Netzwerkaktivität während der Entwicklung des Präfrontalen Kortex in der Ratte

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nicole Cichon aus Hamburg

> Hamburg, 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Professor Dr. I. HANGANU-OPATZ Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. M. KNEUSSEL Tag der Disputation: 18. Oktober 2013

Hamburg, den 30. September 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

- 1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ileana Hanganu-Opatz
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Kneussel

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis VII							
Abkürzungen IX							
Zusammenfassung XI							
1	Einle	eitung		1			
	1.1	Oszilla	tionen	1			
		1.1.1	Mechanismen und Funktion von Netzwerkoszillationen	1			
		1.1.2	Eigenschaften von Oszillationen	2			
		1.1.3	Beziehung zwischen Netzwerkoszillationen und Spikes	5			
	1.2 Ontogenese oszillatorischer Aktivität		enese oszillatorischer Aktivität	6			
		1.2.1	Stimulus-abhängige und -unabhängige Netzwerkaktivität	7			
		1.2.2	Spindle Bursts	7			
	1.3	Präfro	ntaler Kortex	8			
		1.3.1	Anatomie, Funktion und Konnektivität des PFC $\ .\ .\ .\ .$.	9			
		1.3.2	Funktion präfrontaler und hippocampaler Netzwerke	11			
		1.3.3	Anatomische Entwicklung des Neokortex	11			
	1.4	Zielset	zung und Motivation	13			
2	Allg	emeine	Methoden	15			
	2.1	Messu	ngen der präfrontalen Netzwerkaktivität	15			
		2.1.1	Präparation und Messung	15			
		2.1.2	Histologie und Immunohistochemie	16			
	2.2 Datenanalyse		analyse	17			
	2.3	2.3 Statistik		17			

3	Spe	zifische	e Fragestellungen: Methoden und Ergebnisse	19				
	3.1	Detek	tion und Klassifizierung	19				
		3.1.1	Methoden	20				
		3.1.2	Ergebnisse	22				
	3.2	Frequ	enzkomponenten der Aktivitätsmuster	25				
		3.2.1	Methoden	25				
		3.2.2	Ergebnisse	26				
	3.3	Frequ	enzverteilung und Synchronitätsmuster	30				
		3.3.1	Methoden	30				
		3.3.2	Ergebnisse	34				
	3.4	Beziehung zwischen LFP und Spikes		40				
		3.4.1	Methoden	40				
		3.4.2	Ergebnisse	42				
4	Diskussion							
	4.1	Betrachtung der Methode zur Detektion und Klassifizierung oszille						
		torisc	her Events	48				
	4.2	Oszillatorische Rhythmen während der Entwicklung des PL $\ .\ .\ .$						
	4.3	Funkt	ionelle und anatomische Entwicklung des PL	52				
	4.4	Physic	ologische und patophysiologische Bedeutung	55				
Lit	Literatur							
Ar	Anhang							

Abbildungsverzeichnis

1.1	Oszillatorische Gehirnaktivität	3
1.2	Bestimmung der Amplitude, Phase und Frequenz von Oszillationen .	4
1.3	Frühe oszillatorische Aktivitätsmuster	8
1.4	Konnektivität des PFC	10
3.1	Detektion und Klassifizierung von Events	23
3.2	Berechnung von Power-Spektren	26
3.3	Aktivitätsmuster und ihre Frequenzkomponenten im PL	27
3.4	Unterscheidung von HFO und Spike-Aktivität	29
3.5	Vergleich der intralaminaren und interlaminaren Synchronisation	32
3.6	Power-Spektren für neonatale, präjuvenile und juvenile Ratten	34
3.7	Organisation der Synchronisationsmustern im PL	35
3.8	Phasenshift im PL	38
3.9	Modulation der HFO-Amplitude durch die NG/CA-Phase $\ . \ . \ .$	39
3.10	Organisation der Spiking-Aktivität	43
3.11	Phasenkopplung der Spikes	45
4.1	Aktivitätsmuster im oberen und unteren PL	53

Abbkürzungen

CA	kontinuierliche Aktivität
CFC	Kreuz-Frequenz-Kopplung (cross-frequency coupling)
СР	kortikale Platte
HFO	hochfrequente Oszillation (high-frequency oscillation)
ISI	Inter-Spike-Intervall
LFP	lokales Feldpotential (local field potential)
NG	nested gamma spindle burst
МІ	Modulations-Index (modulation index)
MUA	Spike-Aktivität mehrerer Zellen (multi-unit activity)
MZ	marginale Zone
Р	postnataler Tag
PAC	Phasen-Amplituden-Kopplung (phase-amplitude coupling)
PFC	präfrontaler Kortex
PL	prälimbischer Kortex
rms	quadratischer Mittelwert (root-mean-square)
SB	spindle burst
SD	Standardabweichung
STDP	Spike-Timing-Dependent-Plasticity

- **SUA** Spike-Aktivität einzelner Zellen (single-unit activity)
- **S1** primärer sensorischer Kortex
- **V1** primärer visueller Kortex

Zusammenfassung

Oszillationen ermöglichen eine schnelle und flexible Kommunikation zwischen weit entfernten neuronalen Netzwerken und bieten so die Grundlage für kognitive Funktionen. Im Neokortex tritt oszillatorische Aktivität in unterschiedlichen Frequenzbändern schon während früher Phasen der Entwicklung auf. Diese frühen Aktivitätsmuster spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Verschaltung heranreifender Netzwerke in Hinblick auf ihre zukünftigen funktionellen Anforderungen. Über die zeitliche und räumliche Organisation der frühen Aktivitätsmuster im Zusammenhang mit der altersabhängigen Verfeinerung von Netzwerken ist nur wenig bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der neuronalen Verarbeitung und Kommunikation in lokalen Netzwerken des präfrontalen Kortex (PFC) während früher Entwicklungsstufen. Dafür wurde die Netzwerkaktivität in unterschiedlichen kortikalen Schichten des PFC von neonatalen, präjuvenilen und juvenilen Ratten mithilfe von extrazellulären Elektroden *in vivo* gemessen. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Netzwerkaktivität im PFC während der Entwicklung von einer diskontinuierlichen Aktivität, die aus zwei unterschiedlichen Aktivitätsmustern besteht – *spindle bursts* (SB) und *nested gamma spindle bursts* (NG) – zunehmend in eine kontinuierliche Aktivitätsform übergeht. Teil dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur automatischen Detektion und Klassifizierung dieser Aktivitätsmuster. Diese Methode ermöglichte es, anschließend die Eigenschaften der SB, NG und der kontinuierlichen Aktivität bezüglich ihrer Frequenzkomponenten, Synchronisationsmuster und ihrem Einfluss auf das Feuern der präfrontalen Neurone zu untersuchen.

Frequenzanalysen zeigen, dass der Grundrhythmus aller präfrontalen Oszillationen im *theta/alpha*-Bereich (4-12 Hz) liegt. Während NG wechselt sich dieser mit einem schnelleren Rhythmus im *beta/low gamma*-Bereich (16-40 Hz) ab. Zusätzlich weisen NG eine sehr schnelle Komponente zwischen 100 und 400 Hz auf, die aufgelagert auf dem NG-Rhythmus auftritt (High Frequency Oscillations, HFO). Im neonatalen Alter unterscheidet sich die Power der Oszillationen in oberen und unteren Schichten des PFC. Dieser Unterschied ist besonders deutlich für die HFO und verschwindet mit dem Alter. Eine ähnliche Abhängigkeit von Alter und kortikaler Tiefe wurde für die Synchronität innerhalb der Frequenzbänder gefunden, die mithilfe einer Kohärenzanalyse untersucht wurde. Während die *theta/alpha*-Oszillationen eine starke intralaminare Kohärenz aufweisen, ist der *beta/low gamma*-Rhythmus Säulen-artig synchronisiert. Dieses Synchronisationsmuster verschwindet mit dem Alter. Vor allem während früher Entwicklungsstadien wird die Amplitude der HFO stark durch die Phase der Grundrhythmen moduliert. Das Spiking der präfrontalen Neurone wiederum ist stark an die Phase der HFO gekoppelt.

Die Netzwerkaktivität im heranreifenden PFC weist eine komplexe zeitliche und räumliche Struktur auf, die sich während der Entwicklung ändert. Dabei zeigt jede Entwicklungsstufe eigene Aktivitäts- und Synchronisationsmuster, die eng mit der anatomischen Reifung des PFC zusammenhängen und einen Einfluss auf die Ausbildung der Konnektivität haben könnten.

1 Einleitung

1.1 Oszillationen

Das Gehirn bietet die Basis unseres Bewusstseins. Das Zusammenspiel von Millionen einzelner Nervenzellen ermöglicht es, dass wir unsere Umwelt wahrnehmen und darauf reagieren können, dass wir in der Lage sind zu lernen und uns zu erinnern. Die Aktivität der einzelnen Neurone muss dafür in flexiblen Netzwerken organisiert werden, die miteinander kommunizieren. Für eine funktionelle Interaktion zwischen Neuronen wird die anatomische Konnektivität auf dynamische Weise moduliert. Dies kann durch eine temporäre Synchronisation ihrer Aktivität erfolgen, durch die eine Kommunikation innerhalb lokaler und entfernter Netzwerke erleichtert wird. Dabei spielen Oszillationen eine entscheidende Rolle (Singer, 1993; Fries, 2005; Wang, 2010).

1.1.1 Mechanismen und Funktion von Netzwerkoszillationen

Oszillationen unterschiedlicher Frequenzen treten in allen kortikalen Regionen auf und werden mit verschiedenen Hirnfunktionen in Verbindung gebracht (Buzsaki u. Draguhn, 2004). Sie sind zum Beispiel beteiligt an sensorischer Wahrnehmung und multisensorischer Verarbeitung (Hipp u. a., 2011), bei der Steuerung von Bewegungen (Schoffelen u. a., 2005), an Gedächtnisprozessen (Hasselmo u. a., 2002), Aufmerksamkeit (Fries u. a., 2001; Buschman u. Miller, 2007; Gregoriou u. a., 2009), Arbeitsgedächtnis (Siegel u. a., 2009) und Entscheidungsfindung (Pesaran u. a., 2008).

Aufgrund intrinsischer Membraneigenschaften zeigen einzelne Nervenzellen Resonanzverhalten, das heisst sie reagieren selektiv auf Inputs in bestimmten Frequenzen und ihr Membranpotential zeigt unter bestimmten Bedingungen oszillatorische Fluktuationen (Llinás, 1988; Hutcheon u. Yarom, 2000). Damit Netzwerkoszillationen entstehen, sind bestimmte Strukturen in der Netzwerkarchitektur (vor allem inhibitorische und rekurrente exzitatorische chemische Synapsen, aber auch elektrische Synapsen) notwendig, durch die es zu einer Synchronisation der Aktivität von Neuronenpopulationen kommt (Steriade u. Llinás, 1988; Destexhe u. Sejnowski, 2003). Das regelmäßige Feuern dieser Neurone kann wiederum durch synchrone Inputs im Zielnetzwerk Oszillationen auslösen (Bartos u. a., 2007).

Oszillationen eines Netzwerkes geben zeitliche Fenster für Inhibition und Exzitation vor. Auf diese Weise modulieren sie die Erregbarkeit von Neuronen und können ihr Feuern zeitlich koordinieren (Fries, 2005). Präzise zeitliche Koordination von Aktionspotentialen kann langfristige Auswirkungen auf die synaptische Stärke haben (Hebb, 1949). Auf diese Weise fördern Oszillationen synaptische Plastizität (Markram u. a., 1997; Bi u. Poo, 2001), die auch schon während der Entwicklung von Bedeutung ist (Bi u. Poo, 2001). Ebenso haben Oszillationen aber auch einen direkten transienten Einfluss auf die Signalübertragung. Wenn zwei entfernte Netzwerke auf kohärente Art oszillieren, erleichtert das – durch aufeinander abgestimmte zeitliche Fenster erhöhter Erregbarkeit – die Kommunikation zwischen ihnen. So werden feste anatomische Verbindungen auf dynamische und flexible Weise effektiv verstärkt (Varela u. a., 2001; Fries, 2005; Schoffelen u. a., 2005; Womelsdorf u. a., 2007).

Oszillationen in unterschiedlichen Frequenzbändern werden mit unterschiedlichen Bewusstseinszuständen in Zusammenhang gebracht (Abb. 1.1). Der *delta*-Rhythmus (0,5-4 Hz) zum Beispiel ist der dominante Rhythmus während des Schlafes (Steriade u. a., 1991), *theta*-Aktivität wird mit dem Arbeitsgedächtnis in Zusammenhang gebracht und *gamma*-Aktivität ist erhöht bei Aufmerksamkeit und Gedächtnisformierung. Generell synchronisieren langsame Oszillationen weit entfernte Netzwerke über lange Zeitfenster, während schnelle Oszillationen lokale Netzwerke für kurze Zeit synchronisieren (Kopell u. a., 2000; Buzsaki u. Draguhn, 2004). Oszillationen in unterschiedlichen Frequenzbändern können auch gleichzeitig auftreten. Dabei synchronisieren langsame Oszillationen lokale Netzwerke in entfernten Regionen, indem sie die Zeitfenster für das Auftreten von schnellen lokalen Oszillationen bestimmen (Buzsaki u. Draguhn, 2004).

1.1.2 Eigenschaften von Oszillationen

Eine Methode zur Messung von Hirnaktivität ist die Ableitung mithilfe von extrazellulären Elektroden. Diese Elektroden messen extrazellulär die Änderungen des Membranpotentials einer ganzen Neuronenpopulation – das lokale Feldpotential (local field potential, LFP). Das LFP spiegelt hauptsächlich die Summe der postsynap-



Abbildung 1.1 – Oszillatorische Gehirnaktivität. Im Gehirn treten Oszillationen in verschiedenen Frequenzbändern auf, die an unterschiedlichen Funktionen und Bewusstseinszuständen beteiligt sind. Diese Tabelle zeigt die bekanntesten Frequenzbänder und einige Funktionen, mit denen diese in Verbindung gebracht werden (Wang, 2010).

tischen Potentiale aller Zellen in der Umgebung der Elektrode wider (Buzsaki u. a., 2003; Buzsáki, 2004). Fluktuieren die Membranpotentiale dieser Zellen synchron, werden Netzwerkoszillationen gemessen.

Wichtige Eigenschaften zur Charakterisierung von Netzwerkoszillationen sind die Frequenz der Oszillation und ihre Amplitude, beziehungsweise die Power in den einzelnen Frequenzbändern. Die Amplitude gibt die maximale Auslenkung des Signals wieder. Die Größe der Auslenkung eines Signals mit einer festen Amplitude wird durch die Phase festgelegt. Sie enthält die Information über den aktuellen Abschnitt des Oszillationszyklus. Instantane Phase und Amplitude können über die Hilbert-Transformation berechnet werden. Innerhalb einer Periode nimmt die Phase Werte zwischen $-\pi$ an einem Trough und π am nächsten Trough an, mit einer Phase von 0 an den Peaks. Die Dauer einer Periode T bestimmt die Frequenz der Oszillation, die durch $f = \frac{1}{T}$ gegeben ist. Durch eine Fourier-Analyse kann das Signal von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne umgewandelt werden (Abb. 1.2). Dabei wird das Signal in Sinus- und Kosinusfunktionen zerlegt. Jede dieser Funktionen hat eine eindeutige Frequenz und Amplitude. Ein Powerspektrum zeigt die Signalstärke in Abhängigkeit der Frequenz an.



Abbildung 1.2 – Bestimmung der Amplitude, Phase und Frequenz von Oszillationen. Oszillatorisches Signal in der Zeitdomäne (links) mit dazugehöriger Amplitude (grün) und Phase (unten, rot) für jeden Zeitpunkt und dasselbe Signal nach Umwandlung in die Frequenzdomäne (rechts).

1.1.3 Beziehung zwischen Netzwerkoszillationen und Spikes

Mit einer extrazellulären Elektrode können neben dem LFP, das in erster Linie die Eingänge des Netzwerkes widerspiegelt, auch die Aktionspotentiale von Zellen gemessen werden, die sich in unmittelbarer Nähe zur Elektrode befinden (Buzsáki, 2004). Die Spikes spiegeln im Gegensatz zum LFP die Ausgänge des Netzwerkes wider. Mit Hilfe eines Hochpassfilters kann das schnelle Spike-Signal von den langsameren Netzwerkoszillationen getrennt werden (Schomburg u. a., 2012). Anhand ihrer Wellenform ist es möglich Spikes von unterschiedlichen Zellen zu unterscheiden (Harris u. a., 2000). Die Unterschiede in der Wellenform können Aufschluss über den Zelltyp geben. Die Spikes von Interneuronen sind in der Regel schneller als die von Pyramidenzellen (Bartho, 2004). Aber auch Spikes von mehreren Neuronen des gleichen Typs können durch die unterschiedliche Entfernung zur Elektrode anhand ihrer Wellenform unterschieden werden (Gold u. a., 2006).

Sind die Eingänge eines Netzwerkes synchronisiert, erleichtert das die Integration der synaptischen Potentiale und erhöht damit die Feuer-Wahrscheinlichkeit einzelner Zellen. Netzwerkoszillationen modulieren in rhythmischer Weise die Erregbarkeit einer Zellpopulation, was zu einer synchronisierten Spiking-Aktivität im gesamten Netzwerk führt. Die synchronisierten Output-Signale haben wiederum einen höheren Einfluss auf ihre Zielnetzwerke. Außerdem ist zeitlich abgestimmtes Feuern die Grundlage für synaptische Plastizität.

Die zeitliche Koordination von Spikes bietet neben der Feuerrate einen weiteren Mechanismus der Informations-Kodierung (Singer, 1993). Oft treten Spikes bevorzugt zu einer bestimmten Phase der Netzwerkoszillation auf. Ein in Ratten und Mäusen ausführlich untersuchtes Beispiel sind die *place cells* des Hippocampus. Diese Pyramidenzellen feuern, wenn sich das Tier an einer bestimmten Stelle eines bekannten Raumes befindet – dem *place field* dieser Zelle (O'Keefe u. Dostrovsky, 1971). Das Feuern einer *place cell* gibt also Aufschluss darüber, ob sich das Tier im *place field* dieser Zelle befindet, wobei die Feuerrate im Zentrum des Feldes am höchsten ist. Die Information über die genaue Position innerhalb dieses *place field* ist in der Spikezeit relativ zur Netzwerkoszillation kodiert. *place cells* zeigen eine Präferenz für bestimmte Phasen der *theta*-Oszillation im Hippocampus. Wenn das Tier ein *place field* betritt, feuert die entsprechende Zelle bevorzugt zu einer bestimmten Phase der Oszillation. Diese Phasenpräferenz verschiebt sich zunehmend zu früheren Phasen, wenn sich das Tier entlang des *place field* bewegt. Die Information über die Position des Tieres ist also in einer Kombination aus Raten- und Phasen-Kode enthalten (O'Keefe u. Recce, 1993; O'Keefe u. Burgess, 2005). Auch außerhalb des Hippocampus spielt die Kopplung zwischen Spikes und Oszillationsphase eine Rolle, so ist zum Beispiel im präfrontalen Kortex die Information über einzelne Objekte im Kurzzeitgedächtnis phasenkodiert (Siegel u. a., 2009).

1.2 Ontogenese oszillatorischer Aktivität

Oszillationen sind nicht nur im adulten Gehirn von großer Bedeutung, sondern spielen bereits während der Entwicklung eine entscheidende Rolle.

Die neuronale Entwicklung beginnt mit der Proliferation, Migration und Differenzierung von Nervenzellen. Während der Proliferation teilen und vermehren sich Stammzellen aus denen Neurone hervorgehen, die dann durch Migration an ihre Zielposition gelangen. Die Differenzierung der Neurone umfasst die Entwicklung elektrischer Erregbarkeit, Transmitterspezifizierung und die Ausbildung von Axonen und Dendriten. Diese Vorgänge legen die Grundarchitektur des Netzwerkes fest (Spitzer, 2006; Blankenship u. Feller, 2009; Kilb u. a., 2011). Hauptsächlich sind diese Vorgänge von genetischen Faktoren abhängig. Genexpression führt zur Synthese von Ionen-Kanälen, Rezeptoren und Liganden und molekulare Signalstoffe steuern erste Zell-Zell-Interaktionen (Katz u. Shatz, 1996; Polleux, 2005; Khazipov u. Luhmann, 2006). Aber auch unkoordinierte elektrische Aktivität (vor allem in Form von Ca^{2+} -Strömen) spielt hierbei eine Rolle. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hat eine regulatorische Funktion für die Genexpression und viele Signalwege (Spitzer, 2006; Blankenship u. Feller, 2009).

Anschliessend findet die Entstehung von Synapsen, die Festlegung der Konnektivität und eine Verfeinerung der Netzwerkarchitektur statt. Dabei ist eine frühe Form koordinierter Netzwerkaktivität von entscheidender Bedeutung (Katz u. Shatz, 1996; Khazipov u. Luhmann, 2006; Hanganu-Opatz, 2010; Kilb u. a., 2011). Diese Muster früher oszillatorischer Aktivität und ihre Rolle während der Entwicklung wurden für die sensorischen Kortices am ausführlichsten beschrieben (Hanganu u. a., 2006; Huberman u. a., 2006; Yang u. a., 2009). Im adulten Gehirn ist der sensorische Kortex in somatotopischen Karten organisiert, die die Topologie der Peripherie widerspiegeln (Mountcastle, 1957). Diese Organisation wird schon früh in der Entwicklung unter Beteiligung von Oszillationen angelegt (Minlebaev u. a., 2011).

1.2.1 Stimulus-abhängige und -unabhängige Netzwerkaktivität

Hubel u. Wiesel (1970) haben gezeigt, dass elektrische Aktivität und visuelle Erfahrung für die Ausbildung von okulären Dominanzsäulen notwendig sind. Wurde bei neonatalen Katzen während einer bestimmten Entwicklungsphase ein Auge depriviert, reagierten viele Zellen im visuellen Kortex später nicht mehr auf Stimulationen dieses Auges. Eine Deprivierung vor oder nach dieser kritischen Phase zeigt eine geringe oder gar keine Auswirkung. Dieser Effekt ist nicht spezifisch für das visuelle System, sondern wurde auch für andere sensorische Systeme beschrieben. So zeigten zum Beispiel Ratten, die in der frühen Entwicklung unnatürlichen Geräuschen ausgesetzt waren, Veränderungen im auditorischen Kortex (de Villers-Sidani u. a., 2007). Sensorische Erfahrungen während der kritischen Phase und die elektrischen Aktivitätsmuster, die durch externe Reize erzeugt werden, dienen der Verfeinerung von Netzwerkverbindungen und somatotopischen Karten im Kortex.

Die grobe Anlage der somatotopischen Karten entsteht jedoch schon früher während der präkritischen Phase (Feller u. Scanziani, 2005). Schon während dieser Zeit treten Oszillationen im Kortex auf. Diese sind jedoch unabhängig von externen Reizen. So treten zum Beispiel in der Retina durch spontanes Feuern von Ganglienzellen retinale Wellen auf. Diese werden über den Thalamus in den primären visuellen Kortex (V1) geleitet, wo sie oszillatorische Netzwerkaktivität hervorrufen (Hanganu u. a., 2006). Oszillationen in der präkritischen Phase sind beteiligt an der Ausbildung und Verfeinerung von synaptischen Verbindungen und bereiten so das Netzwerk auf spätere Aufgaben vor (Goodman u. Shatz, 1993; Feller u. Scanziani, 2005).

1.2.2 Spindle Bursts

In unterschiedlichen Hirnarealen und verschiedenen Spezies wurden Muster früher koordinierter elektrischer Aktivität gefunden (Abb. 1.3). So zeigen EEG-Messungen bei frühgeborenen Säuglingen ab der 28. Schwangerschaftswoche ein als *delta-brushes* bezeichnetes Aktivitätsmuster, das aus spindelförmigen Oszillationen mit einer Frequenz zwischen 8 und 25 Hz besteht, die überlagert auf langsamen *delta*-Wellen (0.3-1.5 Hz) auftreten (Dreyfus-Brisac u. Larroche, 1971; Anderson u. a., 1985; Lamblin u. a., 1999). *In vitro*-Messungen im Neokortex von Ratten und Mäusen zeigen ein ähnliches diskontinuierliches Aktivitätsmuster, das als *spindle burst* bezeichnet wird (Khazipov u. a., 2004; Hanganu u. a., 2006; Yang u. a., 2009). *spindle bursts* im primären visuellen (V1) und primären somatosensorischen (S1) Kortex haben

A. Mensch (25.-28. Schwangerschaftswoche)



Abbildung 1.3 – Frühe oszillatorische Aktivitätsmuster (A) beim Menschen und (B) im primären visuellen und somatosensorischen Kortex der Ratte (Abbildung angepasst aus Hanganu-Opatz (2010)).

eine Frequenz zwischen 5 und 25 Hz und eine Dauer von etwa 1s. Sie werden in lokalen Netzwerken generiert und können spontan in den sensorischen Kortices auftreten oder werden durch die Aktivierung von metabotropen Glutamat- oder muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren oder durch sensorische Eingänge hervorgerufen (Khazipov u. Luhmann, 2006; Hanganu-Opatz, 2010).

1.3 Präfrontaler Kortex

Β.

Obwohl die Funktion der Netzwerkoszillationen in den heranreifenden sensorischen Arealen eingehend untersucht wurde, ist über die Bedeutung von Oszillationen für die Entwicklung der Hirnareale, die für kognitive Leistungen verantwortlich sind, nur wenig bekannt. Eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl kognitiver Prozesse spielt der präfrontale Kortex (PFC), der Assoziationskortex des Frontallappens (Fuster, 2002). Die Bedeutung des PFC liegt mit in seiner Konnektivität begründet. Er ist die Hirnregion mit den meisten Verbindungen zu anderen Strukturen. Zum Beispiel bekommt er – indirekt über die Assoziationskortices – Eingänge von allen sensorischen Systemen, dessen Informationen im PFC integriert werden. Auch Verbindungen mit dem limbischen System sind von entscheidender Bedeutung. Eine besonders wichtige Rolle nimmt dabei der Hippocampus ein (Gao u. a., 2012).

1.3.1 Anatomie, Funktion und Konnektivität des PFC

Sowohl in phylogenetischer als auch in ontogenetischer Hinsicht ist der PFC die zuletzt reifende Hirnregion (Fuster, 2002). Er ist beim Menschen am weitesten ausgebildet (Brodmann, 1909) und seine ontogenetische Entwicklung ist erst im Erwachsenenalter abgeschlossen (Choudhury u. a., 2008). Per ursprünglicher Definition ist der PFC in allen Spezies die Hirnregion, die reziproke Eingänge vom mediodorsalen Thalamus erhält (Rose u. Woolsey, 1948). Inzwischen werden zusätzliche Merkmale bezüglich der Konnektivität, Zellarchitektur und Funktion herangezogen, um den PFC in unterschiedlichen Spezies zu identifizieren (Van Eden u. Uylings, 1985; Pandya u. Yeterian, 1990; Birrell u. Brown, 2000; Dalley u. a., 2004). Man geht davon aus, dass alle Säugetiere einen PFC besitzen. Bei Nagetieren besteht der PFC aus drei räumlich getrennten Arealen – dem medialen, dem orbitalen und dem lateralen PFC– die sich auch in ihren Funktionen unterscheiden (Dalley u. a., 2004).

Zu den höheren kognitiven Fähigkeiten, an denen der mediale PFC beteiligt ist, gehören zum Beispiel das Arbeitsgedächtnis, Aufmerksamkeit und das Treffen von Entscheidungen (Goldman-Rakic, 1995; Birrell u. Brown, 2000; Dalley u. a., 2004; Hoover u. Vertes, 2007). Der mediale PFC ist in drei weitere Subregionen untergliedert – der cinguläre Kortex ist an der Planung von Bewegungsabläufen beteiligt, der infralimbische Kortex beeinflusst autonome viszerale Aktivität und der prälimbische Kortex spielt eine Rolle bei kognitiven Prozessen (Hoover u. Vertes, 2007).

Der PFC bildet eine Vielzahl an Verbindungen mit anderen kortikalen und subkortikalen Strukturen, die meisten sind reziprok. Zu den kortiko-kortikalen Verbindungen gehören reziproke Verbindungen mit sensorischen Kortices, dem perirhinalen und entorhinalen Kortex und nicht-rekurrente Afferenzen des Hippocampus. Zu den subkortikalen Strukturen, die Verbindungen mit dem PFC ausbilden, gehören die Basalganglien, die Amygdala und der Thalamus (Uylings u. Van Eden, 1990). Für kognitive Funktionen sind hauptsächlich Verbindungen zwischen dem prälimbischen Kortex (PL) und dem Hippocampus, dem Nucleus accumbens, dem insulären Kortex, Kernen der Amygdala und des Thalamus und dem ventralen Tegmentum wichtig (Vertes, 2006). Der PFC bildet ein enges Netzwerk mit dem Hippocampus und dem Thalamus, deren Kommunikation neuromodulatorisch beeinflusst wird (Abb.1.4).



Abbildung 1.4 – Konnektivität des adulten PFC. Der PFC bildet ein enges Netzwerk mit anderen kortikalen und subkortikalen Strukturen. Für kognitive Funktionen sind die Verbindungen mit dem Hippocampus und Thalamus besonders bedeutend (rot). Die Aktivität innerhalb dieses Netzes wird durch neuromodulatorische Eingänge beeinflusst (blau).

1.3.2 Funktion präfrontaler und hippocampaler Netzwerke

Der Hippocampus ist in erster Linie an mnemonischen Prozessen beteiligt, der Koordination von Gedächtnisinhalten, Gedächntniskonsolidierung und räumlicher Orientierung (O'Keefe u. Dostrovsky, 1971; Bontempi u. a., 1999; Broadbent u. a., 2004). Viele kognitive Funktionen erfordern eine Kommunikation zwischen Hippocampus und PFC. Im adulten Gehirn wird korrelierte Aktivität in den beiden Regionen zum Beispiel mit räumlichem Arbeitsgedächtnis (Jones u. Wilson, 2005) und Lernprozessen (Benchenane u. a., 2010) in Zusammenhang gebracht. Der PFC erhält direkte Eingänge vom Hippocampus, wohingegen die Projektionen vom PFC zum Hippocampus indirekt über den entorhinalen Kortex und den Thalamus laufen (Hasselmo, 2005; Vertes, 2006). Der prälimbische Kortex wird am stärksten vom Hippocampus innerviert (Vertes, 2006). Bei der Koordination der beiden Regionen spielen hippocampale Oszillationen im theta-Frequenzband eine entscheidende Rolle. Diese synchronisiseren präfrontale Neurone (Hyman u.a., 2005; Siapas u.a., 2005) und modulieren lokale gamma-Oszillationen im PFC (Sirota u. a., 2008). Diese Synchronisation zwischen Hippocampus und PFC könnte die synaptische Plasitizität beeinflussen und einen Mechanismus zur Festigung von Gedächtnisinhalten darstellen (Siapas u. a., 2005).

Die Konnektivität zwischen Hippocampus und PFC entsteht bereits früh in der Entwicklung. Eine korrelierte Aktivität der beiden Regionen scheint daran beteiligt zu sein. Eingänge aus dem Hippocampus steuern die Aktivität im neonatalen PFC (Brockmann u. a., 2011) und eine gestörte Kommunikation führt zu kognitiven Defiziten (Krüger u. a., 2012). Das Feuern der präfrontalen Neurone ist im neonatalen Alter mit der Spikingaktivität im Hippocampus korreliert, was einen Einfluss auf deren Konnektivität haben könnte (Brockmann u. a., 2011).

1.3.3 Anatomische Entwicklung des Neokortex mit Fokus auf den prälimbischen Kortex

Die Organisation des Neocortex in kortikalen Schichten entsteht schon früh in der Entwicklung (Rakic, 1988). Die ventrikuläre Zone an der Oberfläche der lateralen Ventrikel besteht aus proliferierenden Zellen, die durch Zellteilung und anschliessende Differenzierung sowohl Neurone als auch Gliazellen hervorbringen (Rakic, 1971). Die ersten postmitotischen Zellen bilden die Präplatte zwischen Pia mater und ventrikulärer Zone (Bystron u. a., 2006). Die danach entstehenden Neurone wandern an Gliazellen entlang (Rakic, 1971) in Richtung der kortikalen Oberfläche und bilden dort die kortikale Platte. Die kortikale Platte trennt die Präplatte in zwei Regionen - die superfizielle Marginalzone, die vor allem Cajal-Retzius-Zellen enthält, und die tiefer liegende Subplatte (Bystron u. a., 2008). Die Cajal-Retzius-Zellen der Marginalzone exprimieren das Glykoprotein Reelin, das die Migration der kortikalen Zellen terminiert (Tissir u. Goffinet, 2003). Die ersten Zellen der Kortikalplatte bilden später die kortikale Schicht VI. Die nächsten Zellen wandern an diesen Zellen vorbei bis zur Grenze zwischen Kortikalplatte und Marginalzone und bilden dort die nächste Schicht. So enstehen die kortikalen Schichten von innen nach außen, bis als letztes Schicht II entsteht (Rakic, 1988). Schicht I bildet sich aus der Marginalzone (Bystron u. a., 2008). Die Neurone der Subplatte sind die Zellen mit den reifsten physiologischen Eigenschaften im heranreifenden Neokortex. Sie erhalten funktionelle neuromodulatorische und thalamische Eingänge und projizieren in die korikale Platte (Hanganu u. a., 2002). Sie sind an der Entstehung und Weiterleitung früher elektrischer Aktivitätsmuster beteiligt und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung (Kanold u. Luhmann, 2010).

Die Entwicklung der prälimbischen Schichten entspricht weitgehend diesem allgemeinen Schema. Jedoch reift der PFC später als andere kortikale Strukturen. Zudem fehlt im PL Schicht IV, die in den sensorischen Kortices durch thalamische Projektionen innerviert wird (Van Eden u. Uylings, 1985; Uylings u. Van Eden, 1990). Der prälimbische Kortex der Ratte besteht am ersten postnatalen Tag aus der Marginalzone, der kortikalen Platte und der Subplatte. Schicht VI bildet sich und enthält schon einige weiter entwickelte Zellen. Am Ende der ersten postnatalen Woche ist die Entstehung der kortikalen Schichten weitestgehend abgeschlossen. Im Gegensatz zu den sensorischen Kortices befinden sich die präfrontalen Schichten jedoch noch in einem unreifen Zustand. Schicht II und III sind noch nicht ausgebildet, aber in der bilaminaren Erscheinung der Kortikalplatte bereits zu erkennen. Die Zellen sind noch nicht vollständig differenziert. Auch Schicht V ist noch unterentwickelt. Nur Schicht VI zeigt bereits Merkmale der erwachsenen Schicht. An P10 können Schicht II und III klar unterschieden werden. Ausserdem finden erhebliche Reifungsprozesse in Schicht V statt. Die Zellarchitektur nimmt von nun an immer stärker adulte Strukturen an. An P14 sind Schicht II und III weitestgehend differenziert und die Unterschiede zum adulten Kortex liegen hauptsächlich in der Dicke der einzelnen Schichten (Van Eden u. Uylings, 1985).

An der Entstehung der Netzwerkarchitektur sind sowohl genetische Faktoren und molekulare Signalstoffe als auch frühe oszillatorische Aktivität beteiligt.

1.4 Zielsetzung und Motivation

In den sensorischen Kortices werden schon in frühen Entwicklungsstadien oszillatorische Aktivitätsmuster gefunden, die für die korrekte Entstehung und Verschaltung funktioneller Netzwerke eine entscheidende Rolle spielen. Auch in Assoziationskortices, wie dem präfrontalen Kortex, treten ähnliche diskontinuierliche Oszillationen in der frühen Entwicklung auf (Brockmann u. a., 2011). Über ihre Eigenschaften, ihre Generierung und ihre Rolle bei der Reifung kognitiver Verarbeitung ist noch wenig bekannt. Hippocampale Oszillationen im *theta*-Frequenzband regen Netzwerkaktivität im neonatalen prälimbischen Kortex an und eine gestörte Kommunikation zwischen den beiden Regionen führt zu kognitiven Beeinträchtigungen (Krüger u. a., 2012). Die Kommunikation zwischen PFC und Hippocampus wird durch cholinerge Projektionen beeinflusst (Janiesch u. a., 2011).

Die frühen präfrontalen Oszillationen haben eine komplexe Struktur und beinhalten ein breites Spektrum an Frequenzbändern. Inwieweit diese frühe Netzwerkaktivität mit der anatomischen Reifung des PFC korreliert und diese beeinflusst, ist noch unklar. Der PFC ist eine spät in der Entwicklung reifende Hirnregion und die anatomischen Strukturen unterliegen bis zur juvenilen Entwicklungsphase noch Reifungsprozessen.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit geklärt werden:

- Was sind die Eigenschaften prälimbischer Netzwerkaktivität und der unterschiedlichen Frequenzkomponenten? Und wie ändern sich diese während der postnatalen Entwicklung?
- Welchen Einfluss hat die Entwicklung der kortikalen Schichten auf die funktionelle Kopplung im PL?
- Arbeitet der heranreifende PL in funktionellen Einheiten, wie es für den erwachsenen PFC (Kritzer u. Goldman-Rakic, 1995) und primäre sensorische Kortices in der Entwicklung (Yang u. a., 2009; Minlebaev u. a., 2011) beschrieben wurde?

• Inwiefern hat die oszillatorische Netzwerkaktivität Einfluss auf das Feuern prälimbischer Neurone?

Es wurden lokale Feldpotentiale (LFP) und Spiking-Aktivität in verschiedenen Schichten des PL und über die gesamte postnatale Entwicklung gemessen. Die räumliche und zeitliche Organisation der Netzwerkaktivität und das Feuern einzelner Neurone wurde in Beziehung zur anatomischen Reifung des PL untersucht.

2 Allgemeine Methoden

2.1.1 Präparation und Messung

Alle Experimente wurden nach deutschem Recht und nach den Richtlinien des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt und wurden vom lokalen Ethikkommitee überprüft (94/08, 111/12). Schwangere Wistar-Ratten wurden zwischen dem 14. und 17. Trächtigkeitstag aus der Tierversuchshaltung des Universitätsklinikum Eppendorf geliefert, individuell in Brutkäfigen mit einem hell/dunkel Zyklus von jeweils 12 Stunden gehalten und *ad libitum* gefüttert. Extrazelluläre Messungen wurden im PFC (1.5-2.5 mm anterior zu Bregma, 0.1-1mm lateral zur Mittellinie) männlicher Ratten zwischen postanatalem Tag (P) 7 und 15 durchgeführt. Die experimentellen Protokolle wurden von Brockmann et al. (2011) beschrieben. Unter leichter Urethan-Anästhesie (1g/kg; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) wurde der Kopf der Ratte im stereotaxischen Apparat (Stoelting, Wood Dale, IL) fixiert. Dafür wurde jeweils ein Metallstäbchen mit Zahnzement auf dem nasalen und okzipitalem Knochen befestigt. Um den Knochen über dem PFC zu entfernen, wurde ein Loch von 0.5-1 mm Durchmesser gebohrt. Die darunterliegende Dura Mater wurde nicht entfernt, da ein Austritt von Blut und der cerebrospinalen Flüssigkeit die kortikale Aktivität und das neuronale Feuern reduziert (I. Hanganu-Opatz, persönliche Beobachtung). Der Körper der Tiere wurde mit Baumwolle umhüllt und auf eine Heizplatte gelegt, um die Körpertemperatur konstant bei 37°C zu halten. Nach einer Erholungsphase von 20-40 min wurden Multielektroden-Arrays (Silicon Michigan probes, NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) im rechten Winkel zur Schädeloberfläche und parallel zur Mittellinie bis zu einer Tiefe von 3 mm in den PFC eingeführt. Die Elektroden wurden mit Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethyl-Indocarbocyanin, Invitrogen, Darmstadt, Germany) eingefärbt, um post mortem in histologischen Schnitten die genaue Position der Elektroden rekonstruieren zu können. Ein Silberdraht wurde als Erdung und Referenzelektrode in das Cerebellum eingeführt. Miniatur-Kopfhöhrer wurden unter dem Rattenkörper plaziert, um selbst kleinste Bewegungen der Pfoten und die Atmung der Ratte während der Messung sichtbar zu machen.

Mit 32-Kanal-Michigan-Elektroden (0.5-3 M Ω), die vier Shanks mit jeweils acht Ableitstellen besaßen, wurden simultan das LFP und die Spikingaktivität im PFC gemessen. Die einzelnen Shanks waren 200 µm voneinander entfernt. Die einzelnen Ableitstellen auf einem Shank hatten einen Abstand von 50 oder 100 µm. Die Ableitstellen deckten den gesamten prälimbischen Kortex (PL) ab (Van Eden and Uylings, 1985). LFP und Spikes wurden bei einer Abtastrate von 32kHz für 40-60 min aufgenommen. Dafür wurde ein Multikanal-Extrazellulär-Verstärker (Digital Lynx 4S, Neuralynx, Bozeman, MO) und die dazugehörende Software (Cheetah) verwendet. Während der Aufnahme wurde das Signal zwischen 0.1 Hz und 5 kHz Bandpassgefiltert.

2.1.2 Histologie und Immunohistochemie

Nach der elektrophysiologischen Messung wurden die Ratten mit 10% Ketamin (ani-Medica, Senden-Bösensell, Germany)/ 2% Xylazin (WDT, Garbsen, Germany) in NaCl (10 μ l/g Körpergewicht, intraperitoneal) tief anästhesiert und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entfernt und in derselben Lösung für mindestens 24h nachfixiert. Dann wurden Koronalschnitte mit einer Dicke von 100 μ m angefertigt und bei -80°C gelagert.

Für die Rekonstruktion der mit DiI angefärbten Elektrodenspuren im PFC wurde eine Fluoreszenz-Nissl-Färbung durchgeführt (Quinn et al., 1995). Als Färbemittel wurde NeuroTrace (R) 500/525 Green Fluorescent Nissl Stain (Invitrogen) verwendet. Dafür wurden rehydrierte Schnitte für 20 min mit 1:100 verdünntem NeuroTrace inkubiert, danach gewaschen, mit Fluoromont und Deckgläsern bedeckt und unter Verwendung der 488 und 568 nm Filter an einem Imager M1 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany) untersucht. Helligkeit und Kontrast der Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS4 eingestellt.

2.2 Datenanalyse

Die Analyse der Daten erfolgte offline mit Matlab Version 7.7 (Mathworks, Natick, MA). Die Signale wurden in Matlab importiert. Für die LFP-Analyse wurden die Signale unter Verwendung eines Butterworth-Filters dritter Ordnung Tiefpass-gefiltert (<1500 Hz) und danach die Abtastrate auf 3255 Hz reduziert. Alle Filter-Prozesse wurden in Phasen-erhaltender Weise durchgeführt.

2.3 Statistik

Die Daten im Text sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. In Abbildungen sind diese als Balkendiagramme gezeigt. Für den Vergleich einzelner Gruppen wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test in Matlab durchgeführt. Signifikanzstufen von p<0,05 (*), p<0,01 (**) oder p<0,001 (***) wurden ermittelt.

3 Spezifische Fragestellungen: Methoden und Ergebnisse

Die prälimbische Region (PL) des präfrontalen Kortex (PFC) zeigt während der ersten postnatalen Woche diskontinuierliche Muster von Netzwerkaktivität, die durch eine einseitig gerichtete Kommunikation vom *theta*-Rhythmus der CA1-Region des Hippocampus angetrieben werden. Mit der Entwicklung nimmt die Dauer, die Häufigkeit und die Amplitude dieser Oszillationen zu. Am Ende der zweiten postnatalen Woche zeigt der PL kontinuierliche Netzwerkaktivität und wechselseitige Interaktion mit dem Hippocampus (Brockmann u. a., 2011).

In dieser Studie wurde die räumliche Organisation der Netzwerkaktivität im PL während unterschiedlicher Entwicklungsphasen in der zweiten postnatalen Woche untersucht. Dafür wurden mit Multielektroden-Arrays das LFP und die Spiking-Aktivität im PL von neonatalen (P7-9), prä-juvenilen (P10-12) und juvenilen (P13-15) Urethan-anästhesierten Ratten (n=6 in jeder Altersgruppe) *in vivo* gemessen.

3.1 Detektion und Klassifizierung der oszillatorischen Aktivität im prälimbischen Kortex während der postnatalen Entwicklung

In der zweiten postnatalen Woche unterscheidet sich die Aktivität im PFC noch stark von den adulten Aktivitätsmustern. Oszillationen treten spontan als relativ kurze Events auf, die von Rauschen mit geringer oszillatorischer Aktivität unterbrochen sind. Diese diskontinuierlichen oszillatorischen Events lassen sich visuell in zwei Klassen unterteilen — *spindle bursts* (SB) und *nested gamma spindle bursts* (NG), die sich bezüglich ihrer Amplitude und Frequenzkomponenten unterscheiden (Brockmann u. a., 2011). Aufgrund der Komplexität und Variabilität der Signale erfordert die visuelle Detektion und Klassifizierung der Events ein großes Maß an Erfahrung des Experimentators. Deshalb wurde eine unüberwachte Methode entwickelt, um auf objektive Weise Episoden oszillatorischer Aktivität zu detektieren und zwischen SB und NG zu unterscheiden.

3.1.1 Methoden

Detektion

Diskontinuierliche oszillatorische Events und Perioden kontinuierlicher Aktivität mit erhöhter Amplitude werden detektiert, indem ein für jede Messung spezifischer Schwellenwert auf das Signal angewendet wird. Die Festlegung des Schwellenwertes ist durch die Variabilität der Signale erschwert. Mit dem Alter der Ratten erhöht sich die Häufikeit des Auftretens von diskontinuierlichen Oszillationen, während ihre Amplitude abnimmt. Auch die kontinuierliche Aktivität in der juvenilen Entwicklungsphase hat eine variable Amplitude. Der korrekte Schwellenwert für die Detektion von oszillatorischen Events ist also von Messung zu Messung unterschiedlich und muss individuell an das Signal-Rausch-Verhältnis angepasst werden, dabei aber unabhängig von der absoluten Amplitude und der Anzahl der Oszillationen sein.

Für die Detektion wird zuerst der quadratische Mittelwert (root-mean-square, rms) des zwischen 4 und 100 Hz Bandpass-gefilterten Signals in gleitenden Fenstern mit einer Länge von 200 ms berechnet. Um einen Schwellenwert für die Detektion zu bestimmen, wurde für jede Messung ein Histogramm des rms für einen definierten Zeitabschnitt, der oszillatorische Events enthielt, berechnet. Dieser Zeitabschnitt hatte eine Länge von 5 min und begann 15 min nach dem Start der Messung, um jegliche Art von Randeffekten auszuschliessen. In der Verteilung der rms-Werte sollten im Idealfall zwei Peaks zu erkennen sein. Ein erster Peak sollte bei niedrigen rms-Werten liegen. Dieser spiegelt die mittlere Amplitude des Rauschens wieder. Ein zweiter Peak bei höheren Werten sollte die mittlere Amplitude der oszillatorischen Events anzeigen. Der Peak der rms-Verteilung im Bereich niedriger rms-Werte wurde mit einer Gauss-Funktion angepasst.

$$f(x) = ae^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$
(3.1)

Aus der Funktion lassen sich Mittelwert μ und Standardabweichung σ der Gauss-Verteilung bestimmen, um den Schwellenwert für die Detektion von Oszillationen festzulegen. Zeitabschnitte mit rms-Werten $\geq \mu + 2\sigma$ wurden als Oszillationen detektiert. Alle aufeinanderfolgenden Oszillationen mit Inter-Event-Intervallen <100 ms wurden als einzelnes Event zusammengefasst. Für die weitere Analyse wurden nur Oszillationen mit einer Dauer >1 s berücksichtigt. Perioden erhöhter oszillatorischer Aktivität während der kontinuierlichen Aktivität (CA) wurden auf dieselbe Weise detektiert.

Klassifizierung

Nach der Detektion der oszillatorischen Events wird schon bei einer visuellen Betrachtung deutlich, dass zwei Aktivitätsmuster (SB und NG) vorliegen, die sich vor allem in ihrer Amplitude und in ihren Frequenzkomponenten unterscheiden. Um diese Unterschiede zu quantifizieren, wurden für jedes Event vier Merkmale bestimmt: (i) der maximale rms-Wert, (ii) der maximale Wert der ersten Ableitung des rms-Signals, (iii) der mittlere zeitliche Abstand zwischen den *troughs* der Oszillation und (iv) die Power zwischen 16 und 40 Hz, die auf die Power zwischen 4 und 50 Hz normalisiert wurde. Um den mittleren zeitlichen Abstand zwischen den *troughs* [feature (iii)] zu bestimmen, wurde das Elektrodensignal Bandpass-gefiltert (4-40 Hz) und über die Hilbert-Transformation die Phase der Oszillation berechnet (Varela u. a., 2001; Quian Quiroga u. a., 2002). Eine Phase von 0 entspricht einem Peak, eine Phase von $+\pi$ oder $-\pi$ einem *trough* der Oszillation. *Troughs* wurden als Zeitpunkte detektiert, zu denen die Phase der Oszillation von $+\pi$ nach $-\pi$ springt. Die zeitlichen Abschnitte zwischen zwei aufeinanderfolgenden *troughs* wurde gemittelt, um für jedes oszillatorische Event einen einzelnen Wert zu erhalten.

Für jedes Event wurde ein Merkmalsvektor mit den Merkmalen (i)-(iv) erstellt. Diese Daten wurden verwendet, um eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) durchzuführen. Die PCA ist ein statistisches Verfahren, um die Dimensionalität eines Datensatzes zu reduzieren ohne dabei wesentliche Information zu verlieren. Dabei wird ein neuer Datensatz mit nicht-korrelierten, orthogonalen Merkmalsvektoren erzeugt. Der Merkmalsraum wird dabei so transformiert, dass die neuen Dimensionen den Richtungen der größten Varianz entsprechen. Diese resultierenden neuen Dimensionen werden Hauptkomponenten (*principal components*, PC) genannt. Sie sind nach absteigender Varianz geordnet. Die erste Hauptkomponente (PC1) erfasst also die größtmögliche Varianz aller Datenpunkte. Die zweite Hauptkomponente (PC2) bildet die Dimension, die einerseits orthogonal zu PC1 ist und andererseits die verbleibende Datenvarianz am besten beschreibt. So haben PC1 und PC2 zusammen den größtmöglichen Informationsgehalt.

Die Präsentation aller Events im Raum der ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) wurde verwendet, um jedes Event einer der beiden Eventgruppen – SB und NG – zuzuordnen. Dafür wurde der Gustafson-Kessel-Clustering-Algorithmus angewandt. Dieser Algorithmus ist in der Lage, Cluster mit unterschiedlichen geometrischen Formen zu erkennen (Babuska u. a., 2004), was bei den vorliegenden Daten der Fall war. Es wurde eine Implementation der Fuzzy Clustering and Data Analysis Toolbox (Abonyi u. Feil, 2007) eingesetzt. Im Gegensatz zu harten Clustermethoden, werden bei einer Fuzzy-Clustering-Methode die einzelnen Datenpunkte nicht entweder dem einen oder dem anderen Cluster zugeordnet. Stattdessen kann ein einzelner Datenpunkt zu mehreren Clustern gehören – mit einem bestimmten Grad von Zugehörigkeit zu jedem Cluster. Datenpunkte mit einer Zugehörigkeit von >0.7 zu einem der beiden Cluster, wurden dementsprechend als SB oder NG gewertet. Datenpunkte mit einem geringeren Zugehörigkeitsgrad wurden als unzugeordnet klassifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für sieben Testmessungen wurde diese Clustermethode mit einer visuellen Zuordnung verglichen. Die visuelle Zuordnung erfolge anhand der Erscheinung der gefilterten Spuren der einzelnen Events hinsichtlich ihrer Amplitude und der Anwesenheit von mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen im beta/low gamma-Bereich.

3.1.2 Ergebnisse

Mit dem Alter der Ratten nimmt die Anzahl der oszillatorischen Events im PFC zu. Auch die Dauer und die Amplitude der Events ändert sich. Das zeigt sich in der Verteilung der rms-Werte der einzelnen Messungen (Abb. 3.1A, graue Kurven). Bei neonatalen Ratten ist die Häufigkeit oszillatorischer Events gering. Die Verteilungskurve für das P8-Tier in Abbildung 3.1Ai fällt schnell ab und Messpunkte mit hohen rms-Werten sind selten. Mit dem Alter der Ratten nimmt die Häufigkeit der Oszillationen zu, was zu einer Änderung der rms-Verteilung führt. Je älter das Tier ist, desto mehr Messpunkte weisen hohe rms-Werte auf (Abb. 3.1Aii und iii). Der Peak bei geringen rms-Werten spiegelt das Rauschen wieder. Dieses ist abhängig von der Elektrode und der Qualität der Messung, aber größtenteils unabhängig von Häufigkeit und Amplitude der oszillatorischen Events. Die schwarzen Kurven zeigen die Anpassung des ersten Bereichs der Verteilung (Rauschen) mit der Gauss-Funktion.

SB und NG unterscheiden sich in ihrer Amplitude und ihren Frequenzkomponenten (3.1B). Die für die Klassifizierung relevanten Eigenschaften, die diese Unterschiede quantifizieren sollen, sind (i) das Maximum des rms-Signals, (ii) das Maximum der ersten Ableitung, (iii) der Mittelwert der zeitlichen Abstände zwischen den *troughs* und (iv) die mittlere und normalisierte Power im Bereich 16-40 Hz. Eine PCA mit diesen vier-dimensionalen Merkmalsvektoren ergab, dass der maximale rms und die Inter-*trough*-Intervalle [d.h. Merkmale (i) und (iii)] am effektivsten sind, um individuelle oszillatorische Events zu trennen, indem sie die Unterschiede in der Amplitude und den Frequenzkomponenten zwischen SB und NG erfassen (Abb. 3.1C). Die Ergebnisse der unüberwachten Klassifizierung wurden mit Ergebnissen einer visuellen Klassifizierung der individuellen Events verglichen (Abb. 3.1D). Über verschiedene Messungen (n=6) erreichten die visuelle und die automatische Methode eine Übereinstimmung von 94, 1±5, 68%. Damit repräsentiert die unüberwachte Methode eine leistungsfähige, schnelle und objektive Methode zur Detektion und Klassifizierung der oszillatorischen Events im heranreifenden PFC.

Abbildung 3.1 (nächste Seite) – Unüberwachte Detektion und Klassifizierung oszillatorischer Events im heranreifenden PL. (A) Histogramme des rms (grau) des gemessenen LFP-Signals jeweils einer Ratte im Alter von P8 (i), P12 (ii) und P13 (iii). Die schwarzen Kurven zeigen die Gauss-Funktionen, die an den linken Teil der rms-Verteilung angepasst wurden (Werte von 0 bis zum Histogramm-Peak). Dieser Teil der Histogramme entspricht Zeitabschnitten mit geringer oszillatorischer Aktivität. (B) Charakteristische gefilterte (4-100 Hz) Signale eines SB (i) und eines NG (ii) und die entsprechende rms-Amplitude (graue Kurve). Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Power-Spektren für Frequenzen zwischen 10 und 40 Hz gezeigt. (C) Mittlere Koeffizienten für die erste (PC1, oben) und zweite (PC2, unten) Hauptkomponente in Bezug auf den ursprünglichen Merkmalsraum, der durch den maximalen rms, die maximale Steigung, den zeitlichen Abstand zwischen zwei troughs und die Power im beta/low gamma-Frequenzband definiert ist. Die Koeffizienten einheitlicher Länge wurden über alle Messungen gemittelt (n=12). (D) Bewertung der unüberwachten Methode (i) durch den Vergleich mit der visuellen Klassifizierung der oszillatorischen Events der gleichen Messung (ii). Jeder Punkt entspricht der Projektion des Merkmalsvektors eines Events (SB in blau, NG in rot) in den Hauptkomponentenraum, der die ersten beiden Hauptkomponenten umfasst. Events, die nicht einer der beiden Klasse von Oszillationen zugeordnet werden konnten, werden als weiße Punkte gezeigt. Die Übereinstimmung der beiden Methoden beträgt 96%.


3.2 Frequenzkomponenten der Aktivitätsmuster im neonatalen, präjuvenilen und juvenilen prälimbischen Kortex

Bereits bei der visuellen Betrachtung der Daten wird deutlich, dass sich die einzelnen oszillatorischen Events (SB, NG und CA) in ihren Frequenzkomponenten unterscheiden. Um diese Frequenzkomponenten zu identifizieren und Unterschiede zu quantifizieren, wurde nach der Detektion und automatischen Klassifizierung von SB, NG und CA eine Freuenzanalyse durchgeführt. Die Frequenz von Netzwerkoszillationen kann Hinweise über ihre Entstehung und Funktion geben.

3.2.1 Methoden

Zeit-Frequenz-Darstellungen des LFP von einzelnen Zeitabschnitten für SB, NG und CA wurden über eine Morlet-Wavelet-Analyse berechnet. Aufgrund der großen Power-Differenz wurde die Analyse für die Frequenzbänder zwischen 4 und 100 Hz und zwischen 100 und 400 Hz getrennt durchgeführt, um die Visualisierung zu erleichtern.

Um die Unterschiede zwischen den Events genauer zu untersuchen, wurden Power-Spektren berechnet. Die einzelnen Events sind von kurzer Dauer und zeigen starke Unregelmäßigkeiten in ihrer Frequenz. Außerdem ist die Amplitude der Oszillationen besonders bei jungen Tieren gering, was zu einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis führt. Diese Umstände machten die Berechnung von gemittelten Power-Spektren erforderlich, bei der der Power-Anteil in verschiedenen Frequenzbändern nach Anwendung eines Bandpass-Filters auf das Rohsignal berechnet wird (Pfurtscheller u. Lopes da Silva, 1999).

Die einzelnen Bandpass-Filter wurden um Frequenzen f zwischen 1 und 50 Hz zentriert und die Bandweite der Filter wurde als Funktion der Periode T der Oszillation bestimmt. Die unteren und oberen Grenzfrequenzen wurden als $\frac{1}{1,2T}$ beziehungsweise $\frac{1}{0,8T}$ festgelegt. An dieser Stelle wurde anstelle des Butterworth-Filters ein FIR-Filter (*finite impulse response filter*; Filter mit endlicher Impulsantwort) verwendet (eegfilt aus der EEGLAB-Toolbox, (Delorme u. Makeig, 2004)). Aufgrund ihrer Impulsantwort mit garantiert endlicher Länge sind FIR-Filter immer stabil und erhöhen so die Genauigkeit der Berechnung in engen Filterbändern. Für alle detektierten Events wurde die totale Power P(f) jedes um die Frequenz f gefilterten Signals berechnet



Abbildung 3.2 – Berechnung von Power-Spektren für einzelne Frequenzbänder. Das Signal wurde in engen Frequenzbändern gefiltert und für jede Frequenz f wurde ein Power-Spekrum berechnet. Hier sind für eine Messung die Power-Spektren für f = 1 Hz bis f = 25 Hz dargestellt (grau). Das Power-Spektrum für f = 10 Hz ist als Beispiel hervorgehoben (rot).

und über alle Events desselben Typs gemittelt (Abb. 3.2). Auf dieselbe Weise wurde ein mittleres Power-Spektrum $P_0(f)$ für Zeitabschnitte ohne oszillatorische Aktivität erstellt, um die Power-Spektren für SBs und NGs darüber zu normalisieren $(\frac{P(f)}{P_0(f)})$.

3.2.2 Ergebnisse

Am Ende der ersten postnatalen Woche besteht die Netzwerkaktivität aus den diskontinuierlichen oszillatorischen Events SB und NG (Abb. 3.3Ai und ii). Diese Events sind von kurzer Dauer (SB: $1,94 \pm 0,26$ s, n=6 Ratten; NG: $2,87 \pm 0,61$ s, n=6 Ratten) und ihre Frequenzverteilung variiert stark zwischen einzelnen Events. Auch innerhalb eines Events ist die Frequenzstruktur komplex und kann zwischen einem langsamen *theta/alpha*-Rhythmus und einem schnelleren *beta/low gamma*-Rhythmus wechseln.

Um die dominanten Frequenzen der einzelnen Events zu berechnen und zu vergleichen, wurden normalisierte gemittelte Power-Spektren berechnet. Diese ergaben eine dominante Frequenz im *theta/alpha*-Bereich für neonatale SB (5 Hz, n = 6 Ratten). Neonatale NG haben insgesamt eine höhere Power und zusätzlich zur Aktivität im *theta/alpha*-Band (7 Hz) einen Peak im *beta/low gamma*-Band (Abb. 3.3Bi). Dieser Unterschied ergibt sich aus den schnellen Oszillationszyklen, die sich während NG mit der *theta/alpha*-Oszillation abwechseln. Im präjuvenilen PL ist die Netzwerkaktivität immer noch diskontinuierlich und besteht aus einzelnen Events von SB mit



Abbildung 3.3 – Aktivitätsmuster und ihre Frequenzkomponenten im prälimbischen Kortex. (A) Charakteristische Beispiele der Bandpass-gefilterten LFP-Signale (4-100 Hz und 100-400 Hz) für SB (i), NG (ii) und CA (iii) mit den zugehörigen farbkodierten Wavelet-Spektren, die die Power in Zeit- und Frequenzauflösung darstellen. Alle drei Zeit-Frequenz-Darstellungen für einen Filterbereich sind gleich skaliert entsprechend der Farbbalken in (i). (B) Normalisierte gemittelte Power-Spektren für SB (blau) und NG (rot) in neonatalen (i) und präjuvenilen (ii), sowie für CA (grün) in juvenilen (iii) Ratten. Die Spektren wurden über alle Tiere einer Entwicklungsstufe gemittelt und über die Basis-Power $P_0(f)$, die für Zeitabschnitte geringer oszillatorischer Aktivität berechnet wurde, normalisiert.

Aktivität im theta/alpha-Band (5 Hz, n = 6 Ratten) und NG mit Aktivität im theta/alpha-Band (6 Hz) und beta/low gamma-Band (20 Hz)(Abb. 3.3Bii). Im Vergleich zur neonatalen Aktivität sind die Unterschiede zwischen SB und NG weniger stark ausgeprägt und die Power während NG ist reduziert. Am Ende der zweiten postnatalen Woche geht die diskontinuierliche Aktivität in eine kontinuierliche Oszillation über. Die dominante Frequenz liegt im theta/alpha-Bereich (Mittelwert: 5 Hz, n = 6 Ratten), der gelegentlich von beta/low gamma-Oszillationen abgelöst wird (Abb. 3.3Aiii,Biii).

Neben den oszillatorischen Komponenten im theta/alpha- und beta/gamma-Band treten während NG und CA außerdem kurze Episoden einer schnellen Oszillation auf. Die Frequenz dieser aufgelagerten Events liegt zwischen 100 und 400 Hz, was die Frage aufwirft, ob es sich hierbei wirklich um Oszillationen handelt oder ob die erhöhte Power in dem Bereich durch Spikes verursacht wird. Spikes erzeugen schnelle Spannungsänderungen im Signal und führen im Powerspektrum zu Peaks bei sehr hohen Frequenzen, die sich aber – gegeben durch die Spikeform – auch in andere Frequenzbänder ausbreiten können (Jackson u.a., 2011; Ray u. Maunsell, 2011). Hochfrequente Oszillationen (high frequency oscillations, HFO) und Spikevermittelte hochfrequente Oszillationen (spike-leaked high-frequency oscillation, SL-HFO) können anhand mehrerer Merkmale unterschieden werden (Tort u.a., 2013; Scheffer-Teixeira u.a., 2013). Um die Herkunft der erhöhten Power zwischen 100 und 400 Hz zu klären, wurden die hochfrequenten Events auf zwei der beschriebenen Unterschiede zwischen HFO und SLHFO getestet. Ein Merkmal von HFO ist, dass diese bereits im ungefilterten Signal identifiziert werden können. Die Betrachtung des ungefilterten Signals stellt sicher, dass die oszillatorische Aktivität nicht durch Filterartefakte um die schnellen Spikes enstanden ist. Abb. 3.4A zeigt klar sichtbare schnelle Oszillationen in den troughs des ungefilterten Signals. Ein weiteres Merkmal für einen Unterschied ziwschen HFO und SLHFO ist die Phase ihres Auftretens während eines langsameren Rhythmus. Dafür wurde die Kopplung an die theta/alpha-beta/low gamma-Phase (4-40 Hz) für die schnellen Oszillationen und für Spikes untersucht. Die Amplitude der schnellen Oszillationen und die Feuerrate zeigen zu unterschiedlichen Phasen ihre höchsten Werte (3.4B). Das weist darauf hin, dass Spikes und HFO nicht den gleichen Ursprung haben und die oszillatorische Aktivität zwischen 100 und 400 Hz nicht artifiziell durch Spikes erzeugt ist.





Abbildung 3.4 – Unterscheidung von Hochfrequenten Oszillationen (HFO) und Spike-Aktivität. (A) Im oberen PL abgeleitetes ungefiltertes (oben) und zwischen 100 und 400 Hz gefiltertes (unten) LFP-Signal von zwei NG-Zyklen mit überlagerten HFO-Episoden (grau unterlegt). Die HFO sind im ungefilterten Signal bereits zu erkennen. (B) Normalisierte Histogramme der Spikes (gestrichelte Linie) und mittlere HFO-Amplitude (durchgezogene Linie) in Bins der NG/CA-Phase im unteren PL von neonatalen (links), präjuvenilen (mitte) und juvenilen (rechts) Ratten. Der Referenz-Rhythmus (4-40 Hz) ist als schwarze Kurve unter der linken x-Achse zu sehen.

3.3 Frequenzverteilung und Synchronitätsmuster der Netzwerkaktivität innerhalb des prälimbischen Kortex

Nach der Charakterisierung der verschiedenen Muster der Netzwerkaktivität im heranreifenden prälimbischen Kortex, wurde ihre räumliche Organisation in Beziehung zur Reifung der kortikalen Schichten und der Konnektivität im neonatalen, präjuvenilen und juvenilen Entwicklungsstadium untersucht. Außerdem sollte untersucht werden, ob bereits während der Entwicklung räumlich organisierte Synchronisationsmuster gefunden werden, die eine Anlage funktioneller Einheiten, wie sie im adulten PFC vorhanden sind, begünstigen könnten. Dafür wurden für die extrazellulären Messungen Multielektroden-Arrays verwendet, die aus vier Shanks mit jeweils acht Ableitstellen bestanden. Die vier Shanks wurden in verschiedene kortikale Schichten eingeführt und die Aktivität wurde über 350-700 µm innerhalb jeder Schicht gemessen (Abb. 3.6A). Während der untersuchten Entwicklungsperioden (P7 bis P15) finden bedeutende anatomische Veränderungen statt. Die kortikalen Schichten entstehen, Zellen differenzieren und reifen und temporäre Strukturen, wie die kortikale Platte, verschwinden. Dadurch variiert die Position der Elektrodenshanks hinsichtlich der Schichten des neonatalen, präjuvenilen und juvenilen PL. Aus diesem Grund wurde die Organisation von Frequenz- und Synchronitätsmustern erst in Bezug auf "oberen" und "unteren" PL untersucht und im Nachhinein mit den anatomischen Veränderungen während der Entwicklung in Zusammenhang gebracht.

3.3.1 Methoden

Frequenzverteilung im oberen und unteren PL

Den Peaks der normalisierten Spektren (Abb. 3.3B) entsprechend, wurde die mittlere Power in den Frequenzbändern *theta/alpha* (4-12 Hz) und *beta/low gamma* (16-40 Hz) und für schnelle Oszillationen (100-400 Hz) bestimmt. Die Werte wurden über alle Tiere einer Altersgruppe gemittelt, um die Power der einzelnen Oszillationen (SB, NG und CA) über das Alter im oberen und unteren PL zu vergleichen (Abb. 3.6B).

Kohärenz- und Phasenshift-Berechnung

Um die Korrelation zwischen zwei Signalen zu messen, wurde die Kohärenz aus den Kreuzspektren zwischen den Signalen berechnet und über die individuellen Power-Spektren jedes Signals normalisiert (Jerbi u. a., 2007). Für die Berechnung wurde eine Multi-Taper-Methode verwendet, die in der Chronux-Toolbox implementiert ist (Mitra u. Bokil, 2008). Die Kohärenz ergibt sich aus der Formel

$$C(f) = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i(f) Y_i^*(f)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N} |X_i(f)|^2 \sum_{i=1}^{N} |Y_i|^2}}$$
(3.2)

Dabei sind $X_i(f)$ und $Y_i(f)$ die Fourier-Transformationen der beiden Signale für das *i*te Taper (n=5) an der Frequenz *f*. Durch * wird das komplexe Konjugat angezeigt. Der Kohärenzkoeffizient ergibt sich aus dem Modulus der Kohärenz C(f) und der Phasenshift ist durch das Argument gegeben. Kohärenzkoeffizienten und Phasenshifts wurden für alle gleichzeitig auftretenden Oszillationen zwischen dem LFP einer Referenzelektrode und allen anderen Ableitstellen berechnet. Die tiefste Ableitstelle an dem Elektrodenshank, der am nähesten zur Mittellinie lag, diente als Referenzelektrode (Abb. 3.5 links: Markierung durch x). Die Zeitfenster für die Berechnung wurden entsprechend der Dauer der oszillatorischen Events gewählt (1,9 s für SB, 2,7 s für NG). Die Kohärenzkoeffizienten und Phasenshifts der einzelnen Oszillationen wurden innerhalb der *theta/alpha*- und *beta/low gamma*-Frequenzkomponente gemittelt. Der mittlere Kohärenzkoeffizient und Phasenshift aller Oszillationen eines Tieres wurde für alle Elektrodenpaare farbkodiert dargestellt (Abb. 3.7A und 3.8A).

Die Synchronisation innerhalb einer kortikalen Schicht wurde mit der Synchronisation zwischen kortikalen Schichten verglichen. Dafür wurde die Änderung der Kohärenzkoeffizienten bzw. die Phasenshifts mit dem Abstand der Ableitstellen für alle Oszillationen parallel (intralaminar) und rechtwinklig (interlaminar) zur Mittellinie bestimmt und gegeneinander aufgetragen. Zur besseren Visualisierung wurden die Punktewolken als Ellipsen dargestellt. Die Orientierung, Position und Größe der Ellipsen wurde über eine PCA berechnet. Sie erfassen den Mittelwert \pm eine Standardabweichung der Punktewolke in den Richtungen der der größten Varianz, die durch die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) gegeben sind (Abb. 3.5).



Abbildung 3.5 – Vergleich der intralaminaren und interlaminaren Synchronisation anhand der Kohärenzkoeffizienten und Phasenshifts zwischen der Referenzelektrode und jeweils einer Ableitstelle mit dem größtmöglichen intralaminaren bzw. interlaminaren Abstand. Links: Schema der Ableitstellen im PL. Als Referenzelektrode diente die tiefste Ableitstelle, die am dichtesten zur Mittellinie lag (Markierung durch x). Die höchste Ableitstelle desselben Elektrodenshanks diente zur Berechnung der intralaminaren Kohärenz. Die tiefste Ableitstelle an dem Elektrodenshank, mit der größten Entfernung zur Mittellinie, diente zur Berechnung der interlaminaren Kohärenz. Rechts: Punktewolke, die für alle Oszillationen die inter- und intralaminare Änderung der Kohärenzkoeffizienten anzeigt (grau). Um diese Punktewolke als Ellipse darzustellen, wurde eine PCA durchgeführt. Die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2, Pfeile) geben als Richtungen der grösten Varianz die Orientierung der Ellipse an. Mittelwert (rot) und Standardabweichung (grün) in den Richtungen der Hauptkomponenten bestimmen Größe und Position der Ellipse (blau).

Kopplung von Oszillationen in verschiedenen Frequenzbändern

Um zu untersuchen, ob das Auftreten von HFO-Episoden während NG und CA an bestimmte Phasen der theta/alpha- und beta/low gamma-Rhythmen gebunden ist, wurde eine Phasen-Amplituden-Kopplungs-Analyse (phase-amplitude coupling, PAC) durchgeführt (Tort u. a., 2010). Als Maß für die Stärke der Kopplung wurde der Modulations-Index (modulation index, MI) berechnet. Der MI gibt an, wie stark die Amplitude einer schnellen Frequenz f_A durch die Phase einer langsameren Frequenz f_p moduliert wird. Es wurde die Kopplung der HFO-Amplitude (f_A : 100-400 Hz) und der NG- bzw. CA-Phase $(f_p: 4-40 \text{ Hz})$ untersucht. Dafür wurde das Signal erst in den entsprechenden Bereichen gefiltert und dann eine Hilbert-Transformation durchgeführt. Die Hilbert-Transformation wandelt das zeitlich aufgelöste Signal in seine Unterbestandteile – Phasen- und Amplitudeninformation – um. Die Hilbert Transformation ermöglicht es, an jedem Abtastpunkt des zeitlich aufgelösten Signals die instantane Phasen- $\phi_{f_p}(t)$ und Amplitudeninformation $A_{f_A}(t)$ zu extrahieren. Das Phasensignal wurde in Bins von $\frac{1}{10}\pi$ aufgeteilt und für jedes Bin j die mittlere Amplitude $(\langle A_{f_A} \rangle_{\phi_{f_p}}(j))$ berechnet. Diese wurde durch die Summe über alle Bins normalisiert:

$$P(j) = \frac{\langle A_{f_A} \rangle_{\phi_{f_p}}(j)}{\sum_{k=1}^N \langle A_{f_A} \rangle_{\phi_{f_p}}(k)}$$
(3.3)

Dabei ist N die Anzahl der Phasenbins. Eine Modulation von A_{f_A} durch ϕ_{f_p} ist gegeben, wenn P von einer Gleichverteilung abweicht. Die Stärke dieser Abweichung wurde über eine Anpassung der Kulback-Leibler-Distanz (KL) berechnet:

$$D_{KL}(P,Q) = \sum_{j=1}^{N} P(j) \log \frac{P(j)}{Q(j)}$$
(3.4)

Der Modulationsindex ergibt sich dann aus:

$$MI = \frac{D_{KL}(P,Q)}{\log(N)} \tag{3.5}$$

Ein hoher MI bedeutet demnach, dass die mittlere HFO-Amplitude nicht für alle Bins der NG/CA-Phase gleich ist, sondern A_{f_A} durch $\phi_{f_p}(t)$ moduliert ist. Der MI wurde für jedes Tier getrennt für NG- und CA-Perioden berechnet, die im oberen oder unteren PFC auftraten und dann der Mittelwert über alle Tiere berechnet.

3.3.2 Ergebnisse

Entsprechend der Wavelet-Analyse und der normalisierten Power-Spektren ist die Frequenzverteilung der SB hauptsächlich auf das *theta/alpha*-Band (4-12 Hz) beschränkt. Dagegen wechselt sich während NG der *theta/alpha*-Rhythmus mit höheramplitudigen *beta/low gamma*-Oszillationen (16-40 Hz) ab. Außerdem treten überlagert auf dem NG-Rhythmus kurze Episoden von HFO (100-400 Hz) auf. Alle drei Frequenzbänder kommen auch während der juvenilen CA vor. Während die *theta/alpha*-Aktivität während SB über das Alter relativ konstant bleibt, ändert sich für NG die Power in allen Frequenzbändern (Abb. 3.6B). Generell ist die Power der Oszillationen im unteren PL geringer als im oberen. Besonders die Power der HFO zwischen 100 und 400 Hz, die während neonataler und präjuveniler NG auftreten, nimmt vom oberen zum unteren PL signifikant (p=0,031, p=0,031) ab (Abb. 3.6Biii). Dagegen ist die Power der SB und CA relativ konstant über den gesamten PL.



Abbildung 3.6 – Alters-abhängige Power-Verteilung im *theta/alpha-*, *beta/low gamma-* und HFO-Frequenzbereich. (A) Digitale Photomontage eines Nissl-gefärbten 100 µm dicken Koronalschnittes (grün) zur Visualisierung der Position der vier Dilmarkierten Elektrodenshanks (orange) im PFC. (B) Balkendiagramme, die Mittelwerte und Standardabweichungen der Power im *theta/alpha-* (i), *beta/low gamma-* (ii) und HFO-Band (iii) von SB (blau), NG (rot) und CA (grün) im oberen (helle Farben) und unteren (dunkle Farben) PL zeigen. Die Power der oszillatorischen Events wurde über alle Ratten einer Altersgruppe gemittelt.

In allen Messungen traten oszillatorische Events gleichzeitig an verschiedenen benachbarten Ableitstellen des Multielektroden-Arrays auf. Die Synchronität dieser Signale kann Hinweise auf eine Bedeutung der Oszillationen für die Festlegung der



Abbildung 3.7 – Räumliche und zeitliche Organisation von Synchronisationsmustern im heranreifenden PL. (A) Farbkodierte Darstellung der mittleren Kohärenz-Koeffizienten für eine ausgewählte Ableitung mit einer 4x8-Elektroden-Anordnung in einer neonatalen Ratte (P8). Die tiefste Ableitstelle auf dem Elektrodenshank, der am nähesten an der Mittellinie lag, wurde als Referenz gewählt. (B) Änderung der Kohärenz innerhalb einer Schicht aufgetragen gegen die Änderung zwischen den Schichten für alle Frequenzkomponenten von SB (blau), NG (rot) und CA (grün) im neonatalen, präjuvenilen und juvenilen Entwicklunsstadium. Die Ellipsen zeigen eine Standardabweichung der mittleren Datenwolke in Richtung ihrer Hauptkomponenten, die durch eine PCA berechnet wurden. Die Insets zeigen die Ellipsen separat für die einzelnen Frequenzkomponenten von SB und NG und die dazugehörigen Datenwolken (grau), die alle Werte der einzelnen Oszillationen enthalten.

Netzwerkaktivität geben. Netzwerkoszillationen begünstigen ein synchrones Feuern einzelner Neurone, was zu einer Verstärkung ihrer Konnektivität führen kann (Hebb, 1949; Markram u. a., 1997). Auf diese Weise beeinflussen Oszillationen auch während der Entwicklung die Entstehung von Verbindungen (Bi u. Poo, 2001). Hier sollte geklärt werden, ob im heranreifenden PL Synchronisationsmuster gefunden werden, die auf eine Entstehung von funktionellen Einheiten hindeuten könnten. Die Kohärenz zwischen zwei Signalen diente als Maß ihrer Synchronität. Um die räumliche und zeitliche Organisation der Synchronisationsmuster und die Frequenz-abhängige Kopplung zu untersuchen, wurden Kohärenzkoeffizienten für Oszillationen an allen Ableitstellen in Bezug zu einer Referenzelektrode im oberen PL berechnet und getrennt für die *theta/alpha-* und *beta/low gamma-*Komponente farbkodiert dargestellt (Abb.3.7A). Die Kohärenzkoeffizienten sind an direkt benachbarten Ableitstellen am höchsten und nehmen mit dem Abstand zwischen den Elektrodenpaaren ab.

Wie stark der Kohärenzkoeffizient mit zunehmendem Abstand abfällt, ist sowohl von dem jeweiligen Frequenzband als auch von der Richtung (innerhalb einer kortikalen Schicht oder zwischen verschiedenen Schichten rechtwinklig zur kortikalen Oberfläche) abhängig (Abb.3.7B). Hier zeigen sich Unterschiede zwischen den theta/alpha- und beta/low gamma-Komponenten des Signals. Die Mehrheit der SB (63,4%) weisen über den gesamten gemessenen Bereich eine starke intralaminare Synchronität auf (Kohärenzabnahme $0, 25 \pm 0, 03$ /mm), interlaminar nehmen die Kohährenzkoeffizienten dagegen schneller ab $(0, 37 \pm 0, 03/\text{mm})$. Ebenso ist für die theta/alpha-Komponente der meisten NG (68,6%) die intralaminare Synchronität stärker (Kohärenzabnahme $0, 53 \pm 0, 01/\text{mm}$) als die interlaminare (Kohärenzabnahme 0.86 ± 0.16 /mm). Die *beta/low gamma*-Komponente von NG zeigt dagegen ein Säulen-artiges Synchronisationsmuster. Die Kohärenz nimmt in 64,4% aller Oszillationen intralaminar stärker ab $(0, 64\pm0, 03/\text{mm})$ als interlaminar $(0, 54\pm0, 06/\text{mm})$. Die Kohärenzkoeffizienten zwischen Signalen von Elektroden, die innerhalb einer Schicht weniger als 200 µm entfernt waren, sind signifikant höher als zwischen Signalen von weiter entfernten Elektroden.

Die Synchronisationsmuster ändern sich stark mit dem Alter. Die interlaminare Abnahme der Kohärenzkoeffizienten wurde für neonatale, präjuvenile und juvenile Ratten gegen die Abnahme innerhalb einer Schicht aufgetragen (Abb 3.7B). Während die Synchronisation im *theta/alpha*-Band innerhalb einer kortikalen Schicht bei neonatalen und juvenilen Tieren sehr stark ist, ist die kolumnenartige Sychnronisation im *beta/low gamma*-Band auf das neonatale Alter begrenzt. Die präjuvenile Entwicklungsphase scheint ein Zeitfenster für Umstrukturierungen der oszillatorischen Kopplung innerhalb des PL zu sein. Die Abnahme der Kohärenzkoeffizienten ist für beide Frequenzkomponenten und alle oszillatorischen Events innerhalb und zwischen den Schichten ähnlich stark.

Um die Kopplung der Oszillationen im PL genauer zu untersuchen, wurde der intralaminare und interlaminare Phasenshift für die beiden Frequenzkomponenten berechnet. Der mittlere Phasenshift über alle Oszillationen einer Messung wurde getrennt für die *theta/alpha-* und *beta/low gamma-*Komponente für alle Ableitstellen relativ zur Referenzelektrode bestimmt (Abb. 3.8A). Die Phasenverschiebung innerhalb einer kortikalen Schicht ist vernachlässigbar. Zwischen kortikalen Schichten ist die Phase der Signale jedoch verschoben. Positive Werte bedeuten, dass das Signal an der Referenzelektrode dem Signal an der Testelektrode vorangeht. Bei negativen Werten geht entsprechend die Phase an der Testelektrode der Phase an der Referenzelektrode voraus. Der Phasenshift der neonatalen SB ist im Vergleich zu den NG verhältnismäßig klein. Hier ist die Phasenverschiebung für beide Frequenzbänder unterschiedlich. Die *beta/low gamma-*Komponente der NG zeigt einen positiven interlaminaren Phasenshift von $(0, 17\pm0, 03) 2\pi$ rad (ein verzögertes Signal im oberen PL relativ zum unteren PL). Der Phasenshift für einzelne Oszillationen im *theta/alpha-*Band kann sowohl positiv als auch negativ sein.

Während der Entwicklung nimmt die Stärke des Phasenshifts für SB und NG signifikant ab. Auch die Unterschiede zwischen der *theta/alpha-* und der *beta/low gamma-*Komponente werden geringer. Juvenile CA zeigen für beide Frequenzbänder einen interlaminaren Phasenshift, der positiv oder negativ sein kann.

Neben den theta/alpha- und beta/low gamma-Oszillationen treten im PL auch schnelle Oszillationen (100-400 Hz) auf. Die kurzen HFO-Episoden überlagern die NG- und CA-Rhythmen und repräsentieren einen möglichen zusätzlichen Kopplungsmechanismus innerhalb des heranreifenden PL. In vielen Hirnregionen treten Oszillationen in unterschiedlichen Frequenzbändern gleichzeitig auf, wobei der schnellere Rhythmus den langsameren überlagert. Dabei ist die Aktivität der beiden Rhythmen oft gekoppelt. Eine Art dieser Kreuz-Frequenz-Kopplung (cross-frequency coupling, CFC) ist die Modulation der Amplitude des schnelleren Rhythmus durch



Abbildung 3.8 – Phasenshifts der oszillatorischen Aktivität innerhalb des PL. (A) Farbkodierte Darstellung der mittleren Phasenshifts für eine ausgewählte Ableitung mit einer 4x8-Elektroden-Anordnung in einer neonatalen Ratte (P8). Die tiefste Ableitstelle auf dem Elektrodenshank, der am nähesten an der Mittellinie lag, wurde als Referenz gewählt. (B) Änderungen des Phasenshifts innerhalb einer Schicht aufgetragen gegen die Änderung zwischen den Schichten für alle Frequenzkomponenten von SB (blau), NG (rot) und CA (grün) im neonatalen, präjuvenilen und juvenilen Entwicklunsstadium. Die Ellipsen zeigen eine Standardabweichung der mittleren Datenwolke in Richtung ihrer Hauptkomponenten.

die Phase des langsamen Rhythmus (*phase-amplitude coupling*, PAC). Das bedeutet, dass die Amplitude der schnelleren Oszillation nicht konstant ist, sondern sich in Abhängigkeit des Oszillationszyklus der langsameren Oszillation ändert und zu einer bestimmten Phase dieser Oszillation am höchsten ist. Die Phase des langsamen Rhythmus spiegelt dabei die Erregbarkeit des Netzwerkes wider, während die Amplitude des schnellen Rhythmus die Aktivierung eines Unternetzwerkes anzeigt. Als Maß für die Stärke der Kopplung zwischen HFO-Amplitude und NG- bzw. CA-Phase (4-40 Hz) wurde der Modulations-Index (modulation index, MI) für den gesamten PL in verschiedenen Entwicklungsphasen berechnet.



Abbildung 3.9 – Modulation der HFO-Amplitude (100-400 Hz) durch die NG/CA-Phase (4-40 Hz). Balkendiagramm, dass den mittleren Modulationsindex für die HFO-Amplitude durch die NG- (rot) und CA-Phase (grün) im oberen (helle Farben) und unteren (dunkle Farben) PL zeigt.

Die stärkste Kopplung zwischen der NG/CA-Phase und der HFO-Amplitude wurde im oberen PFC von neonatalen Ratten gefunden (Abb. 3.9). Die HFO-Episoden treten bevorzugt an den *troughs* der NG im oberen PL auf und zu einer späteren Phase im unteren PL (Abb. 3.4). Die Modulation im oberen PFC nimmt mit dem Alter stark ab. Während bei präjuvenilen Tieren noch ein signifikanter Unterschied in der Modulation zwischen oberen und unterem PFC zu erkennen ist, verschwindet die Schicht-spezifische Phasen-Amplituden-Kopplung, wenn die oszillatorische Aktivität in einen kontinuierlichen Rhythmus übergeht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass verschiedene Frequenzkomponenten auf unterschiedliche Art die Netzwerkaktivität im oberen und unteren PL beeinflussen. Besonders die HFO, die in frühen Stadien der Entwicklung durch einen langsameren Rhythmus moduliert werden, könnten eine entscheidende Rolle bei der Verfeinerung der Konnektivität in lokalen Netzwerken des PL spielen.

3.4 Beziehung zwischen Netzwerkoszillationen und dem Feuern von Neuronen im PL

Die Organisation der Netzwerkaktivität in räumlichen und zeitlichen Mustern lässt vermuten, dass sie auch das Feuern der Neurone im PL während früher Phasen der Entwicklung koordiniert. Während Oszillationen vor allem synaptische Aktivität und damit sowohl den lokalen als auch Input aus anderen Regionen widerspiegeln, sind Spikes extrazellulär gemessene Aktionspotentiale und somit der Output einzelner Neurone. Zeitlich koordiniertes Feuern trägt zur synaptischen Plastizität bei und kann so während der Entwicklung Einfluss auf die Organisation der Netzwerkkonnektivität haben. Um die Kopplung zwischen Spiking-Aktivität und Oszillationen in unterschiedlichen Frequenzbändern zu untersuchen, wurde die Aktivität einzelner Neurone untersucht.

3.4.1 Methoden

Spikesorting

Um aus dem extrazellulären Signal die Spike-Akivität von einzelnen Zellen zu extrahieren, wurden einzelne Spikes erst detektiert und dann nach ihrer Wellenform sortiert. Dafür wurde der Offline-Sorter von Plexon (Plexon, Dallas, TX) verwendet. Für die Detektion wurde das Rohsignal erst über 407 Hz Hochpass-gefiltert. Dann wurde die Detektionsschwelle fuer jede Elektrode manuell eingestellt. Die detektierten Wellenformen wurden visuell inspiziert, um fälschlich detektiertes Rauschen auszuschließen. Unterschiedliche Eigenschaften der Wellenformen wurden im zwei- oder dreidimensionalen Raum dargestellt, um dann nach ihren Eigenschaften in mehrere Cluster eingeteilt zu werden, die ähnliche Wellenformen und somit die Spikes einzelner Neurone enthalten (*single-unit activity*, SUA). Die Inter-Spike-Intervalle (ISI) wurden auf die Anwesenheit einer Refraktärzeit von >1 ms untersucht. Außerdem wurde die Qualität des Clustering anhand mehrerer statistischer Maße überprüft: klassische parametrische F-Statistik der multivariaten Varianz-Analyse (MANOVA), J3 und PseudoF (PsF)-Statistik, Davies-Bouldin Validitätsindex (DB) (?). Die Werte lagen zwischen 0 und 0,51 für MANOVA, 0,26 und 15,2 für J3, 56,02 und 7524,61 für PsF und 0,08 und 15,2 für DB.

Feuerraten und -muster

Für die Auswertung der Spiking-Aktivität wurden nur Spikes verwendet, die während detektierter SBs, NGs oder hochamplitudiger Perioden der kontinuierlichen Aktivität auftraten. Zur Berechnung der Feuerraten wurden Spikes aller Zellen zusammen verwendet (*multi-unit activity*, MUA), alle anderen Analysen wurden getrennt für die einzelnen Zellen durchgeführt (SUA). Die Feuerraten wurden für jede Ableitstelle berechnet, indem die Anzahl der Spikes durch die Gesamtdauer der oszillatorischen Events geteilt wurde. Die Einzelwerte wurden für den oberen und unteren PL getrennt gemittelt.

Um zu untersuchen, ob die präfrontalen Zellen zufällig feuern oder einem bestimmten Muster folgen, wurden zuerst Inter-Spike-Intervall-Histogramme erstellt. Dafür wurden für jede Zelle getrennt die Abstände zwischen zwei aufeinander folgenden Spikes bestimmt und die Abstände aller Zellen, die in derselben kortikalen Tiefe (auf demselben Elektrodenshank) gemessen wurden, in einem Histogramm kombiniert.

Phasenkopplung

Mit Hilfe von zirkulärer Statistik wurde getestet, ob das Feuern einzelner Neurone an die Phase des LFPs gekoppelt ist (Mardia and Jupp, 1999; Hangya et al., 2009). Die Phase der SB, NG und CA (4-40 Hz) wurde über die Hilbert-Transformation bestimmt, wobei eine Phase von 0 dem Peak der Oszillation und eine Phase von π dem *trough* der Oszillation entspricht. Für jeden Spike wurde die instantane Phase des LFPs zum Zeitpunkt seines Auftretens bestimmt. Wenn das Feuern der Zellen durch das LFP moduliert ist, ist die Verteilung dieser Phasen-Werte nicht gleichverteilt. Die CircStat-Toolbox (Berens, 2009) wurde verwendet, um dies zu überprüfen. Der Phasenkopplungs-Wert wurde als zirkulärer Mittelwert berechnet

$$\phi = Re^{i\phi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} e^{i\phi_i}$$
(3.6)

wobei R die mittlere resultierende Vektorlänge des zirkulären Mittelwertes ist und ϕ die mittlere Phase angibt. Die Stärke der Phasenkopplung zwischen Spikes und LFP wurde mit Hilfe einer modifizierten Rayleigh-Statistik auf Signifikanz überprüft. Diese ist definiert als Z = nR, wobei R die mittlere resultierende Länge des Phasenvektors ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese zutrifft, ist gegeben durch

$$P = exp[\sqrt{1 + 4n + 4(n^2 - R^2) - (1 + 2n)} - (1 + 2n)]$$
(3.7)

(Zar, 1998). Zellen, deren Feuermuster signifikant von der Gleichverteilung abweicht, wurden als phasengekoppelt definiert. Die Spikes dieser Zellen wurden verwendet, um für jeden Elektrodenshank und getrennt nach SB, NG und CA der einzelnen Alterstufen zirkuläre Histogramme zu erstellen und die Mittelwerte der Verteilung als bevorzugte LFP-Phase für das Feuern von Neuronen zu bestimmen. Auf dieselbe Weise wurde auch die Kopplung des Spiking zur Phase der HFO (100-400 Hz) bestimmt.

3.4.2 Ergebnisse

Die Feuerrate im neonatalen PFC ist sehr gering $(0.04 \pm 0.04 \text{ Hz}, n=5 \text{ Ratten})$ und beschränkt sich fast ausschließlich auf oszillatorische Perioden (Abb. 3.10A). Mit der Entwicklung nimmt die Rate zu und liegt mit dem Auftreten von kontinuierlicher Aktivität bei $0.11 \pm 0.08 \text{ Hz}$ (n=5 juvenile Ratten). Die Berechnung der Feuerraten für die einzelnen Events ergab höhere Werte für NG ($0.4 \pm 0.29 \text{ Hz}$, n=5 Ratten) verglichen mit SB ($0.04 \pm 0.04 \text{ Hz}$, n=5 Ratten) im neonatalen PFC. Dieser Unterschied ist deutlicher im oberen als im unteren PL zu sehen (Abb. 3.10B). In der präjuvenilen Phase sind die Feuerraten für SB und NG ähnlich hoch, aber im oberen PL erhöht gegenüber dem unteren PL. Im juvenilen PFC ist die Feuerrate im gesamten PL ähnlich hoch (oberer PL: $0.27 \pm 0.21 \text{ Hz}$, unterer PL: $0.27 \pm 0.17 \text{ Hz}$, n=5 Ratten). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Feuern der präfrontalen Neurone sowohl von der Anatomie des PL als auch von den oszillatorischen Aktivitätsmustern abhängig ist.

Um die Abhängigkeit des Spikings von den einzelnen Frequenzbändern (*theta/alpha*: 4-12 Hz, *beta/low gamma*: 16-40 Hz, HFO: 100-400 Hz) zu untersuchen, wurden die Feuermuster einzelner Zellen (SUA) auf Regelmäßigkeiten untersucht. An den Ab-



Abbildung 3.10 – Räumliche und zeitliche Organisation der Spiking-Aktivität im heranreifenden PL. (A) Extrazelluläre LFP-Signale von diskontinuierlicher (i) und kontinuierlicher (ii) Aktivität im PL und die dazugehörige Spiking-Aktivität. Die markierten SB (blau) bzw. NG (rot) sind vergrößert darunter zu sehen. Das Spiking ist erhöht während der diskontinuierlichen Events und die Feuerraten nehmen mit dem Alter zu. (B) Beziehung zwischen Alter und Feuerrate im oberen und unteren PL. Das Balkendiagramm zeigt die mitteleren Feuerraten während SB (blau), NG (rot) und CA (grün) im oberen (helle Farben) und unteren (dunkle Farben) PL. (C)(i) Amplitude der detektierten Wellenformen von zwei Zellen (gelb und grün) über die Zeit und den Mittelwert innerhalb jedes Clusters (schwarze Kurven). (ii) Repräsentation der Wellenformen aus (i) nach der Dimensionreduktion durch die PCA in der Dimension der ersten beiden Hauptkomponenten.Es sind deutlich zwei unterschiedliche Cluster zu sehen. Die Farben der einzelnen Punkte entsprechen der Zuordnung nach dem Clustering mittels der k-means-Methode. (D) Auf SUA basierende Inter-Spike-Intervall-Histogramme für (i) neonatale, (ii) präjuvenile und (iii) juvenile Ratten. Innerhalb jeder Altersgruppe wurden die Intervalle zwischen den Spikes einzelner Neurone berechnet. Dann wurden die Werte aller Zellen einer kortikalen Tiefe in einem Histogramm zusammengefasst. Die Farbkodierung für jeden Elektrodenshank ist im Inset angezeigt.

leitstellen, an denen Spikes gemessen wurden, konnten ein bis drei Zellen identifiziert werden (Abb. 3.10C). Ob das Feuern dieser Zellen einem Rhythmus folgt, wurde anhand von Inter-Spike-Intervall-Histogrammen überprüft. Die Form der Histogramme variiert sowohl über das Alter als auch über die kortikale Tiefe (Abb. 3.10D). Während der neonatalen Periode sind im Histogramm für den oberen PL zwei Peaks zu erkennen – einer bei 5 ms und einer zwischen 20 und 50 ms (Abb. 3.10Di, helle Kurven). Diese Peaks deuten darauf hin, dass das Feuern der Neurone sowohl durch *beta/low gamma*-Oszillationen als auch durch HFO kontrolliert wird. Im Gegensatz dazu zeigt das Feuern der Neurone im tiefen PL wenig Zusammenhang mit der oszillatorischen Aktvität (Abb. 3.10Di, dunkle Kurven). Mit der Entwicklung nimmt der Unterschied zwischen oberem und unterem PL ab. Während der präjuvenilen und juvenilen Periode zeigen die Histogramme für alle Elektrodenshanks Peaks zwischen 20 und 30 ms, was auf ein Feuern im *beta/low gamma*-Rhythmus hindeutet (Abb. 3.10Dii, iii).

ISI-Histogramme können nur einen Hinweis darauf geben, dass Neurone in einem bestimmten Rhythmus feuern, wenn die Spikes in aufeinanderfolgenden Zyklen einer Oszillation auftreten. Um den direkten Zusammenhang zwischen Spikes und LFP-Oszillationen zu untersuchen, wurde berechnet, wie stark das Auftreten von Spikes an eine bestimmte Phase der Netzwerkaktivität in verschiedenen Frequenzbändern gekoppelt ist. Die Beziehung zwischen Spikes und LFP-Phase wurde für den oberen und unteren PL und für alle drei Altersgruppen getrennt bestimmt, indem die instantane Phase des gefilterten LFP-Signals zu den Zeitpunkten bestimmt wurde, an denen Spikes auftraten. Die Kopplung von Spikes zur LPF-Phase wurde für Oszillationen im *theta/alpha*- und *beta/low gamma*-Bereich (4-40 Hz) und für HFO (100-400 Hz) untersucht.

Die Anwendung der Rayleigh-Statistik auf die Verteilung der LFP-Phasen zum Zeitpunkt von Spikes zeigte, dass während neonataler NG signifikant mehr prälimbische Neurone zur Phase des 4-40 Hz Rhythmus gekoppelt feuern (35 von 38 Zellen) als während SB (8 von 38 Zellen). Diese Kopplung zur NG-Phase war stärker im oberen PL als im unteren. Der Anteil der phasengekoppelten Neurone nimmt mit dem Alter ab und ist ähnlich hoch für SB und NG (Abb. 3.11A). Die Phase, zu der die Neurone bevorzugt feuern, zeigt kaum Abhängigkeit von Alter und kortikaler Tiefe (Abb. 3.11B). Die meisten Zellen feuern kurz nach den *troughs* von SB, NG



Abbildung 3.11 – Kopplung der prälimbischen Spikes and die Phase der unterschiedlichen Frequenzkomponenten der Netzwerkaktivität im PL. (A) Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der Neurone im oberen und unteren PL, die an die Phase des 4-40 Hz Rhythmus von SB (blau), NG (rot) und CA (grün) gekoppelt sind während der neonatalen, präjuvenilen und juvenilen Entwicklung. (B) Zirkuläre Histogramme zeigen die Verteilung der Spikes auf der Phase (4-40 Hz) von SB (blau), NG (rot) und CA (grün) in unterschiedlichen kortikalen Tiefen zu allen drei Entwicklungsphasen. Schwarze Linien zeigen den resultierenden mittleren Vektor des zirkulären Mittelwertes. (C) Entspricht (A) für HFO (100-400 Hz). (D) Entspricht (B) für HFO (100-400 Hz).

und CA (Mittelwert: ϕ =-0.76 ± 0.09 π rad, wobei π den *troughs* der oszillatorischen Zyklen entspricht).

Die Kopplung der Spikingaktivität an die Phase der HFO ist sehr stark. Fast alle Zellen feuern phasengekoppelt zu den HFO-Events während NG (36 von 38 Zellen für neonatale Ratten, 48 von 54 Zellen für präjuvenile Ratten und 75 von 76 Zellen für juvenile Ratten; Abb. 3.11C). Dabei gibt es keine Unterschiede in der Kopplung zwischen Zellen im oberen und unteren PL. Auch hier ist die Phase, zu der die Neurone bevorzugt feuern, unabhängig von Alter und kortikaler Tiefe. Die meisten Spikes treten kurz nach den *troughs* der HFO auf (Mittelwert: ϕ =-0.87 ± 0.05 π rad)(Abb. 3.11D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Feuern der prälimbischen Neurone zu verschiedenen Phasen der Entwicklung auf unterschiedliche Weise durch die LFP-Oszillationen kontrolliert ist. Langsame Rhythmen schaffen dabei Zeitfenster für die Aktivierung des Netzwerkes, wohingegen HFO lokal und präzise die Spikingaktivität der Zellen steuern. Dieses kontrollierte Zusammenspiel der Netzwerkaktivität während der frühen Entwicklung könnte zu einer Verfeinerung der Konnektivität beitragen.

4 Diskussion

Im adulten Gehirn ist der PFC an einer Reihe von kognitivien Funktionen beteiligt. Dabei bildet er zusammen mit anderen kortikalen und subkortikalen Strukturen ein enges Netzwerk. Die Kommunikation zwischen verschiedenen Hirnregionen wird durch Netzwerkoszillationen organisisert. Bereits der heranreifende PFC zeigt unterschiedliche Muster von Netzwerkoszillationen und Spikingaktivität. Intraund extrakortikale und modulatorische Inputs treiben die präfrontale Aktivität an (Brockmann u. a., 2011; Janiesch u. a., 2011), aber auch innerhalb des PFC zeigt sich eine komplexe Struktur an lokalen Aktivitätsmustern.

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Netzwerkaktivität in Hinblick auf Alter und kortikale Tiefe untersucht, um einen Einblick in die funktionelle Organsiation und die Reifung des PFC in neonatalen (P7-9), präjuvenilen (P10-12) und juvenilen (P13-15) Ratten zu gewinnen.

Aus diesen Untersuchungen ergaben sich zusammenfassend folgende Erkentnisse:

- (i) Die diskontinuierlichen Aktivitätsmuster im neonatalen und präjuvenilen PFC – SB und NG – weisen Unterschiede bezüglich ihrer Amplitude und Frequenzkomponenten auf. Aufgrund dieser Unterschiede ist es möglich die beiden Aktivitätsmuster zu detektieren und automatisch zu klassifizieren. Im juvenilen PFC werden die SB und NG durch kontinuierliche Aktivität (CA) ersetzt. Die Amplitude der CA zeigt jedoch Schwankungen und es können zeitliche Perioden verringerter bzw. erhöhter oszillatorischer Aktivität detektiert werden.
- (ii) Die Oszillationen im PFC haben eine komplexe Frequenzstruktur. SB zeigen ausschließlich Aktivität im *theta/alpha*-Band (4-12 Hz). Dieser Rhythmus ist auch Hauptbestandteil von NG und CA, während derer er jedoch mit Aktivität im *beta/low gamma*-Bereich (16-40 Hz) alterniert.
- (iii) Die *theta/alpha-* und *beta/low gamma-*Frequenzkomponenten zeigen unterschiedliche Synchronisationsmuster im PL. Dieser Unterschied ist in der neona-

talen Entwicklungsphase besonders deutlich. Während die *theta/alpha*-Signale innerhalb einer kortikalen Schicht stark kohärent sind, weisen die *beta/low gam-ma*-Oszillationen eine Säulen-artige Synchronisation mit hoher interlaminarer Kohärenz auf.

(iv) Während NG und CA treten kurze Episoden hochfrequenter Oszillationen (HFO) auf. Diese überlagern die langsameren Oszillationen. Die Phase der NG (4-40 Hz) moduliert besonders im oberen PL neonataler Ratten die Amplitude der HFO. Die Stärke der Modulation nimmt mit dem Alter ab. Die Phase der HFO wiederum bestimmt zeitlich das Auftreten von Spikes.

4.1 Betrachtung der Methode zur Detektion und Klassifizierung oszillatorischer Events

Die Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Dynamik der frühen oszillatorischen Aktivität im PL setzt eine zuverlässige Detektion und Klassifizierung von SB und NG voraus. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die auf einer Hauptkomponentenanalyse und einem darauf folgenden unüberwachten Clustering beruht, um die beiden Arten von Events trotz großer Variabilität innerhalb der Gruppen automatisch zu identifizieren. Diese Methode war in der Lage Events mit einer Genauigkeit zu klassifizieren, die mit der eines menschlichen Betrachters vergleichbar ist, ohne dass zwischen einzelnen Experimenten eine Anpassung der Parameter notwendig war. Damit ermöglicht die Methode eine objektive Unterscheidung zwischen SB und NG. Zusätzlich gibt die Hauptkomponentenanalyse Aufschluss über die Unterschiede zwischen SB und NG. Die Eigenschaften, in denen sie sich am stärksten unterscheiden, sind die maximalen rms-Werte und die maximale Steigung des Signals. Beide sind für NG höher, was die kurzen beta/low gamma-Perioden mit ihren schnellen und großen Ausschlägen der Amplitude widerspigelt. Kürzere Intervalle zwischen einzelnen troughs sind ein weiteres – aber unzuverlässigeres – Merkmal von NG, das sich ebenfalls durch das Auftreten von beta/low gamma-Perioden neben dem langsameren theta/alpha-Rhythmus ergibt. Die mittlere Power im beta/low gamma-Band zwischen 16 und 40 Hz ist am schlechtesten zur Unterscheidung zwischen SB und NG geeignet. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die große Variabilität in der Frequenzzusammensetzung einzelner Events.

Die Merkmalsvektoren wurden zur Klassifizierung mit dem Fuzzy-Clustering-Algorithmus verwendet. Dieser ermöglicht es jedem Event einen Zugehörigkeitsgrad für jedes der beiden vorgegeben Cluster (SB und NG) zuzuweisen, anstatt es ausschließlich einem Cluster zuzuordnen. Außerdem wurde ein Schwellenwert als minimaler Zugehörigkeitsgrad für eins der beiden Cluster festgelegt und Events, die diesen Wert nicht überschreiten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Damit kann die Empfindlichkeit der Analyse flexibel angepasst werden, was eine zuverlässige Identifikation von SB und NG auch im Fall eines schlechten Signal-Rausch-Verhältnises und großer Variabilität zwischen den Versuchstieren ermöglicht. Ein weiterer Vorteil des verwendeten Clustering-Algorithmus ist die Fähigkeit Cluster zu definieren, die im Merkmalsraum von einer runden Form abweichen. Dies war für die Daten dieser Studie der Fall. Vorangegangene Untersuchungen ergaben, dass eine Klassifizierung der Events mit einfacheren Clustering-Algorithmen (z.B. k-means-Clustering) zu ähnlichen, aber ungenaueren Ergebnissen führten.

4.2 Oszillatorische Rhythmen während der Entwicklung des prälimibischen Kortex

Die Netzwerkoszillationen im heranreifenden PL setzen sich aus drei Frequenzkomponenten zusammen. Aktivität in unterschiedlichen Frequenzbändern deutet auf unterschiedliche Synchronisationseigenschaften und Generierungsmechanismen hin. Der Hauptbestandteil aller oszillatorischer Events ist der theta/alpha-Rhythmus zwischen 4 und 12 Hz. Dieser Rhythmus ist die einzige Frequenzkomponente präfrontaler SB. SB sind ein typisches Aktivitätsmuster während der frühen Entwicklung und wurden bereits in anderen Regionen des Neokortex beschrieben. SB im primären visuellen (V1) und somatosensorischen (S1) Kortex neonataler Ratten zeigen Aktivität in demselben Frequenzbereich wie präfrontale SB und haben außerdem ähnliche Eigenschaften bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens, ihrer Amplitude und Dauer (Hanganu u. a., 2006; Yang u. a., 2009; Brockmann u. a., 2011). Jedoch setzen SB im PFC erst am dritten postnatalen Tag ein, im Gegensatz zu den sensorischen Kortices, in denen SB schon zum Zeitpunkt der Geburt auftreten. Diese Tatsache hängt höchstwahrscheinlich mit der verspäteten Reifung des PFC im Vergleich zu anderen Strukturen des Neokortex zusammen (Flechsig, 1901; Van Eden u. Uylings, 1985; Fuster, 2002). Auch beim Menschen wurde frühe oszillatorische Aktivität gefunden,

die den SB sehr ähnlich ist. Bei EEG-Messungen an Frühgeborenen werden ab der 28. Schwangerschaftswoche delta brushes gefunden – spindelförmige Oszillationen im gleichen Frequenzbereich wie SB (Dreyfus-Brisac u. Larroche, 1971; Selton u. a., 2008). Das Auftreten dieser Aktivitätsmuster in verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Hirnregionen lässt vermuten, dass sie eine entscheidende Rolle während der Entwicklung spielen. Für die sensorischen Kortices, die sehr ausführlich untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Subplattenneurone eine bedeutende Rolle bei der Generierung von SB spielen. Außerdem werden sie durch subkortikale neuromodulatorische Inputs und Aktivität in der Peripherie angetrieben. Besonders aufgrund ihrer Koordination mit der sensorischen Aktivität wird ihnen eine Bedeutung bei der Ausbildung von somatotopischen Karten zugesprochen. Über Ursprung, Generierung und Bedeutung von SB in der Entwicklung von Assoziationskortices – wie dem PFC – ist weitaus weniger bekannt. Im PFC neonataler Ratten treten SB im gesamten prälimbischen Kortex auf und zeigen in allen kortikalen Schichten die gleichen Eigenschaften. Diese verändern sich auch während der unterschiedlichen Entwicklungsphasen nicht. Das lässt vermuten, sondern viel eher dass der theta/alpha-Rhythmus einen globalen Mechanismus in kortiko-subkortikalen Netzwerken darstellt, der zu einer unspezifischen Aktivierung präfrontaler Netzwerke beiträgt.

Während SB in verschiedenen neokortikalen Strukturen auftreten, wurden NG bis jetzt nur im PFC beschrieben. Dort treten sie am häufigsten im PL auf (Brockmann u. a., 2011). NG zeichnen sich durch Aktivität im *beta/low gamma*-Frequenzband zwischen 16 und 40 Hz aus, die zusätzlich zur *theta/alpha*-Komponente vorkommt. Beide Rhythmen treten nebeneinander im Wechsel auf. Die *beta/low gamma*-Oszillationen sind ein temporäres Aktivitätsmuster. Ihre Power ist im neonatalen PL am höchsten und nimmt während der weiteren Entwicklung ab. Außerdem weisen sie eine präzise räumliche Organsisation auf. Ihre Power ist im oberen PL höher als im unteren und sie synchronisieren den PL in einer Weise, die an kortikale Säulen erinnert. Die lokale *beta/low gamma*-Aktivität im neonatalen PL wird durch die hippocampale Aktivität im *theta*-Frequenzband kontrolliert (Brockmann u. a., 2011). Außerdem haben auch modulatorische (z.B cholinerge) Eingänge einen Einfluss auf die NG im PL (Janiesch u. a., 2011). Eine Reduktion der Aktivität in der CA1-Region des Hippocampus oder den cholinergen Arealen des basalen Vorderhirns durch pharmakologische oder immunotoxische Behandlung verringerte die Häufigkeit von NG. Dementsprechend könnten hippocampale und cholinerge Inputs die Erregbarkeit im PL erhöhen und auf diese Weise die Aktivierung lokaler Netzwerke erleichtern, die sich in Form von *beta/low gamma*-Oszillationen äussert. Durch cholinerge Inputs aktivierte Oszillationen in einem ähnlichen Frequenzband wurden in *in vitro*-Messungen im somatosensorischen Kortex beschrieben. Diese weisen ein *gap-junction*-vermitteltes Säulen-artiges Synchronisationsmuster auf, das für die Formierung von Barrels von Bedeutung sein könnte (Dupont u. a., 2006). In ähnlicher Weise könnte die *beta/low gamma*-Aktivität im PL an der Entstehung von funktionellen Einheiten beteiligt sein, wie sie für den adulten PFC beschrieben wurden Kritzer u. Goldman-Rakic (1995). Die Säulen-artige Synchronisation durch den *beta/low gamma*-Rhythmus wird nur im neonatalen PL gefunden und tritt in den präjuvenilen und juvenilen Entwicklungsphasen, in denen die neokortikalen Strukturen reorganisiert werden (Konrad u. a., 2013), nicht mehr auf.

Die dritte Frequenzkomponente, die im heranreifenden PL gefunden wird, sind HFO zwischen 100 und 400 Hz. Diese sehr schnellen Oszillationen treten als kurze Episoden aufgelagert auf den NG- und CA-Rhythmen auf. Dass es sich hierbei um echte Netzwerkoszillationen und nicht um Spike-Artefakte im LFP handelt, konnte durch eine Kreuz-Frequenz-Kopplungs-Analyse (CFC) bewiesen werden. Im unteren PL zeigen Spikes und HFO unterschiedliche Beziehungen zur Phase der NGund CA-Oszillationen. Hochfrequente Oszillationen treten auch im adulten Neokortex auf. In vitro- und Modelling-Studien zeigen, dass in Axongeflechten unter bestimmten Bedingungen Oszillationen in Frequenzbändern über 200 Hz entstehen können. Vorraussetzungen für ihre Generierung sind das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen und eine starke elektrische Kopplung in Form axo-axonaler qapjunctions, die über eine hohe Leitfähigkeit verfügen und in hoher Dichter vorhanden sind (Schmitz u. a., 2001; Traub u. a., 2002, 2003; Maex u. De Schutter, 2007). Bereits während der Entwicklung weisen neokortikale Netzwerke eine starke elektrische Kopplung auf (Yuste u. a., 1992; Peinado u. a., 1993). Dementsprechend könnte auch bei der Generierung der HFO eine axo-axonale elektrische Kopplung zwischen Zellen im unreifen PL beteiligt sein. Durch die theta/alpha- und beta/low gamma-Oszillationen während NG und CA wäre außerdem eine erhöhte Netzwerkaktivität gegeben, die das Auftreten von spontanen Aktionspotentialen und damit die Generierung von HFO begünstigen könnte. Dafür spricht auch die Modulation der

HFO-Amplitude und der Feuerraten im oberen PL durch die Phase der NG und CA, welche die Erregbarkeit des Netzwerkes widerspiegelt.

4.3 Funktionelle und anatomische Entwicklung des PL

Die Eigenschaften der Netzwerkaktivität im PL ändern sich stark im Laufe der zweiten postnatalen Woche – auch im Hinblick auf ihre räumliche Organisation. Dem liegen grundlegende anatomische Änderungen in dieser Zeit zugrunde (Abb. 4.1). Der Aufbau der kortikalen Schichten unterscheidet sich stark zwischen neonatalen, präjuvenilen und juvenilen Ratten. So sind die einzelnen Elektrodenshanks in jeder Entwicklungsphase in unterschiedlichen anatomischen Strukturen plaziert. Aus diesem Grund wurde für einen Vergleich der Daten unterschiedlicher Alterstufen nur zwischen oberem PL und unterem PL unterschieden.

Am Ende der ersten postnatalen Woche (neonatale Entwicklungsstufe) untergliedert sich der PL in die Marginalzone mit sehr wenigen Zellen, die dicht gepackte kortikale Platte und Schicht V und VI, die an die Subplatte angrenzen. Schicht V ist noch unterentwickelt. Die noch undifferenzierten Schichten II und III sind in der bilaminaren Struktur der kortikalen Platte bereits zu erahnen (Van Eden u. Uylings, 1985). Der obere PL besteht demnach hauptsächlich aus der kortikalen Platte. In diesem Bereich weisen *beta/low gamma*-Oszillationen eine besonders hohe Power auf. Die hohe Zellzahl und die starke Konnektivität in der kortikalen Platte können dafür eine Erklärung liefern. Eine ähnlich erhöhte Netzwerkaktivität wurde in der kortikalen Platte im neonatalen S1 gefunden (Dupont u. a., 2006). Cholinerge Inputs lösen oszillatorische Aktivität in der Subplatte aus, die wiederum über *gap-junctions* lokale Netzwerke der kortikalen Platte synchronisieren. Auch das verstärkte Auftreten von HFO im oberen PL, die wahrscheinlich durch starke axo-axonale elektrische Kopplung generiert werden, lässt sich durch die Struktur der kortikalen Platte mit einer hohen Dichte an *gap-junctions* erklären (Elias u. a., 2007).

Während des präjuvenilen Entwicklungsstadiums entstehen Schicht II und III im oberen PL. Die Hauptveränderung im unteren PL besteht in der Reifung von Schicht V (Van Eden u. Uylings, 1985). Diese anatomischen Umstrukturierungen spiegeln sich auch in der Netzwerkaktivität wider. Die Häufigkeit der diskontinuierlichen Events nimmt zu, während sich die Eigenschaften von SB und NG immer stärker ähneln. Gleichzeitig nehmen ebenfalls die Unterschiede zwischen oberem und unterem PL ab. Auch hinsichtlich der intra- und interlaminaren Synchronisations-

Kortikale Oberfläche



Abbildung 4.1 – Aktivitätsmuster im oberen und unteren PL. Die unterschiedlichen Aktivitätsmuster zeigen spezifische Abhängigkeiten von der Entwicklungsphase und der Anatomie des PL. Die *theta/alpha*-Aktivität (blau) ist über das Alter und den gesamten PL weitestgehend konstant. Besonders in der neonatalen, aber auch der juvenilen Entwicklunsstufe weist dieser Rhythmus eine verstärkte intralaminare Synchronisation auf (blaue Pfeile). Die Power im *beta/low gamma*-Band (grün) ist im oberen PL neonataler Ratten besonders stark, wo sie ein Säulen-artiges Synchronisationsmuster zeigt (grüner Pfeil). HFO (rot) treten ebenfalls im neonatalen oberen PL mit der größten Power auf, wo ihre Amplitude stark durch die NG- und CA-Phase moduliert ist. Auch die Spiking-Aktivität (gelb) ist im oberen PL stärker als im unteren. Die Feuerraten nehmen mit der Entwicklung zu. In der juvenilen Entwicklungsphase gibt es für keines der Aktivitätsmuster einen Unterschied zwischen oberem und unterem PL. Der anatomische Aufbau des PL bezüglich der kortikalen Schichten in den unterschiedlichen Entwicklunsstufen entspricht den Befunden von (Van Eden u. Uylings, 1985). Abkürzungen: CP: kortikale Platte, MZ: marginale Zone, SP: Subplatte, I-VI: kortikale Schichten I-VI.

muster ist die präzise räumliche Organisation der neonatalen Netzwerkaktivität im präjuvenilen PL nicht mehr gegeben. Diese Tatsachen könnten einerseits auf die Abnahme der *beta/low gamma*-Aktivität zurückzuführen sein, die wahrscheinlich mit der räumlichen Abnahme der kortikalen Platte – als enges Netzwerk elektrisch gekoppelter Neurone – zusammenhängt. Andererseits könnten Umstrukturierungen der lokalen Konnektivität einen möglichen Grund für die Veränderungen der Netzwerkaktivität liefern.

Im juvenilen Alter ist die Entwicklung der kortikalen Schichten abgeschlossen. Die kortikale Platte ist verschwunden und Schicht II und III mit adulten Eigenschaften bilden jetzt den oberen PL. Der untere PL besteht aus den voll entwickelten Schichten V und VI (Van Eden u. Uylings, 1985). Auch die Netzwerkaktivität ändert sich stark. Sie besteht nun aus einem kontinuierlichen oszillatorischen Rhythmus mit einheitlichen Eigenschaften im gesamten PL. Weder die Power in den einzelnen Frequenzbändern noch die Spiking-Aktivität zeigt Unterschiede zwischen oberem und unterem PL.

Nicht nur die Zellarchitektur und der Entwicklungsstand der prälimbischen Schichten haben Einfluss auf die Organisation der Netzwerkaktivität. Auch einwachsende Projektionen aus anderen kortikalen und subkortikalen Regionen spielen eine wichtige Rolle. Vor allem NG werden durch hippocampale (Brockmann u. a., 2011) und cholinerge (Janiesch u.a., 2011) Eingänge kontrolliert, die den unteren PL innervieren. In diesem Bereich liegt während der neonatalen Entwicklungsphase die Subplatte. Subplattenneurone spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung früher Aktivitätsmuster und könnten auch an der Aktivierung lokaler Netzwerke im oberen PL beteiligt sein. In den primären sensorischen Kortices innervieren vor der Reifung der kortikalen Schichten kortikale und thalamische Projektionen die Subplatte. Angetrieben durch neuromodulatorische Inputs entstehen in der Subplatte Oszillationen, die sich durch *gap-junctions* in die kortikale Platte ausbreiten (Friauf u. a., 1990; Hanganu u. a., 2002; Kanold u. Luhmann, 2010). Die erhöhte Netzwerkaktivität innerhalb der kortikalen Platte könnte lokale beta/low gamma-Oszillationen auslösen. Durch die enge elektrische Kopplung innerhalb des Netzwerkes der kortikalen Platte könnte diese Aktivität weiter verstärkt werden, was wiederum zur Generierung von HFO beitragen kann. Nach der vollständigen Reifung der kortikalen Schichten erreichen die einwachsenden Projektionen ihre Zielposition im Kortex und die Subplatte verschwindet, was die einheitlichen Aktivitätsmuster im gesamten PL erklären könnte.

4.4 Physiologische und patophysiologische Bedeutung von Oszillationen während der Entwicklung des PL

Synchronisierte Oszillationen koordinieren die Aktivität innerhalb und zwischen unterschiedlichen Netzwerken und bieten so die Grundlage kognitiver Hirnfunktionen (Buzsaki u. Draguhn, 2004; Fries, 2009). Bereits während der Entwicklung des Gehirns spielen Oszillationen eine Rolle bei der Ausbildung von Netzwerken. Vor allem organisieren und stabilisieren sie die Konnektivität, indem sie das Feuern präund postsynaptischer Neurone synchronisieren und damit Spike-Timing-Dependent-Plasticity ermöglichen (Hebb, 1949). Diese Studie zeigt, dass die anatomische Entwicklung des PL mit einer dynamischen Organisation der Netzwerkaktivität einhergeht. Die Mechanismen der funktionellen Reifung der prälimbischen Verschaltung zu kennen ist notwendig, um krankheitsbedingte Veränderungen des Netzwerkes zu verstehen.

Vielen neuropsychatrischen Krankheiten, zum Beispiel Autismus oder Schizophrenie, liegt eine gestörte neuronale Synchronisation zugrunde (Uhlhaas u. Singer, 2007, 2010). Diese ist wahrscheinlich ein Ergebnis veränderter Netzwerkkonnektivität, die schon früh in der Entwicklung unter Einfluss von Oszillationen festgelegt wird (Uhlhaas u. a., 2010). Bei der Schizophrenie, die schwere kognitive Defizite mit sich zieht, ist die Kommunikation zwischen PFC und Hippocampus gestört (Sigurdsson u.a., 2010). Aber auch die Verschaltungen in den lokalen Netzwerken sind verändert, was sich unter anderem in reduzierter gamma-Aktivität äußert (Gonzalez-Burgos u. Lewis, 2008; Cardin u. a., 2009; Sohal u. a., 2009). gamma-Oszillationen im PFC spielen z.B. eine Rolle für das Arbeitsgedächtnis (Li u. a., 2012; Roux u. a., 2012). Sowohl reduzierte gamma-Aktivität als auch Beeinträchtigungen des Arbeitsgedächtnis wurden bei Schizophrenie-Patienten und in Tiermodellen dieser Krankheit gefunden (Cho u. a., 2006; Minzenberg u. a., 2010). Schon lange vor dem Einsetzen von Psychosen bestehen bereits mnemonische Defizite (Reichenberg u. a., 2010). Das spricht dafür, dass der abnormalen Netzwerkaktivität eine veränderte Verschaltung zugrunde liegt, die bereits in der frühen Entwicklung entsteht.

In der neonatalen Entwicklungsphase, die eine kritische Periode für die funktionelle Reifung des PL darstellen könnte, wird die lokale prälimbische Netzwerkaktivität durch einseitig gerichteten Informationsfluß angetrieben. Eine gestörte Kommunikation zwischen PFC und Hippocampus in diesem Alter führt zu mnemonischen Beeinträchtigungen (Krüger u. a., 2012), denen fehlerhafte Verschaltungen in lokalen prälimbischen Netzwerken zugrunde liegen könnten. Eine Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Organisation der Netzwerk- und Spikingaktivität in Tiermodellen der Krankheiten könnte Aufschluss darüber geben, wie Power, Synchronität, Kreuz-Frequenz-Kopplung und Feuermuster im oberen und unteren PL verändert sind und wie diese Veränderungen mit bereits beschriebenen zellulären Veränderungen in verschiedenen prälimbischen Schichten zusammen hängen (Yang u. a., 2012; Lee u. a., 2013; McNally u. a., 2013).

Literaturverzeichnis

- [Abonyi u. Feil 2007] ABONYI, János ; FEIL, Balázs: Cluster Analysis for Data Mining and System Identification. Springer, 2007
- [Anderson u. a. 1985] ANDERSON, C M.; TORRES, F; FAORO, A: The EEG of the early premature. In: *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 60 (1985), Februar, Nr. 2, S. 95–105
- [Babuska u. a. 2004] BABUSKA, R ; VEEN, P J. d. ; KAYMAK, U: Improved covariance ce estimation for gustafson-kessel clustering. In: *Fuzzy Systems, 2002. FUZZ-IEEE'02. Proceedings of the 2002 IEEE International Conference on*, 2004, S. 1081–1085
- [Bartho 2004] BARTHO, P: Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. In: Journal of Neurophysiology 92 (2004), März, Nr. 1, S. 600–608
- [Bartos u. a. 2007] BARTOS, Marlene ; VIDA, Imre ; JONAS, Peter: Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. In: *Nature Reviews Neuroscience* 8 (2007), Januar, Nr. 1, S. 45–56
- [Benchenane u. a. 2010] BENCHENANE, Karim ; PEYRACHE, Adrien ; KHAMASSI, Mehdi ; TIERNEY, Patrick L. ; GIOANNI, Yves ; BATTAGLIA, Francesco P. ; WIE-NER, Sidney I.: Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal-Prefrontal Network upon Learning. In: *Neuron* 66 (2010), Juni, Nr. 6, S. 921–936
- [Bi u. Poo 2001] BI, G; POO, M: Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. In: Annual Review of Neuroscience 24 (2001), S. 139–166
- [Birrell u. Brown 2000] BIRRELL, J M.; BROWN, V J.: Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. In: *Journal of Neuroscience* 20 (2000), Juni, Nr. 11, S. 4320–4324

- [Blankenship u. Feller 2009] BLANKENSHIP, Aaron G. ; FELLER, Marla B.: Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. In: *Nature Reviews Neuroscience* 11 (2009), Dezember, Nr. 1, S. 18–29
- [Bontempi u. a. 1999] BONTEMPI, B ; LAURENT-DEMIR, C ; DESTRADE, C ; JAF-FARD, R: Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. In: *Nature* 400 (1999), August, Nr. 6745, S. 671–675
- [Broadbent u. a. 2004] BROADBENT, Nicola J.; SQUIRE, Larry R.; CLARK, Robert E.: Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (2004), Oktober, Nr. 40, S. 14515–14520
- [Brockmann u. a. 2011] BROCKMANN, Marco D. ; PÖSCHEL, Beatrice ; CICHON, Nicole ; HANGANU-OPATZ, Ileana L.: Coupled Oscillations Mediate Directed Interactions Between Prefrontal Cortex and Hippocampus of the Neonatal Rat. In: *Neuron* 71 (2011), Juli, Nr. 2, S. 332–347
- [Brodmann 1909] BRODMANN, K: Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde. (1909)
- [Buschman u. Miller 2007] BUSCHMAN, Timothy J.; MILLER, Earl K.: Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices. In: *Science* 315 (2007), März, Nr. 5820, S. 1860–1862
- [Buzsaki u. Draguhn 2004] BUZSAKI, G ; DRAGUHN, A: Neuronal Oscillations in Cortical Networks. In: Science 304 (2004), Juni, Nr. 5679, S. 1926–1929
- [Buzsaki u. a. 2003] BUZSAKI, G ; TRAUB, R D. ; PEDLEY, T: The cellular synaptic generation of EEG activity. In: *Current Practice of* ... (2003)
- [Buzsáki 2004] BUZSÁKI, György: Large-scale recording of neuronal ensembles. In: Nature neuroscience 7 (2004), Mai, Nr. 5, S. 446–451
- [Bystron u. a. 2008] BYSTRON, Irina ; BLAKEMORE, Colin ; RAKIC, Pasko: Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. In: *Nature Reviews Neuroscience* 9 (2008), Februar, Nr. 2, S. 110–122

- [Bystron u. a. 2006] BYSTRON, Irina ; RAKIC, Pasko ; MOLNÁR, Zoltán ; BLAKEMO-RE, Colin: The first neurons of the human cerebral cortex. In: *Nature neuroscience* 9 (2006), Juli, Nr. 7, S. 880–886
- [Cardin u. a. 2009] CARDIN, Jessica A.; CARLÉN, Marie; MELETIS, KONSTANTINOS ; KNOBLICH, Ulf; ZHANG, Feng; DEISSEROTH, Karl; TSAI, Li-Huei; MOORE, Christopher I.: Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. In: *Nature* 459 (2009), Juni, Nr. 7247, S. 663–667
- [Cho u. a. 2006] CHO, R Y.; KONECKY, R O.; CARTER, C S.: Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. In: *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (2006), Dezember, Nr. 52, S. 19878–19883
- [Choudhury u. a. 2008] CHOUDHURY, Suparna ; CHARMAN, Tony ; BLAKEMORE, Sarah-Jayne: Development of the teenage brain. In: *Mind, Brain, and Education* 2 (2008), Nr. 3, S. 142–147
- [Dalley u. a. 2004] DALLEY, Jeffrey W. ; CARDINAL, Rudolf N. ; ROBBINS, Trevor W.: Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28 (2004), Januar, Nr. 7, S. 771–784
- [Delorme u. Makeig 2004] DELORME, Arnaud ; MAKEIG, Scott: EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. In: *Journal of Neuroscience Methods* 134 (2004), März, Nr. 1, S. 9–21
- [Destexhe u. Sejnowski 2003] DESTEXHE, A ; SEJNOWSKI, T J.: Interactions between membrane conductances underlying thalamocortical slow-wave oscillations. In: *Physiological reviews* 83 (2003), Oktober, Nr. 4, S. 1401–1453
- [Dreyfus-Brisac u. Larroche 1971] DREYFUS-BRISAC, C ; LARROCHE, J C.: Discontinuous electroencephalograms in the premature newborn and at term. Electroanatomo-clinical correlations. In: Revue d'électroencéphalographie et de neurophysiologie clinique 1 (1971), Januar, Nr. 1, S. 95–99
- [Dupont u. a. 2006] DUPONT, Erwan ; HANGANU, Ileana L. ; KILB, Werner ; HIRSCH, Silke ; LUHMANN, Heiko J.: Rapid developmental switch in the mechanisms driving

early cortical columnar networks. In: *Nature* 439 (2006), Januar, Nr. 7072, S. 79–83

- [Elias u. a. 2007] ELIAS, Laura A B.; WANG, Doris D.; KRIEGSTEIN, Arnold R.: Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. In: *Nature* 448 (2007), August, Nr. 7156, S. 901–907
- [Feller u. Scanziani 2005] FELLER, Marla B. ; SCANZIANI, Massimo: A precritical period for plasticity in visual cortex. In: *Current opinion in neurobiology* 15 (2005), Februar, Nr. 1, S. 94–100
- [Flechsig 1901] FLECHSIG, P: Developmental (myelogenetic) localisation of the cerebral cortex in the human subject. In: *Lancet* (1901), Juli, Nr. 2, S. 1027–1029
- [Friauf u. a. 1990] FRIAUF, E ; MCCONNELL, S K. ; SHATZ, C J.: Functional synaptic circuits in the subplate during fetal and early postnatal development of cat visual cortex. In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 10 (1990), August, Nr. 8, S. 2601–2613
- [Fries u. a. 2001] FRIES, P ; REYNOLDS, J H. ; RORIE, A E. ; DESIMONE, R: Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. In: *Science* 291 (2001), Februar, Nr. 5508, S. 1560–1563
- [Fries 2005] FRIES, Pascal: A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. In: *Trends in Cognitive Sciences* 9 (2005), Oktober, Nr. 10, S. 474–480
- [Fries 2009] FRIES, Pascal: Neuronal Gamma-Band Synchronization as a Fundamental Process in Cortical Computation. In: Annual Review of Neuroscience 32 (2009), Juni, Nr. 1, S. 209–224
- [Fuster 2002] FUSTER, Joaquín M: Frontal lobe and cognitive development. In: Journal of neurocytology 31 (2002), März, Nr. 3-5, S. 373–385
- [Gao u. a. 2012] GAO, W J.; WANG, H X.; SNYDER, M A.; LI, Y C.: The Unique Properties of the Prefrontal Cortex and Mental Illness. In: *cdn.intechopen.com* (2012), August
- [Gold u. a. 2006] GOLD, Carl ; HENZE, Darrell A. ; KOCH, Christof ; BUZSÁKI, György: On the origin of the extracellular action potential waveform: A modeling study. In: Journal of Neurophysiology 95 (2006), Mai, Nr. 5, S. 3113–3128
- [Goldman-Rakic 1995] GOLDMAN-RAKIC, P S.: Cellular basis of working memory. In: Neuron 14 (1995), Nr. 3, S. 477–485
- [Gonzalez-Burgos u. Lewis 2008] GONZALEZ-BURGOS, Guillermo ; LEWIS, David A.: GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. In: *Schizophrenia bulletin* 34 (2008), September, Nr. 5, S. 944–961
- [Goodman u. Shatz 1993] GOODMAN, C S. ; SHATZ, C J.: Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. In: *Cell* 72 Suppl (1993), Januar, S. 77–98
- [Gregoriou u. a. 2009] GREGORIOU, Georgia G.; GOTTS, Stephen J.; ZHOU, Huihui ; DESIMONE, Robert: Long-range neural coupling through synchronization with attention. In: *Progress in brain research* 176 (2009), S. 35–45
- [Hanganu u. a. 2006] HANGANU, Ileana L.; BEN-ARI, Yehezkel; KHAZIPOV, Rustem: Retinal Waves Trigger Spindle Bursts in the Neonatal Rat Visual Cortex. In: *Journal of Neuroscience* 26 (2006), Juni, Nr. 25, S. 6728–6736
- [Hanganu u. a. 2002] HANGANU, Ileana L. ; KILB, Werner ; LUHMANN, Heiko J.: Functional synaptic projections onto subplate neurons in neonatal rat somatosensory cortex. In: *Journal of Neuroscience* 22 (2002), August, Nr. 16, S. 7165–7176
- [Hanganu-Opatz 2010] HANGANU-OPATZ, Ileana L.: Between molecules and experience: Role of early patterns of coordinated activity for the development of cortical maps and sensory abilities. In: *Brain Research Reviews* 64 (2010), September, Nr. 1, S. 160–176
- [Harris u. a. 2000] HARRIS, Kenneth D. ; HENZE, Darrell A. ; CSICSVARI, Jozsef ; HIRASE, Hajime ; BUZSÁKI, György: Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. In: *Journal of Neurophysiology* 84 (2000), Nr. 1, S. 401–414

- [Hasselmo 2005] HASSELMO, Michael E.: What is the function of hippocampal theta rhythm?–Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. In: *Hippocampus* 15 (2005), Nr. 7, S. 936–949
- [Hasselmo u. a. 2002] HASSELMO, Michael E. ; BODELÓN, Clara ; WYBLE, Bradley P.: A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. In: *Neural computation* 14 (2002), April, Nr. 4, S. 793–817
- [Hebb 1949] HEBB, Donald O.: The Organization of Behaviour. 1949
- [Hipp u. a. 2011] HIPP, Joerg F.; ENGEL, Andreas K.; SIEGEL, Markus: Oscillatory synchronization in large-scale cortical networks predicts perception. In: *Neuron* 69 (2011), Januar, Nr. 2, S. 387–396
- [Hoover u. Vertes 2007] HOOVER, Walter B. ; VERTES, Robert P.: Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. In: *Brain structure & function* 212 (2007), September, Nr. 2, S. 149–179
- [Hubel u. Wiesel 1970] HUBEL, D H.; WIESEL, T N.: The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. In: *The Journal of physiology* 206 (1970), Februar, Nr. 2, S. 419–436
- [Huberman u. a. 2006] HUBERMAN, Andrew D. ; SPEER, Colenso M. ; CHAPMAN, Barbara: Spontaneous retinal activity mediates development of ocular dominance columns and binocular receptive fields in v1. In: *Neuron* 52 (2006), Oktober, Nr. 2, S. 247–254
- [Hutcheon u. Yarom 2000] HUTCHEON, B ; YAROM, Y: Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. In: *TRENDS in Neurosciences* 23 (2000), Mai, Nr. 5, S. 216–222
- [Hyman u.a. 2005] HYMAN, James M. ; ZILLI, Eric A. ; PALEY, Amanda M. ; HASSELMO, Michael E.: Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. In: *Hippocampus* 15 (2005), Nr. 6, S. 739–749
- [Jackson u. a. 2011] JACKSON, J ; GOUTAGNY, R ; WILLIAMS, S: Fast and Slow Gamma Rhythms Are Intrinsically and Independently Generated in the Subiculum. In: *Journal of Neuroscience* 31 (2011), August, Nr. 34, S. 12104–12117

- [Janiesch u. a. 2011] JANIESCH, P C. ; KRUGER, H S. ; POSCHEL, B ; HANGANU-OPATZ, I L.: Cholinergic Control in Developing Prefrontal-Hippocampal Networks. In: *Journal of Neuroscience* 31 (2011), Dezember, Nr. 49, S. 17955–17970
- [Jerbi u. a. 2007] JERBI, Karim ; LACHAUX, Jean-Philippe ; N'DIAYE, Karim ; PAN-TAZIS, Dimitrios ; LEAHY, Richard M. ; GARNERO, Line ; BAILLET, Sylvain: Coherent neural representation of hand speed in humans revealed by MEG imaging. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007), Mai, Nr. 18, S. 7676–7681
- [Jones u. Wilson 2005] JONES, Matthew W. ; WILSON, Matthew A.: Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. In: *PLoS biology* 3 (2005), Dezember, Nr. 12, S. e402
- [Kanold u. Luhmann 2010] KANOLD, Patrick O.; LUHMANN, Heiko J.: The subplate and early cortical circuits. In: Annual Review of Neuroscience 33 (2010), S. 23–48
- [Katz u. Shatz 1996] KATZ, L C. ; SHATZ, C J.: Synaptic activity and the construction of cortical circuits. In: Science 274 (1996), November, Nr. 5290, S. 1133–1138
- [Khazipov u. Luhmann 2006] KHAZIPOV, Rustem ; LUHMANN, Heiko J.: Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. In: *TRENDS in Neurosciences* 29 (2006), Juli, Nr. 7, S. 414–418
- [Khazipov u. a. 2004] KHAZIPOV, Rustem ; SIROTA, Anton ; LEINEKUGEL, Xavier ; HOLMES, Gregory L. ; BEN-ARI, Yehezkel ; BUZSÁKI, György: Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. In: *Nature* 432 (2004), Dezember, Nr. 7018, S. 758–761
- [Kilb u. a. 2011] KILB, Werner ; KIRISCHUK, Sergei ; LUHMANN, Heiko J.: Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. In: *The European journal of neuroscience* 34 (2011), November, Nr. 10, S. 1677–1686
- [Konrad u. a. 2013] KONRAD, Kerstin ; FIRK, Christine ; UHLHAAS, Peter J.: Brain development during adolescence: neuroscientific insights into this developmental period. In: Deutsches Ärzteblatt international 110 (2013), Juni, Nr. 25, S. 425–431
- [Kopell u. a. 2000] KOPELL, N ; ERMENTROUT, G B. ; WHITTINGTON, M A. ; TRAUB, R D.: Gamma rhythms and beta rhythms have different synchronization proper-

ties. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 (2000), Februar, Nr. 4, S. 1867–1872

- [Kritzer u. Goldman-Rakic 1995] KRITZER, M F.; GOLDMAN-RAKIC, P S.: Intrinsic circuit organization of the major layers and sublayers of the dorsolateral prefrontal cortex in the rhesus monkey. In: *The Journal of Comparative Neurology* 359 (1995), August, Nr. 1, S. 131–143
- [Krüger u. a. 2012] KRÜGER, Hanna-Sophie ; BROCKMANN, Marco D. ; SALAMON, Johannes ; ITTRICH, Harald ; HANGANU-OPATZ, Ileana L.: Neonatal hippocampal lesion alters the functional maturation of the prefrontal cortex and the early cognitive development in pre-juvenile rats. In: *Neurobiology of learning and memory* 97 (2012), Mai, Nr. 4, S. 470–481
- [Lamblin u. a. 1999] LAMBLIN, M D. ; ANDRÉ, M ; CHALLAMEL, M J. ; CURZI-DASCALOVA, L ; D'ALLEST, A M. ; DE GIOVANNI, E ; MOUSSALLI-SALEFRANQUE, F ; NAVELET, Y ; PLOUIN, P ; RADVANYI-BOUVET, M F. ; SAMSON-DOLLFUS, D ; VECCHIERINI-BLINEAU, M F.: Electroencephalography of the premature and term newborn. Maturational aspects and glossary. In: Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology 29 (1999), April, Nr. 2, S. 123–219
- [Lee u. a. 2013] LEE, Frankie H F. ; ZAI, Clement C. ; CORDES, Sabine P. ; RODER, John C. ; WONG, Albert H C.: Abnormal interneuron development in disruptedin-schizophrenia-1 L100P mutant mice. In: *Molecular brain* 6 (2013), S. 20
- [Li u. a. 2012] LI, Shuangyan ; BAI, Wenwen ; LIU, Tiaotiao ; YI, Hu ; TIAN, Xin: Increases of theta-low gamma coupling in rat medial prefrontal cortex during working memory task. In: *Brain research bulletin* 89 (2012), November, Nr. 3-4, S. 115–123
- [Llinás 1988] LLINÁS, R R.: The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. In: Science 242 (1988), Dezember, Nr. 4886, S. 1654–1664
- [Maex u. De Schutter 2007] MAEX, Reinoud R. ; DE SCHUTTER, Erik E.: Mechanism of spontaneous and self-sustained oscillations in networks connected through axoaxonal gap junctions. In: *The European journal of neuroscience* 25 (2007), Mai, Nr. 11, S. 3347–3358

- [Markram u. a. 1997] MARKRAM, H ; LÜBKE, J ; FROTSCHER, M ; SAKMANN, B: Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. In: Science 275 (1997), Januar, Nr. 5297, S. 213–215
- [McNally u.a. 2013] MCNALLY, James M. ; MCCARLEY, Robert W. ; BROWN, Ritchie E.: Impaired GABAergic neurotransmission in schizophrenia underlies impairments in cortical gamma band oscillations. In: *Current psychiatry reports* 15 (2013), März, Nr. 3, S. 346
- [Minlebaev u. a. 2011] MINLEBAEV, M ; COLONNESE, M ; TSINTSADZE, T ; SIROTA, A ; KHAZIPOV, R: Early Gamma Oscillations Synchronize Developing Thalamus and Cortex. In: *Science* 334 (2011), Oktober, Nr. 6053, S. 226–229
- [Minzenberg u. a. 2010] MINZENBERG, Michael J.; FIRL, Alana J.; YOON, Jong H.; GOMES, Glenn C.; REINKING, Celeste; CARTER, Cameron S.: Gamma oscillatory power is impaired during cognitive control independent of medication status in first-episode schizophrenia. In: Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35 (2010), Dezember, Nr. 13, S. 2590–2599
- [Mitra u. Bokil 2008] MITRA, Partha P.; BOKIL, Hemant: Observed Brain Dynamics. Oxford University Press, 2008
- [Mountcastle 1957] MOUNTCASTLE, V B.: Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. In: *Journal of Neurophysiology* 20 (1957), Juli, Nr. 4, S. 408–434
- [O'Keefe u. Dostrovsky 1971] O'KEEFE, J ; DOSTROVSKY, J: The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. In: Brain research 34 (1971), November, Nr. 1, S. 171–175
- [O'Keefe u. Recce 1993] O'KEEFE, J ; RECCE, M L.: Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. In: *Hippocampus* 3 (1993), Juli, Nr. 3, S. 317–330
- [O'Keefe u. Burgess 2005] O'KEEFE, John ; BURGESS, Neil: Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. In: *Hippocampus* 15 (2005), Nr. 7, S. 853–866

- [Pandya u. Yeterian 1990] PANDYA, D N. ; YETERIAN, E H.: Prefrontal cortex in relation to other cortical areas in rhesus monkey: architecture and connections. In: *Progress in brain research* 85 (1990), S. 63–94
- [Peinado u. a. 1993] PEINADO, A ; YUSTE, R ; KATZ, L C.: Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. In: *Cerebral cortex* (New York, N.Y. : 1991) 3 (1993), September, Nr. 5, S. 488–498
- [Pesaran u. a. 2008] PESARAN, Bijan ; NELSON, Matthew J. ; ANDERSEN, Richard A.: Free choice activates a decision circuit between frontal and parietal cortex. In: *Nature* 453 (2008), Mai, Nr. 7193, S. 406–409
- [Pfurtscheller u. Lopes da Silva 1999] PFURTSCHELLER, G ; SILVA, F H. d.: Eventrelated EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. In: *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 110 (1999), November, Nr. 11, S. 1842–1857
- [Polleux 2005] POLLEUX, Franck: Genetic mechanisms specifying cortical connectivity: let's make some projections together. In: Neuron 46 (2005), Mai, Nr. 3, S. 395–400
- [Quian Quiroga u. a. 2002] QUIAN QUIROGA, R; KRASKOV, A; KREUZ, T; GRASS-BERGER, P: Performance of different synchronization measures in real data: a case study on electroencephalographic signals. In: *Physical review. E, Statistical,* nonlinear, and soft matter physics 65 (2002), April, Nr. 4 Pt 1, S. 041903
- [Rakic 1971] RAKIC, P: Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. In: Brain research 33 (1971), Oktober, Nr. 2, S. 471–476
- [Rakic 1988] RAKIC, P: Specification of cerebral cortical areas. In: Science 241 (1988), Juli, Nr. 4862, S. 170–176
- [Ray u. Maunsell 2011] RAY, Supratim ; MAUNSELL, John H R.: Different origins of gamma rhythm and high-gamma activity in macaque visual cortex. In: *PLoS biology* 9 (2011), April, Nr. 4, S. e1000610
- [Reichenberg u. a. 2010] REICHENBERG, Abraham ; CASPI, Avshalom ; HARRING-TON, Honalee ; HOUTS, Renate ; KEEFE, Richard S E. ; MURRAY, Robin M. ; POULTON, Richie ; MOFFITT, Terrie E.: Static and dynamic cognitive deficits

in childhood preceding adult schizophrenia: a 30-year study. In: *The American journal of psychiatry* 167 (2010), Februar, Nr. 2, S. 160–169

- [Rose u. Woolsey 1948] ROSE, J E. ; WOOLSEY, C N.: The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. In: *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 27 (1 vol.) (1948), S. 210–232
- [Roux u. a. 2012] ROUX, Frédéric ; WIBRAL, Michael ; MOHR, Harald M. ; SINGER, Wolf ; UHLHAAS, Peter J.: Gamma-band activity in human prefrontal cortex codes for the number of relevant items maintained in working memory. In: *Journal of Neuroscience* 32 (2012), September, Nr. 36, S. 12411–12420
- [Scheffer-Teixeira u. a. 2013] SCHEFFER-TEIXEIRA, Robson ; BELCHIOR, Hindiael ; LEÃO, Richardson N. ; RIBEIRO, Sidarta ; TORT, Adriano B L.: On high-frequency field oscillations (¿100 Hz) and the spectral leakage of spiking activity. In: *Journal* of Neuroscience 33 (2013), Januar, Nr. 4, S. 1535–1539
- [Schmitz u. a. 2001] SCHMITZ, D ; SCHUCHMANN, S ; FISAHN, A ; DRAGUHN, A ; BUHL, E H. ; PETRASCH-PARWEZ, E ; DERMIETZEL, R ; HEINEMANN, U ; TRAUB, R D.: Axo-axonal coupling. a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. In: *Neuron* 31 (2001), September, Nr. 5, S. 831–840
- [Schoffelen u. a. 2005] SCHOFFELEN, Jan-Mathijs; OOSTENVELD, Robert; FRIES, Pascal: Neuronal coherence as a mechanism of effective corticospinal interaction. In: Science 308 (2005), April, Nr. 5718, S. 111–113
- [Schomburg u.a. 2012] SCHOMBURG, E W. ; ANASTASSIOU, C A. ; BUZSAKI, G ; KOCH, C: The Spiking Component of Oscillatory Extracellular Potentials in the Rat Hippocampus. In: *Journal of Neuroscience* 32 (2012), August, Nr. 34, S. 11798–11811
- [Selton u. a. 2008] SELTON, D; ANDRÉ, M; DEBRUILLE, C; DEFORGE, H; FRESSON, J; BRAGA, C; HASCOËT, J-M: [EEG at 6 weeks of life in very premature neonates without major early cerebral abnormalities]. In: Archives de pédiatrie : organe officiel de la Sociéte française de pédiatrie 15 (2008), August, Nr. 8, S. 1360–1361

- [Siapas u. a. 2005] SIAPAS, Athanassios G. ; LUBENOV, Evgueniy V. ; WILSON, Matthew A.: Prefrontal Phase Locking to Hippocampal Theta Oscillations. In: Neuron 46 (2005), April, Nr. 1, S. 141–151
- [Siegel u. a. 2009] SIEGEL, Markus ; WARDEN, Melissa R. ; MILLER, Earl K.: Phasedependent neuronal coding of objects in short-term memory. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106 (2009), Dezember, Nr. 50, S. 21341–21346
- [Sigurdsson u. a. 2010] SIGURDSSON, Torfi ; STARK, Kimberly L. ; KARAYIORGOU, Maria ; GOGOS, Joseph A. ; GORDON, Joshua A.: Impaired hippocampal. In: *Nature* 464 (2010), Januar, Nr. 7289, S. 763–767
- [Singer 1993] SINGER, W: Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. In: Annual review of physiology 55 (1993), S. 349–374
- [Sirota u. a. 2008] SIROTA, Anton ; MONTGOMERY, Sean ; FUJISAWA, Shigeyoshi ; ISOMURA, Yoshikazu ; ZUGARO, Michael ; BUZSÁKI, György: Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm. In: Neuron 60 (2008), November, Nr. 4, S. 683–697
- [Sohal u. a. 2009] SOHAL, Vikaas S.; ZHANG, Feng; YIZHAR, Ofer; DEISSEROTH, Karl: Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. In: *Nature* 459 (2009), Juni, Nr. 7247, S. 698–702
- [Spitzer 2006] SPITZER, Nicholas C.: Electrical activity in early neuronal development. In: Nature 444 (2006), Dezember, Nr. 7120, S. 707–712
- [Steriade u. a. 1991] STERIADE, M ; DOSSI, R C. ; NUÑEZ, A: Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society* for Neuroscience 11 (1991), Oktober, Nr. 10, S. 3200–3217
- [Steriade u. Llinás 1988] STERIADE, M ; LLINÁS, R R.: The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. In: *Physiological reviews* 68 (1988), Juli, Nr. 3, S. 649–742

- [Tissir u. Goffinet 2003] TISSIR, Fadel ; GOFFINET, André M: Reelin and brain development. In: Nature Reviews Neuroscience 4 (2003), Juni, Nr. 6, S. 496–505
- [Tort u. a. 2010] TORT, A B L. ; KOMOROWSKI, R ; EICHENBAUM, H ; KOPELL, N: Measuring Phase-Amplitude Coupling Between Neuronal Oscillations of Different Frequencies. In: *Journal of Neurophysiology* 104 (2010), August, Nr. 2, S. 1195– 1210
- [Tort u. a. 2013] TORT, Adriano B L. ; SCHEFFER-TEIXEIRA, Robson ; SOUZA, Bryan C. ; DRAGUHN, Andreas ; BRANKAČK, Jurij: Theta-associated high-frequency oscillations (110–160Hz) in the hippocampus and neocortex. In: *Progress in Neurobiology* 100 (2013), Januar, S. 1–14
- [Traub u. a. 2003] TRAUB, R D R.; CUNNINGHAM, M O M.; GLOVELI, T T.; LEBEAU, F E N F.; BIBBIG, A A.; BUHL, E H E.; WHITTINGTON, M A M.: GABA-enhanced collective behavior in neuronal axons underlies persistent gamma-frequency oscillations. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (2003), September, Nr. 19, S. 11047–11052
- [Traub u. a. 2002] TRAUB, Roger D R. ; DRAGUHN, Andreas A. ; WHITTINGTON, Miles A M. ; BALDEWEG, Torsten T. ; BIBBIG, Andrea A. ; BUHL, Eberhard H E. ; SCHMITZ, Dietmar D.: Axonal gap junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. In: *Reviews in the Neurosciences* 13 (2002), Dezember, Nr. 1, S. 1–30
- [Uhlhaas u. a. 2010] UHLHAAS, Peter J.; ROUX, Frédéric ; RODRIGUEZ, Eugenio ; ROTARSKA-JAGIELA, Anna ; SINGER, Wolf: Neural synchrony and the development of cortical networks. In: *Trends in Cognitive Sciences* 14 (2010), Februar, Nr. 2, S. 72–80
- [Uhlhaas u. Singer 2007] UHLHAAS, Peter J.; SINGER, Wolf: What do disturbances in neural synchrony tell us about autism? In: *Biological psychiatry* 62 (2007), August, Nr. 3, S. 190–191
- [Uhlhaas u. Singer 2010] UHLHAAS, Peter J.; SINGER, Wolf: Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. In: *Nature Reviews Neuroscience* 11 (2010), Februar, Nr. 2, S. 100–113

- [Uylings u. Van Eden 1990] UYLINGS, HBM ; VAN EDEN, C G.: Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. In: *Progress in brain research* 85 (1990), S. 31–62
- [Van Eden u. Uylings 1985] VAN EDEN, C G.; UYLINGS, H B M.: Cytoarchitectonic Development of the Prefrontal Cortex in the Rat. In: *The Journal of Comparative Neurology* (1985), September, Nr. 241, S. 253–267
- [Varela u. a. 2001] VARELA, F ; LACHAUX, J P. ; RODRIGUEZ, E ; MARTINERIE, J: THE BRAINWEB: PHASE SYNCHRONIZATION AND LARGE-SCALE INTE-GRATION. In: Nature Reviews Neuroscience 2 (2001), März, Nr. 4, S. 229–239
- [Vertes 2006] VERTES, Robert P.: Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. In: *Neuroscience* 142 (2006), September, Nr. 1, S. 1–20
- [de Villers-Sidani u. a. 2007] VILLERS-SIDANI, Etienne de ; CHANG, Edward F. ; BAO, Shaowen ; MERZENICH, Michael M.: Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. In: *Journal of Neuroscience* 27 (2007), Januar, Nr. 1, S. 180–189
- [Wang 2010] WANG, Xiao-Jing: Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. In: *Physiological reviews* 90 (2010), Juli, Nr. 3, S. 1195–1268
- [Womelsdorf u. a. 2007] WOMELSDORF, T ; SCHOFFELEN, J M. ; OOSTENVELD, R ; SINGER, W ; DESIMONE, R ; ENGEL, A K. ; FRIES, P: Modulation of Neuronal Interactions Through Neuronal Synchronization. In: *Science* 316 (2007), Juni, Nr. 5831, S. 1609–1612
- [Yang u.a. 2009] YANG, J W. ; HANGANU-OPATZ, I L. ; SUN, J J. ; LUHMANN, H J.: Three Patterns of Oscillatory Activity Differentially Synchronize Developing Neocortical Networks In Vivo. In: *Journal of Neuroscience* 29 (2009), Juli, Nr. 28, S. 9011–9025
- [Yang u. a. 2012] YANG, Jian-Ming ; ZHANG, Jing ; YU, Yan-Qin ; DUAN, Shumin ; LI, Xiao-Ming: Postnatal Development of 2 Microcircuits Involving Fast-Spiking Interneurons in the Mouse Prefrontal Cortex. In: Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991) (2012), Oktober

[Yuste u. a. 1992] YUSTE, R ; PEINADO, A ; KATZ, L C.: Neuronal domains in developing neocortex. In: Science 257 (1992), Juli, Nr. 5070, S. 665–669

Anhang

Abstract

Oscillations facilitate a fast and flexible communication between distant neuronal networks. In this way they provide a basis for cognitive functions. In the neocortex oscillations in different frequency bands occur already during early development. This early activity patterns play a role for the formation and connectivity of developing networks regarding their future functional requirements. The temporal and spatial organisation of early activity patterns in relation to the age-dependent refinement of networks is largely unknown.

Aim of this study was the investigation of neuronal processing and communication within local networks of the prefrontal cortex (PFC) during early development. Network activity was measured *in vivo* with extracellular electrodes in different cortical layers of the PFC of neonatal, pre-juvenile and juvenile rats. Earlier investigations have shown that the prefrontal network activity during development progressively switches from a discontinuous rhythm, consisting of two distinct activity patterns – spindle bursts (SB) and nested gamma spindle bursts (NG) – to a continuous rhythm. Part of this work was the development of a method to automatically detect and classify this activity patterns. This method allows their subsequent investigation concerning their frequency components, synchronisation patterns and their influence on neuronal firing.

Frequency analyses show that the base rhythm of all prefrontal oscillations lies within the *theta/alpha*-band (4-12 Hz). During NG this rhythm alternates with a faster rhythm in the *beta/low gamma*-frequency band (16-40 Hz). Additionally, NG are accompanied by high frequency oscillations (HFO) between 100 and 400 Hz. This HFO appear superimposed on the NG rhythm. In the neonatal age the oscillatory power shows differences between the upper and lower layers of the PFC. This difference is most prominent for the HFO and dimishes with age. Similar dependence of age and cortical depth was found for the synchrony within single frequency bands that was investigated using a coherence analysis. While *theta/alpha*-oscillations show a strong intralaminar coherence, the *beta/low gamma*-activity is synchronized in a

column-like manner. This synchrony patterns diminish with age. Mainly during early staged of development the amplitude of HFO is strongly modulated by the phase of the base rhythm. Spiking of prefrontal neurons is in turn highly coupled to the phase of the HFO.

Network activity in the developing PFC shows a complex spatio-temporal structure that changes during maturation. Each developmental stage is characterized by distinct activity and synchronisation patterns that are strongly related to the anatomical maturation of the PFC and could have an influence on the formation of connectivity within the PFC.

Danksagung

Meiner Betreuerin während der Doktorarbeit, Prof. Dr. Ileana Hanganu-Opatz, die mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation durchzuführen, jederzeit offen für Fragen und Diskussionen war, mich immer mit hilfreichen Ratschlägen unterstützte und stets Sorge dafür trug, durch einen gesicherten Output meiner Arbeit mein wissenschaftliches Fortkommen zu gewährleisten.

Prof. Dr. Sonja Grün für die Möglichkeit, ihre Gruppe und deren Arbeitsweise kennenzulernen, und für viele fachliche Diskussionen, die mir neue Denkweisen und Interpretationsmöglichkeiten aufzeigten. Ich habe dabei nicht nur fachlich sehr viel gelernt. Außerdem möchte ich mich für die Unterstützung und persönliche Betreuung bedanken, die mich ermutigt hat, dieses Projekt zu beenden.

Dr. Michael Denker für seinen großen Beitrag zu der Datenanalyse, die Kernstück dieser Arbeit ist, für seine Geduld, die intensive Betreuung, die Bereitschaft, sich detailliert mit meinen Daten auseinanderzusetzen, und dafür, dass ich nie ein fachliches Problem ungelöst lassen musste.

Meinem Dissertationsgutachter Prof. Dr. Matthias Kneussel, der sich die Zeit genommen hat, meine Arbeit zu begutachten. Vielen Dank für die Unterstützung.

Dr. Guido Nolte für hilfreiche Diskussionen, Ideen und Ratschläge bezüglich der Datenanalyse.

Achim Dahlmann und Annette Marquardt für die Unterstützung bei den histologischen Arbeiten.

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hamburg für die Unterstützung bei der finalen Umsetzung.

Allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe, die immer bereit waren zu helfen, zuzuhören und zu verstehen.

Und natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die immer da waren, um mich zu unterstützen, zu motivieren und abzulenken.

Dieses Projekt wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und das Emmy-Noether-Programm der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert.

Publikationen

COUPLED OSCILLATIONS MEDIATE DIRECTED INTERACTIONS BETWEEN PRE-FRONTAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF THE NEONATAL RAT. Brockmann M.D., Pöschel B., Cichon N., Hanganu-Opatz I.L. *Neuron, 2011 Jul 28;71(2):201-2*

LAYER-SPECIFIC MATURATIN OF ACTIVITY PATTERNS IN THE PREFRONTAL CORTEX OF NEONATAL AND JUVENILE RATS. Cichon N., Denker M., Grün S., Hanganu-Opatz I.L. *Front. Neural Circuits (Submitted)*

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzen Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Nicole Cichon