IRES-Venus	26
3.1.2.1b AAV1.hSyn.GCaMP5G(GCaMP-T302L.R303P.D380Y).WPRESV40	27
3.1.2.2 Ovalbuminspezifische T-Lymphozyten	28
3.1.3 Implantation hippokampaler Feldpotentialelektroden	28
3.1.4 Ableitung lokaler Feldpotentiale	29
3.1.5 Elektrophysiologische Datenanalyse	31
3.1.6.1 Implantation der kranialen Hippokampusfenster	34
3.1.6.2 Hippokampusfenster-Aufbau	35
3.1.7 Zwei-Photonen Mikroskopie	35
3.1.7.1 Physikalische Grundlagen der zwei Photonen Mikroskopie	35
3.1.7.2 Aufbau und Funktionsweise des Mikroskops	37
3.1.7.3 Zwei-Photonen System	39

3.1.7.4 In-vivo Zwei-Photonen $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging	39
3.1.8 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Datenanalyse	43
3.2 Material	45
Tabelle 3.4 Material stereotaktische Injektionen	45
Tabelle 3.5 Viren	45
Tabelle 3.6 Material Elektrophysiologie	46
Tabelle 3.7 Operationsmaterialen	46
Tabelle 3.8 Material Zwei-Photonen Mikroskopie, Calcium-Imaging	46
Tabelle 3.9 OT-Zellen	47
Tabelle 3.10 Medikamente	47
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1 Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen	48
4.1.1 Anstieg der mittlere Theta-Stärke eine Woche nach der Lymphozyteninjektion	48
4.1.2 Transiente Abnahme der maximalen Theta-Amplitude bei konstanter Peak-Frequenz infolge der Lymphozyteninjektion	50
4.1.3 Transiente Abnahme der Gamma-Stärke infolge der Lymphozyteninjektion	53
4.1.4 Transiente Abnahme der maximalen Gamma-Amplitude bei konstanter Peak-Frequenz infolge der Lymphozyteninjektion	54
4.1.5 Sharp-Wave-Ripples sind infolge der Lymphozyteninjektion nicht verändert	57
4.2 Ergebnisse des Zwei-Photonen $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings	59
4.2.1 Gesamtbetrachtung der $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität	59
4.2.2 Vergrößerung der $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten-Amplitude im Rahmen der Entzündungsreaktion	62
4.2.3 Konstante Halbwertszeiten der $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Rahmen der Entzündungsreaktion	64
4.2.4 Auftreten und Eigenschaften von $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen	66

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
5.2	Diskussion der Ergebnisse	76
5.3	Ausblick auf weiterführende Untersuchungen	80
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>93</b>

## **1. Abkürzungsverzeichnis**

A. ad inject.	Aqua ad injectabilia
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AAV	adeno assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic
CA	Cornu Ammonis
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP response element-binding protein
cpGFP	zirkulär permutiertes grün fluoreszierendes Protein
CREB	cAMP response element-binding protein
CaM	Calmodulin
dist	distal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Entorhinaler Cortex
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
fs	Femtosekunde
g	Gramm
GD	Gyrus Dentatus
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HS	Hippokampale Sklerose
Hz	Hertz
IRES	internal ribosomal entry site
i.p.	intra peritoneal
Kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
körn	Körnerzellschicht
LE	limbische Enzephalitis
LFP	lokales Feldpotential
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M13	Peptid M13
mg	Milligramm



MHz	Megahertz
min	Minute
mm	Millimeter
molekular	molekulare Schicht
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
npLE	nicht-paraneoplastische limbische Enzephalitis
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OT	ovalbuminspezifische T-Lymphozyten
OVA	Ovalbumin
pLE	paraneoplastische limbische Enzephalitis
prox.	proximal
polymorph	polymorphe Schicht
Pyramid	Pyramidenzellschicht
re	rechts
REM	rapid eye movement
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
Sbc	Subiculum
s.c.	sub cutan
Str. mol.	Stratum Moleculare
Sup	superficial
SWR	Sharp-Wave Ripple
SWS	Sharp-Wave
Syn	hSynapsin 1 Promotor
Tab.	Tabelle
tägl.	täglich
TLE	Temporallappenepilepsie
TP	Tractus Perforans
µl	Mikroliter

UV            ultraviolett  
YFP          gelb fluoreszierendes Protein

## 2. Einleitung

### 2.1 Limbische Enzephalitis

Temporallappenepilepsie (TLE) ist die häufigste erworbene Form der Epilepsie im Erwachsenenalter. Paraneoplastische (pLE) und nicht-paraneoplastische (npLE) Formen der limbischen Enzephalitis wurden als eine der Hauptursachen für die Entwicklung von TLE beschrieben (Bien et al., 2007). Limbische Enzephalitis (LE) führt über noch nicht im Detail bekannte Prozesse zellulärer und struktureller Schädigungen zu chronischen rezidivierenden Krampfanfällen, sowie erheblicher Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung (Vincent et al., 2011).

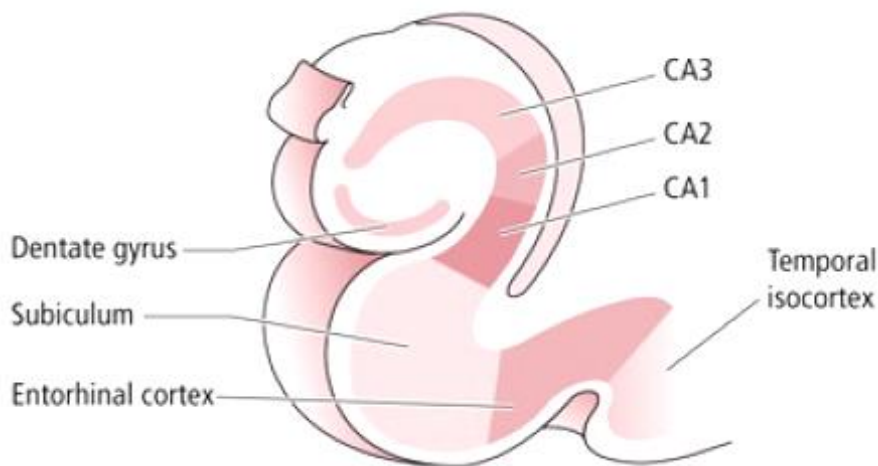
Als neuropathologische Korrelate der TLE zeigen sich eine hippocampale Sklerose (HS) mit Zelluntergang besonders in den Regionen CA1, CA3/4, sowie eine begleitende Gliose. In aktuellen Studien wurden spezifische Autoantikörper als Hauptfaktoren der pLE beschrieben (Malter et al., 2010; Vincent et al., 2011), in einer erheblichen Anzahl von Patienten mit LE wurden jedoch keine Autoantikörper nachgewiesen. Die Pathogenese der LE ist bisher nicht im Detail bekannt. Die genauen Mechanismen, wie Autoantikörper Neurone und Netzwerke in hypererregbare Zustände versetzen, sind ungeklärt. Ferner wurden in Hippokampi von LE-Patienten sowohl verschiedene B-, als auch zahlreiche T-Lymphozyten und aktivierte Mikroglia nachgewiesen (Bien et al., 2007; Vincent et al., 2011). Im Rahmen anderer autoinflammatorischen ZNS-Erkrankungen, wie zum Beispiel der multiplen Sklerose, kann es ebenfalls zu Anfällen kommen. Auch diese Erkrankungen sind durch prominente T-lymphozytäre Infiltrate gekennzeichnet (Koch et al., 2008; Vincent und Crino, 2011).

Zwar wurden in humanem Gewebe und in Tiermodellen bereits Mechanismen des T-Lymphozyten vermittelten Zelltodes für LE untersucht (Nitsch et al., 2004; Schwab et al., 2009), es ist jedoch nicht geklärt, ob diese im Zusammenhang mit Übererregbarkeit des Netzwerks stehen. Der bedeutende Zusammenhang zwischen T-Lymphozyten und Anfällen in verschiedenen inflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen (Saresella et al., 2010; Vincent und Crino, 2011), macht es notwendig, die Signalwege der T-Lymphozyten im Gehirn genauer zu untersuchen.

Die bisherige antiinflammatorische Therapie der LE zeigt zwar antiepileptogene, -konvulsive und gedächtnisfördernde Effekte, aufgrund der ausgeprägten Nebenwirkungen ist diese jedoch nur bedingt einsetzbar (Bien und Elger, 2007; Kroll-Seger et al., 2009). Im Rahmen dieser Dissertation wird ein Tiermodell zur Untersuchung der limbischen Enzephalitis und deren Auswirkung auf das neuronale Netzwerk entwickelt. Anhand dieses Tiermodells sollen neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der LE gewonnen werden. Die Entschlüsselung der Mechanismen, die der LE zugrunde liegen, kann eine Grundlage zur Entwicklung spezifischer nebenwirkungsarmer anti-epileptogener Therapien liefern.

## 2.2 Anatomie des Hippokampus

Der Hippokampus liegt, eingebettet in den *Gyrus parahippocampalis*, im medialen Temporallappen. Anterior des Hippokampus befindet sich die Amygdala, nach posterior wird er durch das Splenium des *Corpus callosum* begrenzt. Er wölbt sich in die untere mediale Wand des *Cornu temporale* des *Ventriculus lateralis* vor.



**Abb. 1:** Regionen des humanen Hippokampus

Der Hippokampus besteht aus Cornu ammonis (CA), Gyrus dentatus (GD) und Subiculum (Sbc). Der Entorhinale kortex (EC) ist eine Hippokampus, assoziierte Struktur (aus Patestas und Gartner, 2010).

Der Hippokampus besteht aus den Regionen *Cornu ammonis* (CA), *gyrus dentatus* (GD) und Subiculum (Sbc). Diverse Strukturen (Entorhinaler Kortex (EC), *indusium griseum*, *nuclei septales* u.v.m.) sind mit dem Hippokampus assoziiert. Die unterschiedlichen Regionen des Hippokampus sind aus phylogenetisch altem drei-schichtigem Archikortex aufgebaut (Patestas und Gartner, 2010).

1) *Cornu ammonis* (CA): Das CA gliedert sich in verschiedene Regionen (CA1-CA3, beim Menschen -CA4). Die CA1-Region liegt proximal des Sbc, während sich CA3 (bzw. CA4) in einer als Hilus bezeichneten Region mit dem GD vermischt. Die am tiefsten gelegene Schicht des CA (*Stratum radiatum*) besteht aus Dendritenbäumen und Axonkollateralen von Pyramidenzellen des CA, sowie aus Axonen des *Tractus perforans* (TP) aus dem EC. Die mittlere Schicht des CA beherbergt die Somata von Pyramidenzellen, deren Axone wiederum den Hauptanteil an der obersten Schicht des CA (*Stratum oriens*) haben. Die Axone der Pyramidenzellen gelangen über nachgeschaltete Strukturen (Alveus, Fimbria, Fornix) zu unterschiedlichen Hirnregionen. Sogenannte Schaffer-Kollateralen der Pyramidenzellaxone von CA3 ziehen zu CA1 und bilden dort Synapsen mit Dendriten anderer Pyramidenzellen (Vago und Kesner, 2008).

2) *Gyrus dentatus*: Der GD gibt seine Efferenzen ausschließlich an Regionen des Hippokampus weiter. Die äußerste molekulare Schicht des GD (Str. mol. GD) besteht aus Dendriten von Körnerzellen, die Synapsen mit Axonen des TP aus dem EC bilden. In der Körnerzellschicht liegen die Somata der Körnerzellen, deren Axone als Moosfasern Synapsen mit Pyramidenzellen des CA ausbilden und Kollateralen mit Dendriten anderer Körnerzellen im Str. mol. GD bilden. In der innersten polymorphen Schicht des GD finden sich, neben den angesprochenen Axonen, hauptsächlich Interneurone (Patestas und Gartner, 2010).

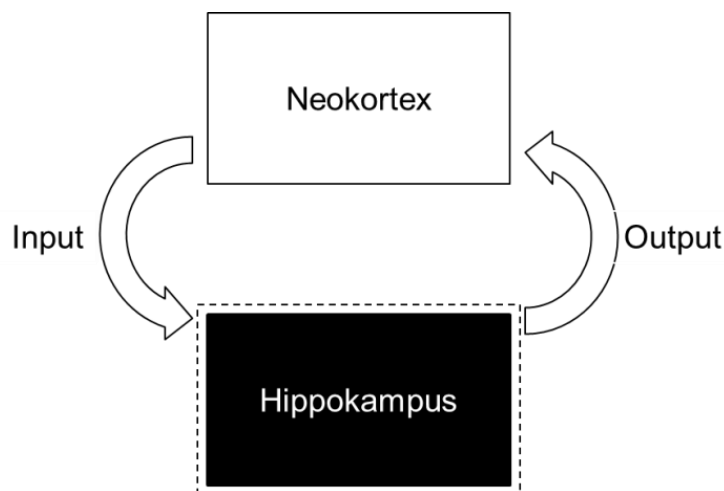
3) Das Subiculum bildet eine Transitionszone zwischen Hippokampus und Parahippokampus von dreischichtigem Archikortex hin zu höher strukturiertem sechsschichtigem Neokortex. Das Sbc erhält Afferenzen von Pyramidenzellen des CA und entsendet Efferenzen über die Fornix zu den *Corpora mammilaria* des Hypothalamus und den *Nuclei anteriores thalami* (Patestas und Gartner, 2010).

Der Entorhinale Kortex (Brodmann-Areal 28), erhält sowohl die Afferenzen verschiedener Hirnregionen, als auch Informationen aus dem Hippokampus. Er ist aus sechsschichtigem Isokortex aufgebaut. Die oberflächlichen Schichten (I-III) des EC liefern In-

put an den Hippokampus (Steward und Scoville, 1976). Schicht II besteht hauptsächlich aus Stern- und Pyramidenzellen, die zum GD und CA3 projizieren (Klink und Alonso, 1997). Schicht III besteht in erster Linie aus Pyramidenzellen, die zum CA1 und dem Sbc projizieren (Hjorth-Simonsen und Jeune, 1972). Die *Lamina dissecans* bezeichnete zellarme Schicht IV trennt die Neurone der oberflächlichen und tiefen Schichten voneinander (Chrobak et al., 2000). Die tiefen Schichten V und VI des EC fungieren als hauptsächliche Empfänger hippokampaler Informationen und projizieren zu verschiedenen Hirnregionen (Suzuki und Amaral, 1994). Darüber hinaus projizieren einige Neurone der tiefen Schichten intralaminar zu Neuronen der oberflächlichen Schichten des EC (Kohler, 1986 und 1988).

### 2.3 Intrinsischer Schaltkreis des Hippokampus

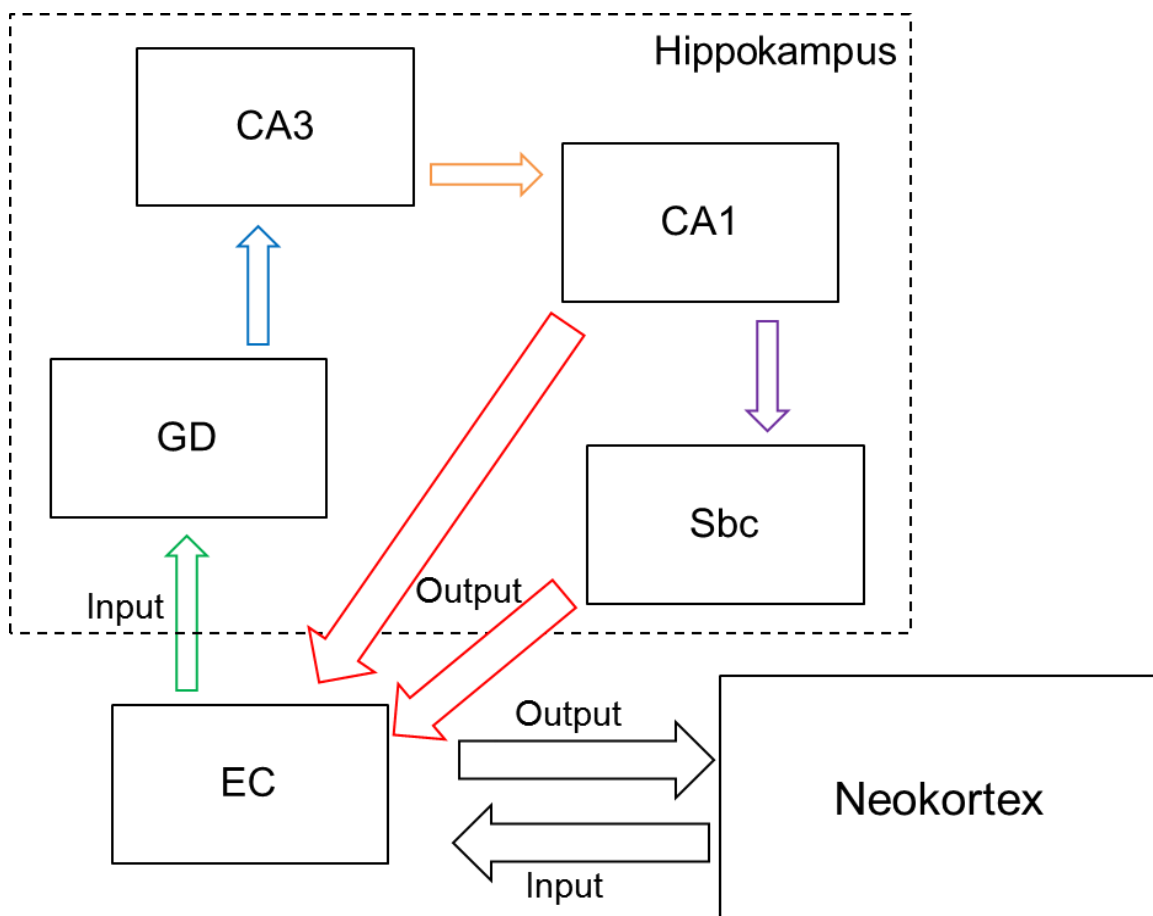
Betrachtet man den Hippokampus in einem „black-box“-Modell, lässt sich vereinfacht sagen, dass Informationen aus dem Neokortex in den Hippokampus eingeschleust und nach dortiger Bearbeitung wieder an Regionen des Neokortex abgegeben werden.



**Abb. 2:** „black-box“-Modell des Hippokampus

Die Hippokampusregion empfängt und sendet Informationen aus verschiedenen und an verschiedene Regionen des Neokortex.

Das vorherrschende Modell, nachdem der intrinsische Schaltkreis des Hippokampus beschrieben wird, ist der „Trisynaptische-Bogen“. In diesem Modell fungiert der EC als Schaltstelle für eingehende und ausgehende Informationen des Hippokampus. Als erster Schritt werden in den EC eingehende Informationen über den *tractus perforans* an den GD weitergeleitet. Von dort aus leiten sog. Moosfasern Informationen an CA3. CA3 ist über die Schaffer-Kollateralen mit CA1 verbunden, die wiederum über einen optionalen Zwischenschritt über das Sbc zum EC projizieren, womit sich der intrinsische Schaltkreis schließt. Vom EC aus werden Efferenzen an verschiedene Gehirnregionen weitergeleitet (Maier et al., 2013).



**Abb. 3:** Trisynaptischer Bogen des Hippocampus

Der Entorhinale Kortex (EC) fungiert als Schnittstelle zwischen neokortikalen Hirnregionen und dem Hippokampus. Er erhält aus beiden Anteilen sowohl Input- als auch Output-Informationen. Über den Tractus perforans (grüner Pfeil) gelangen Informationen in die Regionen des Hippokampus. Trisynaptischer Bogen: Moosfasern (blauer Pfeil), Schaffer-Kollateralen (oranger Pfeil), Projektion des CA1 und des Subiculum (Sbc) zum Entorhinalen Kortex (EC) (rote Pfeile). Es besteht eine optionale Schaltstelle zwischen CA1 und Sbc (violetter Pfeil).

Eine differenziertere Beschreibung des intrinsischen Schaltkreises lässt die Komplexität der Hippokampusregion erahnen:

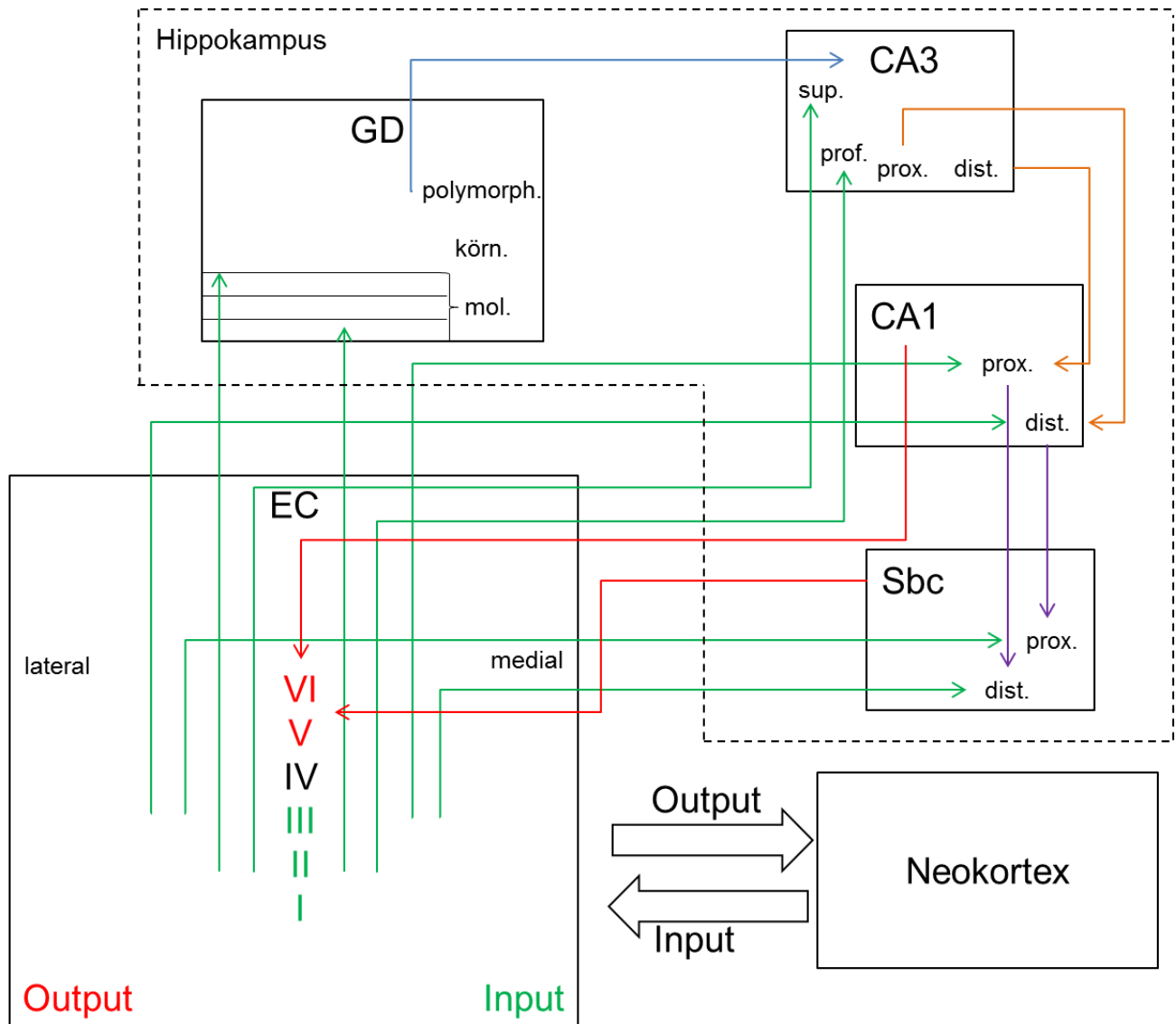
Wie oben beschrieben besteht der EC aus sechsschichtigem Isokortex. Die oberflächlichen Schichten des EC (I-III) sind der Ausgangspunkt des Informationsflusses. Neurone der Schicht II projizieren zum GD und CA3, wobei laterale gelegene Neurone der Schicht II zum oberen Drittel des Str. mol. von GD und zu tiefen Schichten von CA3 projizieren und medial gelegene Neurone der Schicht II zum unteren Drittel des Str. mol. des GD und oberflächlichen Schichten von CA3 projizieren (Sporns und Tononi, 2007). Neurone der Schicht III finden ihre Zielregionen in CA1 und dem Sbc. Medial gelegene Neurone der Schicht II projizieren an die proximale CA1 sowie distale Region des Sbc, wohingegen lateral gelegene Neurone der Schicht II zu distalen CA1 und proximalen Regionen des Sbc projizieren (Baks-Te-Bulte et al., 2005). Alle diese Verbindungen zwischen dem EC und Regionen des Hippokampus bilden zusammen den Tractus Perforans (Strien et al., 2009).

Innerhalb der Hippokampusregion startet der intrinsische Schaltkreis mit der Projektion des GD über die Moosfasern zu CA3. Als Schaffer-Kollaterale bezeichnete Axone projizieren von CA3 zu CA1 (Strien et al., 2009), wobei die proximal gelegenen CA3 Neurone zum distalen und distal gelegene CA3 Neurone zum proximalen Teil der CA1 Region projizieren (Ishizuka et al., 1990). Kürzlich wurde ein weiterer Zwischenschritt von CA3 und CA1 über CA2 beschrieben (Chevalleyre et al., 2010). Der nächsten Schritt des intrinsischen Schaltkreises ist die Projektion der CA1-Pyramidenzellen zum Sbc, wobei der proximale CA1 Bereich zur distalen und der distale CA1 Bereich zur proximalen Region des Sbc projiziert (Naber et al., 2001).

Der letzte Schritt des intrinsischen Schaltkreises verbindet die Hippokampusregion wieder mit dem EC. Der hippokampale Output wird von CA1 und dem Subiculum an die medial und lateral gelegenen tiefen Schichten (V, VI) des EC geleitet (Strien et al., 2009).

Aus den tiefen Schichten des EC gelangen Informationen wiederum an weitere Teile verschiedener Hirnregionen (Suzuki und Amaral, 1994).





**Abb. 4:** Intrinsischer Schaltkreis des Hippokampus

Der Entorhinale Kortex (EC) liefert den Hauptinput des hippocampalen Schaltkreises. Aus den medialen und lateralen Anteilen der Schichten II und III gelangen Informationen über den Tractus Perforans (grüne Pfeile) in unterschiedliche Schichten und Abschnitte des Gyrus Dentatus (GD), Cornu Ammonis (CA) und des Subiculus (Sbc). Der GD projiziert über Moosfasern (blauer Pfeil) nach CA3. Die Schaffer-Kollateralen (orangene Pfeile) verbinden CA3 mit CA1. Über einen optionalen Zwischenschritt über das Sbc (violette Pfeile) gelangt der Output der Hippokampus-Region von CA1 und dem Sbc zu den Schichten V und VI des Entorhinalen Kortex.

polymorph.=polymorphe Schicht, körn.=Körnerzellschicht, mol.=Stratum moleculare, sup.=superficial, prof.=profundus, prox.=proximal, dist.=distal.

## 2.4 Funktionen des Hippokampus

Lernen beschreibt den Vorgang neues Wissen zu erwerben. Die Funktion des Gedächtnisses ist es, erlerntes Wissen zu speichern und abzurufen. Das Gedächtnis lässt sich zeitlich wie folgt einteilen: 1) sensorisches Gedächtnis, 2) Kurzzeitgedächtnis, 3) Langzeitgedächtnis. Das sensorische Gedächtnis hat eine hohe Kapazität und dient dazu, aktuelle Sinnesinformationen und Erfahrungen für wenige Sekunden zu speichern. Es integriert alle aktuellen Ereignisse und bietet damit die Grundlage, um Aufmerksamkeitssysteme zu aktivieren und Ereignisse ihrer Wichtigkeit nach zu selektieren. Das Kurzzeitgedächtnis hat eine begrenzte Kapazität. Es stellt die Verbindung der Gegenwart mit der unmittelbaren Vergangenheit dar. Über eine Dauer von Sekunden bis Minuten dient es als eine Art Arbeitsspeicher, um auf aktuelle Geschehnisse reagieren und jüngste Erfahrungen kategorisieren zu können. Das Langzeitgedächtnis ist ein Speichersystem von großer Kapazität. In ihm werden Informationen über die Dauer von Stunden bis hin zur gesamten Lebenszeit gespeichert. Für den als Konsolidierung bezeichneten Prozess, neue Informationen im Langzeitgedächtnis abzuspeichern, ist der Hippokampus von essentieller Bedeutung (Pape et al., 2010)

Erkrankungen, welche die Hippokampus-Region betreffen, führen regelhaft zur Beeinträchtigung der expliziten Gedächtnisleistung. Ein berühmtes Beispiel, welches die Wichtigkeit des Hippokampus für die Konsolidierung des Gedächtnisses belegt, ist die Krankengeschichte des in der Fachliteratur H.M. genannten Patienten. Diesem wurden mit der therapeutischen Absicht, ihn von epileptischen Anfällen zu kurieren, beide Hippokampi entnommen, woraufhin er die Fähigkeit verlor, Informationen ins Langzeitgedächtnis zu transferieren (Scoville und Milner, 1957). Wie an voriger Stelle bereits beschrieben, zeigen auch Patienten mit limbischer Enzephalitis Defizite im Bereich der Gedächtnisleistung (Vincent et al, 2011).

Die zellulären Mechanismen, welche für die Konsolidierung angenommen werden, wurden in allen Abschnitten der hippokampalen Schaltkreise beschrieben: Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) (Bliss und Lomo, 1973; Bliss und Gardner-Medwin, 1973; McNaughton et al., 1986; Morris et al., 1990). Diese Vorgänge beschreiben synaptische Plastizität, also die adaptive Anpassung synaptischer Prozesse in Abhängigkeit ihrer Aktivierung durch andere Neurone.

Demnach verstärkt oder verringert sich die Reaktion eines Zielneurons in Form eines postsynaptischen Potentials abhängig von der Form der eingehenden Signale. Wird ein Neuron beispielsweise wiederholt mit gleichbleibender Intensität aktiviert, so bildet es, entsprechend der konstanten synaptischen Übertragungsstärke, postsynaptische Potentiale konstanter Amplituden aus. Erhöht oder verringert sich nun die synaptisch Übertragungsstärke auf das Neuron für eine kurze Zeit besonders stark, so werden nachfolgende einzelne Aktivierungen mit signifikant höheren oder tieferen postsynaptischen Potentialen beantwortet. Dieser Zustand kann Stunden bis Wochen anhalten. Man spricht in diesem Fall von Langzeitpotenzierung bzw. Langzeitdepression der synaptischen Übertragung (Pape et al., 2010).

## 2.5 Lokale Feldpotentiale als Taktgeber hippocampaler Mechanismen

Neuronale Aktivität verursacht transmembranäre Ionenströme. Diese können im Extrazellularraum als lokale Feldpotentiale registriert werden. Am extrazellulären Feld sind dabei alle Prozesse beteiligt, in denen Ionenbewegungen stattfinden. Somit liefert die Ableitung lokaler Feldpotentiale ein Integral der neuronalen Aktivität, dessen Form, Amplitude und Frequenz vom proportionalen Beitrag der verschiedenen Quellen und verschiedenen Eigenschaften des Gehirngewebes abhängt (Buzsaki et al., 2012).

Synchrone Entladungen von Neuronenverbänden führen zu bestimmten Mustern lokaler Feldpotentiale. Diese Synchronisierung dient dabei der Rekrutierung verschiedener Neurone zu einer funktionellen Einheit. Je nachdem welche Neurone an welcher Art von Muster beteiligt sind, lassen sich beliebig viele funktionelle Gruppen für unterschiedliche Prozesse rekrutieren (Pape, 2010).

Im Hippokampus von Nagetieren werden maßgeblich vier verschiedene Muster lokaler Feldpotentiale beschrieben, die in jeweils unterschiedlichen Aktivitätszuständen auftreten und sich gegenseitig beeinflussen: Während Bewegung und in REM-Schlafphasen wurden Oszillationen im Theta-Band (5-12 Hz) (Whishaw und Vanderwolf, 1973) beschrieben, welche von schnelleren Oszillationen im Gamma-Band (30-80 Hz) überlagert sind (Maier, 2013), deren Amplituden in Abhängigkeit zur Theta-Aktivität stehen (Bragin et al., 1995; Buzsaki et al., 1983).

In Ruhephasen und während orthodoxen Schlafs wurden sogenannte „Sharp-Wave-Komplexe“ beobachtet. Dies sind kurze Entladungen des Netzwerks aufgrund starker synaptischer Aktivität, die entlang des intrinsischen hippocampalen Schaltkreises (siehe Kapitel 2.3.) propagieren und mit Phasen hochfrequenter Oszillationen (140-210 Hz) assoziiert sind (Maier, 2013). Diese Oszillationen wurden von O’Keefe und Nadel (1978) als „Ripples“ terminiert und spielen eine entscheidende Rolle in der Generierung des Gedächtnisses (O’Keefe und Nadel, 1978).

### 2.5.1 Theta-Oszillationen

Theta-Oszillationen repräsentieren einen Aktivzustand des Hippokampus. Die extrazellulären Ströme, die der Entstehung von Theta-Oszillationen zugrunde liegen, werden maßgeblich im EC, CA3 (Schaffer-) Kollateralen und durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in Dendriten von Pyramidenzellen generiert. Durch Theta-Oszillationen werden neuronale Funktionsgruppen gebildet, die für unterschiedliche Aufgaben verantwortlich sind. Da Theta-Oszillationen nicht nur in der Hippokampusregion, sondern synchron in verschiedenen Regionen des limbischen Systems detektiert werden können, sollte man präziser von „limbischen Theta-Oszillationen“, als von hippocampalen Theta-Oszillationen sprechen. Durch Rekrutierung unterschiedlicher Neuronengruppen generieren Theta-Oszillationen ein funktionelles Makrosystem, welches im Sinne der Hebb’schen Regel zeitlich präzisiert auf nachgeschaltete Neuronen einwirkt und so zur Gedächtniskonsolidierung beiträgt (Buzsaki, 2002).

### 2.5.2 Gamma-Oszillationen

Als weiterer Synchronisierungsmechanismus des Hippokampus während Aufmerksamkeitszuständen fungieren Gamma-Oszillationen. Wegen ihrer relativ höheren Frequenz sind sie ideal für Vorgänge geeignet, deren Zeitskala über dem Bereich der bewussten Wahrnehmung liegen. Gamma-Oszillationen werden als Grundlage wesentlicher Hippokampusfunktionen wie der schnellen Differenzierung eingehender Informationen, des Zusammenführens verschiedener Neuronen zu funktionellen Gruppen, des Abrufens von Informationen, um erlernte Fähigkeiten auszuüben und der Auswahl, welcher Aspekt einer Erfahrung später erinnert werden soll, angenommen.

Im Gegensatz zu Theta-Rhythmen, die sich zeitlich relativ stabil verhalten, treten Gamma-Oszillationen in Salven auf, die zeitlich an die Oszillationen des Theta-Bandes, sowie in ihrem Auftreten an eingehende sensorische Informationen der Umgebung adaptiert sind. Der Annahme folgend, dass Theta-Oszillationen Neurone zu funktionellen Gruppen zusammenführen, dienen Gamma-Oszillationen vermutlich der Feinabstimmung dieser funktionellen Gruppen (Colgin und Moser, 2010).

### 2.5.3 Sharp-Wave-Ripples

Sharp-Wave-Ripples (SWR) werden vornehmlich während Immobilitätszuständen beobachtet, wobei es zusätzliche Vermutungen über die Funktion von SWR während Aufmerksamkeitszuständen gibt (Csicsvari und Dupret, 2012). SWR wird eine zentrale Rolle in der Konsolidierung des Gedächtnisses während des Schlafs im Hippokampus zugesprochen (Marr, 1971). Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, ist es eine zentrale Funktion des Hippokampus, Inhalte vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis zu übertragen. Da während SWR eine Vielzahl von Neuronen synchron aktiv ist, werden sie als geeigneter Zustand angenommen, um Gedächtnisspuren an extra-hippokampale Kortexareale zu transferieren (Buzsaki, 1989; McClelland et al., 1995). Als Gedächtnisspur werden vorige Prozesse neuronaler Aktivität angesehen, welche während SWR reaktiviert werden (O'Neill et al., 2006; Wilson und McNaughton 1994). Als Beleg für diese Funktion der SWR gelten Experimente, in denen Schlafphasen während SWR-Episoden unterbrochen wurden, was in der Folge zur Beeinflussung der Gedächtnisleistung führte (Girardeau et al., 2009; Stengel und Wilson, 2010).

### 3. Methoden und Material

#### 3.1 Methoden

Alle experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit den institutionellen Tierschutz-Richtlinien durchgeführt und von den zuständigen Behörden genehmigt.

##### 3.1.1 Versuchsaufbau

Es wurden zwei verschiedene Versuchsabläufe durchgeführt. In jedem Ablauf wurden verschiedene Aspekte neuronaler Netzwerke untersucht.

Beiden Versuchsgruppen sind die Injektionen des AAV-Syn-OVA-IRES-Venus-Virus sowie die Auslösung der Entzündungsreaktion durch Injektion von ovalbuminspezifischen T-Lymphozyten (OT-Lymphozyten) gemeinsam.

Die stereotaktischen Injektionen sowie die Implantationen der hippocampalen Feldpotentialelektroden und kranialen Hippokampusfenster wurden von Dipl. Biol. Falko Fuhrmann durchgeführt.

Die erste Gruppe von Versuchstieren wurde elektrophysiologischen Messungen unterzogen (siehe Tab. 1).

**Tab.1:** Schrittweiser Arbeitsablauf der Elektrophysiologie

Schritte	Experiment
1	stereotaktische Injektion von AAV-Syn-OVA-IRES-Venus (Virus)
2	Implantation hippocampaler Feldpotentialelektroden
3	stereotaktische Injektion von OT-I & -II-Zellen
4	Ableitung lokaler Feldpotentiale des Hippokampus
5	Elektrophysiologische Datenanalyse

Die zweite Gruppe von Versuchstieren wurde  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messungen unterzogen (siehe Tab. 2).

**Tab. 2:** Schrittweiser Arbeitsablauf des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging

Schritte	Experiment
1a	stereotaktische Injektion von AAV-Syn-OVA-IRES-Venus (Virus)
1b	stereotaktische Injektion von AAV1.hSyn.GCaMP5G(GCaMP-T302L.R303P.D380Y).WPRESV40 ( $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator)
2	Implantation kranialer Fenster
3	stereotaktische Injektion von OT-I & -II-Zellen
4a	Zwei-Photonen $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging
5	$\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Datenanalyse

### 3.1.2 Stereotaktische Injektion

Mittels stereotaktischer Injektionen wurden die viralen Vektoren AAV-Syn-OVA-IRES-Venus und AAV1.hSyn.GCaMP5G(GCaMP-T302L.R303P.D380Y).WPRESV40 sowie OT-Lymphozyten in die Hippokampus-Region der Versuchstiere eingebracht.

Die Injektionen liefen nach folgendem Protokoll ab:

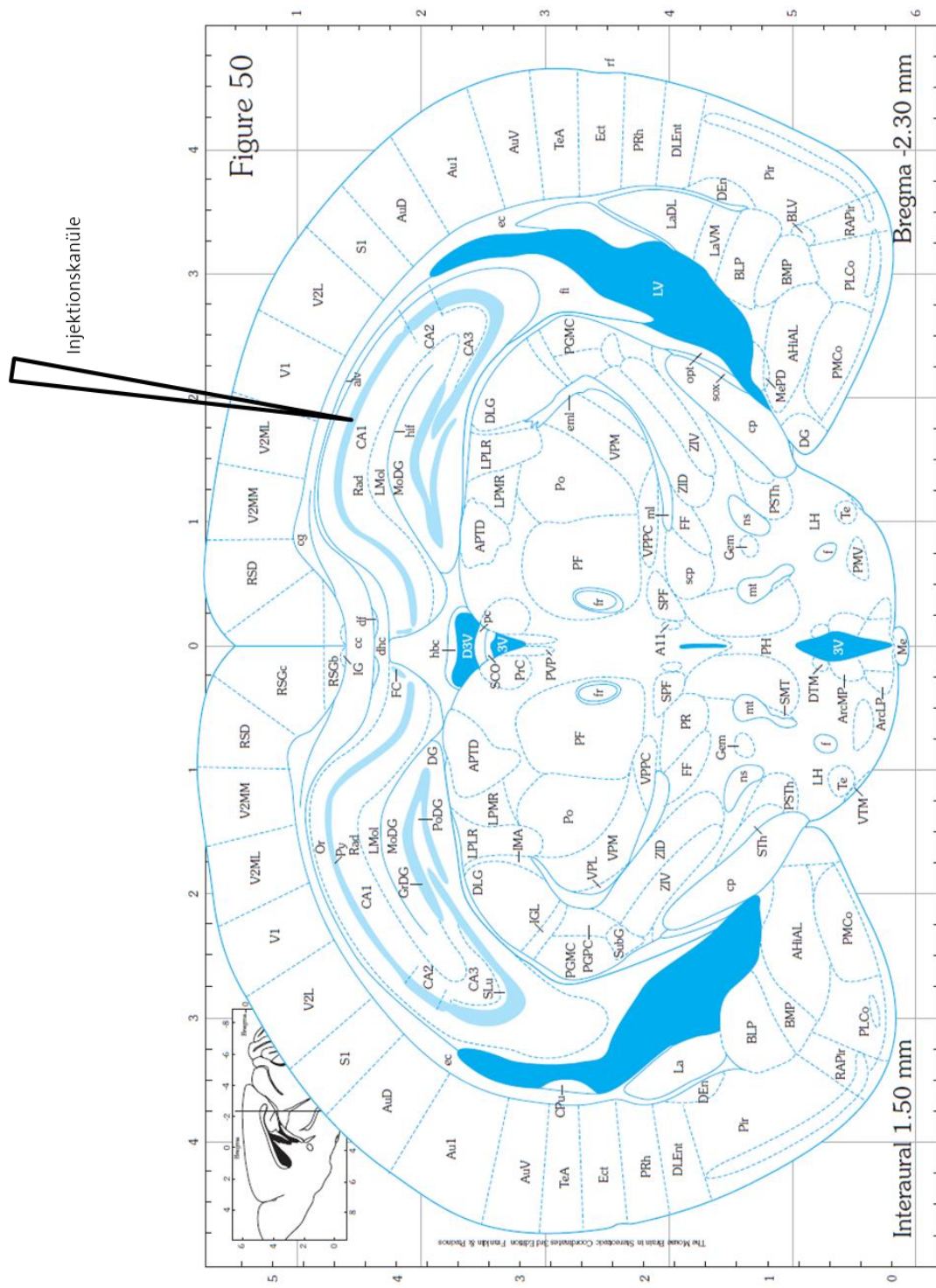
Die Versuchstiere erhielten ca. 30 min präoperativ zur Analgesie 5 mg/kg KM Ketoprofen, s. c., und Buprenorphin (0,05 mg/kg KM s. c, verdünnt in A. ad inject., Volumen: 100  $\mu\text{l}$ /20 g Maus). Zusätzlich wurde während der Injektion viraler Vektoren eine Xylazin/Ketamin-Narkose (16 mg/kg KM Xylazin und 100 mg/kg KM Ketamin i.p., verdünnt mit A. ad inj., Volumen: 100  $\mu\text{l}$ /20 g Maus) durchgeführt. In tiefer Anästhesie wurden die Tiere in einen Rahmen eingespannt, welcher den Kopf fixierte, und auf eine sich selbst regulierende Wärmeplatte gelegt.

Die Kopfhaut der Tiere wurde rasiert und auf einer Länge von ca. 5 mm eröffnet, anschließend wurde das Periost entfernt. Anhand des Bregmas wurde die Injektionsstelle aufgesucht. An der entsprechenden Stelle (für Koordinaten siehe Tab. 3) wurde ein ca. 0,5 mm großes Loch in den Schädel gebohrt und die Kanüle der Injektionsapparatur zur stereotaktischen Zielposition geführt.

Sobald die entsprechenden Koordinaten erreicht waren, wurde über einen Zeitraum von zehn Minuten kontinuierlich 1  $\mu\text{l}$  der zu injizierenden Lösung eingebracht. Nach einer

Verweildauer von weiteren fünf Minuten wurde die Kanüle zurückgezogen. Anschließend erfolgte die Hautnaht.

Postoperativ erhielten die Tiere Ketoprofen 1x tägl. und Buprenorphin 2 x tägl. in oben genannter Dosierung über drei Tage.



**Abb. 5:** Zielposition der stereotaktischen Injektionen in der CA1-Region des linken Hippokampus (nach Franklin und Pixons, 2008)



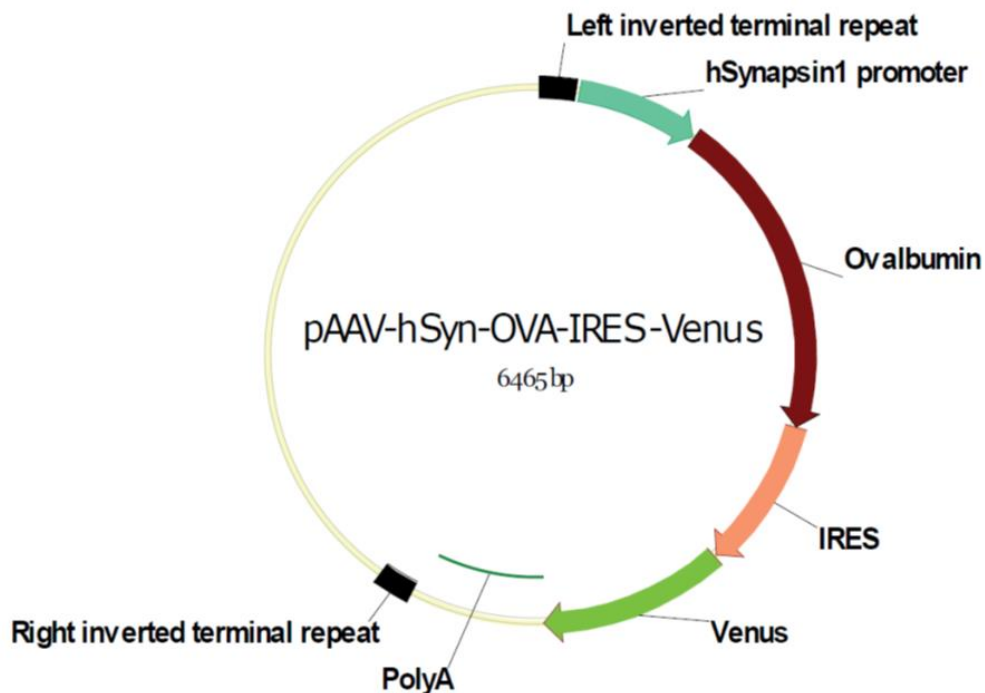
**Tab. 3:** Parameter der stereotaktischen Injektionen

Parameter	Konfiguration
Position ausgehend vom Bregma nach rechts lateral	2000 $\mu\text{m}$
Position ausgehend vom Bregma nach kaudal	2300 $\mu\text{m}$
Position ausgehend vom Bregma nach ventral	1400 $\mu\text{m}$
Neigungswinkel Einstichkanüle senkrecht zum Bregma	10 ° nach re. lateral
Injektionsvolumen OVA-Virus Lösung	1 $\mu\text{l}$
Injektionsvolumen GCamp5 Lösung	1 $\mu\text{l}$
Injektionsvolumen OT-Zell Lösung	1 $\mu\text{l}$ , entspricht ~50.000 Zellen

### 3.1.2.1 Virale Vektoren

Viraler Gentransfer bietet die Möglichkeit, DNA in Neurone lebender Organismen zu transferieren. Ein viraler Vektor ist ein winziges Partikel, das sich an Zellen heftet und genetisches Material in diese injiziert. In der Natur codiert das virale genetische Material für Proteine, die nötig sind, um weitere virale Vektoren zu produzieren. Auf diese Weise werden die infizierten Zellen des Wirtsorganismus zu Produzenten weiterer viraler Vektoren. Unter Laborbedingungen wurden virale Vektoren dahingehend verändert, dass die von ihnen injizierte DNA nicht für zur Virenreplikation nötige Proteine codiert, sondern durch artifizielle DNA ausgetauscht wurde. Dadurch liefern virale Vektoren ein Expressionsprodukt an Zellen ohne diese zur Produktion von Virusproteinen zu zwingen. Der Prozess nicht-replikationsfähiger viraler Vektoren zum Transfer fremder DNA in Zielzellen wird als Transduktion bezeichnet. Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV) sind von Natur aus replikationsdefizient und benötigen daher ein Helfervirus zur Replikation. Dies macht sie als Vektor künstlicher DNA besonders sicher. AAV können sowohl teilungsfähige als auch postmitotische Zellen infizieren und integrieren ihre DNA ins Genom der Wirtszelle, was zu langfristiger Genexpression führt (Carter und Shieh, 2010).

## 3.1.2.1a AAV-Syn-OVA-IRES-Venus



**Abb. 6:** Vektorkarte des AAV-Syn-OVA-IRES-Venus

Es handelt sich um einen Adeno-assoziierten-viralen-vektor (AAV), dessen Abschnitte für einen neuronenspezifischen Promotor (Syn), einen Hauptbestandteil des Hühnereiweißes (Ovalbumin) sowie eine ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und eine Fluorophore (Venus) codieren.

Dieser virale Vektor codiert für verschiedene Proteine:

- hSynapsin 1 Promotor (Syn): Dieser Promotor richtet die transgene Expression spezifisch auf Neurone (Kügler et al., 2003).
- Ovalbumin (OVA): Dieses Protein ist der Hauptbestandteil des Hühnereiweißes und stellt ein Antigen dar, das als Zielstruktur für Ovalbumin-spezifische T-Zellen (OT-Zellen) fungiert (Clarke et al., 2000).
- Interne ribosomale Eintrittsstelle, (engl. Internal Ribosomal Entry Site=IRES): Ein RNA-Abschnitt, der die Bindung von Ribosomen und damit die Synthese der codierten Proteine unabhängig von zellulären Initiationsfaktoren ermöglicht (Thompson, 2012).
- Venus: eine Variante des yellow fluorescent protein (YFP), welches wiederum eine Mutante des green fluorescent protein (GFP) darstellt. Dieses Protein lässt

sich fluoreszenzmikroskopisch darstellen und dient so als Reporter der Expression des Virusgenoms (Phillips, 2001).

### 3.1.2.1b AAV1.hSyn.GCaMP5G(GCaMP-T302L.R303P.D380Y).WPRE.SV40

Dieser virale Vektor codiert als wesentliches Expressionsprodukt für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator GCaMP5.

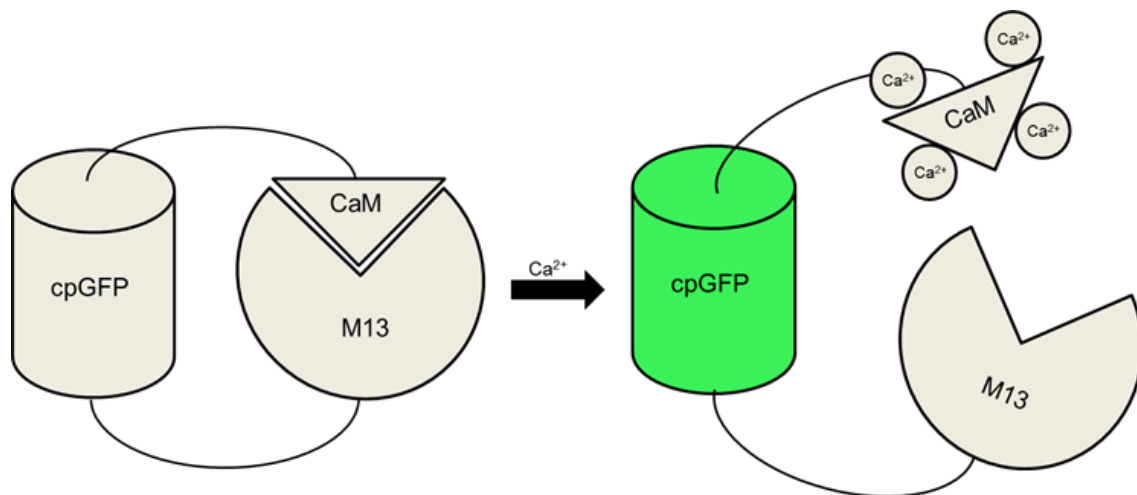
Mithilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren lassen sich Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Zellen darstellen, indem durch Interaktion von Ionen und Indikator Fluoreszenz erzeugt wird, welche wiederum fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden kann.

Als  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator werden sogenannte chimäre Proteine verwendet. Dies sind aus mehreren unterschiedlichen Proteinen zusammengesetzte Konstrukte, welche die unterschiedlichen Eigenschaften ihrer Bestandteile miteinander fusionieren.

Der verwendete  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator GCaMP-5 besteht aus den folgenden drei Proteinen:

- 1) zirkulär permutiertem grün fluoreszierendem Protein (cpGFP): ein Protein, dass bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert.
- 2) Calmodulin (CaM): ein Calcium-bindendes Protein.
- 3) Peptid M13 (M13): ein Peptidabschnitt der Myosinleichtkettenkinase, der als Zielsequenz des CaM fungiert. (Akerboom et al., 2009)

In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  binden die CaM und die M13 Strukturen aneinander. Steigt die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Umgebung des GCaMP5 an, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit dafür, dass  $\text{Ca}^{2+}$  an CaM bindet. Durch diese Interaktion ändert sich aufgrund der veränderten Konformation von CaM und M13 zueinander auch die Konformation des cpGFP, wodurch sich dessen Fluoreszenzintensität erhöht.



**Abb. 7:** Schema der Konformationsänderung des GCaMP5

Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an CaM ändert sich die Konformation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators, wodurch die Fluoreszenzintensität des cpGFP ansteigt.

CaM=Calmoculin, M13=Peptid 13, cpGFP=zirkulär permutiertes grün fluoreszierendes Protein

### 3.1.2.2 Ovalbuminspezifische T-Lymphozyten

Die Injektion einer Kombination aus OVA-spezifischen CD8+ zytotoxischen Lymphozyten (OT-I-Zellen) und CD4+ T-Helferzellen (OT-II-Zellen) dient der Induktion einer Entzündungsreaktion im Hippokampus der Versuchstiere (Kurts et al., 1997).

### 3.1.3 Implantation hippokampaler Feldpotentialelektroden

Die Versuchstiere erhielten ca. 30 min präoperativ zur Analgesie 5 mg/kg KM Ketoprofen, s.c., und Buprenorphin (0,05 mg/kg KM s.c, verdünnt in A. ad inject., Volumen: 100  $\mu\text{l}$ /20g Maus). Zusätzlich wurde intraoperativ eine Xylazin/Ketamin Narkose (16 mg/kg KM Xylazin und 100 mg/kg KM Ketamin i.p., verdünnt mit A. ad inj., Volumen: 100  $\mu\text{l}$ /20 g Maus) durchgeführt. In tiefer Anästhesie wurden die Tiere in einen Rahmen eingespannt, welcher den Kopf fixierte und auf eine sich selbst regulierende Wärmeplatte gelegt.

Monopolare Feldpotentialelektroden wurden im *Stratum radiatum* der rechten Hippokampusregion implantiert (2,3 mm kaudal, 2 mm rechts lateral und 1,6 mm ventral, in Bezug zum Bregma).

Um die Versuchstiere zur Vorbereitung auf die elektrophysiologischen Messungen festhalten zu können wurde eine temporäre Kopffixierungsleiste angebracht. Alle Implantate wurden mit Zahnacryl befestigt.

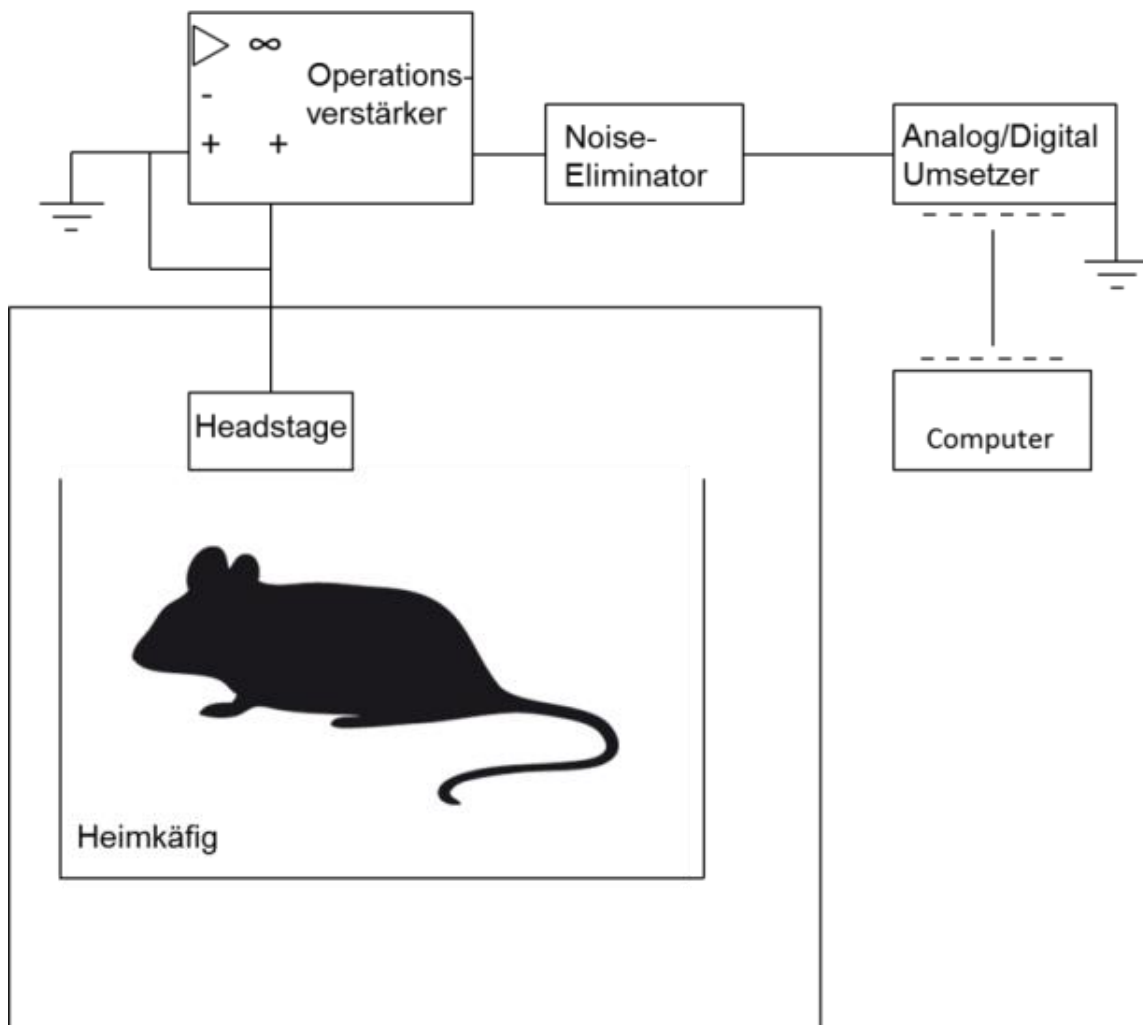
Postoperativ erhielten die Tiere Ketoprofen 1x tägl. und Buprenorphin 2x tägl. in oben genannter Dosierung über drei Tage. In den folgenden zwei Wochen wurden die Mäuse zur Regeneration einzeln in ihren Heimkäfigen gehalten.

#### 3.1.4 Ableitung lokaler Feldpotentiale

Die Versuchstiere wurden mit den in den Hippokampus implantieren Elektroden (MS 303/3-AIU/Spc, Plastics one, Roanoke, Virginia, USA) über ein Kabel (Bipolare Kabel für Plastics one 303 Elektroden, npi electronic, Tamm) mit einem elektrophysiologischen Setup verbunden. Dieses bestand aus einer Miniheadstage (EXT Miniheadstage, npi electronic, Tamm), die das aufgenommene Signal an einen Operationsverstärker (EXT-02F/2 Extrazellular-Verstärker, npi electronic, Tamm) weiterleitete. Dieser verstärkte das Signal zweihundertfach und filterte es in einem Bereich von 3-500 Hz Bandpass. Außerdem wurde im Bereich des Netzrauschens (50 Hz) eine Rauschminimierung durchgeführt („Hum Bug“ Noise Eliminator, science products, Hofheim). Anschließend wurde das Signal durch einen analog/digital-Wandler (Mini-Digi 1B, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) konvertiert und an einen Computer mit der Aufnahmesoftware pCLAMP 10 (pCLAMP 10 Electrophysiology Data Acquisition and Analysis Software Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) weitergeleitet.

Während der Messungen wurden die Versuchstiere einzeln in ihren Heimkäfigen gehalten. Diese wurden auf einem schwingungsgedämpften Tisch im Innenraum eines Faraday'schen Käfigs platziert, welcher aus einem zu fünf Seiten geschlossenem Quader aus Metall, sowie einer aufschiebbarer Doppeltür aus demselben Material an der Vorderseite bestand.

Die Innenseite des Käfigs war mit Noppen-Schaumstoffmatten ausgekleidet, um auch akustisch einen möglichst isolierten Bereich zu schaffen.



**Abb. 8:** Schaltskizze des elektrophysiologischen Setups

Mittels einer Hippokampus-Elektrode wird das Signal über eine Miniheadstage an einen Operationsverstärker weitergeleitet. Dieser verstärkt das Signal zweihundertfach und filtert es in einem Bereich von 3-500 Hz Bandpass. Außerdem wird im Bereich des Netzausbaus (50 Hz) eine Rauschminimierung durchgeführt (Noise-Eliminator). Anschließend wird das Signal durch einen analog/digital-Wandler konvertiert und an einen Computer weitergeleitet.

Die Experimente wurden nach einem festen Zeitplan in Bezug auf die Injektion der T-Lymphozyten durchgeführt.

An zwei aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar vor der Injektion wurden lokale Feldpotentiale aufgenommen, um eine Baseline der neuronalen Aktivität zu registrieren.

Die weiteren Aufnahmen fanden am ersten, zweiten, dritten, siebten zehnten und 14. Tag nach der Lymphozyteninjektion statt.

Jede Aufnahme dauerte 30 Minuten in denen sich die Versuchstiere frei in ihren Heimkäfigen bewegen konnten. Durch den Versuchsaufbau wurde eine dunkle und geräuscharme Umgebung geschaffen.

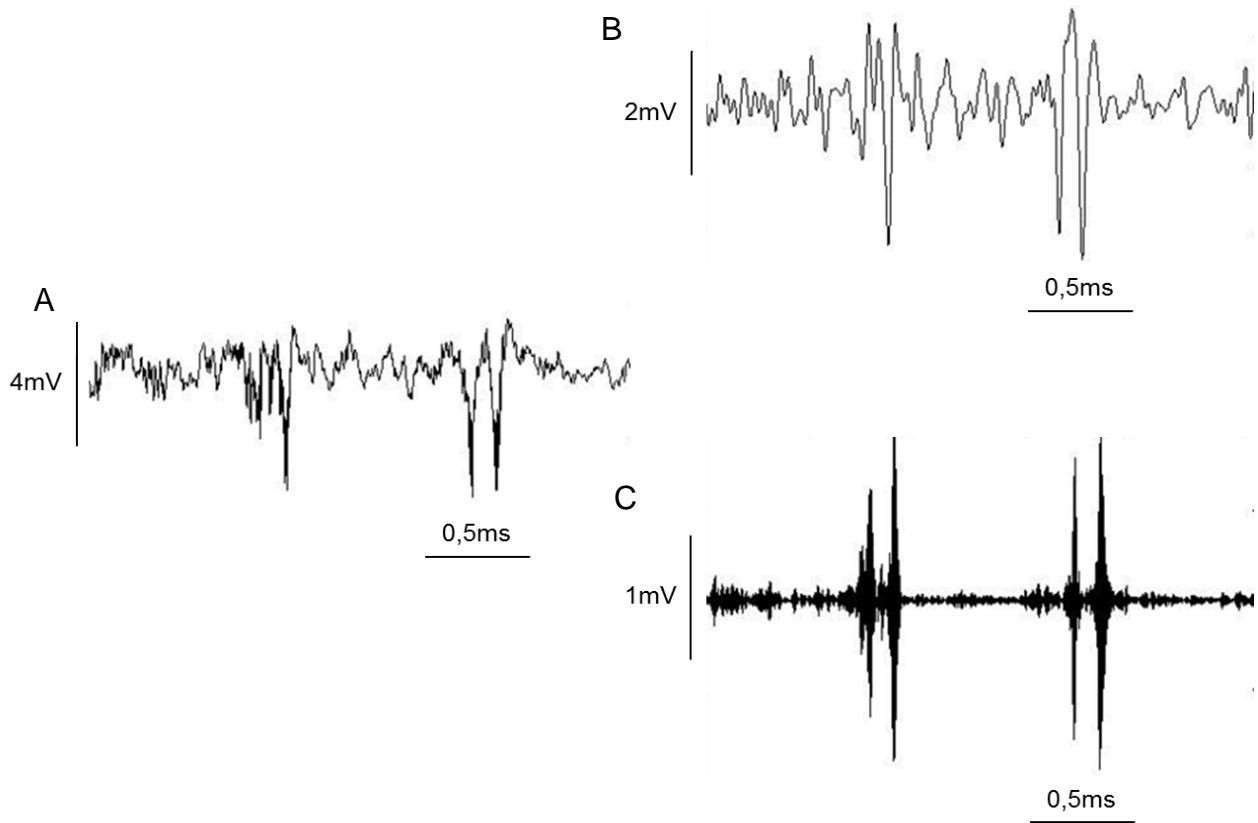
### 3.1.5 Elektrophysiologische Datenanalyse

Die elektrophysiologischen Daten wurden mit pCLAMP 10-Software aufgenommen und mit Matlab R2014b-Software, sowie Prism 6-Software analysiert. Zur Analyse der Theta- und Gamma-Frequenzbänder wurden Frequenzbereiche von 5-12 Hz bzw. 30-80 Hz definiert und die Stärke des jeweiligen Frequenzbandes aus den Mittelwerten der entsprechenden Amplituden errechnet. Die Maximalwerte der Amplituden wurden als „Peak“ des Frequenzbandes festgelegt, außerdem wurde analysiert, bei welcher Frequenz dieser Peak stattfand.

Zur Analyse von Sharp Waves (SWS) wurden die LFP-Signale in einem Frequenzbereich von 5-30 Hz Bandpass gefiltert. Als Sharp-Wave-Komplexe wurden Oszillationen definiert, deren Amplituden über der dreifachen Standardabweichung des LFP-Signals lagen, sowie eine Dauer von 10 ms überschritten.

Zur Analyse von Ripple-Oszillationen wurden die LFP-Signale in einem Frequenzbereich von 140-210 Hz Bandpass gefiltert. Als Ripple Komplexe wurden Oszillationen definiert, deren Amplituden über der zweifachen Standardabweichung des LFP-Signals lagen sowie eine Dauer von 40 ms überschritten.

Als Sharp-Wave-Ripple-Komplexe wurden diejenigen Abschnitte definiert, an denen Sharp-Wave- sowie Ripple-Komplexe gleichzeitig auftraten.



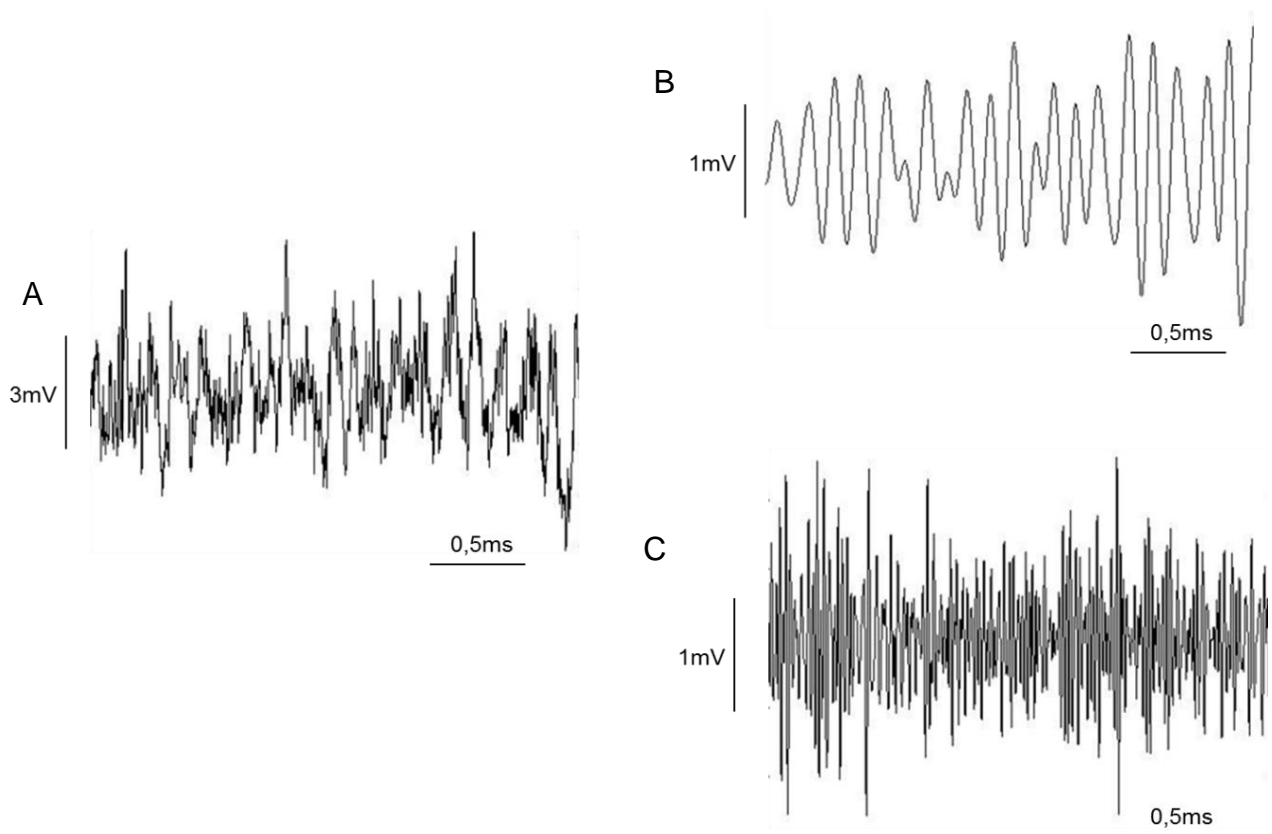
**Abb. 9:** Exemplarische Darstellung der Anteile von SWR

**A)** ungefiltertes LFP-Signal. 2,5 Sekunden langer Ausschnitt aus einer LFP-Aufnahme.

**B)** SWS. 5-30 Hz Bandpass gefiltertes Signal aus der LFP-Aufnahme von A). Es sind drei SWS mit relativ großen Amplituden zu erkennen.

**C)** Ripple-Oszillationen. 140-210 Hz Bandpass gefiltertes Signal aus der LFP Aufnahme von A). Es sind vier Ripple-Oszillationen von großer Amplitude in Assoziation mit den SWS aus B) zu erkennen.





**Abb. 10:** Exemplarische Darstellung des Theta- und Gamma-Frequenzbandes  
**A)** Ungefilterter LFP-Signal. 2,5 Sekunden langer Ausschnitt aus einer LFP-Aufnahme  
**B)** Theta-Frequenzband (5-12 Hz) Bandpass gefiltert aus dem LFP-Signal aus A)  
**C)** Gamma-Frequenzband (30-80 Hz) Bandpass gefiltert aus dem LFP-Signal aus A).

### 3.1.6.1 Implantation der kranialen Hippokampus-Fenster

Um  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging des Hippokampus wacher Versuchstiere durchzuführen, wurde ein Hippokampus-Fenster chirurgisch über der rechten dorsalen Hippokampus-Region implantiert.

Die Versuchstiere erhielten ca. 30 min präoperativ zur Analgesie 5 mg/kg KM Carprofen, s. c., und Buprenorphin (0,05 mg/kg KM s.c, verdünnt in A. ad inject., Volumen: 100  $\mu\text{l}$ /20 g Maus), sowie Dexamethason (0,2 mg/kg s.c., verdünnt in A. ad inject., Volumen: 200  $\mu\text{l}$ /20 g Maus). Zusätzlich wurde intraoperativ eine Xylazin/Ketamin-Narkose (16 mg/kg KM Xylazin und 100 mg/kg KM Ketamin i.p., verdünnt mit A. ad inj., Volumen: 100  $\mu\text{l}$ /20 g Maus) durchgeführt. In tiefer Anästhesie wurden die Tiere in einen Rahmen eingespannt, welcher den Kopf fixierte und auf eine sich selbst regulierende Wärmeplatte gelegt.

Nach Eröffnung der Kopfhaut und Entfernung des Periosts wurde ein rundes (ca. 3 mm im Durchmesser großes) Stück des Schädels über der Region des Hippocampus vorsichtig mittels eines scharfen Bohrers entfernt und die Dura mit einer spitzen Pinzette eröffnet. Der Kortex wurde mit einer schwachen Vakuum-Pumpe abgesaugt, bis die Capsula externa sichtbar wurde. Blut und aufgewirbeltes Gewebe wurden durch einen konstanten Fluss von artifiziellem *Liquor cerebrospinalis* (ACSF) aus dem Operationsfeld gespült. Das Hippokampusfenster wurde mithilfe eines Mikromanipulators eingesetzt. Während des Absaugens das restliche ACSF wurde das Fenster vorsichtig auf die *Capsula externa* abgesenkt. Durch leichten Druck auf das Fenster wurde dessen Kontakt zur *Capsula externa* gefestigt. Das Hippokampusfenster wurde mit Zahnacryl befestigt und im Gebiet der Kraniotomie versiegelt. Zusätzlich wurde eine kleine Metallstange zur Kopffixation paramedian auf dem Schädel implantiert und ebenfalls mit Zahnacryl befestigt.

Postoperativ erhielten die Tiere Ketoprofen 1x tägl. und Buprenorphin 2 x tägl. in oben genannter Dosierung über drei Tage. In den folgenden zwei Wochen wurden die Mäuse zur Regeneration einzeln in ihren Heimkäfigen gehalten.

### 3.1.6.2 Hippokampusfenster-Aufbau

Die Hippokampusfenster bestanden aus einer 1,5 mm langen Edelstahlkanüle mit einem Außendurchmesser von 3 mm, einem dazu passenden runden Deckgläschen und einer flachen Scheibe zu Befestigung am Manipulator. Das Deckgläschen und die Scheibe wurden mit UV-härtbarem Klebstoff auf die gegenüberliegenden Seiten der Kanüle geklebt.

### 3.1.7 Zwei-Photonen-Mikroskopie

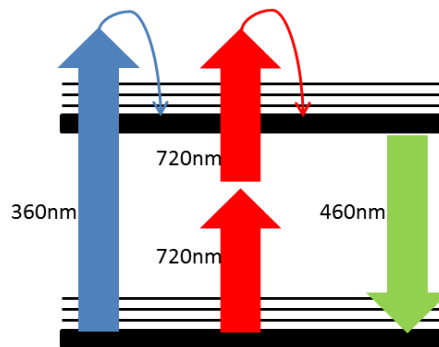
Zwei-Photonen-Mikroskopie ermöglicht es, biochemische Prozesse auf zellulärer Ebene in lebenden Organismen zu beobachten. Die Methode wurde zuerst von Denk et al. (1990) beschrieben.

#### 3.1.7.1 Physikalische Grundlagen der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Zwei-Photonen-Mikroskopie basiert auf der Absorption zweier Photonen, deren kombinierte Energie Elektronen eines Moleküls in einen angeregten Zustand versetzt.

Diese Anregung tritt auf, wenn die Energie der absorbierten Photonen dem Energieniveau zwischen Grund- und Anregungszustand der Elektronen entspricht.

Quantenmechanisch regt ein einzelnes Photon die Elektronen auf ein virtuelles Zwischenniveau an. Durch das zweite Photon werden die Elektronen auf das Niveau ihres Anregungszustandes gehoben. Hierzu müssen die beiden Photonen extrem zeitnah aufeinander (im Bereich einer halben Femtosekunde (fs) =  $0,5 \times 10^{-15}$  s) folgen, da es kein stabiles Zwischenniveau gibt. Das Prinzip dieses Absorptionsvorgangs lässt sich mittels eines Perrin-Jablonski-Diagramms schematisieren (Helmchen und Denk, 2005):



**Abb. 11:** Vereinfachtes Perrin-Jablonski-Schema für 1-, und 2-Photonen-Anregung. Sobald der angeregte Zustand erreicht wurde, ist die nachfolgende Fluoreszenz-emission dieselbe für beide Anregungsmodalitäten.

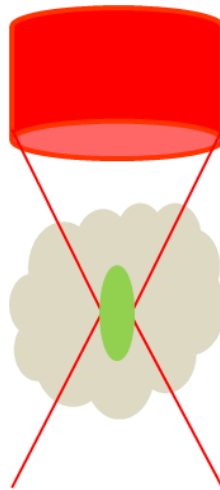
Aus der Abbildung wird erkenntlich, dass der angeregte Zustand entweder durch ein einzelnes hochenergetisches Photon oder zwei weniger energiereiche Photonen erzeugt werden kann. Bei der Relaxation der Elektronen in ihren Grundzustand kommt es zur Emission von Licht, was man als Lumineszenz bezeichnet (Diaspro et al., 2006).

Das Prinzip der Zwei-Photonen-Anregung wurde zuerst von Göppert-Mayer (1931) beschrieben.

Durch dieses Prinzip lässt sich die zur Anregung benötigte Energie, für die ultraviolette Strahlung nötig wäre, durch weniger energiereiche Infrarotstrahlung erreichen, ohne die Nachteile ultravioletter Strahlung (z.B. Polymerisation oder Temperatureffekte) in Kauf nehmen zu müssen. Da infrarotes Licht weniger gestreut und absorbiert wird (relativ zu ultraviolettem oder sichtbarem Licht), dringt die Strahlung tief in Gewebe ein, was die Darstellung von dort befindlichen Strukturen (in bis zu 1000  $\mu\text{m}$  Tiefe) ermöglicht.

Da, wie bereits beschrieben, zur Erzeugung des Zwei-Photonen-Effektes ein nahezu gleichzeitiges Eintreffen zweier Photonen nötig ist, kann Fluoreszenzanregung nur im Bereich extrem hoher Photonendichte erzeugt werden. Bereiche, die ober- oder unterhalb dieses Fokuspunktes liegen, werden nur schwach angeregt.

Daraus ergeben sich weitere Vorteile für die Anwendung von Zwei-Photonen-Mikroskopie in vivo: Die Phototoxizität sowie das Ausbleichen der Fluorophoren sind auf den Bereich des Fokuspunktes beschränkt. Des Weiteren kann die komplette entstehende Fluoreszenz zur Bilderzeugung genutzt werden, ohne die Emission aus anderen Ebenen subtrahieren zu müssen. (So et al., 2000)



**Abb. 12:** Fokuspunkt des Zwei-Photonen-Strahlengangs  
Durch infrarotes Licht wird in einem sehr kleinen Bereich grüne Fluoreszenz erzeugt. Das umgebende Gewebe wird nicht angeregt.

### 3.1.7.2 Aufbau und Funktionsweise des Mikroskops

Die Menge der pro Fluorophore aufgenommenen Photonen, welche die angesprochene Photonendichte ausmacht, lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$n_a \approx \frac{p_0^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left( \frac{(NA)^2}{2hc\lambda} \right)^2$$

**Abb. 13:**  $n_a$  = Photonen, die pro Laserpuls pro Fluorophore absorbiert werden,  $\tau_p$  = Dauer des Laserpulses,  $\delta$  = Zwei-Photonen-Absorption der Fluorophore bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $p_0$  = durchschnittliche Laserintensität,  $f_p$  = Wiederholungsrate des Lasers, NA = Numerische Apparatur des Objektivs,  $h$  = Planck'sche Konstante,  $c$  = Lichtgeschwindigkeit (aus So et al., 2000)

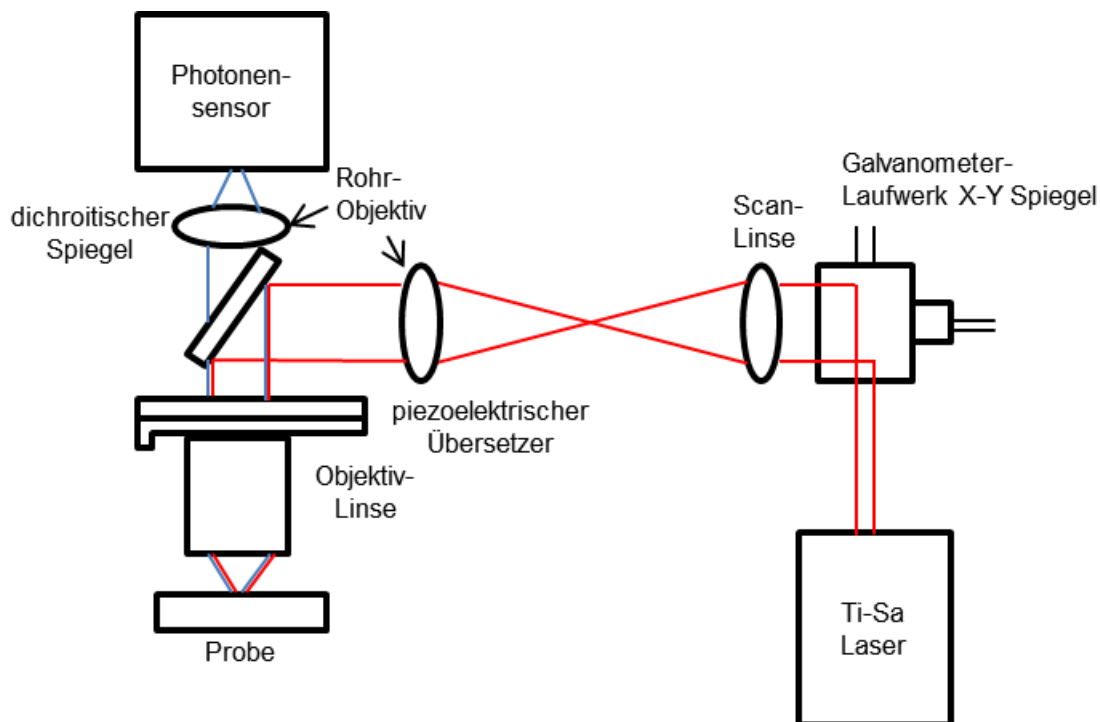
Durch einige Besonderheiten im Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskops lässt sich eine sehr hohe Photonendichte erzeugen.

Grundlegend besteht ein Zwei-Photonen-Mikroskop aus drei Hauptkomponenten: einer Anregungslichtquelle, einem Fluoreszenzmikroskop und einem hochsensitivem Detektionssystem.

Als Lichtquelle dient ein auf einem Titan-Saphire-System basierender Laser.

Dieses System ist in der Lage, Laserimpulse mit 100 fs Impulsfolge und einer Wiederholungsrate von 80 MHz zu erzeugen. Die Bandbreite der Wellenlänge des Anregungslichts beträgt 700-1000 nm.

Aus oben genannter Gleichung wird ersichtlich, dass bei gleicher durchschnittlicher Laserintensität und Wiederholungsrate die Photonendichte höher wird, je größer die numerische Apparatur und je geringer die Impulsfolge des Lasers ist. Um diese Möglichkeit zu nutzen, wird eine Impulsfolge von 100 fs ( $10^{-13}$  Sekunden) und eine numerischen Apparatur von 0,8 (16x-Objektiv) verwendet.



**Abb. 14:** Schemazeichnung eines Zwei-Photonen-Mikroskops.

Der Gang des Anregungslichtes ist in Rot, der des emittierten Lichts in Blau dargestellt.

Zum Generieren von Bildern wird das Objekt rasterförmig abgetastet. Dazu wird der Strahlengang des Lasers im Zwei-Photonen-Mikroskop durch einen Galvoscanner, einem von einem Galvanometerantrieb bewegtem Spiegel, justiert.

Die im Objekt entstehende Fluoreszenz wird vom Objektiv aufgefangen. Da diese eine andere Wellenlänge, als das zur Anregung genutzte Licht aufweist, lassen sich die unterschiedlichen Lichtarten mittels eines dichroitischen Spiegels auftrennen. Auf diese Weise wird nur das vom Objekt emittierte Licht an ein Photonendetektorsystem, in Form eines Photonenmultipliers, weitergeleitet. (So et al., 2000)

### 3.1.7.3 Zwei-Photonen-System

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde mit einem TrimScope II resonant scanning Mikroskop der Firma LaVision BioTec (Bielefeld) durchgeführt, das mit einem Ti:sapphire Anregungslaser (Chameleon Ultra II, Coherent, Santa Clara, Kalifornien USA) und einem 16x Objektiv (N16XLWD-PF, Nikon, Düsseldorf) ausgestattet war.

Der Laser wurde für grüne GCaMP5 Fluoreszenzanregung auf eine Wellenlänge von 920 nm justiert. GCaMP5s Fluoreszenz-Emission wurde mit einem optischen Bandpassfilter isoliert (542/50, Semrock, Rochester, New York USA) und mit einem GaAsP Photo-Multiplier (H7422-40, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee) detektiert.

Zur Mikroskopsteuerung und Bildakquisition wurde die Inspector software (LaVision BioTec) verwendet.

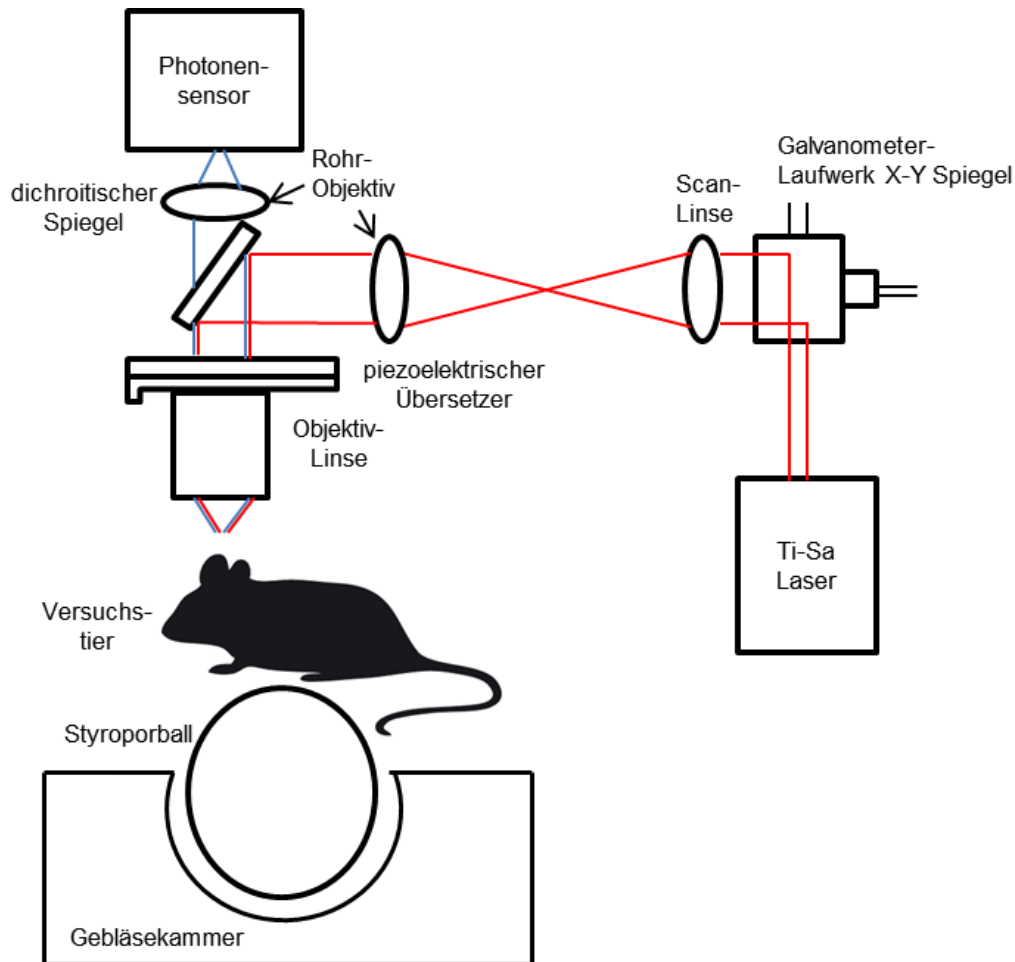
Es wurden Bildserien von 2695 Bildern pro Aufnahme mit einer Frequenz von 15,4 ms/Bild mit 1024×1024 Pixeln (~500×500 µm) Sichtfeld aufgenommen.

### 3.1.7.4 In-vivo Zwei-Photonen-Ca<sup>2+</sup>-Imaging

Die Versuchstiere wurden auf einen Styroporball gesetzt, der von einer Gebläsekammer in einem Schwebezustand gehalten wurde. Dadurch war der Ball frei beweglich und das Versuchstier konnte auf ihm laufen.

Mit der auf den Schädel geklebten Metallstange wurden die Versuchstiere an einer Haltevorrichtung fixiert, welche eine konstante Position während des Experiments gewährleistete. Auf diese Weise waren die Versuchstiere zwar fest eingespannt, jedoch in der

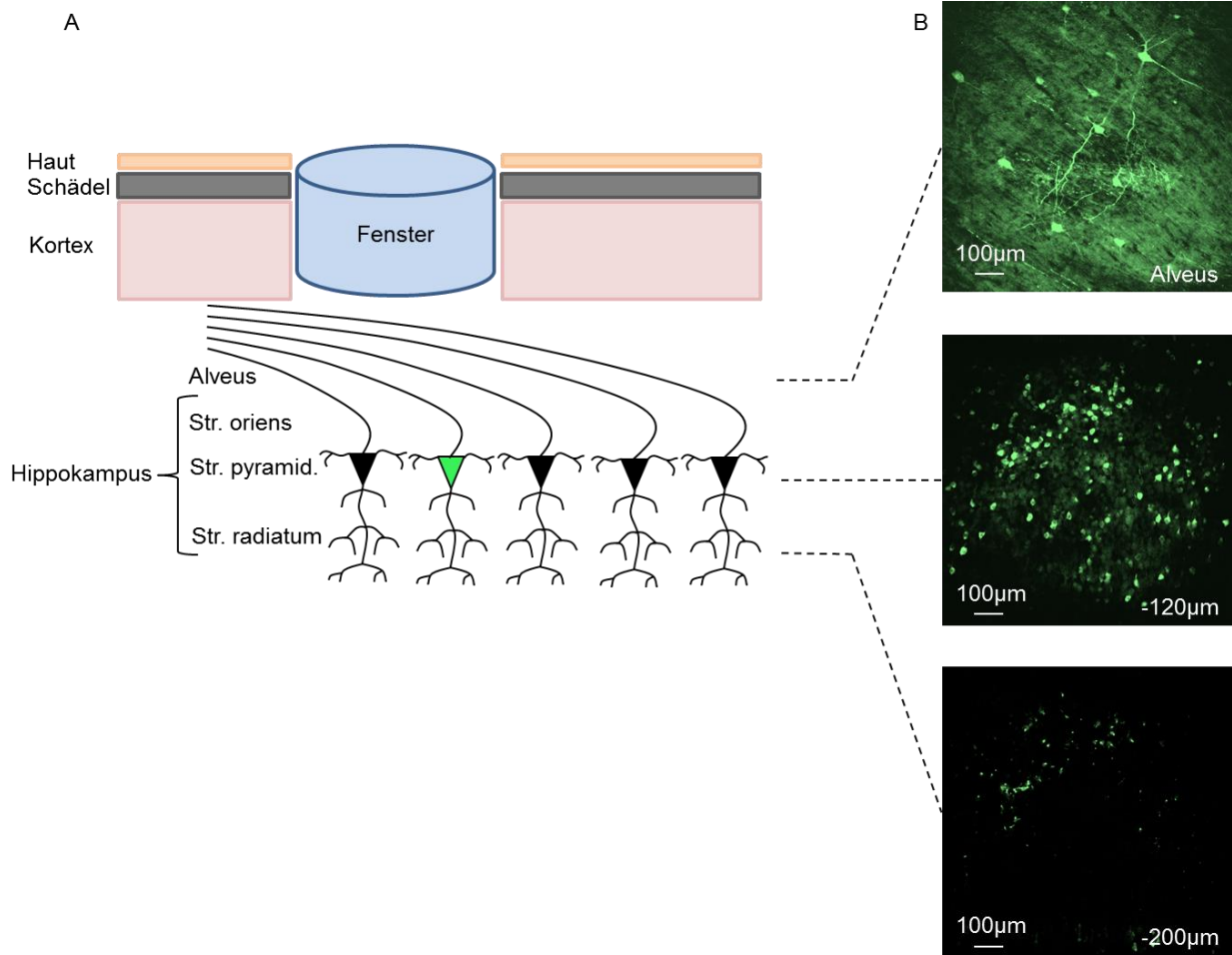
Lage, ihre Körper zu bewegen. Der Kopf der Tiere wurde so unter dem Objektiv positioniert, dass es möglich war, durch das implantierte Hippokampus-Fenster hindurch zu mikroskopieren.



**Abb. 15:** Schemazeichnung des Versuchsaufbaus.

Die Versuchstiere wurden auf einem in Schweben gehaltenen Ball positioniert, sodass sie sich frei bewegen konnten. Mit dem Kopf wurden sie an einer speziellen Haltevorrichtung am Mikroskop befestigt.





**Abb. 16:** Detailschema des Versuchsaufbaus

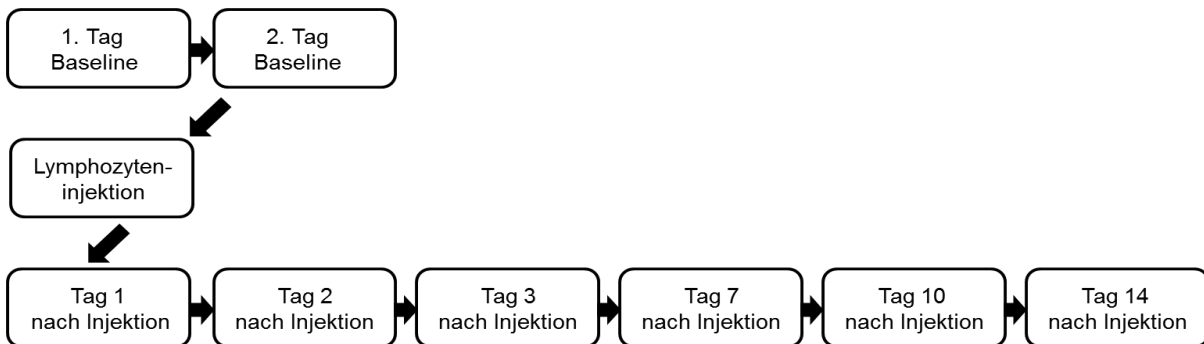
**A)** Detailschema des Hippokampusfensters: Nach Eröffnung von Haut und Schädel und Entfernung eines Teils der Kortex, wurde oberhalb des Alveus das Hippokampusfenster eingesetzt. Auf diese Weise konnte mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie die CA-Region untersucht werden. Man beachte die exemplarisch Darstellung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Transients.

**B)** In vivo Zwei-Photonen-Imaging durch ein Hippokampusfenster. Im Alveus verlaufen die Axone der Pyramidenzellen, von dort ausgehend 120 µm nach kaudal sind die Somata der Pyramidenzellschicht, weitere 80 µm kaudal einige Dendriten in der molekularen Schicht des CA1 dargestellt.

Die Experimente wurden nach einem festen Zeitplan in Bezug auf die Injektion der T-Lymphozyten durchgeführt.

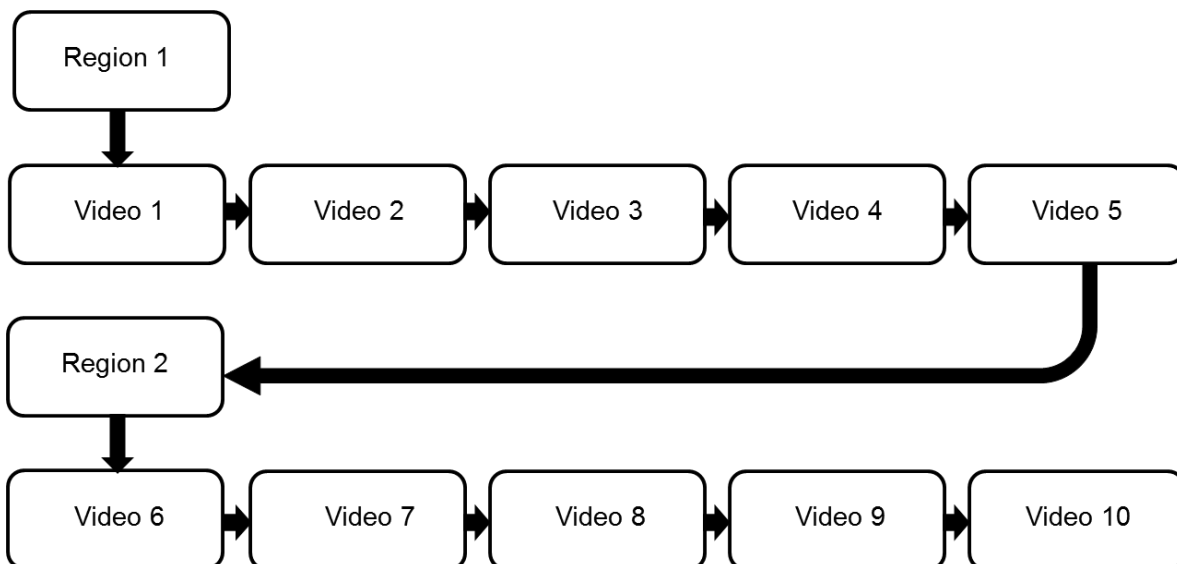
An zwei aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar vor der Injektion wurde eine Baseline der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität registriert.

Die weiteren Imagingssessions fanden am ersten, zweiten, dritten, siebten, zehnten und 14. Tag nach der Lymphozyteninjektion statt.



**Abb. 17:** Versuchsablauf  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging

Pro Maus wurden fünf Bildserien von 90 Sekunden Dauer aus jeweils zwei unterschiedlichen Regionen aufgenommen. In jeder Imagingssession wurde darauf geachtet, möglichst genau die gleichen Regionen aufzufinden.



**Abb. 18:** Schema  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingssession

### 3.1.8 Ca<sup>2+</sup>-Imaging Datenanalyse

Die Daten des Calcium-Imagings wurden mit Inspector-Software aufgenommen und mit matlab R2014b, Fiji, IMARIS sowie Prism 6 analysiert.

Die Bildserien wurden mit benutzerdefinierten matlab-Algorithmen bearbeitet. Nachdem die verschiedenen Bildserien zusammengeschnitten wurden, wurden sie von Bewegungsartefakten korrigiert (Guizar-Sicairos et al., 2008). Nach einem weiteren Algorithmus wurden Zellsomata detektiert (Mukamel et al., 2009). Die so gefundenen Regionen, in denen sich Fluoreszenzänderungen zeigten, wurden als dasselbe Neuron behandelt, insofern sie weniger als 10 Pixel voneinander entfernt lagen und ihre Fluoreszenz-Spuren zu mindestens 75 % miteinander korrelierten. Als Calciumtransienten wurden Ereignisse definiert, deren  $\Delta F/F$  des Fluoreszenzsignals um mindestens 5 % innerhalb von 200 ms anstiegen sowie eine Amplitude von mindestens 8 % und eine Halbwertszeit von mindestens 500 ms aufwiesen.

Zur Datenanalyse der Ca<sup>2+</sup>-Wellen wurden die Bildserien zunächst mit Fiji einem Gauschen-Filters unterzogen, welcher alle Werte, die mindestens 50 % heller waren als der Hintergrund, einschloss. Diese so gefilterte Spur wurde mit der IMARIS-Software als Oberfläche definiert und mit einem benutzerdefinierten Algorithmus zur Oberflächendetektion untersucht. Als weitere Eigenschaften zur Definition einer Ca<sup>2+</sup>-Welle wurde eine Ausbreitungsfläche von mindestens 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser sowie einer Mindestdauer von zwei Sekunden festgelegt.



### 3.2 Material

**Tab. 4:** Material stereotaktische Injektionen

Produktname	Hersteller
Injektionssystem UltraMicroPump (four) with SYS-Micro4 Controller (UMP3-4)	World Precision Instruments, Berlin
Spritze SGE 10µL 26 ga (SGE010RNS)	World Precision Instruments, Berlin
Kanüle 26G Replacement needle for syringe (SGE010RN(S))	World Precision Instruments, Berlin
Kanüle 34G beveled NanoFil needle (NF34BV-2)	Luigs&Neumann, Ratingen
Stereotaktische Manipulatoren Junior 4 axen InVivo Unit	Luigs&Neumann, Ratingen
Steuerungsdisplay Remote control SM7 / Keypad SM7	Luigs&Neumann, Ratingen
Control box SM7	Luigs&Neumann, Ratingen
M80 Stereomikroskop	Leica, Wetzlar
Kaltlichtquelle KI 1500 L (C-KL1500)	Schott, Mainz
Bohrer Ideal Micro-Drill™	World Precision Instruments, Berlin
Hot Bead Sterilizer (18000-45)	Fine Science Instruments, Heidelberg
Self regulating heating pad (21061-90)	Fine Science Instruments, Heidelberg
Head Holding Adaptor for Mice (MA-6N)	Narishige, Tokio, Japan

**Tab.5:** Viren

Produktname	Hersteller
AAV1.hSyn.GCaMP5G(GCaMP-T302L.R303P.D380Y).WPRE.SV40	Penn Vector Core, Philadelphia, Pennsylvania, USA
AAV-Syn-OVA-IRES-Venus	AG Schoch, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn

**Tab.6:** Material Elektrophysiologie

Produktname	Hersteller
EXT-02F/2 Extrazellular-Verstärker	npi electronic, Tamm
Mini-Digi 1B	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
Axon Digidata 1449A Data Acquisition System	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
MS 303/3-AIU/Spc Elektroden	Plastics one, Roanoke, Virginia, USA
Bipolare Kabel für Plastics one 303 Elektroden	npi electronic, Tamm
EXT Miniheadstage	npi electronic, Tamm
pCLAMP 10 Electrophysiology Data Acquisition and Analysis Software	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
63-Series 900x120 Schwingungsisolierter Tisch	TMC, Peabody, Massachusetts, USA
Farady'scher Käfig Typ II	TMC, Peabody, Massachusetts, USA
Mini-Messkopfflatine mit Beschleunigungssensor	npi electronic, Tamm
"Hum Bug" Noise Eliminator	science products, Hofheim

**Tab.7:** Operationsmaterialien

Produktname	Hersteller
Ideal micro drill	World Precision Instruments, Berlin
UV-härtbarer Klebstoff NOA81	Thorlabs, Dachau/München
Cyano-Veneer fast	Heinrich Schein Dental Depot, München
Stereotaktische Manipulatoren Junior 4 axen InVivo Unit	Luigs&Neumann, Ratingen
Steuerungsdisplay Remote control SM7 / Keypad SM7	Luigs&Neumann, Ratingen
Control box SM7	Luigs&Neumann, Ratingen
Pinzette Jewelers #5 Forceps	World Precision Instruments, Berlin

**Tab. 8:** Material Zwei-Photonen-Mikroskopie, Calcium-Imaging

Produktname	Hersteller
TriM Scope II 2-Photon Microscopy	LaVision Biotec, Bielefeld
Ti:sapphire excitation laser, Chameleon Ultra II	Coherent, Santa Clara, Kalifornien, USA
16x Objective N16XLWD-PF	Nikon, Düsseldorf
band-pass filter 542/50	Semrock, Rochester, USA
GaAsP PMT (H7422-40)	Hamamatsu. Herrsching am Ammersee
Inspector software (LaVision BioTec)	LaVision Biotec, Bielefeld

**Tab. 9:** OT-Zellen

Produktname	Hersteller
Ovalbuminspezifische CD8+ (OT-I) Zellen	Institut für Experimentelle Immunologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Ovalbuminspezifische CD4+ (OT-II) Zellen	Institut für Experimentelle Immunologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

**Tab. 10** Medikamente

Produktname	Hersteller
Ketamin 10%, Ketaminhydrochlorid	WDT, Garbsen
Rompun 2%, Xylazinhydrochlorid	Bayer, Leverkusen
Buprenovent®, Buprenorphinhydrochlorid	Reckitt Benckiser Healthcare, Berkshire, United Kingdom
Ketoprofen, Gabrilen	Bayer, Leverkusen
Carprofen, Rimady	Bayer, Leverkusen
Dexamethason	Bayer, Leverkusen

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen

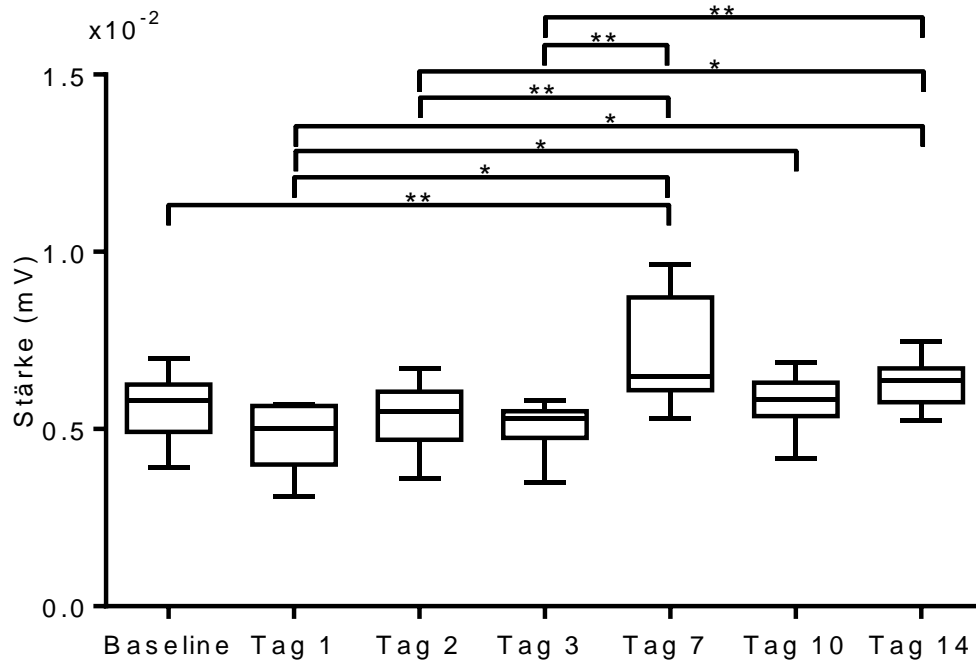
Die elektrophysiologischen Messungen dienten dem Vergleich zwischen vor der Lymphozyteninjektion aufgenommenen Baseline-Werten und möglichen Veränderungen infolge der Lymphozyteninjektion. Es wurden verschiedene Parameter ausgewertet, um festzustellen, ob und in welcher Art die so ausgelöste Entzündungsreaktion zu Veränderungen des neuronalen Netzwerks führt. Von allen Versuchstieren wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur Aufnahme einer Baseline lokale Feldpotentiale der Hippokampusregion abgeleitet. Am dritten Tag wurde eine Mischung von T-Lymphozyten in die Hippokampusregion der Tiere injiziert und in der Folge am ersten, zweiten, dritten, siebten, zehnten und 14. Tag nach der Injektion für jeweils 30 Minuten Messungen durchgeführt.

#### 4.1.1 Anstieg der mittleren Theta-Stärke eine Woche nach der Lymphozyteninjektion

Das Theta-Frequenzband wurde auf verschiedene Parameter hin untersucht. Zum einen wurde ausgewertet, ob sich die mittlere Stärke des Theta-Bandes im Rahmen der Entzündungsreaktion veränderte. In den ersten drei Tagen nach Injektion der Lymphozyten blieben die Werte konstant auf dem Niveau der Baseline (Baseline 0,56 mV, Tag 1 0,48 mV, Tag 2 0,53 mV, Tag 3 0,51 mV). Am siebten Tag konnte ein Anstieg der mittleren Stärke gegenüber diesem Niveau beobachtet werden (Tag 7 0,73 mV), der bis zum 14. Tag anhielt (Tag 10 0,58 mV, Tag 14 0,63 mV).

Repeated-measurement-one-way-ANOVA  $p = 0,0002$ ,  $n = 9$  Mäuse; Test auf Normalverteilung: Shapiro-Wilk-Normalitätstest; post-hoc-Datenanalyse: Tukeys Multivergleichstest. (siehe Abb. 20).





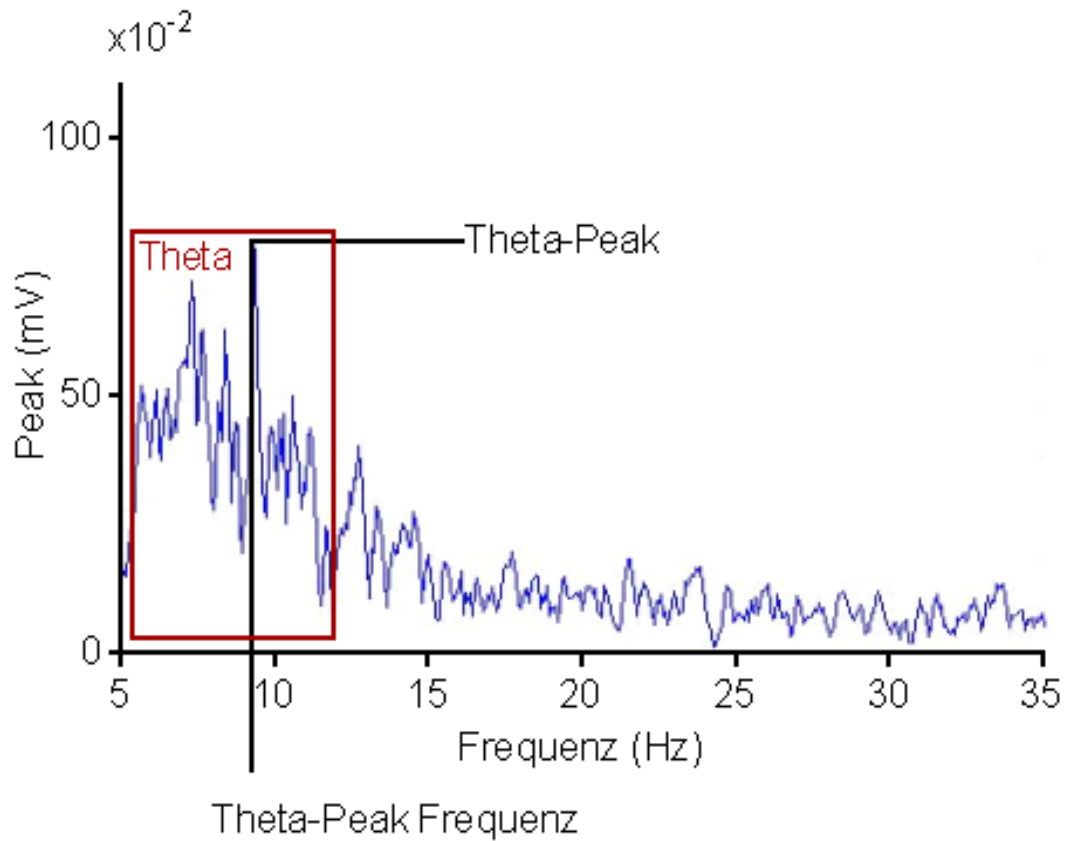
**Abb. 20:** Zeitlicher Verlauf der mittleren Stärke des Theta-Frequenzbandes  
 Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender mittlerer Stärken des Theta-Fre-  
 quenzbandes an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14; n = 9 Mäuse.  
 Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile.  
 Repeated-measurement-one-way-ANOVA  $p = 0,0002$ ; \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

#### 4.1.2 Transiente Abnahme der maximalen Theta-Amplitude bei konstanter Peak-Frequenz infolge der Lymphozyteninjektion

Als weitere Parameter wurden die Maximalwerte der Theta-Amplitude (= Theta-Peak) sowie die Frequenz untersucht, bei welcher die Peaks lagen.

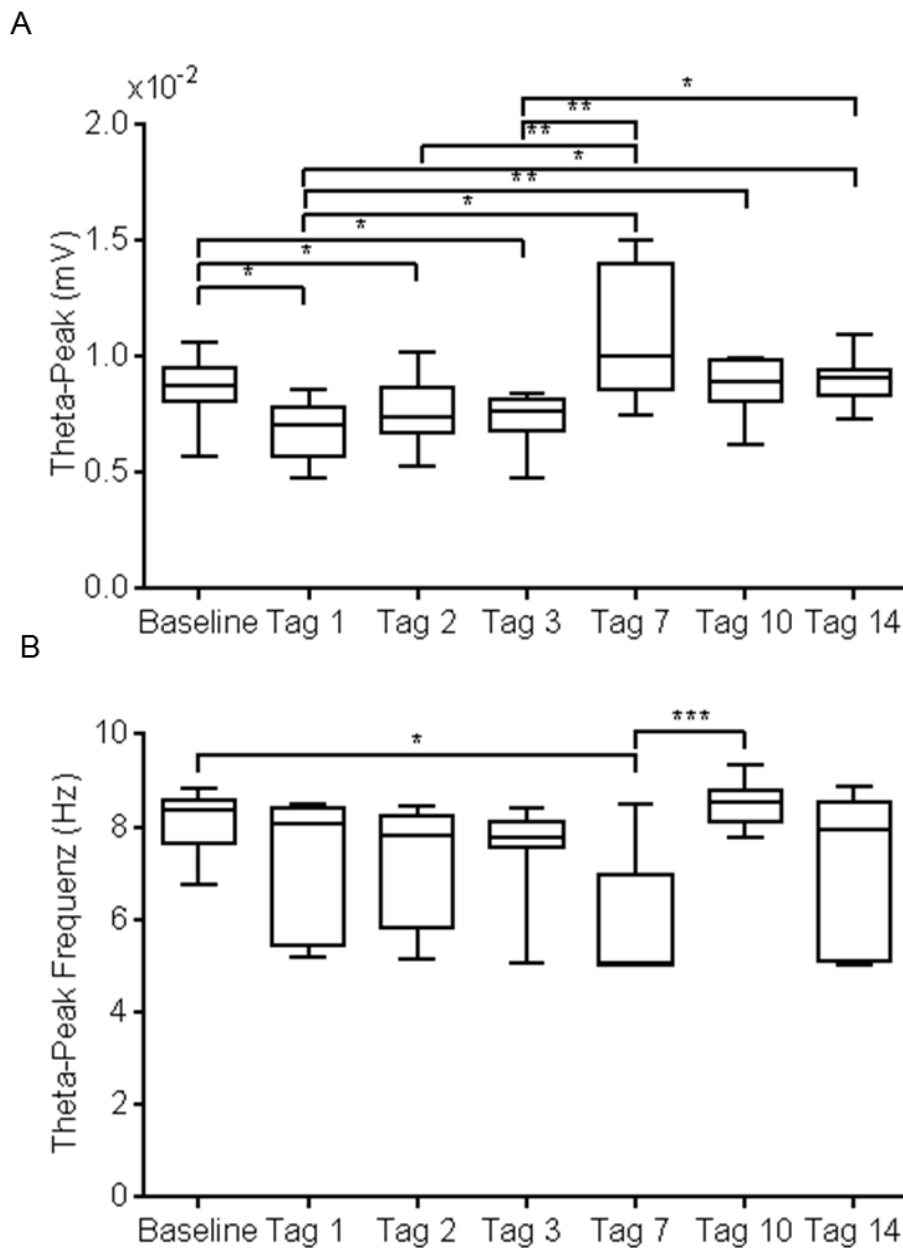
Die Peak-Werte zeigten infolge der Lymphozyteninjektion eine transiente Abnahme in den ersten drei Tagen nach der Injektion (Baseline 0,86 mV, Tag 1 0,68 mV, Tag 2 0,75 mV, Tag 3 0,73 mV). Nach einer Woche, glichen sich die Werte des Theta-Peaks wieder dem Niveau der Baseline an (Tag 7 1,1 mV, Tag 10 0,88 mV, Tag 14 0,9 mV). Repeated-measurement-one way-ANOVA  $p = 0,0012$ ,  $n = 9$  Mäuse (siehe Abb. 22A).

Die Frequenzen der Peak-Werte verhielten sich in den Messungen, mit Ausnahme einer Erniedrigung am siebten Tag, auf einem konstanten Niveau. (Baseline 8,12 Hz, Tag 1 7,03 Hz, Tag 2 7,12 Hz, Tag 3 7,59 Hz, Tag 7 5,87 Hz, Tag 10 8,51 Hz, Tag 14 7,24 Hz). Friedman-Test  $p = 0,0013$ ,  $n = 9$  Mäuse (siehe Abb. 22B).



**Abb. 21:** Peak und Peak-Frequenz des Thetabandes

Auftragung der maximalen Amplitude (mV) des LFP-Signales gegen die Frequenz (Hz) nach Fourieranalyse. Theta-Frequenzband, sowie Maximalwert (Peak) der Theta-Oszillation und entsprechende Frequenz sind im Theta-Frequenzband gekennzeichnet.



**Abb. 22:** Zeitlicher Verlauf des Theta-Peaks und der Theta-Peak Frequenz nach der Lymphozyteninjektion

**A)** Maximalwerte des Theta-Bandes im zeitlichen Verlauf.

Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte des Theta-Peaks an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14; n = 9 Mäuse

**B)** Frequenz der Maximalwerte des Theta-Bandes im zeitlichen Verlauf.

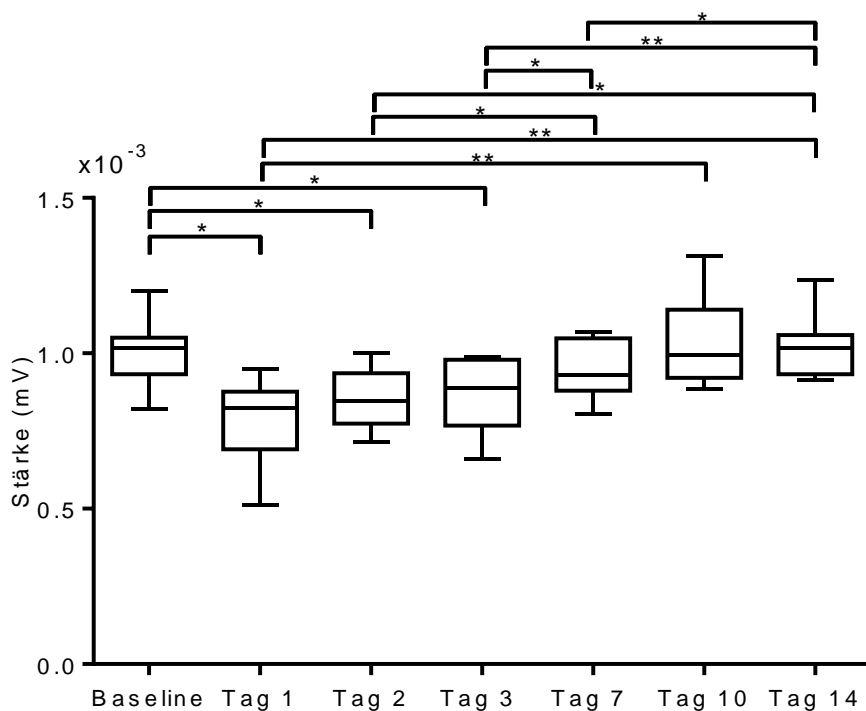
Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Frequenzen des Theta-Peaks an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14; n = 9 Mäuse.

Darstellung: Median, Box 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95.

#### 4.1.3 Transiente Abnahme der Gamma-Stärke infolge der Lymphozyteninjektion

Bei der Untersuchung des Gamma-Frequenzbandes fand sich eine Parallele zwischen dem Verlauf der mittleren Gamma-Stärke und dem Verhalten des Peaks von Theta. Die mittlere Stärke des Gamma-Bandes zeigte ebenso wie der Theta-Peak eine transiente Abnahme in den ersten drei Tagen der Entzündungsreaktion (Baseline 1,0 mV, Tag 1 0,78 mV, Tag 2 0,86 mV, Tag 3 0,87 mV) sowie eine Wiederangleichung diese Werte nach einer Woche an das Niveau der Baseline (Tag 7 0,95 mV, Tag 10 1,03 mV, Tag 14 1,02 mV).

Repeated-measurement-one-way-ANOVA  $p = 0,0006$ ,  $n = 9$  Mäuse; Test auf Normalverteilung: Shapiro-Wilk-Normalitätstest; post-hoc-Datenanalyse: Tukeys Multivergleichstest (siehe Abb. 23).



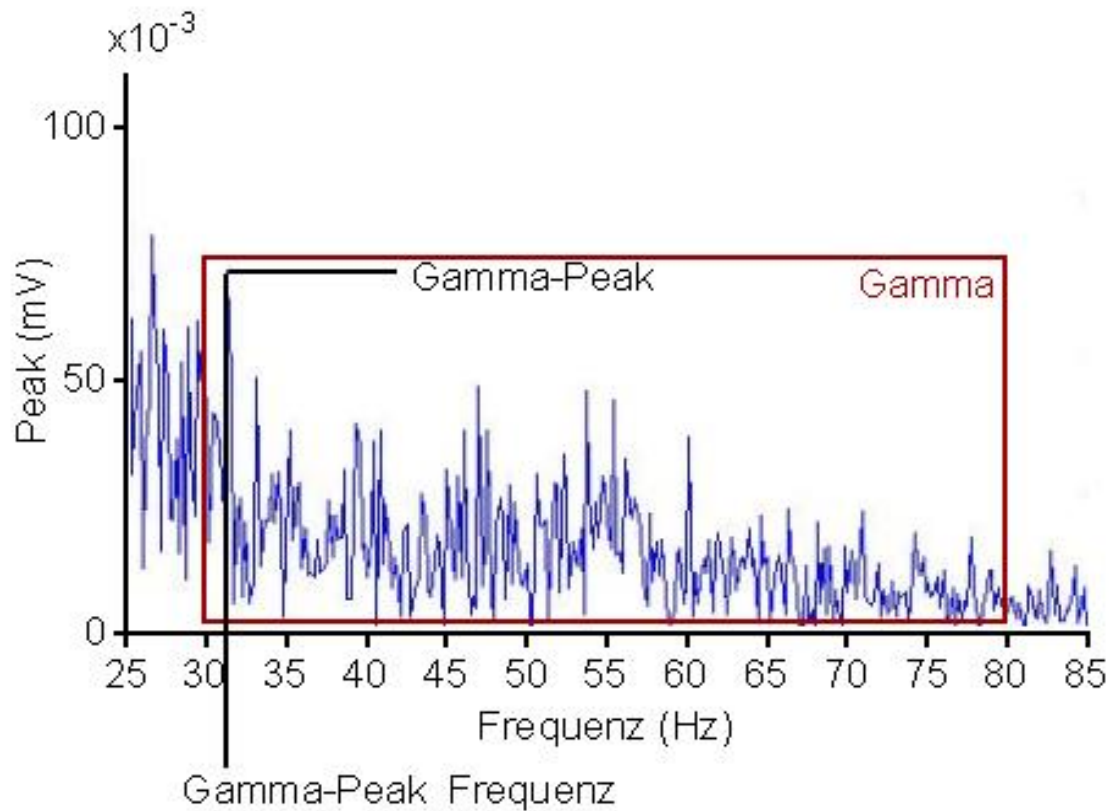
**Abb. 23:** Transiente Abnahme der mittleren Stärke des Gamma-Frequenzbandes infolge der Lymphozyteninjektion  
 Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Frequenzen des Theta-Peaks an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 9$  Mäuse  
 Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile

#### 4.1.4 Transiente Abnahme der maximalen Gamma-Amplitude bei konstanter Peak-Frequenz infolge der Lymphozyteninjektion.

Auch die Werte für den Gamma-Peak verhielten sich ähnlich denen des Theta-Peaks sowie der Gamma-Stärke. Am Folgetag der Lymphozyteninjektion verringerten sich die Werte des Gamma-Peaks (Baseline 1,43 mV, Tag 1 1,26 mV). Die übrigen Werte verhielten sich im Vergleich zur Baseline konstant. Es liegen Schwankungen zwischen den Werten nach der Injektion vor. Das Niveau der Werte für den Gamma-Peak in der zweiten Woche nach der Injektion liegt über dem Niveau der ersten Woche (Tag 2 1,33 mV, Tag 3 1,32 mV, Tag 7 1,49 mV, Tag 10 1,47 mV, Tag 14 1,55 mV) repeated-measurement-ANOVA  $p = <0,0001$ ,  $n = 9$  Mäuse (siehe Abb. 25A).

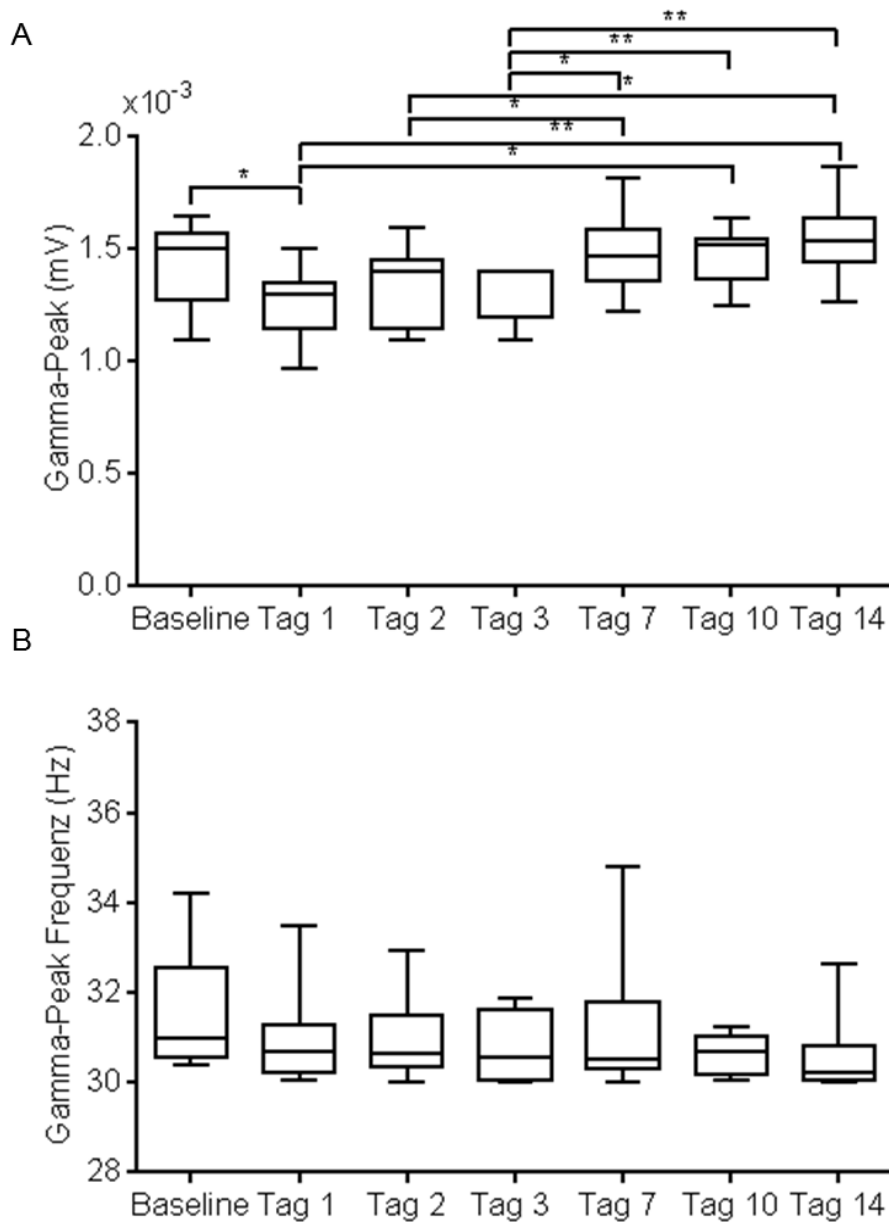
Die Frequenzen der Peak-Werte des Gamma-Bandes verhielten sich konstant auf einem Niveau (Baseline 31,5 Hz, Tag 1 30,96 Hz, Tag 2, 30,94 Hz, Tag 3 30,8 Hz, Tag 7 31,2 Hz, Tag 10 30,63 Hz, Tag 14 30,57 Hz) Friedman-Test  $p = 0,4463$  (n.s.),  $n = 9$  Mäuse (siehe Abb. 25B).

Tests auf Normalverteilung: Shapiro-Wilk-Normalitätstest, post-hoc-Datenanalyse: Dunns Multivergleichstest.



**Abb. 24:** Peak und Peak-Frequenz des Gammabandes

Auftragung der maximalen Amplitude (mV) des LFP-Signales gegen die Frequenz (Hz) nach Fourieranalyse. Gamma-Frequenzband, sowie Maximalwert (Peak) der Gamma-Oszillation und entsprechende Frequenz sind im Gamma-Band gekennzeichnet.



**Abb. 25:** Zeitlicher Verlauf des Peaks und der Peak-Frequenz des Gamma-Bandes nach der Lymphozyteninjektion

**A)** Transiente Abnahme des Gamma-Peaks infolge der Lymphozyteninjektion. Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte des Gamma-Peaks an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14; n = 9 Mäuse.

**B)** Konstanz der Frequenz des Gamma-Peaks.

Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Frequenzen des Gamma-Peaks an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14; n = 9 Mäuse.

Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile.



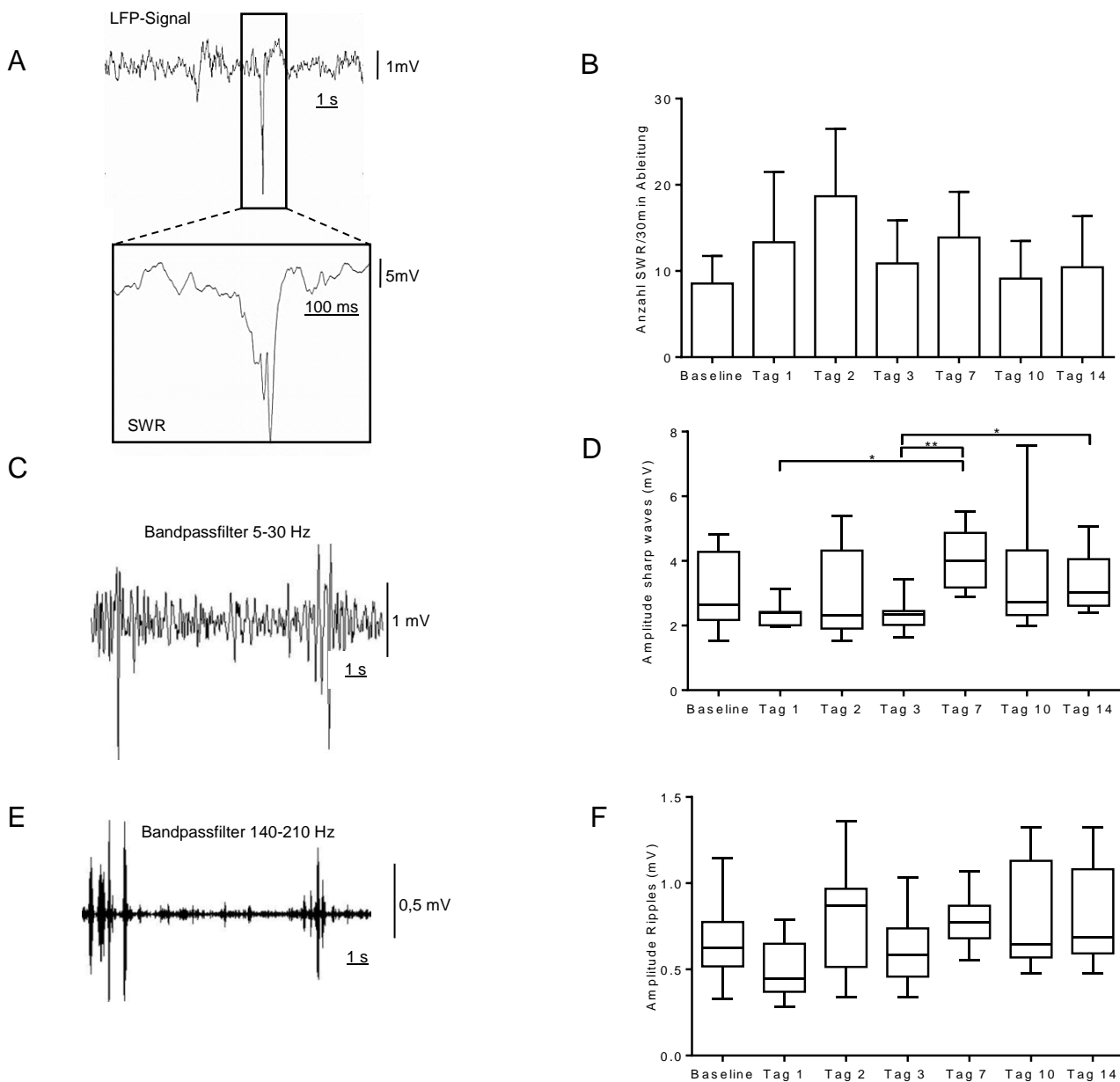
#### 4.1.5 Sharp-Wave-Ripples sind infolge der Lymphozyteninjektion nicht verändert

Die Sharp-Wave-Ripples (SWR) wurden auf ihre Häufigkeit sowie auf die Amplitude der Sharp-Waves (SWS) und der Ripples untersucht.

In den ersten beiden Tagen nach Lymphozyteninjektion traten etwas mehr SWR auf als zu den übrigen Zeitpunkten (Baseline 8,56 SWR/Aufnahme, Tag 1 13,33 SWR/Aufnahme, Tag 2 18,67 SWR/Aufnahme, Tag 3 10,89 SWR/Aufnahme, Tag 7 13,89 SWR/Aufnahme, Tag 10 9,11 SWR/Aufnahme, Tag 14 10,44 SWR/Aufnahme). Repeated-measurement-one-way-ANOVA  $p = 0,0208$ ,  $n = 9$  Mäuse; Test auf Normalverteilung: Shapiro-Wilk-Normalitätstest; post-hoc-Datenanalyse: Tukeys Multivergleichstest (siehe Abb. 26B).

Die Amplituden der Sharp-Wave-Komplexe nehmen in der zweiten Woche gegenüber der ersten Woche der Entzündungsreaktion leicht zu (Baseline 3,09 mV, Tag 1 2,34 mV, Tag 2 2,96 mV, Tag 3 2,31 mV, Tag 7 4,09 mV, Tag 10 3,45 mV, Tag 14 3,33 mV). Repeated-measurement-one-way-ANOVA  $p = 0,966$  (n.s.);  $n = 9$  Mäuse; Test auf Normalverteilung: Shapiro-Wilk-Normalitätstest; post-hoc-Datenanalyse: Tukeys Multivergleichstest (siehe Abb. 26D).

Es finden sich keine Änderungen in den Amplituden der Ripples (Baseline 0,66 mV, Tag 1 0,5 mV, Tag 2 0,79 mV, Tag 3 0,63 mV, Tag 7 0,79 mV, Tag 10 0,79 mV, Tag 14 0,8mV). Repeated measurement one-way ANOVA  $p = 0,0421$  (n.s.);  $n = 9$  Mäuse; Test auf Normalverteilung: Shapiro-Wilk-Normalitätstest; post-hoc-Datenanalyse: Tukeys Multivergleichstest (siehe Abb. 26F).



**Abb. 26:** Anzahl der SWR und Amplituden der SWS und Ripples im zeitlichen Verlauf nach Lymphozyteninjektion

**A)** Beispielhafte Darstellung eines SWR aus einem LFP-Signal heraus vergrößert dargestellt. **B)** Vergleich der Baseline (2 Tage) und der entsprechenden Anzahl von SWR pro LFP-Aufnahme an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 9$  Mäuse. Darstellung: Mittelwerte mit Standardabweichungen **C)** Beispielhafte Darstellung eines im Bereich von 5-30 Hz Bandpass gefilterten LFP-Signales. Es sind SWS zu erkennen. **D)** Vergleich der Baseline (2 Tage) und der entsprechenden Amplituden von SWS der Tage 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 9$  Mäuse. Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile. **E)** Beispielhafte Darstellung eines im Bereich von 140-210 Hz Bandpass gefilterten LFP-Signales. Es sind Ripple-Muster zu erkennen. **F)** Vergleich der Baseline (2 Tage) und der entsprechenden Amplitude der Ripples der Tage 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 9$  Mäuse. Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile

## 4.2 Ergebnisse des Zwei-Photonen $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings

Mittels Zwei-Photonen- $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings sollte untersucht werden, ob sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Verlauf der Entzündungsreaktion, nach Injektion der Lymphozyten in den Hippokampus, verändern. Als Baseline wurden Aufnahmen von allen Tieren am Tag vor der Injektion gemacht. Nach stereotaktischer Einbringung der OT-Zellen wurden am ersten, zweiten, dritten, siebten, zehnten und vierzehnten Tag nach der Injektion aus zwei verschiedenen Ebenen der Hippokampusregion jeweils fünf 90 Sekunden lange Videos aufgenommen. Es wurden verschiedene Parameter ausgewertet, um zu untersuchen, ob und in welcher Art die ausgelöste Entzündungsreaktion zu Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führt.

### 4.2.1 Gesamtbetrachtung der $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität

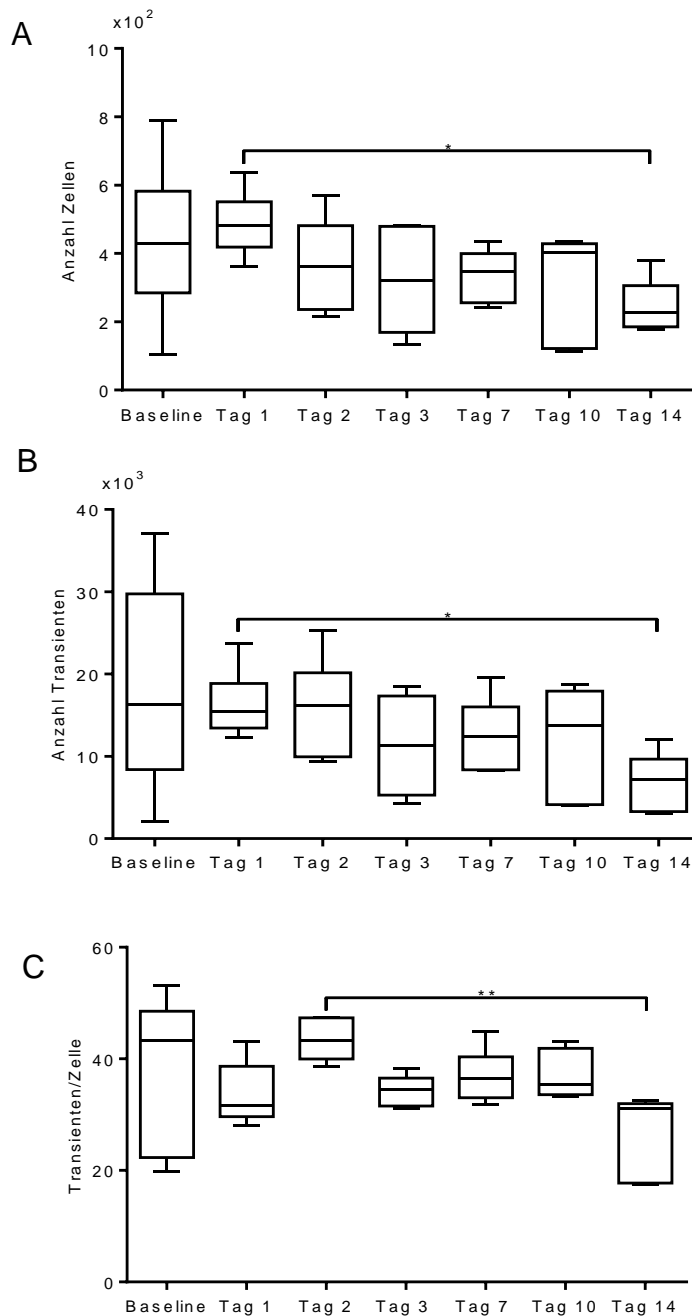
Zur Gesamtbetrachtung des Netzwerks und dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität wurde untersucht, wie viele Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten generieren und ob sich deren Anzahl sowie die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten während der Entzündungsreaktion veränderten.

Die Anzahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten generierender Zellen pro Versuchstier blieb nach Injektion der Lymphozyten konstant (Baseline 435 Zellen, Tag 1 487,5 Zellen, Tag 2 367 Zellen, Tag 3 319,5 Zellen, Tag 7 336,3 Zellen, Tag 10 317,3 Zellen, Tag 14 246,2 Zellen). Auffällig war die relativ große Streuung dieser Werte für die Baseline: Einige Tiere zeigten vor Injektion der Lymphozyten  $\text{Ca}^{2+}$ -Events in bis zu 800 Zellen, andere nur in etwa 100 Zellen. Infolge der Injektion streuten diese Werte weniger stark. Friedman-Test  $p = 0,0799$  (n. s.), Test auf Normalverteilung: Kolmogorow-Smirnow-Normalitätstest, post-hoc-Datenanalyse. Dunns Multivergleichstest,  $n = 6$  Mäuse (siehe Abb. 27A).

Die Werte für die Gesamtzahl der registrierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten pro Versuchstier verhielten sich ähnlich (Baseline 18255,5 Transienten, Tag 1 16349,2 Transienten, Tag 2 15942,3 Transienten, Tag 3 11317,7 Transienten, Tag 7 12650,8 Transienten, Tag 10 12019,3 Transienten, Tag 14 6945,5 Transienten). Die Werte der Baseline streuten wiederum von 2.000 bis 40.000 Transienten. Nach Injektion der Lymphozyten vermindert sich diese Streuung. Repeated-measurement-one-way-ANOVA  $p = 0,0662$  (n.s.), Tests

auf Normalverteilung: Kolmogorow-Smirnow-Normalitätstest, post-hoc-Datenanalyse: Dunns Multivergleichstest, n = 6 Mäuse (siehe Abb. 27B).

Auch das Verhältnis der Transienten pro Zelle änderte sich im Verlauf der Entzündungsreaktion nicht (Baseline 42 Transienten/Zelle, Tag 1 33,5 Transienten/Zelle, Tag 2 43,4 Transienten/Zelle, Tag 3 35,4 Transienten/Zelle, Tag 7 37,6 Transienten/Zelle, Tag 10 37,9 Transienten/Zelle, Tag 14 28,21 Transienten/Zelle). Auch hier zeigte sich die starke Streuung der Werte in den Baseline-Aufnahmen. Friedman-Test  $p = 0,0083$  Tests auf Normalverteilung: Kolmogorow-Smirnow-Normalitätstest, post-hoc-Datenanalyse: Dunns Multivergleichstest, n = 6 Mäuse (siehe Abb. 27C).



**Abb. 27:** Keine Veränderung des Gesamtzellverhaltens im  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging nach der Lymphozyteninjektion

**A)** Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte der Gesamtzahl aller Zellen, in denen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten registriert wurden, an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 6$  Mäuse

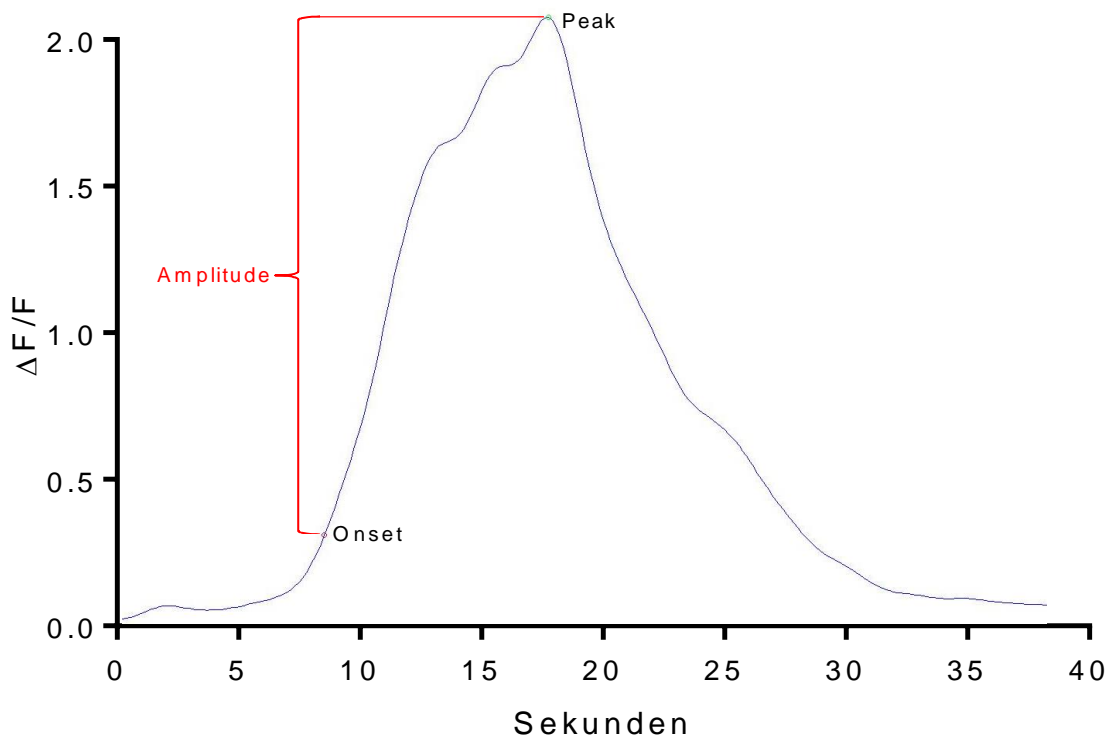
**B)** Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte der Gesamtzahl registrierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 6$  Mäuse.

**C)** Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte des Verhältnisses von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten pro Zelle an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 6$  Mäuse.

Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile.

#### 4.2.2 Vergrößerung der $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten-Amplitude im Rahmen der Entzündungsreaktion

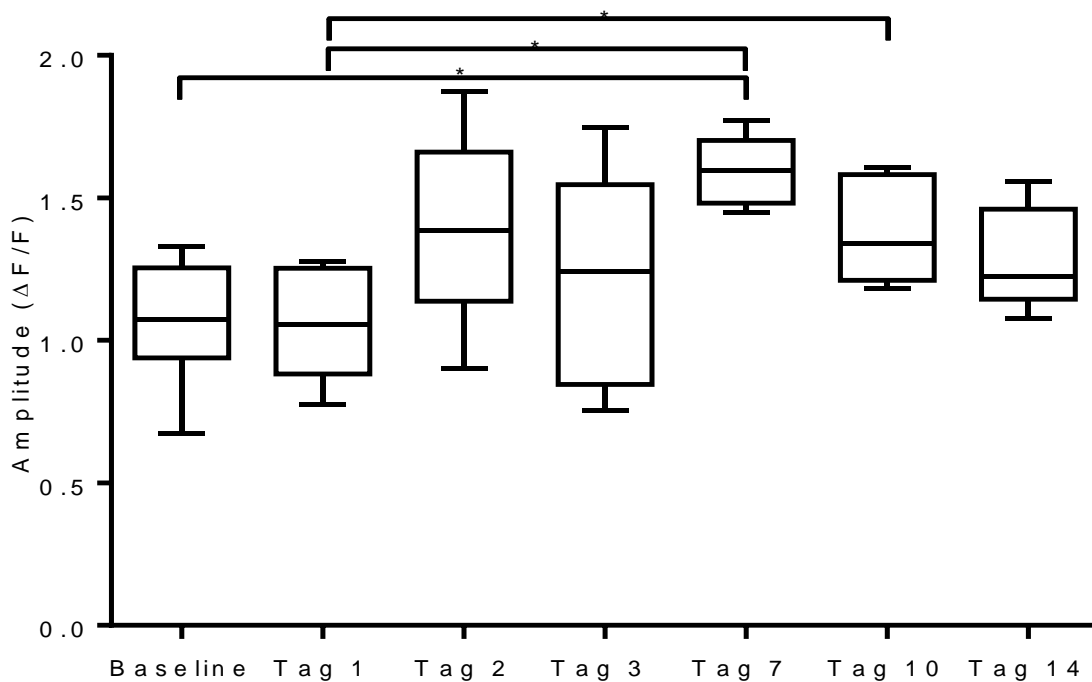
Zur weiteren Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings wurde untersucht, ob sich die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Verlauf der Entzündungsreaktion veränderten.



**Abb. 28:** Darstellung der Amplitude eines einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

In blau ist das Fluoreszenzverhalten einer einzelnen Zelle während eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beispielhaft dargestellt. Die Y-Achse beschreibt die relative Fluoreszenz, auf der X-Achse wird die Zeit in Sekunden dargestellt. Das Überschreiten einer festgelegte Intensität der Fluoreszenz wird als Onset (=Startpunkt) eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten definiert. Aus der Differenz zwischen dem Wert für diesen Onset und dem Maximalwert der Fluoreszenzintensität (=Peak) errechnet sich die Amplitude.

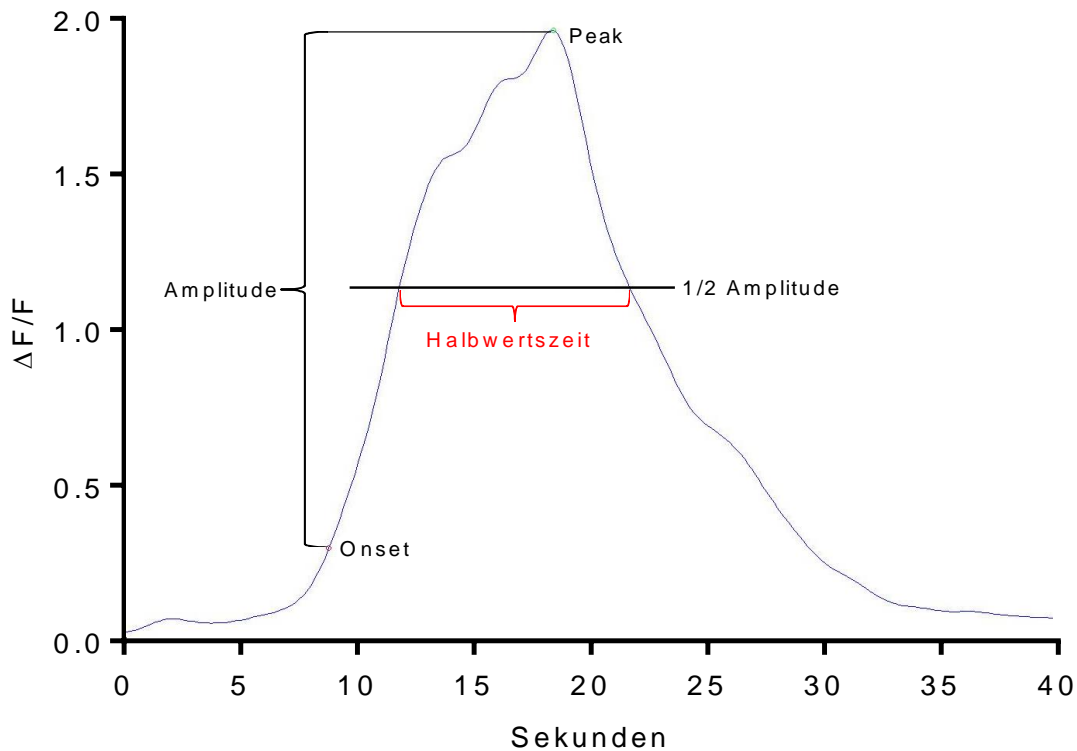
Im Verlauf der Entzündungsreaktion stiegen die Werte der durchschnittlichen Amplitudenhöhe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ab dem zweiten Tag nach der Lymphozyteninjektion stetig an. Am siebten Tag wurden die Maximalwerte erreicht. In den darauf folgenden Messungen sankt die durchschnittliche Amplitudenhöhe wieder ab (Baseline 1,07  $\Delta\text{F}/\text{F}$ , Tag 1 1,05  $\Delta\text{F}/\text{F}$ , Tag 2 1,4  $\Delta\text{F}/\text{F}$ , Tag 3 1,23  $\Delta\text{F}/\text{F}$ , Tag 7 1,6  $\Delta\text{F}/\text{F}$ , Tag 10 1,38  $\Delta\text{F}/\text{F}$ , Tag 14 1,28  $\Delta\text{F}/\text{F}$ ) repeated-measurement-ANOVA  $p = 0,011$ , Tests auf Normalverteilung: Kolmogorow-Smirnow-Normalitätstest, post-hoc-Datenanalyse: Tukeys Multivergleichstest,  $n = 6$  Mäuse (siehe Abb. 29).



**Abb. 29:** Mittlere Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im zeitlichen Verlauf  
Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte der mittleren Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten an den tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 6$  Mäuse.  
Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile

#### 4.2.3 Konstante Halbwertszeiten der $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Rahmen der Entzündungsreaktion

Es wurde untersucht, ob sich die Dauer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in Abhängigkeit der durch die Lymphozyteninjektion ausgelösten Entzündungsreaktion veränderte.

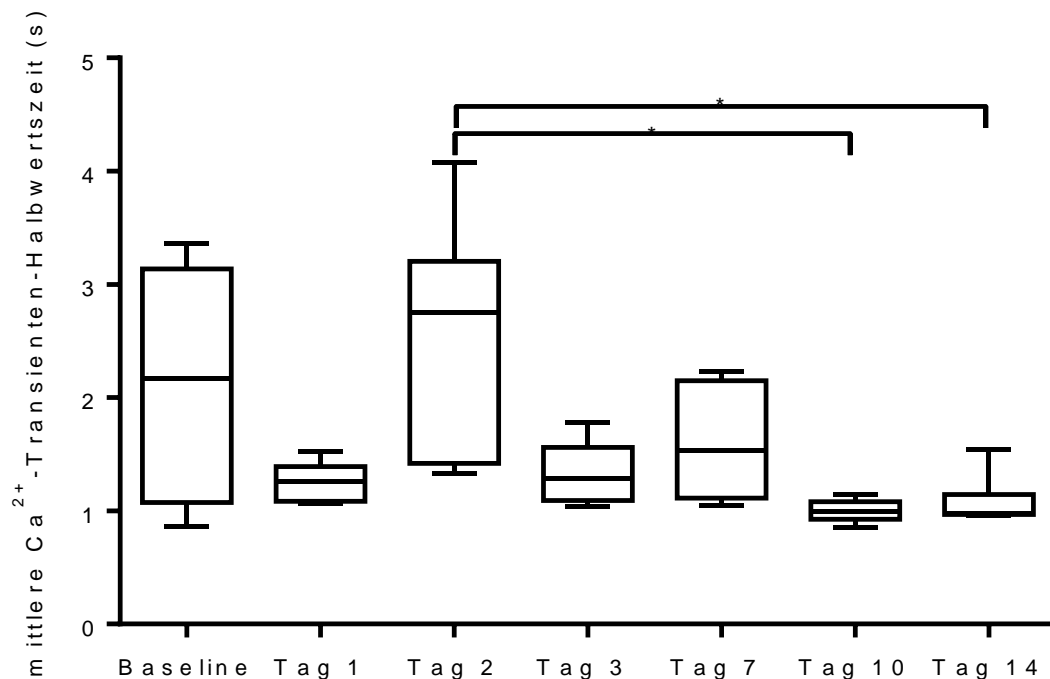


**Abb. 30:** Darstellung der Halbwertszeit eines einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

In blau ist das Fluoreszenzverhalten einer einzelnen Zelle während eines Transienten beispielhaft dargestellt. Die Y-Achse beschreibt die relative Fluoreszenz, auf der X-Achse wird die Zeit in Sekunden dargestellt. Das Überschreiten einer festgelegte Intensität der Fluoreszenz wird als Onset (=Startpunkt) eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten definiert, als Peak wird der Maximalwert der Fluoreszenzintensität bezeichnet. Aus der Differenz zwischen Peak und Onset errechnet sich die Amplitude. Die Halbwertszeit bezeichnet das zeitliche Intervall zwischen dem Überschreiten der Hälfte der Amplitude bis zum Wiedererreichen dieses Wertes.



Die durchschnittliche Halbwertszeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten änderte sich im Verlauf der Entzündungsreaktion nur unwesentlich (Baseline 2,13 s, Tag 1 1,26 s, Tag 2 2,55 s, Tag 3 1,33 s, Tag 7 1,6 s, Tag 10 0,99 s, Tag 14 1,1 s). Die Werte lagen im Bereich von einer bis zwei Sekunden durchschnittlicher Halbwertszeit der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Auffällig war, dass die Werte der Baseline, sowie des zweiten Tages nach Lymphozyteninjektion stark streuten. Zudem lagen sie etwas über dem Niveau der übrigen Messwerte, zwischen zwei und drei Sekunden. Friedman-Test  $p = 0,0032$ , Tests auf Normalverteilung: Kolmogorow-Smirnow-Normalitätstest, post-hoc-Datenanalyse: Dunns Multivergleichstest,  $n = 6$  Mäuse (siehe Abb. 31).



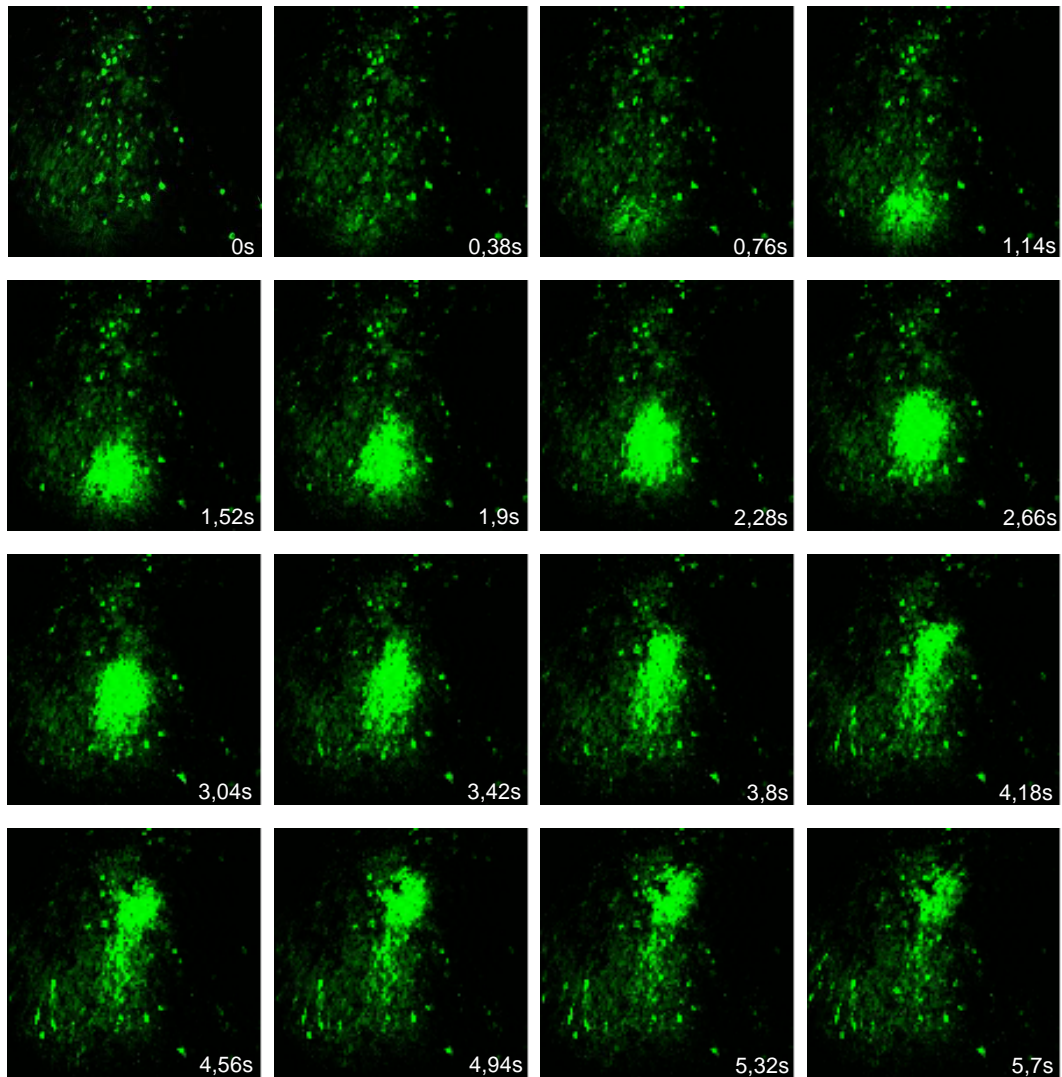
**Abb. 31:** Mittlere Halbwertszeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im zeitlichen Verlauf. Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte der mittleren Halbwertszeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14;  $n = 6$  Mäuse. Darstellung: Median, Box: 25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile.

#### 4.2.4 Auftreten und Eigenschaften von $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen

Während der Imagingsessions traten spontan  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten simultan in mehreren benachbarten Neuronen auf. Diese kumulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten propagierten über benachbarte Neurone durch den jeweiligen Bildausschnitt. Wegen der wellenartigen Ausbreitung dieses Phänomens wird im Folgenden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen gesprochen.

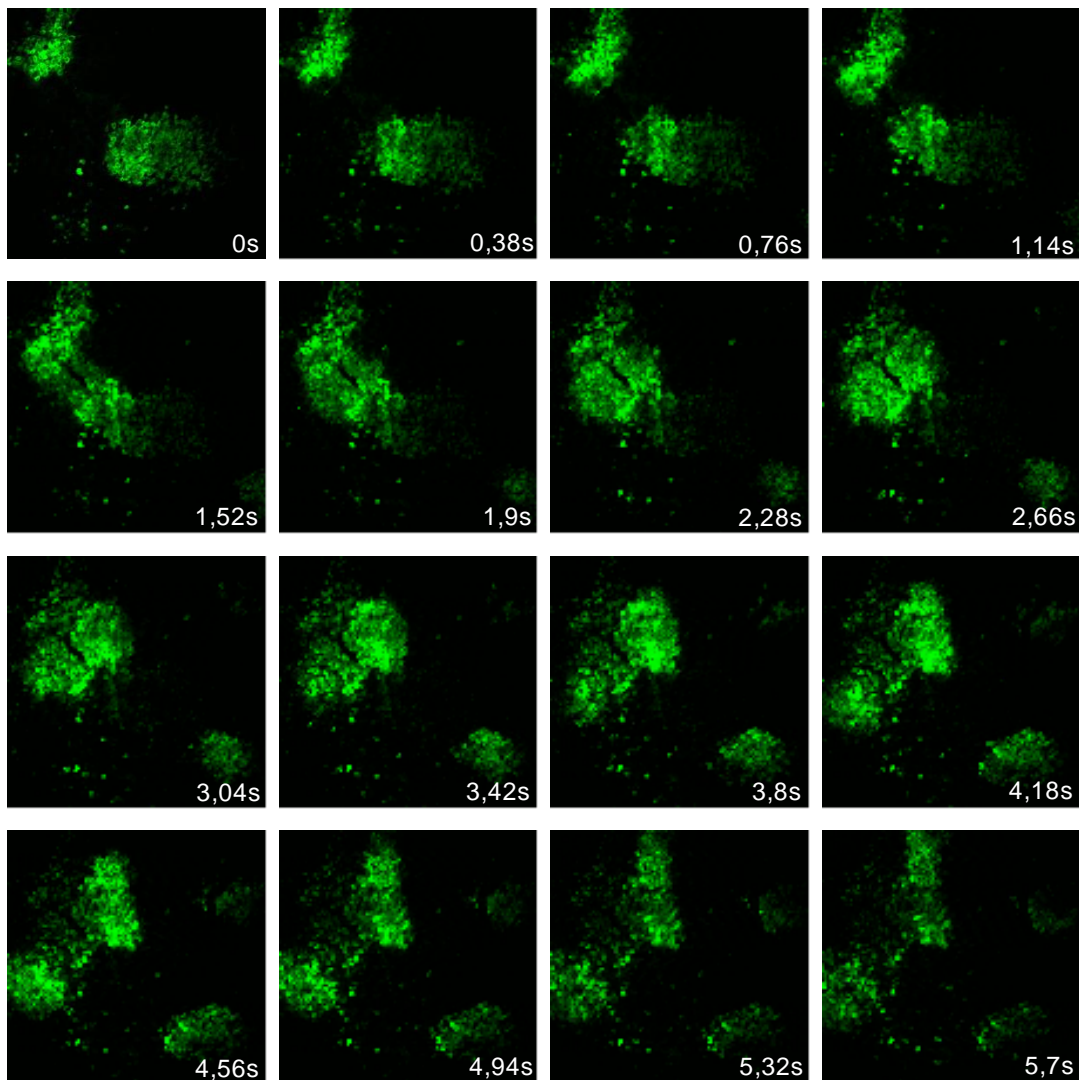
$\text{Ca}^{2+}$ -Wellen wurden in beinahe allen Aufnahmen beobachtet. Ihr Verhalten ist stets stereotyp: Es rekrutieren sich etwa 20 in unmittelbarer Nachbarschaft liegende Zellen über eine Fläche von etwa 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser zusammen, die simultan Fluoreszenzsignale ausbilden. Dieses Fluoreszenzsignal breitet sich auf weitere Zellen der unmittelbaren Umgebung aus.

In einigen Aufnahmen traten mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen zur gleichen Zeit in unterschiedlichen Regionen des Bildausschnitts auf. Bei Aufeinandertreffen zweier  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen kumulieren diese für einige Zeit und verlaufen danach in etwa  $90^\circ$  veränderter Richtung weiter in jeweils entgegengesetzte Richtungen voneinander weg. (siehe Abb. 32-34).



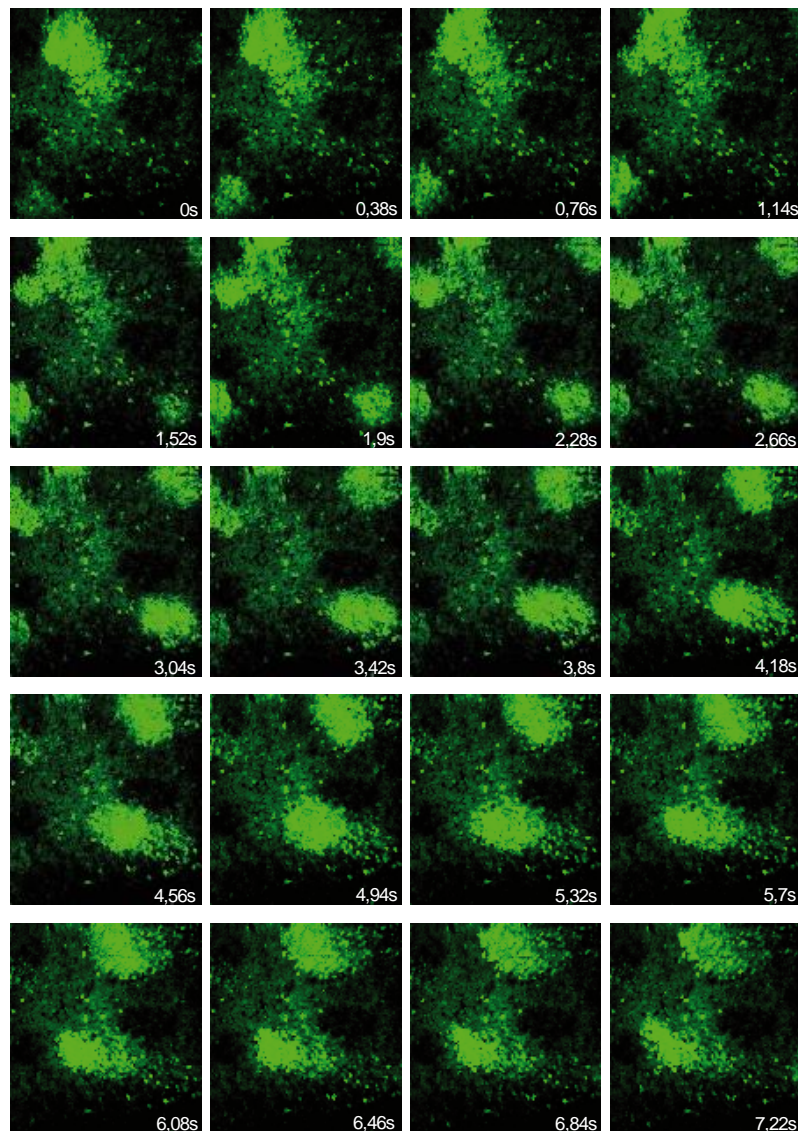
**Abb. 32: Ca<sup>2+</sup>-Welle**

Die Abbildung zeigt eine 5,7 Sekunden dauernde Bildsequenz, in der sich in der unteren mittleren Bildkante eine Ca<sup>2+</sup>-Welle generiert und in Richtung der oberen mittleren Bildkante verläuft. Nach 0,38 Sekunden erkennt man einen Fluoreszenzanstieg in einigen Zellen am unteren Bildrand. Bis 1,14 Sekunden erfasst dieser Fluoreszenzanstieg weitere Zellen in der Umgebung. Der Fluoreszenzanstieg propagiert über eine etwa gleichbleibende Anzahl von Zellen innerhalb der nächsten 2,28 Sekunden zur Bildmitte. Ab 3,42 Sekunden nimmt die Anzahl von an der intensiv fluoreszierenden Region beteiligten Zellen stetig ab. Die so ausdünnende Ca<sup>2+</sup>-Welle verläuft weiter in Richtung Mitte der oberen Bildkante.



**Abb. 33:** Zusammentreffen zweier  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen

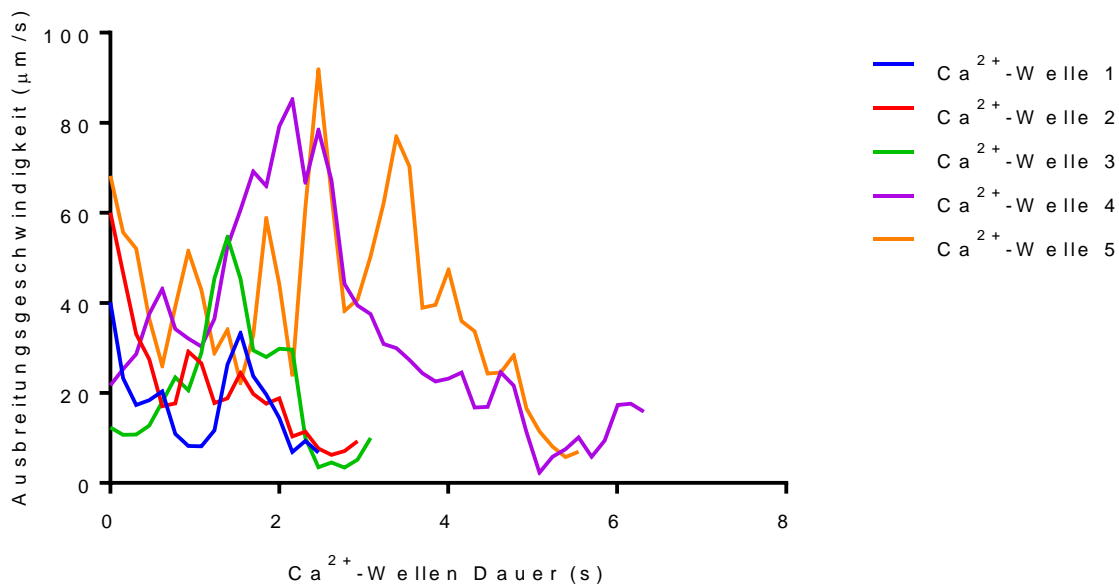
Es sind zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen zu erkennen, die sich aus der oberen linken Ecke in Richtung der Bildmitte bzw. von der Bildmitte aus in Richtung der oberen linken Ecke aufeinander zu bewegen. Nach 1,52 Sekunden treffen die Wellen aufeinander. Bis 2,66 Sekunden fusionieren beide Wellen zu einer Zellansammlung hoher Fluoreszenzintensität. Diese Zellansammlung teilt sich wieder in zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, die sich in entgegengesetzte Richtung voneinander ausbreiten. Die Ausbreitungsrichtung der beiden neu entstehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen verläuft etwa senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der beiden ursprünglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen. Von der unteren rechten Bildecke verläuft zwischen 1,9 bis 5,7 Sekunden eine weitere, unabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle entlang der unteren Bildkante zur Mitte, deren Fluoreszenzintensität bis 4,56 Sekunden stetig ansteigt und bis 5,7 Sekunden beinahe restlos erlischt.



**Abb. 34:** Gruppe von Ca<sup>2+</sup>-Wellen

Es sind vier Ca<sup>2+</sup>-Wellen in einer Bildsequenz von 7,22 Sekunden Dauer zu erkennen. Bereits zum Zeitpunkt 0 besteht eine Ca<sup>2+</sup>-Welle in der Mitte der oberen Bilddrittels. Diese propagiert bis 1,14 Sekunden in Richtung der oberen linken Bildecke und teilt sich nach 1,52 Sekunden in zwei in entgegengesetzte Richtungen verlaufende Ca<sup>2+</sup>-Wellen auf, die nach 5,32 Sekunden erloschen sind. Eine kleinere Ca<sup>2+</sup>-Welle läuft im Zeitraum von 0 bis 4,56 Sekunden von der unteren linken Bildecke in Richtung Bildmitte. Ab 1,52 Sekunden generiert sich in der oberen rechten Ecke eine weitere Ca<sup>2+</sup>-Welle, die entlang der oberen Bildkante horizontal in Richtung Mitte propagiert und bis zum Ende der Bildsequenz bestehen bleibt. Die vierte Ca<sup>2+</sup>-Welle breitet sich in etwa parallel zur Dritten ab 1,52 Sekunden bis zum Ende der Bildsequenz von der unteren rechten Bildecke in Richtung Mitte aus.

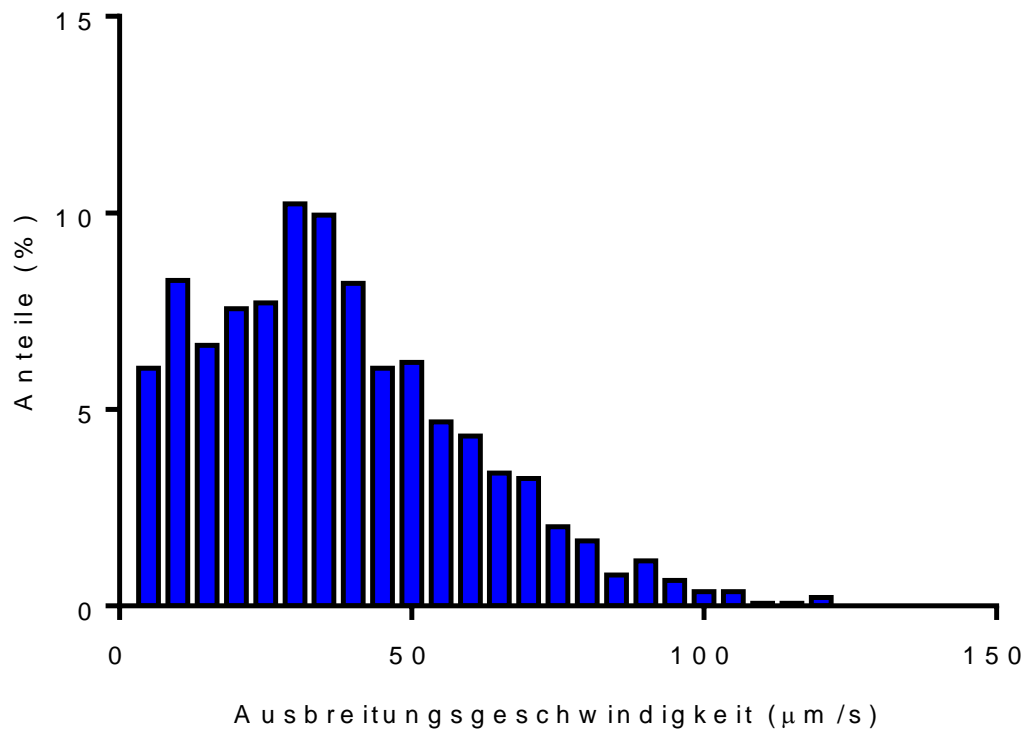
Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen verhält sich ungleichmäßig. Betrachtet man sie im Einzelnen, so ist festzustellen, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit während des Verlaufs über ein Intervall von bis zu  $80 \mu\text{m/s}$  schwankt (siehe Abb. 35). In der Gesamtbetrachtung propagieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen jedoch zu 70 % der Zeit mit einer mittleren Ausbreitungsgeschwindigkeit zwischen  $10 \mu\text{m/s}$  und  $50 \mu\text{m/s}$  (siehe Abb. 36). Es wurden insgesamt 53  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen untersucht.



**Abb. 35:** Geschwindigkeitsprofile einzelner  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen

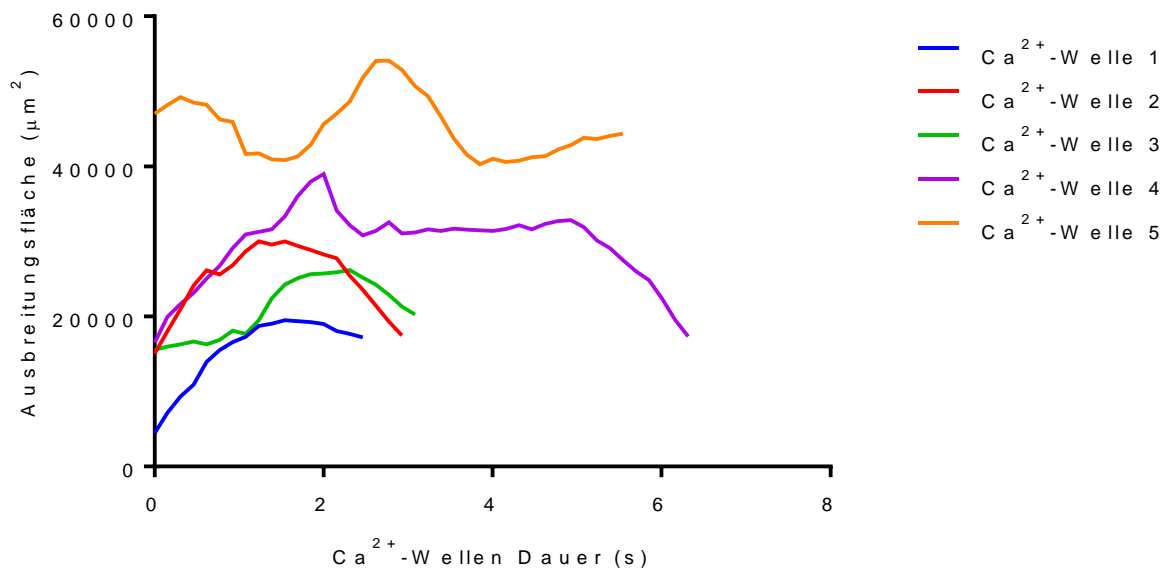
Darstellung der Geschwindigkeitsprofile fünf exemplarischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen.

Die X-Achse beschreibt die Dauer der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in Sekunden auf der Y-Achse ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  abzulesen.



**Abb. 36:** Histogramm zur Ausbreitungsgeschwindigkeit von Ca<sup>2+</sup>-Wellen  
Relative Aufteilung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Ca<sup>2+</sup>-Wellen in der Gesamtbe-  
trachtung. Es wurden 53 Ca<sup>2+</sup>-Wellen untersucht.

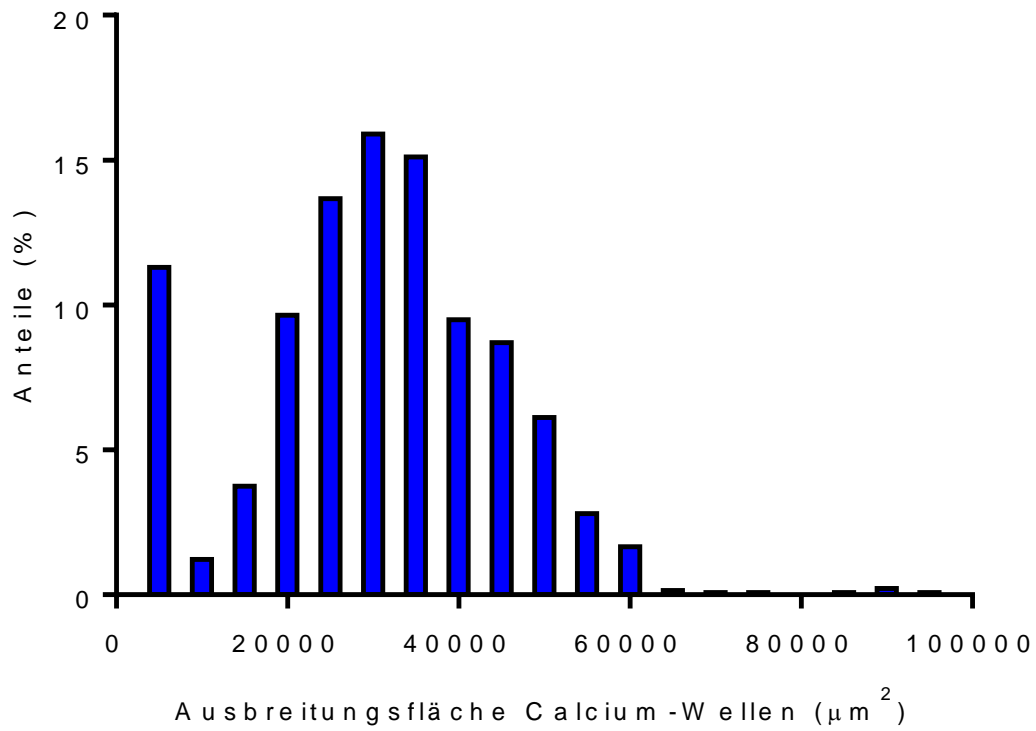
Die Ausbreitungsflächen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen verhalten sich konstant. Betrachtet man die Ausbreitungsflächen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen im Einzelnen, so ergibt sich ein Bild ohne wesentliche Schwankungen der Fläche der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen (siehe Abb. 37). In der Gesamtbetrachtung sind 83 % aller untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen zwischen  $10.000 \mu\text{m}^2$  und  $50.000 \mu\text{m}^2$  groß (siehe Abb. 38).



**Abb. 37:** Größenprofile einzelner  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen

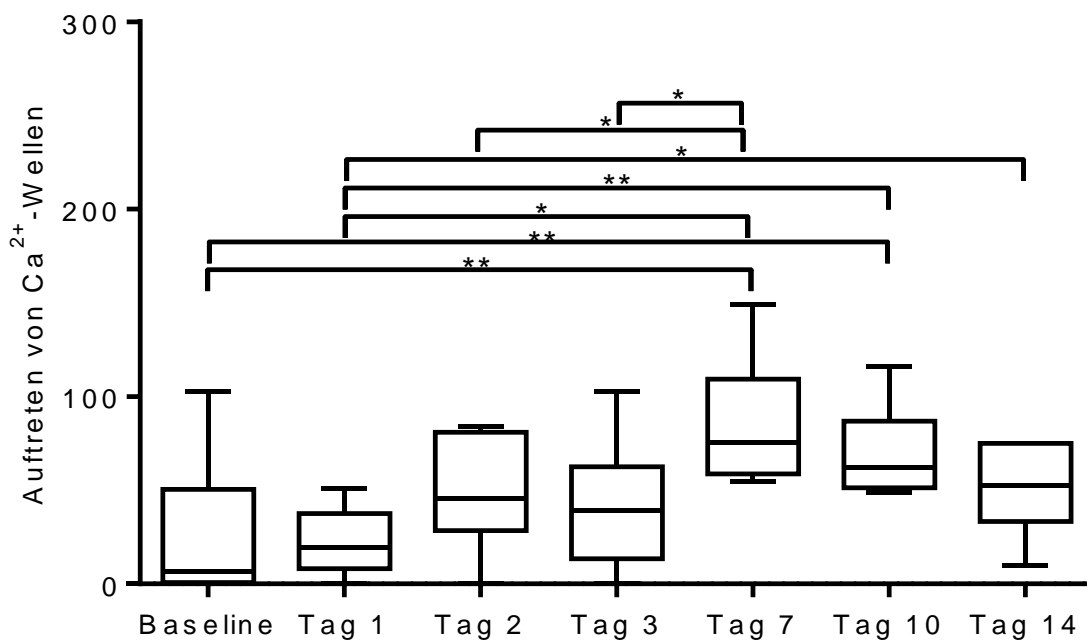
Darstellung der Größenprofile fünf exemplarischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen. Die X-Achse beschreibt die Dauer der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in s, auf der Y-Achse ist die Ausbreitungsfläche in  $\mu\text{m}^2$  abzulesen.





**Abb. 38:** Histogramm zur Ausbreitungsfläche von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen  
Relative Aufteilung des Durchmessers der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in der Gesamtbetrachtung. Es wurden 53  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen untersucht.

Es wurde untersucht, ob sich das Auftreten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen im Rahmen der Entzündungsreaktion veränderte. In der Tat traten eine Woche nach Injektion der Lymphozyten vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen auf. In den ersten drei Tagen nach Induktion der Entzündung verhielt sich die Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen konstant auf dem Niveau der Baseline (Baseline 21, Tag 1 19, Tag 2 50, Tag 3 41 Tag 7 70, Tag 10 64, Tag 14 51  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen pro Experiment) (siehe Abb. 39).



**Abb. 39:** Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen im zeitlichen Verlauf  
 Vergleich der Baseline (2 Tage) und entsprechender Werte des Auftretens von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen an den Tagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14:  $n = 6$  Mäuse.  
 Darstellung: Median, Box:25-75. Perzentile, Whisker: 5-95. Perzentile

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier präsentierten Ergebnisse liefern neue Hinweise über die Mechanismen der LE und der damit verbundenen gesteigerten Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks sowie der Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung. Folgende Befunde konnten erhoben werden:

- 1) Auswirkung der induzierten Entzündungsreaktion auf lokale elektrische Aktivitätsmechanismen (Feldpotentiale): a) Die Amplitude des Theta-Peaks zeigte sich infolge der Lymphozyteninjektion zunächst leicht vermindert, nach einer Woche jedoch wieder auf dem Niveau der Baseline. b) In gleicher Art veränderten sich auch die Messwerte der Gamma-Oszillationsstärke. Sie waren zunächst vermindert und nach einer Woche gingen sie auf das Baselinenniveau zurück. c) Eine solche Verminderung infolge der Lymphozyteninjektion mit Angleichung an die Werte der Baseline nach einer Woche zeigte sich auch für die maximale Amplitude („Peak“) des Gamma-Frequenzbandes.
- 2) Veränderung der neuronalen Aktivität: Die induzierte Entzündungsreaktion beeinflusste den aktivitätsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Neurone. Die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten waren eine Woche nach Injektion der T-Lymphozyten in die Hippokampusregion im Vergleich zur Baseline und den Werten der ersten Woche erhöht.
- 3) Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen im Verlauf der Neuroinflammation: Es konnten gekoppelte Entladungen von unmittelbar angrenzenden Neuronenpopulationen beschrieben werden, die sich gerichtet ausbreiteten und als bisher unbekannte pathologische Entladungsmuster angesehen werden können.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

In Hippokampi von LE-Patienten wurden sowohl verschiedene B-, als auch zahlreiche T-Lymphozyten und aktivierte Mikroglia nachgewiesen (Bien et al., 2007; Vincent et al., 2011). Auf Grundlage dieser Befunde wurden in dieser Arbeit T-Lymphozyten mittels stereotaktischer Injektion in die Hippokampusregion von Mäusen eingebracht, um eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Die Vorbefunde legen die Beteiligung zytotoxischer CD8+ T-Lymphozyten an neuronalen Schädigungen nahe: 1) Das Ausmaß der neuronalen Schädigung korrelierte mit der Anzahl gefundener CD8+ T-Lymphozyten, 2) CD8+ T-Lymphozyten wurden in unmittelbarer Nähe geschädigter Neurone nachgewiesen, 3) entsprechende CD8+ T-Lymphozyten wiesen einen aktivierten Phänotyp auf, indem sie Effektormoleküle (z.B. Perforin und Proteasen) exprimierten. (Bien et al., 2012; McKeon und Pittock, 2011).

Nitsch et al (2004) fanden heraus, dass der durch direkten Kontakt zu T-Lymphozyten eingeleitete Zelltod von Neuronen durch Blockade von Glutamat-Rezeptoren verhindert werden konnte und schlossen daraus, dass die Aktivität des neuronalen Netzwerks von zentraler Bedeutung für durch T-Lymphozyten vermittelte Entzündungsreaktionen im Gehirngewebe sein könnte (Nitsch et al., 2004). Glutamat-Rezeptoren tragen wesentlich zur synaptischen Transmission, der funktionellen Kopplung von Neuronen untereinander und damit zum Erscheinungsbild lokaler Feldpotentiale bei (Buzsaki et al., 2012; Kandel, 2000). Der Einfluss von T-Lymphozyten auf Glutamat-Rezeptoren könnte die Synchronität synaptischer Vorgänge reduzieren. Dies könnte ein Mechanismus für die in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen Verminderungen der Stärke des Gamma-Frequenzbandes infolge der Lymphozyteninjektion sein. Die Blockade der Glutamat-Rezeptoren könnte eine verminderte Rekrutierung von Neuronen zu funktionellen Gruppen zur Folge haben und damit die Stärken der Frequenzbänder vermindern. Auch die Abnahme der maximalen Amplitude des Gamma-Frequenzbandes, sowie des Theta-Frequenzbandes könnte auf diesen Mechanismus zurückzuführen sein.

Ein Schlüssel-molekül des Zelluntergangs von Neuronen durch T-Lymphozyten ist das Protein Perforin (Bien et al., 2012; Ehling et al., 2015; McKeon und Pittock 2011; Nitsch et al., 2004). Perforin ist ein zytosolisches Protein von CD8+ T-Lymphozyten, welches nach Degranulation derselben die Zellmembran angegriffener Zellen perforiert und somit

Poren ausgebildet (Pipkin und Liebermann, 2007). Solche Poren könnten die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran verändern und darüber hinaus als Ein- und Austrittsstelle von Ionen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) fungieren. Der Einfluss von Perforin auf die elektrische Erregbarkeit von Zellen wurde vor allem in ventrikulären Kardiomyozyten untersucht. Durch die Ausbildung von Poren in der Zellmembran kann es zu einer intrazellulären Überladung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  kommen (Binah et al., 1994). Infolgedessen wären eine Depolarisation des Membranpotentials sowie Veränderungen der Dauer und Amplitude von Aktionspotentialen möglich (Binah et al., 1992; Felzen et al., 1994). Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen, könnten die entsprechend veränderten Aktionspotentiale als Mechanismus für die Veränderungen der gemessenen Feldpotentiale infrage kommen: Aktionspotentiale tragen wesentlich zur Synchronität des neuronalen Netzwerks und damit zum Erscheinungsbild lokaler Feldpotentiale bei (Buzsaki et al., 2012). Darüber hinaus könnte der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und die damit einhergehende Überladung der Neurone im Zusammenhang mit den vergrößerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten stehen, welche in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben wurden.

$\text{Ca}^{2+}$  gilt als eines der wichtigsten neuronalen Signalmoleküle (Berridge, 1998) und wird als wesentlich für die Kontrolle verschiedener Funktionen wie Zellintegrität (Zeng et al., 2007), Energiemetabolismus (Zsurka und Kunz, 2015), sowie des Zelltods (Paschen, 2003) angenommen. Eine Überladung von Neuronen mit  $\text{Ca}^{2+}$  kann diverse  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Proteine beeinflussen (Beck et al., 1999) und gilt als ein wesentlicher Auslöser neuronaler Toxizität (Otmakhov, 2015). Unterschiedliche Studien haben die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als verantwortlichen Mechanismus für den Zelltod von Neuronen diskutiert (Choi 1995; Nicotera et al., 1998; Yu et al., 2001). Meuth et al (2009) vermuten, dass ein direkter Kontakt von  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten zu Neuronen eine Erhöhung des neuronalen Membranwiderstands bewirkt. Die durch stereotaktische Injektion induzierte Entzündungsreaktion von Lymphozyten in die Hippokampus-Region in dieser Arbeit wäre mit einem solchen direkten Kontakt vereinbar. Eine entsprechende Erhöhung des neuronalen Membranwiderstands könnte ebenfalls zu Alterationen des neuronalen Netzwerks und damit dem Erscheinungsmuster der gemessenen lokalen Feldpotentiale führen. Des Weiteren beschrieben Meuth et al. (2009) in diesem Zusammenhang gesteigerte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sowohl der angegriffenen Zellen, als auch

der Neuronen der unmittelbaren Umgebung (Meuth et al., 2009). Steigt die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytoplasma von Neuronen an, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass  $\text{Ca}^{2+}$  an den hier verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator bindet, was zu stärkerer Fluoreszenz des Moleküls führt (vgl. Kapitel 3.1.2.1b). So ließen sich die vergrößerten Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten im Verlauf der Untersuchungen miteinander vereinbaren. Der Befund, dass neben den direkt angegriffenen Zellen auch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der benachbarten Neurone ansteigt, könnte als Grundlage zur Generierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen gedeutet werden, da diese ebenfalls in unmittelbar angrenzenden Neuronen auftreten und sich kontinuierlich über das Synzytium hinweg ausbreiten.

Berdyeva et al. (2016) beschrieben jüngst in einem in vivo Tiermodell  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale im Rahmen epileptischer Anfälle, die sich ebenfalls wellenartig ausbreiteten (Berdyeva et al., 2016). Die beschriebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale waren durch einen kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zu einem gewissen Maximum und einem anschließenden Verblassungsprozess gekennzeichnet und propagierten mit einer Geschwindigkeit von ca. 1cm/min über das Synzytium. Wie auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator GCaMP verwendet. Die Parallelen der Befunde aus der Arbeit von Berdyeva et al. und der hier vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den gefundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen um vergleichbare Phänomene handeln könnte. Berdyeva et al. argumentieren, dass die Befunde die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Pathogenese epileptischer Anfälle und neuronaler Schädigungen (Nargakatti et al., 2009; Cao et al., 2015) nicht nur nahelegen könnte, sondern  $\text{Ca}^{2+}$  eine zentrale Schlüsselposition einnähme. Auch die LE geht mit epileptischen Anfällen und neuronales Schädigung einher (vgl. Kapitel 2.1). Das Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen könnte also einen Mechanismus darstellen, welcher zur Pathogenese der LE beiträgt.

Ein weiterer Aspekt, welcher mit dem Auftreten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen zu diskutieren ist, ist deren mögliche Korrelation zu hippokampaler Streudepolarisation. Als Streudepolarisation bezeichnet man eine sich wellenartig über Hirngewebe hinweg ausbreitenden Depolarisation als Reaktion auf einen pathologischen Auslöser. Das Phänomen der Streudepolarisation wurde zuerst 1944 von Leão beschrieben (Leão et al., 1944) und ist bis heute im Kortex, subkortikalen Strukturen wie dem Hippokampus, sowie in der Retina bekannt (Mesgari, 2015). Ein initiales Ereignis führt zu pathologischen Veränderungen von Ionenkanälen, welche an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt

sind (Kramer et al., 2016). Streudepolarisation wird bei verschiedenen Krankheitsentitäten wie Migräne mit Aura, verschiedenen Kopfschmerzsyndromen, ischämischen Schlaganfällen, subarachnoidalen und intrazerebralen Blutungen, Schädel-Hirn-Traumata sowie Epilepsien beschrieben (Chen und Ayata, 2016). Als auslösendes Ereignis der Streudepolarisation werden verschiedene Mechanismen vermutet: Die Akkumulation von  $K^+$  während intensiver neuronaler Entladungen innerhalb des begrenzten interstitiellen Raumes des Gehirngewebes depolarisiert dieselben Zellen, aus denen es diffundiert ist noch weiter, was zu einer Deaktivierung der neuronalen Erregung führt. Durch Diffusion des extrazellulären  $K^+$  zu angrenzenden Hirnregionen propagiert auch die Depolarisation in angrenzendes Gewebe. Dieser Mechanismus wird als Grafstein-Hypothese der Streudepolarisation zusammengefasst (Grafstein, 1956). Der van-Harreveld-Hypothese folgend, steht Glutamat als exzitatorischer Transmitter im Mittelpunkt der Streudepolarisation (van Harreveld, 1959).

Überträgt man die bekannten Eigenschaften der Streudepolarisation auf die Befunde der hier vorliegenden Arbeit, finden sich einige Gemeinsamkeiten, welche vermuten lassen, dass es sich bei den beschriebenen  $Ca^{2+}$ -Wellen um eine Form der Streudepolarisation handeln könnte: Zum einen entspricht die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Streudepolarisation mit 2-3 mm/min (Gorji, 2001) in etwa der Ausbreitungsgeschwindigkeit der  $Ca^{2+}$ -Wellen. Zum anderen wurde beschrieben, dass während der Depolarisation im Rahmen der Streudepolarisation die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  ansteigt (Somjen, 2001), was sich ebenfalls mit dem vermehrten Auftreten von  $Ca^{2+}$ -Wellen, sowie der vergrößerten Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Transienten im Verlauf der induzierten Entzündungsreaktion vereinbaren ließe.

### 5.3 Ausblick auf weiterführende Untersuchungen

Um nachzuvollziehen, ob die durch T-Lymphozyteninjektion induzierte Entzündungsreaktion des Hippokampus neben Veränderungen des neuronalen Netzwerks auch zu typischen pathologieassoziierten Veränderungen des LFP führt, wäre eine Erweiterung des Aufnahmespektrums der LFP vorteilhaft. Im Einzelnen könnte die Ausbildung sehr schneller Oszillationen über 300 Hz (=„Fast-Ripples“) durch entsprechende Filtereinstellungen zusätzlich beobachtet werden (Bragin et al., 2010; Foffani et al., 2007).

Zur weiteren Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in Bezug auf deren Entstehung und Eigenschaften könnte untersucht werden, ob Zell-Zell-Kanäle („Gap-Junctions“) an der Propagation der Fluoreszenz beteiligt sein könnten, indem die Versuche in einer entsprechenden Connexin Knock-out-Mauslinie (vgl. Baldo et al., 2001) oder in Gegenwart von spezifischen Blockern durchgeführt würden. Ebenfalls könnte man der Vermutung nachgehen, dass sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen im Sinne des Streudepolarisation-Phänomens ausbreiten indem man die Membraneigenschaften an  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen beteiligter Einzelzellen mittels In-Vivo-Patch-Clamp-Technik untersucht (vgl. Kitamura et al., 2008).

Es besteht die Möglichkeit, dass die beschriebenen Veränderungen zum Teil durch mechanische Manipulation am Hirngewebe der Mäuse und dadurch verursachte neuronale Schädigungen bedingt wurden. Allerdings zeigen Vorversuche, dass die Implantation des Hippokampusfenster wenig Einfluss auf die Hirnfunktionen der Mäuse hat (Gu et al., 2015): Es konnte gezeigt werden, dass sich infolge der operativen Prozedur eine Mikro-, sowie Astrogliose im Operationsgebiet bildete, welche jedoch nach 20 Tagen abgeklungen war und lediglich eine Narbe im Randgebiet des Operationsfeldes hinterließ (Gu et al., 2015). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die Dichte dendritischer Zellfortsätze durch die Implantation des kranialen Hippokampusfensters nicht änderte. Die Überlebensrate von CA1-Neuronen wurde durch den operativen Eingriff ebenfalls nicht beeinflusst (Gu et al., 2015).

Zur Verifizierung, ob die stereotaktischen Injektionen der Lymphozyten erfolgreich verliefen, könnten immunhistologische Untersuchungen angestellt werden. Da der Erfolg der Injektionen der viralen Vektoren durch die mittels Zwei-Photonen Mikroskopie erfasst Fluoreszenz nachgewiesen wurde, wurde angenommen, dass auch die Injektionen der Lymphozyten erfolgreich verliefen. Des Weiteren wurden bereits im



Vorfeld zu dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Becker immunhistochemische Untersuchungen infolge der Lymphozyteninjektion durchgeführt, welche sowohl das erfolgreiche Einbringen der Lymphozyten, als auch die Ausbildung einer Entzündungsreaktion zeigten.

Um nachzuweisen, ob die beschriebenen Befunde tatsächlich auf eine lymphozytenvermittelte Immunreaktion zurück zu führen sind, oder durch das bloße Trauma der Injektion hervorgerufen wurden, könnten Sham-Injektionen, also die Injektion äquivalenter Mengen einer neutralen Substanz (beispielsweise ACSF) durchgeführt werden. Auf derartige Untersuchungen wurde bisher verzichtet um die Anzahl an verwendeten Versuchstieren nicht noch weiter zu steigern.

## 6. Zusammenfassung

Die limbische Enzephalitis wurde als eine der Hauptursachen für die Entwicklung der Temporrallappenepilepsie beschrieben (Bien et al., 2007) und führt über noch nicht im Detail bekannte Prozesse zellulärer und struktureller Schädigungen zu chronischen rezidivierenden Krampfanfällen sowie erheblicher Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung (Vincent et al., 2011).

Als Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit sollte mittels elektrophysiologischer Methoden und in-vivo Multiphotonen-Kalziumimaging die Auswirkung einer T-Lymphozyten-vermittelten parenchymalen Immunreaktion der Hippokampusregion auf die Erregbarkeit und Netzwerkfunktion von Nervenzellen in einem Mausmodell untersucht werden.

Es zeigten sich Auswirkungen auf die lokale elektrische Aktivität (Feldpotentiale) im Rahmen der induzierten Immunreaktion: Die Stärke der Gamma-Oszillationen sowie die maximale Amplitude der Gama-Oszillationen und der maximalen Amplitude des Theta-Frequenzbandes zeigten sich in den ersten Tagen nach Lymphozyteninjektion vermindert und nach einer Woche wieder auf dem Niveau der Baseline. Ebenfalls fanden sich Veränderungen der neuronalen Aktivität im Sinne eines beeinflussten aktivitätsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in Neuronen: Die mittels Multiphotonen-Kalziumimaging gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten waren eine Woche nach Injektion der T-Lymphozyten in die Hippokampusregion im Vergleich zu den Messwerten der Baseline und der ersten Woche erhöht. Ein weiterer Befund war die Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen. Es handelte sich dabei um gekoppelte Entladungen von unmittelbar angrenzenden Neuronenpopulationen im Verlauf der Neuroinflammation, welche sich gerichtet ausbreiten und als bisher unbekannte pathologische Entladungsmuster angesehen werden können.

Diese Befunde lassen sich zusammenfassend als pathophysiologische Reaktion des Gehirngewebes auf die T-Lymphozyten-vermittelte Entzündungsreaktion deuten. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse liefern somit neue Hinweise über die Mechanismen der limbischen Enzephalitis und deren Einfluss auf die Eigenschaften des neuronalen Netzwerks.

## 7. Literaturverzeichnis

Akerboom J, Rivera JD, Guilbe MM, Malavé EC, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreier ER. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem* 2009; 284: 6455-6464

Baks-Te Bulte L, Wouterlood FG, Vinkenoog M, Witter MP. Entorhinal projections terminate onto principal neurons and interneurons in the subiculum: a quantitative electron microscopical analysis in the rat. *Neuroscience* 2005; 136: 729-739

Baldo GJ, Gong X, Martinez-Wittinghan FJ, Kumar NM, Gilula NB, Mathias RT. Gap junctional coupling in lenses from alpha(8) connexin knockout mice. *J Gen Physiol* 2001; 118: 447-456

Beck H, Steffens R, Heinemann U, Elger CE. Ca(2+)-dependent inactivation of high-threshold Ca(2+) currents in hippocampal granule cells of patients with chronic temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 1999; 82: 946-954

Benke TA, Lüthi A, Isaac JT, Collingridge GL. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 1998; 393: 793-797

Berdyeva TK, Frady EP, Nassi JJ, Aluisio L, Cherkas Y, Otte S, Wyatt RM, Dugovic C, Ghosh KK, Schnitzer MJ, Lovenberg T, Bonaventure P. Direct Imaging of Hippocampal Epileptiform Calcium Motifs Following Kainic Acid Administration in Freely Behaving Mice. *Front Neurosci* 2016; 29: 10-53

Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998; 21: 13-26

Bien CG, Vincent A, Barnett MH, Becker AJ, Blümcke I, Graus F, Jellinger KA, Reuss DE, Ribalta T, Schlegel J, Sutton I, Lassmann H, Bauer J. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis. *Brain* 2012; 135:1622-1638

Bien CG, Elger CE. Limbic encephalitis: a cause of temporal lobe epilepsy with onset in adult life. *Epilepsy Behav* 2007; 10: 529-538

- Bien CG, Urbach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, Vincent A, Elger CE. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2007; 69: 1236-1244
- Binah O, Berke G, Rosen D, Hoffman BF. Calcium channel blockers modify electrophysiological effects induced by lytic granules from cytotoxic T lymphocytes in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268:1581-1587
- Binah O, Marom S, Rubinstein I, Robinson RB, Berke G, Hoffman BF. Immunological rejection of heart transplant: how lytic granules from cytotoxic T lymphocytes damage guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1992; 420:172-179
- Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331-356
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 357-374
- Bragin A, Engel J Jr, Staba RJ. High-frequency oscillations in epileptic brain. *Curr Opin Neurol* 2010; 23: 151-156
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsaki G. Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 1995; 15: 47–60
- Buzsaki G. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 2002; 33: 1-20
- Buzsáki G. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 1989; 31: 551-570
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 407-420
- Buzsaki G, Leung LW, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 1983; 287: 139–171

Cao Z, Zou X, Cui Y, Hulsizer S, Lein PJ, Wulff H, Pessah IN. Rapid throughput analysis demonstrates that chemicals with distinct seizurogenic mechanisms differentially alter Ca<sup>2+</sup> dynamics in networks formed by hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol* 2015; 87:595-605

Caporale N, Dan Y. Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 25-46

Carter M, Shieh J. Gene Delivery Strategies. In: Carter M, Shieh J (eds.). *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Burlington: Academic Press 2010: 229-262

Chen SP, Ayata C. Spreading Depression in Primary and Secondary Headache Disorders. *Curr Pain Headache Rep* 2016: 44

Chevaleyre V, Siegelbaum SA. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron* 2010; 66: 560-572

Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 1995; 18: 58-60

Chrobak JJ, Lörincz A, Buzsáki G. Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 2000; 10: 457-465

Clarke SR, Barnden M, Kurts C, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 110-117

Colgin LL, Moser EI. Gamma Oscillations in the Hippocampus. *Physiology* 2010; 25: 319-329

Csicsvari J, Dupret D. Sharp wave/ripple network oscillations and learning-associated hippocampal maps. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 369: 20120528

Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990; 248: 73-76

Diaspro A, Bianchini P, Vicidomini G, Faretta M, Ramoino P, Usai C. Multi-photon excitation microscopy. *Biomed Eng Online* 2006; 5: 36

Göppert-Mayer M. Über elementarakt mit zwei quantensprüngen. *Ann Phys* 1931; 5:273-294

Ego-Stengel V, Wilson MA. Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* 2010; 20: 1–10

Ehling P, Melzer N, Budde T, Meuth SG. CD8(+) T Cell-Mediated Neuronal Dysfunction and Degeneration in Limbic Encephalitis. *Front Neurol* 2015; 15: 163

Felzen B, Berke G, Rosen D, Coleman R, Tschopp J, Young JD, Binah O. Effects of purified perforin and granzyme A from cytotoxic T lymphocytes on guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2011; 28: 643-649

Foffani G, Uzcategui YG, Gal B, Menendez de la Prida L. Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron* 2007; 55: 930-941

Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsaki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory *Nat. Neurosci.* 2009; 12: 1222-1223

Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 38: 33-60

Grafstein B. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 1956; 19: 154-171

Gu L, Kleiber S, Schmid L, Nebeling F, Chamoun M, Steffen J, Wagner J, Fuhrmann M. Long-term in vivo imaging of dendritic spines in the hippocampus reveals structural plasticity. *J Neurosci* 2014; 34: 13948-13953

Guizar-Sicairos M, Thurman ST, Fienup JR. Efficient subpixel image registration algorithms. *Opt Lett* 2008; 33: 156-158

Hebb DO. *The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory.* New York: Wiley 1949; 19: 335

- Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2005; 2: 932-940
- Helmke S, Pfenninger KH. Growth cone enrichment and cytoskeletal association of non-receptor tyrosine kinases. *Cell Motil Cytoskel* 1995; 30: 194–207
- Hjorth-Simonsen A, Jeune B. Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol* 1972; 144: 215-232
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 295: 580-623
- Kandel ER. Cellular Mechanisms of Learning and the Biological Basis of Intivduality. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill, 4. Auflage 2000: 1247-1279
- Kitamura K, Judkewitz B, Kano M, Denk W, Häusser M. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nature Methods* 2008; 5: 61-67
- Klink R, Alonso A. Morphological characteristics of layer II projection neurons in the rat medial entorhinal cortex. *Hippocampus* 1997; 7: 571-583
- Koch M, Uyttenboogaart M, Polman S, De Keyser J. Seizures in multiple sclerosis. *Epilepsia* 2008; 49: 948-953
- Kohler, C. Intrinsic connections of the retrohippocampalregion in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J Comp Neurol* 1986; 246: 149–169
- Kohler, C. Intrinsic connections of the retrohippocampalregion in the rat brain: III. The lateral entorhinal area. *J.Comp. Neurol* 1988; 271: 208–228
- Kramer DR, Fujii T, Ohiorhenuan I, Liu CY. Cortical spreading depolarization: Pathophysiology, implications, and future directions. *J Clin Neurosci* 2016; 24: 22-27
- Kröll-Seger J, Bien CG, Huppertz HJ. Non-paraneoplastic limbic encephalitis associated with antibodies to potassium channels leading to bilateral hippocampal sclerosis in a pre-pubertal girl. *Epileptic Disord* 2009; 11: 54-59

Kügler S, Kilic E, Bähr M. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther* 2003; 10: 337-347

Kurts C, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR, Miller JF. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 1997; 186: 2057-2062

Leão AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7: 359–390

Maier N, Draguhn A, Schmitz D Both M. Fast network oscillations in the hippocampus e-Neuroforum 2013; 4:1-10

McKeon A, Pittock SJ. Paraneoplastic encephalomyelopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 381-400

Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2010; 67: 470-478

Marr D. Simple memory: a theory for archicortex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 1971; B 262: 23–81

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; 309: 261–263

McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 1995; 102: 419-457

McNaughton BL, Barnes CA, Rao G, Baldwin J, Ras M. Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J Neurosci* 1986; 6: 563-571

Mesgari M, Ghaffarian N, Khaleghi Ghadiri M, Sadeghian H, Speckmann EJ, Stummer W, Gorji A. Altered inhibition in the hippocampal neural networks after spreading depression. *Neuroscience* 2015; 304: 190-197



Meuth SG, Herrmann AM, Simon OJ, Siffrin V, Melzer N, Bittner S, Meuth P, Langer HF, Hallermann S, Boldakowa N, Herz J, Munsch T, Landgraf P, Aktas O, Heckmann M, Lessmann V, Budde T, Kieseier BC, Zipp F, Wiendl H. Cytotoxic CD8+ T cell-neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death. *J Neurosci* 2009; 29: 15397-15409

Morris RG, Davis S, Butcher SP. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1990; 329: 187-204

Mukamel EA, Nimmerjahn A, Schnitzer MJ. Automated analysis of cellular signals from large-scale calcium imaging data. *Neuron* 2009; 63: 747-760

Naber PA, Lopes da Silva FH, Witter MP. Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* 2001; 11: 99-104

Nagarkatti N, Deshpande LS, DeLorenzo RJ. Development of the calcium plateau following status epilepticus: role of calcium in epileptogenesis. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 813-824

Nicotera P, Orrenius S The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1998; 23: 173-180

Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J Neurosci* 2004; 24: 2458-2464

O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford, Oxford University Press, 1978

O'Neill, Senior T, Csicsvari J. Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior. *Neuron* 2006; 49: 143-155

Otmakhov N, Gorbacheva EV, Regmi S, Yasuda R, Hudmon A, Lisman J. Excitotoxic insult results in a long-lasting activation of CaMKII $\alpha$  and mitochondrial damage in living hippocampal neurons. *PLoS One* 2015; 10: e0120881

Pape HC. Integrative Funktionen des Gehirns. In: Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. (Hrsg.) Physiologie. Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag, 6.Auflage 2010: 815-847

Paschen W. Mechanisms of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various subcellular compartments. *Cell Calcium* 2003; 34: 305-310

Patestas MA, Gartner LP Limbic System. In: Patestas MA, Gartner LP. A Textbook of Neuroanatomy. Malden (Massachusetts, USA): Blackwell Publishing Ltd, 4. Auflage 2010: 344-360

Paxinos G, Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Third Edition. Burlington: Academic Press, 2008

Phillips GJ. Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204: 9-18

Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 301-308

Saresella M, Calabrese E, Marventano I, Piancone F, Gatti A, Calvo MG, Nemni R, Clerici M. PD1 negative and PD1 positive CD4+ T regulatory cells in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 21: 927-938

Schwab N, Bien CG, Waschbisch A, Becker A, Vince GH, Dornmair K, Wiendl H. CD8+ T-cell clones dominate brain infiltrates in Rasmussen encephalitis and persist in the periphery. *Brain* 2009; 132: 1236-1246

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry* 1957; 20: 11-21

So PT, Dong CY, Masters BR, Berland KM. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu Rev Biomed Eng* 2000; 2: 399-429

Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 2001; 81: 1065-1096

Sporns O, Tononi G. Handbook of Brain Connectivity Berlin, Springer 2007: 117-147

Steward O, Scoville SA. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 1976; 169: 347-370

Suzuki WA, Amaral DG. Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J Neurosci* 1994; 14: 1856-1877

Sweatt JD. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem* 1999; 6: 399-416

Thompson SR. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol* 2012; 20: 558-566

Vago DR, Kesner RP. Disruption of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus interferes with spatial working memory and novelty detection. *Behav Brain Res* 2008; 189: 273-283

Van Harreveld A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem* 1959; 3: 300–315

Van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 272-282

Vincent A, Bien CG, Irani SR, Waters P. Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges. *Lancet Neurol* 2011; 10: 759-772

Vincent A, Crino PB. Systemic and neurologic autoimmune disorders associated with seizures or epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52: 12-17

Whishaw IQ, Vanderwolf CH. Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol* 1973; 8: 461-484

Wilson MA, McNaughton BL. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 1994; 265: 676–679

Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 405-411

Zeng LH, Xu L, Rensing NR, Sinatra PM, Rothman SM, Wong M. Kainate seizures cause acute dendritic injury and actin depolymerization in vivo. *J Neurosci* 2007; 27: 11604-11613

Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *Lancet Neurol* 2015: 956-966

## 8. Danksagung

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Stefan Remy, dem Betreuer und Initiator dieser Doktorarbeit, danken. Er hat mich stets zur Eigenständigkeit in der Erbringung wissenschaftlicher Leistung angehalten und trägt mit seinen Ideen, Vorschlägen und natürlich der Bereitstellung der exzellenten wissenschaftlichen Rahmenbedingungen den Löwenanteil am Gelingen dieser Dissertationsschrift.

Des Weiteren danke ich allen weiteren Mitarbeitern der AG Remy, besonders Falko Fuhrmann für seine geschickte und tatkräftige Unterstützung in der Anfertigung der Experimente und Daniel Justus für seine Geduld und seine unterstützenden Ideen bei der Auswertung der Daten.

Prof. Dr. Albert Becker und Prof. Dr. Susanne Schoch-McGovern danke ich für die grundlegenden Ideen zu diesem Projekt, sowie die Bereitstellung der viralen Vektoren.

Ich danke André Tittel aus der AG Kurts für die Bereitstellung von OT-Zellen und die gute und interessante Zusammenarbeit.

Christoph Möhl aus dem DZNE danke ich für Unterstützung in der Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen.

Für das sprachliche Korrekturlesen danke ich meinem Freund Malte Laub.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, allen voran Conny, für ihren Zuspruch und ihre Motivation.